

Aus der Neurologischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Platten)

Auswirkungen epileptischer Anfälle auf Zellexpressionsmarker und Plasmaproteom,
sowie dessen Assoziation zu postiktaler Blut-Hirn-Schrankenstörung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Maximilian Woog

aus
Heidelberg
2024

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Michael Platten

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 <i>Wissenschaftlicher Hintergrund.....</i>	9
1.1.1 Ätiologie	9
1.1.2 Klassifikation epileptischer Anfälle	10
1.1.3 Klassifikation der Epilepsien	11
1.1.4 Prodromi und Auren eines epileptischen Anfalls.....	11
1.1.5 Regulation der Immunantwort durch zelluläre Interaktionen.....	13
1.2 <i>Rolle des Immunsystems bei der Iktogenese</i>	14
1.3 <i>Postiktale Zerstörung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität.....</i>	17
1.3.1 Veränderung in den Tight Junctions der Endothelzellen	17
1.3.2 Schädigung der Endothelzellen und Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten.....	18
1.3.3 Periphere Immunzellen.....	20
1.3.4 TNF-alpha	21
1.3.5 IL-6	22
1.4 <i>Veränderungen der postiktalen Plasmaproteinexpression</i>	23
2. Material und Methoden.....	25
2.1 <i>Patientenkollektiv</i>	25
2.2 <i>Studienablauf.....</i>	26
2.3 <i>FACS.....</i>	28
2.4 <i>Proteomik</i>	30
3. Ergebnisse	32
3.1 <i>Patientenkollektiv</i>	32
3.2 <i>Ergebnisse FACS.....</i>	34
3.2.1 Übersicht.....	34
3.2.2 T-Zellpopulationen.....	35
T-Gedächtniszellen (central memory T cells)	35
Nicht aktivierte T-Zellen (naive Tcells)	39
TIGIT T-Zellen	40
Regulatorische T-Zellen	41
3.2.3 Erschöpfte T-Zellen (exhausted T cells)	42
Tim3+ T-Zellen.....	42
Lag3+ T-Zellen	44
3.2.4 Immunregulation und Aktivierung.....	45
CTLA-4 + T-Zellen.....	45
T-Helferzellen.....	47
3.2.5 Myeloide Zellen	48
Monozyten	48
Neutrophile Granulozyten	51
MDSC (myeloid derived suppressor cells).....	52
Dendritische Zellen	53
3.2.6 Zusammenfassung der Immunologischen Veränderungen in T- und Myeloid-Zellpopulationen.....	54
3.2.7 Stimulierte Panels	55
CD4+ T-Zellen	55
Chemo und Zytokine	56
Zellproliferations- und Apoptosemarker.....	66
3.2.8 Abhängigkeit der erhobenen Daten von äußeren Einflussfaktoren	71
3.2.9 Hauptkomponentenanalyse	72
3.2.10 Volcano-Plot.....	73
3.2.11 Heat-Map	74

3.3 Ergebnisse Proteomik	75
4. Diskussion	77
4.1 T-Zell-Dysregulation und Erschöpfung	78
4.1.1 Erschöpfung durch chronische Aktivierung	78
4.1.2 Erhöhte Anteile von CD28- T-Zellen	79
4.1.3 Erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen (Tregs)	79
4.1.4 Unklare Ursachen der Erschöpfung	79
4.1.5 Schlussfolgerung	80
4.2 Aktivierung und Erschöpfung durch proinflammatorische Zytokine	81
4.2.1 Erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine	81
4.2.2 Chronische Entzündung und T-Zell-Erschöpfung	81
4.2.3 Kompensation durch IL-10	82
4.2.3 Fehlende Evidenz für spezifische Trigger	82
4.2.4 Schlussfolgerung	82
4.3 Verstärkte Aktivierung der Myeloiden Zellen	83
4.3.1 Erhöhte Anteile von Monozyten und Neutrophilen	83
4.3.2 Hemmung der adaptiven Immunantwort durch MDSCs	83
4.3.3 Fehlende direkte Verbindung zu epileptischen Anfällen	84
4.3.4 Schlussfolgerung	84
4.4 Gegenregulationsmechanismen des Immunsystems	85
4.4.1 Regulatorische und naive T-Zellen und BHS-Schädigung	85
4.4.2 Tim3+ Zellen und der neuronale Schaden	85
4.4.3 Lag3+ T-Zellen und Gegenregulation	85
4.4.4 Th2-Zellen und glialer Zellschutz	86
4.4.5 Rolle der Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) bei der immunologischen Gegenregulation	86
4.4.6 Granzym B und T-Zell-Suppression	87
4.4.7 Schlussfolgerung	87
4.5 Verminderte immunregulatorische Aktivität durch TIGIT und CTLA-4	88
4.5.1 Verminderte Expression von TIGIT und CTLA-4	88
4.5.2 Fehlende Kontrolle der Entzündungsreaktion	88
4.5.3 Verschiebung der Monozytären Subpopulationen	88
4.5.4 Rolle der regulatorischen T-Zellen (Tregs) und Zytokine	89
4.5.5 Erhöhte Anteile an CD28-negativen T-Zellen	89
4.5.6 Schlussfolgerung	90
4.6 BHS-Störung und postiktale Zustände	91
4.6.1 Monozyten und Chemokin-Ligand-2 (CCL-2)	91
4.6.2 IL-17 und TNF- α	91
4.6.3 Dendritische Zellen und neuroinflammatorische Kaskade	92
4.6.4 Neutrophile und IL-8-Signalwege	92
4.6.5 IFN- γ und CXCL10	92
4.6.6 Schlussfolgerung	93
5. Zusammenfassung und Ausblick	94
5.1 T-Zell-Dysregulation und Erschöpfung	94
5.2 Regulatorische Mechanismen	95
5.3 Ausblick	95
6. Anhang	97
6.1 Patientenaufklärung	97

6.2 Protokolle Probenverarbeitung.....	108
6.2.1 Isolation von PBMCs aus 3 HepBlut Röhrchen - ca.18ml Blut.....	108
6.2.2 Präparation von Plasma aus 2ml EDTA Blut	111
6.2.3. Präparation von Serum	113
6.3 Antikörperliste FACS	114
6.4 Worksheets FACS-Analysen	115
6.4.1 Worksheet FACS staining PBMCs Niklas Grassl Tcell1 Panel.....	115
6.4.2 Worksheet FACS staining PBMC Niklas Grassl_ Tcell2-Panel.....	118
6.4.3 Worksheet FACS staining PBMC Niklas Grassl_ Tcell3-Panel.....	122
6.4.4 Worksheet FACS staining PBMCs Niklas Grassl T-cell4 Panel	125
6.4.5 Worksheet FACS staining PBMC Niklas Grassl_ Tcell5-Panel.....	128
6.4.6 Worksheet FACS staining PBMC Niklas Grassl_ Tcell6-Panel.....	132
6.4.7 Worksheet FACS staining PBMCs Niklas Grassl MDSC Panel	136
6.4.8 Worksheet FACS staining PBMCs Niklas Grassl TBNKDC Panel.....	140
6.5 Gating FACS-Analyse.....	143
6.5.7 Gating in Panel „MDSC2“	143
6.5.8 Gating in Panel „TBNK“	144
6.5.1 Gating in Panel „Tcell1“	145
6.5.2 Gating in Panel „Tcell2“	146
6.5.3 Gating in Panel „Tcell3“	148
6.5.4 Gating in Panel „Tcell4“	151
6.5.5 Gating in Panel „Tcell5- unstimuliert“	152
6.5.6 Gating in Panel „Tcell5- stimuliert“	154
6.5.7 Gating in Panel „Tcell6-unstimuliert“	156
6.5.8 Gating in Panel „Tcell6-stimuliert“	158
6.6 Proteomik Protokoll (EDTA – Plasma).....	160
6.7 Protokoll Proteomikanalyse.....	162
7. Quellenverzeichnis.....	163
7.1 Paper.....	163
7.2 Websiten.....	175
7.3 Bücherquellen	175
8. Lebenslauf	176
9. Danksagung	177

Hinweis zur geschlechterspezifischen Sprache:

In dieser Promotionsarbeit wird zugunsten der Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Diese sprachliche Vereinfachung dient ausschließlich der besseren Verständlichkeit und impliziert keinerlei Benachteiligung oder Ausschluss anderer Geschlechter. Alle personenbezogenen Bezeichnungen beziehen sich damit ausdrücklich auf Personen jeder Geschlechteridentität. Ich danke den Leser*innen für ihr Verständnis.

1. Einleitung

Der Begriff epileptische Anfälle beschreibt einen Vorgang des Gehirns, bei welchem es zu einer unkoordinierten Entladung der Neurone kommt und sich in unterschiedlichen Symptomen äußert. Die Epilepsie zählt auch noch heute zu einer der komplexesten Erkrankungen der Medizin, allein in Deutschland leiden etwa 400.000 Menschen an dieser neurologischen Krankheit¹, weltweit betrifft es etwa 0,8-1% der Bevölkerung^{2,3}. Die Inzidenz der Erkrankung zeigt sich in einem charakteristischen zweigipfligen Verlauf mit einem Peak im ersten Lebensjahr. Die Ursache der dort ausgeprägten Epilepsien ist meist genetisch. Und einem weiteren Peak um das 71. Lebensjahr herum, hier dominiert besonders die strukturelle Epilepsie aufgrund fokaler neuronaler Schäden.⁴

Die Lebenszeitprävalenz für einen epileptischen Anfall beträgt bei der Gesamtbevölkerung und somit auch bei Menschen ohne Epilepsie ca. 10%.⁵

Etwa ein Drittel aller Epilepsiepatienten leiden an einer therapieresistenten Epilepsie, welche durch rezidivierende Anfälle zu einer deutlichen Einschränkung in der Selbstständigkeit des alltäglichen Lebens und somit auch der Lebensqualität führt.⁶ Trotz immer weiter voranschreitender medizinischer Forschung sind die genauen Mechanismen der Iktogenese bisher nur zu geringem Anteil aufgedeckt und verstanden, aufgrund dessen wird die weitere Forschung an Ursachen sowie auch neuen Therapiemöglichkeiten definitiv Teil zukünftiger wissenschaftlich-medizinischer Arbeiten sein.

Das Krankheitsbild und damit die Diagnose der Epilepsie muss generell von einem epileptischen Anfall abgegrenzt werden. Ein epileptischer Anfall ist definiert durch das transiente Auftreten bestimmter Symptome oder hinweisender Zeichen basierend auf abnormaler überschießender oder synchroner Entladung der Neurone im Gehirn.⁷ Diese Art von Anfällen können einerseits im Rahmen der epileptischen Erkrankung selbst, aber auch andererseits durch sogenannte Provokationsfaktoren als Gelegenheitsanfälle entstehen und somit zu einem Symptom eines Krankheitsbildes anderer Ätiologie werden. Auslöser hierfür können beispielsweise Infektionen des Gehirns aber auch Substanzmissbrauch und deren Entzug sein. In solchen Fällen ist eine sorgfältige Anamnese zur korrekten Diagnosestellung und für die weitere Therapie essentiell.

Der Anfall selbst beginnt mit einer präiktalen Phase, welche von Minuten bis hin zu Tagen andauern kann. Manche Patienten berichten in dieser Phase auch von gewissen Prodromi oder Auren (siehe Absatz Prodromi und Auren). An sie schließt sich mit der iktalen Phase dann der eigentliche Anfall egal ob generalisiert oder fokal. Diese dauert normalerweise etwa 2 Minuten. Als letztes befinden sich die Patienten in der postiktalen Phase, die mehrere Stunden andauern kann und durch psychomotorische Verlangsamung, Sprach- und Gedächtnisstörungen oder Stimmungsveränderungen der Betroffenen charakterisiert ist. Nach diesen drei abgelaufenen Phasen wird der Zustand des Patienten bis zum nächsten Anfall als interiktal bezeichnet.^{8 9}

¹ Hamer et al., 2006

² Fisher et al., 2014

³ Forsgren et al. 2005

⁴ Forsgren et al. 2005

⁵ Elger 2012, S.1- 23

⁶ Thijs et al. 2019

⁷ Fisher et al. 2014

⁸ Elger 2012, S.1- 23

⁹ Elger, Berkenfelder, 2017

Die Diagnose Epilepsie hingegen bezieht sich auf eine anhaltende Prädisposition des Gehirns epileptische Anfälle auszulösen und beinhaltet hier auch die neurobiologischen, psychosozialen und kognitiven Beeinträchtigungen, welche sich hieraus ergeben. An dieser Stelle ist zu betonen, dass es sich nicht um eine einzige Erkrankung handelt, sondern vielmehr um breitgefächertes Spektrum an verschiedensten Krankheitsbildern, bei welchen es zur Ausprägung epileptischer Anfälle kommt. Die „International league against epilepsy“ (ILAE) veröffentlichte 2014 eine überarbeitete Version der praktisch-klinischen Definitionskriterien der Epilepsie. Laut diesen ist die Diagnose der Epilepsie zu stellen, wenn mindestens 2 unprovokierte epileptische Anfälle hintereinander mit einem Abstand von mehr als 24 Stunden auftreten. Allerdings kann auch ein einmaliger Anfall, welcher eine Wiederauftretenswahrscheinlichkeit von mehr als 60% in den nächsten 10 Jahren besitzt, zu der Diagnose Epilepsie führen. Auch die Diagnose eines Epilepsiesyndroms (siehe Klassifikation der Epilepsen) zählt zu den Diagnosekriterien der Erkrankung.¹⁰

Aufgrund ihrer Häufigkeit und Schwere ist es essenziell die genaueren Ursachen der Epilepsie weiter zu erforschen, um gegebenenfalls besser angepasste Therapieoptionen zu entwickeln und somit den Leidensdruck der Erkrankung zu reduzieren. Durch immer weiter voranschreitende medizinische Forschung in den letzten 30 Jahren wurden immer mehr Aspekte der Ätiologie beleuchtet, hierdurch rückte auch die Rolle des Immunsystems immer weiter ins Rampenlicht. Um ein genaueres Verständnis der Prozesse postiktal zu erlangen, wurde in dieser Studie eine Analyse der immunologischen Vorgänge mittels FACS und Proteomik an Patienten mit epileptischen Anfällen vorgenommen.

¹⁰ Fisher et al. 2014

1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

1.1.1 Ätiologie

Das Feld der Entstehungsmechanismen ist breit gefächert, weshalb aus pragmatischen Gründen die Einteilung in strukturelle/metabolische, genetische und kryptogene Ätiologie vorgenommen wird.¹¹

Von strukturellen oder metabolischen (früher symptomatischen) Epilepsie spricht man, wenn sich eine erworbene oder genetische Ursache für das Vorhandensein einer neuroanatomischen oder neuropathologischen Transformation identifizieren lässt. Hierzu zählen beispielsweise angeborene oder auch erworbene Hirnfehlbildungen sowie Entzündungs- und Traumafolgen des zentralen Nervensystems. Aber auch Patienten mit arteriovasculären Malformationen und Hirntumoren, die an rezidivierenden epileptischen Anfällen leiden werden hierzu gezählt.

Die früher als idiopathisch deklarierte Epilepsie findet in der neuen Einteilung als genetische Epilepsie ihren Platz, hierunter zählen Anfallsleiden bei welchen genetischen oder mutmaßlich genetischen Ursachen ohne den Nachweis struktureller Veränderungen vermutet werden. Am Beispiel des Dravet-Syndroms (oder Severe myoclonic epilepsy of infancy; SMEI) lässt sich dies gut beschreiben. Durch eine de novo Mutation im SCN1A-Gen, welches für die Codierung der alpha-Untereinheit eines elektrisch gesteuerten Kalziumkanals zuständig ist, kommt es vor allem in den ersten Lebensjahren zu fiebrig, fokal und meist unilatralen motorischen Krampfanfällen, welche später auch sekundär generalisieren können und so einen Grand-mal-Anfall auslösen können.¹² erfreulicherweise sind genetisch bedingte Epilepsien meist gut medikamentös therapierbar. Sie werden in der Regel nicht monogen vererbt, weshalb es auch zu einem Generationssprung der Erkrankung kommen kann.¹³

Die Diagnose der kryptogenen Epilepsie ergibt sich nach Ausschluss der beiden oben genannten Ätiologien, hierbei bleibt für das Auftreten der epileptischen Anfälle, welche die Kriterien der Epilepsie erfüllen der exakte Entstehungsmechanismus unklar.

¹¹ Elger, Berkenfelder, 2017

¹² Anwar, Saleem, Patel, Arumaithurai, Malik, 2019

¹³Faltblatt Epilepsie und Genetik, Bundesverband für Epilepsie, 2019

1.1.2 Klassifikation epileptischer Anfälle

Es ist essenziell die Klassifikation der epileptischen Anfälle von der Klassifikation der Epilepsie als Erkrankung abzugrenzen. Bei der Unterscheidung der Anfälle ist der Entstehungsort Grundlage für die einzelnen Einteilungen. Somit ergeben sich, in Abhängigkeit der Lokalisation des ursächlichen neuronalen Netzwerks drei verschiedene Kategorien: generalisiert, fokal und unbekannt.¹⁴

Fokale Anfallsformen bleiben in ihrem Ursprung des neuronalen Netzwerkes auf einer Hemisphäre des Gehirns zwar konstant, können sich aber in ihrer interhemisphärischen Ausdehnung unterscheiden.

Eine weitere, genauere Differenzierung der fokalen Anfälle ist aufgrund der Bewusstseinslage möglich, denn ein ictaler Status mit erhaltenem Bewusstsein wird einfach fokaler Anfall genannt, wohingegen ein Anfall mit zusätzlicher Bewusstlosigkeit als komplex fokaler Anfall bezeichnet wird.¹⁵ Nicht jeder Anfall muss zwangsläufig eine motorische Komponente enthalten und somit als sichtbares Zucken wahrnehmbar sein, denn auch die Veränderung sensorischer Qualitäten oder der Emotionen können sogenannte nicht-motorische fokale Anfälle sein.¹⁶

Da in der gängigen Klassifikation der ILAE das ursächliche neuronale Netzwerk und dessen Lokalisation der Unterscheidung zwischen fokal und generalisiert zu Grunde liegt sind auch Anfälle, welche sich erst im Verlauf auf die andere Hemisphäre ausbreiten, die sogenannten sekundär generalisierten Anfälle, zu den fokalen Anfällen zu zählen. Es können zu Beginn fokale Symptomatiken wie Schmatzen oder Armzucken auftreten, welche sich dann auf den gesamten Körper ausbreiten und einen Grand-mal-Anfall auslösen.

Nach aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen finden generalisierte Anfälle ihren Ursprung in einem Neuronennetzwerk, welches sich über beide Hemisphären erstreckt oder diese zumindest chemoelektrisch miteinander verbindet. Dabei können auch subkortikale Strukturen betroffen sein, allerdings muss nicht zwangsläufig der komplette Kortex an einem epileptischen Anfall beteiligt sein. Der wohl eindrücklichste Unterschied ergibt daraus, dass der Ursprung bei dieser Art der Anfälle von Anfall zu Anfall variabel ist und eine asymmetrische Ausprägung möglich ist¹⁷. Der Sonderfall des Absenceanfalls, ist immer als generalisiert zu werten.^{18 19} Zur Operationalisierung der Diagnostik im klinischen Alltag in Bezug auf die Semiologie der Anfälle, wurden erweiternde Klassifikationen erstellt wie beispielsweise die von Lüders et al.²⁰

¹⁴ Fisher et al., 2017B

¹⁵ Fisher et al., 2017A

¹⁶ Fisher et al., 2017A

¹⁷ Berg et al., 2010

¹⁸ Fisher, van Emde Boas, Blume, Elger, Genton, Lee, Engel, 2005

¹⁹ Fisher et al., 2017A

²⁰ Lüders et al., 1998

1.1.3 Klassifikation der Epilepsien

Mit zunehmenden Erkenntnissen aus den vergangenen Jahrzehnten medizinischer Forschung wandelte sich auch die Unterteilung der Erkrankung immer weiter.^{21 22} Ein 2017 von der Internationalen League Against Epilepsy (ILAE) veröffentlichtes Stufenkonzept führt über die Identifikation der verschiedenen obengenannten Anfallstypen zur Definition der Epilepsieform. Hieraus ergibt sich die Aufteilung in vier mögliche Formen: generalisierte Epilepsie, fokale Epilepsie, kombiniert fokal-generalisierte Epilepsie und unklare Epilepsie.²³

Im Anschluss kann eine weitere Stufe durch das Vorliegen eines Epilepsiesyndroms erreicht werden, hierbei handelt es sich um eine Diagnose, welche nach Zusammenschau aller klinisch verfügbaren Informationen gestellt werden darf. Hierzu zählen unter anderem das Erkrankungsalter, die Anfallsform, das EEG und auch strukturellen und funktionellen bildgebende Verfahren wie das SPECT oder PET. Nicht selten liegen hier spezifisch identifizierbare Anfallstrigger vor.²⁴

1.1.4 Prodromi und Auren eines epileptischen Anfalls

Es besteht die Möglichkeit, dass sich epileptische Anfälle im Rahmen von Prodromi oder Auren vorankündigen. Als Prodromi bezeichnet man in einem Zeitraum von Stunden bis Tage von einer außenstehenden Person wahrgenommene Änderungen in der Stimmung oder eine vermehrte Reizbarkeit der Patienten. Es besteht die Möglichkeit einer Zunahme der Intensität der Symptome zum epileptischen Anfall hin, welche dann aber in der Phase nach einem abgelaufenen Anfall wieder völlig verschwinden. Als Aura bezeichnet man die subjektiven Wahrnehmungen der Patienten auf Ebene der verschiedenen Sinnesmodalitäten. Sie treten unmittelbar vor Anfallsbeginn auf und sind somit aller erstes Zeichen eines fokalen epileptischen Anfalls, denn generalisierte Anfälle gehen nicht mit Auren einher. Allerdings kann auch nur die Aura, ohne folgenden epileptischen Anfall auftreten. Diese wird dann den einfachen fokalen Anfällen gemäß der internationalen Klassifikation zugeordnet. Besteht die Möglichkeit während einer auftretenden Aura ein EEG abzuleiten, lassen sich in den meisten Fällen lokale Funktionsstörungen identifizieren. Sie beginnt dann entweder auf Ebene der Wahrnehmung auf autonom-vegetativer Ebene, einer Sinneswahrnehmung oder eine Veränderung in der Psyche. In aller Regel ist die Form und der Beginn einer Aura vor jedem Anfall idem. Eine Varianz besteht lediglich in der Dauer der Aura und dem Hinzutreten anderer Sinneseindrücke oder psychischer Veränderungen. Eine somatosensible Aura bspw. äußert sich, als kribbeln an einer bestimmten Stelle einer Extremität oder im Gesicht, es ist Ausdruck einer übermäßig gestörten Entladung der kontralateralen Hemisphäre. Des Weiteren können auch visuelle Auren auftreten, bei welchen der Patient helle und dunkle Punkte wahrnimmt, die auch blinken und zunehmend zur Mitte wandern können. Bei einer Wahrnehmung von komplexen Mustern oder Formen findet sich häufig auch eine Beteiligung des Temporallappens. Die häufigste Form der Aura ist die sogenannte epigastrische Aura. Dort kommt es zu einem aufsteigenden merkwürdigen Gefühl in der Bauchregion, das sich auf Hals und Kopf ausbreiten kann. Vermutet wird für diese Form der Aura eine übermäßige Entladung in der Insula. Die weiteren Formen der Aura, wie auditive, olfaktorische oder gustatorische gehen jeweils mit unterschiedlichen unangenehmen entsprechenden Sinneswahrnehmungen einher

²¹ Scheffler et al., 2017

²² Berg et al., 2010

²³ Scheffler et al., 2017

²⁴ Nachtrag et al., 1998

1. Einleitung

und sind vergleichsweise selten. Die epigastrischen, olfaktorischen und gustatorischen Auren gehen in der Regel mit einem Déjà-vu Erlebniss einher und versetzen den Patienten in einen sogenannten Dreamy state. Bei allen Formen der Aura ist es möglich, dass Patienten ein beklemmendes Gefühl erlangen, Angst wahrnehmen und die Auren somit als belastende Symptomatik empfinden.

1.1.5 Regulation der Immunantwort durch zelluläre Interaktionen

Jede Form der Immunantwort, egal ob zellulär oder humoral besitzt das Ziel der Beseitigung des pathogenen Antigens bzw. des pathogenen Erregers. Die Zellen des adaptiven Immunsystems werden hierfür durch eine komplexe Interaktionskaskade aktiviert und durchlaufen eine Proliferations- und Differenzierungsphase bis sie dann ihre Effektorfunktion ausüben. Hierbei muss die Effektorfunktion nicht direkt auf die pathogene Zelle via Antikörperproduktion wirken, sondern kann bspw. im Rahmen einer Steuerung der Aktivierung und Differenzierung anderer Zellreihen zur Immunantwort beitragen. Ein Beispiel hierfür ist die Regulation der Aktivierung und Differenzierung der zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen durch die CD4-positiven T-Zellen. Diese CD4 Zellen können anhand ihrer Sekretierten Zytokine in Th1 und in Th2 Zellen unterteilt werden. Th1 Zellen sezernieren unter anderem IL-2, IFN-gamma, IL-3 und TNF alpha und spielen eine wichtige Rolle bei der Beseitigung intrazellulärer Erreger und initiieren die Differenzierung zytotoxischer T-Zellen. Th2 Zellen sezernieren unter anderem IL-3, -4, -6, -10, -13 und sind wiederum wichtig für den Klassenwechsel der B-Zellen und die Regulation der humoralen Immunantwort. Sie unterstützen die Produktion spezifischer Antikörper, was zu einer höheren Konzentration der wichtigen Antikörper führt. Auch durch Ihre Produktion von IL-4 und IL-10 ist es den Th2 Zellen möglich die Differenzierung und proinflammatorische Wirkung der Th1 Zellen zu regulieren. Auch dendritische Zellen spielen in diesem Netzwerk eine Rolle, denn sie produzieren IL-12 und induzieren eine Th1 Zellantwort, welche dann in der Produktion von IFN-gamma und einer Th2 Antwort mündet. Werden die plasmazytoiden dendritischen Zellen aktiviert kommt es durch die vermehrte IFN-alpha Bildung zu einer Th2 Zellantwort, welche dann in einer verstärkten Antikörperproduktion und IL-4 Liberation gipfelt. Weitere wichtige Zellen in der Regulation der Immunantwort sind die CD4-positiven und CD8-positiven regulatorischen T-Zellen, sie exprimieren dauerhaft CD25 und produzieren IL-10 und unterdrücken so B- und T-Zellantworten. Diese Zellart ist essenziell für die Aufrechterhaltung der immunologischen Tolleranz und auch für die Dauer und Stärke eine Immunantwort gegenüber einem bestimmten Erreger. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für eine adäquate spezifische Immunantwort die B-Zelle das Antigen über ihren Rezeptor erkennen und aufnehmen muss, um in anschließend zu prozessieren und zu präsentieren. Im Anschluss bindet eine T-Zelle an das präsentierte Antigen und über den CD40-CD40-Liganden kommt es dann zur Induktion des Ig-Klassenwechsels der B-Zelle und zur Produktion der hochaffinen Antikörper gegen das identifizierte Antigen.^{25,26}

²⁵ Jameson, J. Larry, et al. Harrisons Innere Medizin S.3059-3062

²⁶ Bröker B, Schütt C, Fleischer B (2019) Grundwissen Immunologie S.27-45

1.2 Rolle des Immunsystems bei der Iktogenese

Verschiedenste Arbeiten intensiver neurologischer Forschungen konnten in der vergangenen Dekade die Rolle des angeborenen Immunsystems und der Zytokine an der Entstehung epileptischer Anfälle herausarbeiten.²⁷

Seit längerer Zeit wird eine Assoziation zwischen inflammatorischen Prozessen im Gehirn und der Entstehung des Krankheitsbildes der Epilepsie hergestellt. Hierbei fokussierte man sich vornehmlich auf die Korrelation zwischen dem inflammatorischen Status von Patienten mit Multipler Sklerose und dem Auftreten epileptischer Anfälle. In den vergangenen Jahren zeigte sich eine zunehmende Evidenz dafür, dass entzündliche Prozesse des Gehirns die Entstehung von Epilepsien fördern und das fortdauernde Auftreten rezidivierender Anfälle begünstigen können.^{28,29,30} Besagte Phänomene werden bereits konkret mit spezifischen Epilepsieformen wie beispielsweise der Temporallappenepilepsie^{31,32} oder der fokalen kortikalen Dysplasie³³ assoziiert. Aktuelle Forschungsergebnisse weisen außerdem auf eine Korrelation der Immunreaktionen im Plasma mit weiteren Epilepsieformen hin, welche bisher nicht primär mit immunologischen Vorgängen in Verbindung gebracht wurden.^{34,35,36}

In einer Studie aus dem Jahr 2020³⁷ konnte eine signifikante Erhöhung der CD4 positiven T-Zellen bei Patienten mit fokaler Epilepsie festgestellt werden. Patienten, welche an einer therapieresistenten Epilepsie litten, wiesen darüber hinaus deutlich höhere Konzentrationen der CD4 pos. T-Zellpopulation auf. In einer detaillierteren Analyse der PBMCs der sog. Drugresistance group konnte ein Shift der im Blut befindlichen CD4 positiven T-Zellpopulationen hin zu den Th17/Th1 CD4 T-Zellen gezeigt werden. Im Rahmen weiterer Studien zeigte sich, dass Th17/Th1 CD4-positive T-Zellen insbesondere bei entzündlichem neuroglialem Schaden exprimiert werden, da sie aufgrund ihrer erhöhten Migrationsfähigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke einen direkten axonalen Schaden induzieren können.^{38,39}

Ebenfalls wurde weiterführend die Rolle der Interleukine konkreter untersucht. Dabei konnte ein statistisch signifikanter Anstieg des, in Korrelation zu neuronalem Schaden stehenden, IL-1beta nachgewiesen werden. Eine Verminderung der Produktion oder Rezeptoraktivität dieses Interleukins im Mausmodell wurde als neuroprotektiv identifiziert.⁴⁰ Gleichzeitig konnte eine erhebliche Erniedrigung des Interleukin-4 Spiegels in derselben Fallgruppe nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wird im Falle einer Neuroinflammation als neuroprotektiv bewertet.⁴¹ Stimmig zu diesen Ergebnissen

²⁷ Li et. Al 2011

²⁸ Wilco, Vezzani 2016

²⁹ Auvin, Mazarati, Shin, Sankar, Okt. 2010

³⁰ Auvin S, Shin D, Mazarati A, Sankar R. b Jul. 2010

³¹ Van Vliet et. Al 2006

³² Ravizza et. Al 2007

³³ Ravizza et. Al 2006

³⁴ Li et. Al 2011

³⁵ De Vries et. Al 2016

³⁶ Vezzani et. Al. 2013

³⁷ Ouédraogo et al. 2020

³⁸ Birkner et al 2020

³⁹ Siffrin et al., 2016

⁴⁰ Vezzani, Friedman, Dingledine, 2012

⁴¹ Vogelaar et al., 2018

zeigten sich ebenfalls erniedrigte Werte der Th2-T-Zellpopulation, welche insbesondere bei den therapierefraktären Epilepsien auffielen.⁴²

Der Nachweis einer postiktal vermehrten Bildung des Interleukin-10 erbrachte weitere wissenschaftliche Erkenntnisse auf dem Gebiet der Ursachenerforschung epileptischer Krankheitsbilder. Eine aus diesem Anstieg resultierende verminderte Interleukin-12 Aktivität führt zu einer Reduktion der NK-Zellaktivität und somit auch zu erniedrigten Spiegeln des proinflammatorischen INF-gamma. Diese Wechselwirkungen spiegeln den Versuch einer antiinflammatorischen Regulation des Immunsystems mit dem Ziel der Limitierung der anfallsbedingten entzündlichen Aktivierung wider, welche primär von de Vries et al.⁴³ Beschrieben wurde.

Kamaşak et al. untersuchten in ihrer Studie unter anderem bei Patienten mit diagnostizierter Epilepsie die Serumkonzentrationen des Tumornekrosefaktors-alpha. Dabei konnte eine signifikante Erhöhung dieser im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Es ließen sich sogar noch deutlich höhere Werte bei Patienten, welche unter schwerer Epilepsie litten im Vergleich zu denen mit milder Epilepsie feststellen.⁴⁴ Eine Arbeit von Stellwagen et al. konnte zeigen, dass TNF-alpha, welches von Astrozyten freigesetzt wird an die dazugehörigen Rezeptoren (TNFR) an Neuronen binden. Dies induziert eine Erhöhung der Expression des exzitatorischen AMPA-Typ Glutamatrezeptors, mit einer gleichzeitig verminderten Expression des inhibitorischen GABA_A-Rezeptors an den Synapsen.⁴⁵ Um eine Assoziation zwischen diesem Befund und der Epilepsie herzustellen wurden TNFR-Knockout-Mäuse im Hinblick auf die Entwicklung von Epilepsien innerhalb einer hirninfektösen Periode untersucht. Mäuse dieser Knockout-Gruppe zeigten eine deutlich höhere Krampfschwelle bei infektiösem Geschehen als die Kontrollgruppe. Hierdurch konnte belegt werden, dass TNF-alpha einen großen Einfluss auf die cerebralen exzitatorischen Vorgänge hat und dass eine massive Überexpression von TNF-alpha zu einer erhöhten Anfallsaktivität beitragen kann.^{46,47,48}

Genauer lässt sich dies folgendermaßen erläutern: TNF-alpha wird von Astrozyten und Mikrogliazellen freigesetzt wird. Diese Freisetzung führt unter anderem zu einer verstärkten Freisetzung von Glutamat und einer gleichzeitigen Endozytose von GABAergen Rezeptoren. Über diesen Mechanismus werden die exzitatorischen Reize erhöht und die inhibitorischen Reize (GABA) vermindert, was unweigerlich zu einer Erhöhung der Erregbarkeit des ZNS führt. Dies ist ein Grund, weshalb der Tumornekrosefaktor alpha zunehmend an Bedeutung bei Aufstellungen von Theorien der Iktogenese gewinnt.^{49,50,51,52,53} Durch diesen zusätzlichen und über-mäßigen Anfall an exzitatorischen Transmittern kann TNF-alpha so zu der Exzitotoxizität in bereits geschädigten Hirnregionen beitragen.⁵⁴

⁴² Ouédraogo et al. 2020

⁴³ De Vries et al. 2016

⁴⁴ Kamaşak et al. 2020

⁴⁵ Stellwagen et al. 2005

⁴⁶ Balosso, Ravizza, Aronica, Vezzani, 2013

⁴⁷ Balosso et al., 2005

⁴⁸ Weinberg, Blake, McCown, 2013

⁴⁹ Balosso, Ravizza, Aronica, Vezzani, 2013

⁵⁰ Balosso et al., 2005

⁵¹ Weinberg, Blake, McCown, 2013

⁵² Takeuchi et al., 2006

⁵³ Santello M, Bezzi P, Volterra A, 2011

⁵⁴ Takeuchi et al., 2006

1. Einleitung

In der Vergangenheit wurden bereits verschiedenste Behandlungsansätze für therapierefraktäre Epilepsien durch antiinflammatorisch wirkende Substanzen verfolgt und in experimentellen Studien erprobt. Beispielsweise wurde der spezifische Hemmstoff des Interleukin converting enzymes (ICE) VX-765 untersucht. Das ICE ist unter anderem für die Synthese von Interleukin-1 Beta und HMGB1 zuständig. Diesen beiden Substanzen wurde in einer experimentellen Studie von Vezzani A. Et. Al⁵⁵ eine Beteiligung an der Entstehung von Anfällen zugeschrieben.

Gleichzeitig ist VX-765 auch die einzige antiinflammatorische Substanz, welche bereits in einer klinischen Wirksamkeitsstudie untersucht wurde.⁵⁶ Im Rahmen einer randomisierten Doppelblindstudie wurden Auswirkungen der Substanz auf die Anfallsfrequenz von Patienten mit therapierefraktärer fokaler Epilepsie untersucht. Ergebnisse der Studie zeigten, dass es zu einer Reduktion der Anfallshäufigkeit bis zu 13%-19% in der VX-765 Gruppe kam. Ebenfalls ist an dieser Stelle hervorzuheben, dass die Verträglichkeit des oral eingenommenen Medikaments vergleichbar zu der Einnahme von Placebo war.

Aufgeführte Ansätze antiinflammatorische Therapieformen lassen Grund zur Annahme, dass die Verminderung des proinflammatorischen Status zu einer Reduktion der Anfallsfrequenz und Intensität bei Patienten mit therapieresistenten Epilepsieformen führen kann.^{57,58}

⁵⁵ Vezzani, Aronica, Mazarati, Pittman. 2013

⁵⁶ Vertex Pharmaceuticals Incorporated, März 2011

⁵⁷ Dey A, Kang X, Qiu J, Du Y, Jiang J, 2017

⁵⁸ French et al. 2017

1.3 Postiktale Zerstörung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität

Ein weiterer Aspekt ist die Störung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität nach epileptischen Anfällen. Da es sich bei dem zentralen Nervensystem um einen immunprivilierten Raum handelt, ist die Regulation der Permeabilität dieser Barriere essenziell für die Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS und somit auch des gesamten Organismus. Sowohl zentrale als auch periphere inflammatorische Vorgänge erhöhen die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) über unterschiedliche Mechanismen. Im Folgenden werden wichtige bereits beschriebene Vorgänge, welche zur Reduktion der Barrierefunktion beitragen besprochen:

1.3.1 Veränderung in den Tight Junctions der Endothelzellen

Labus et al.⁵⁹ veranschaulichten in ihrer 2018 veröffentlichten Studie, dass die von Mikrogliazellen sowie auch von peripheren Immunzellen produzierten pro-inflammatorischen Zytokine IL-1beta, IL-6, IL-9, TNF-alpha und auch IFN-gamma die Expression der Tight Junctions in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke signifikant vermindern und eine adäquate Organisation stören. Claudin-5 ist ein wichtiges Protein im Rahmen der aktiven Permeabilität in den Tight Junctions und wird vor allem durch die Wirkung von TNF-alpha und Interleukin-1beta herunterreguliert. Hierdurch kommt es zu einer vermehrten parazellulären Permeabilität und somit zu einer Störung der Integrität der BHS.⁶⁰ Durch diese Irritationen im strukturellen Aufbau der interzellulären Kontakte können Entzündungsmediatoren und periphere Immunzellen deutlich leichter in das ZNS gelangen und dort eine weiterführende Entzündungsreaktion aufrechterhalten, welche in einem weiteren neuronalen Zelluntergang mündet.

Ebenfalls konnte die Forschungsgruppe um Huang et al.⁶¹ im Dezember 2020 einen weiteren Beleg für die Zerstörung der Tight Junctions durch Entzündungsmediatoren liefern. Sie veranschaulichten eine Korrelation zwischen dem durch CoVID-19 ausgelösten Zytokinsturm und einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke in Bezug auf die Wirkung der Zytokine auf die Zonula occludens.

Die Zerstörung der Tight Junctions erfolgt nicht ausschließlich über peripher bzw. außerhalb des ZNS produzierte Zytokine, sondern kann wie Hagberg et al.⁶² in ihrer Publikation berichteten, auch durch aktivierte Mikrogliazellen geschehen. Diese werden durch hypoxische, proinflammatorische oder auch durch Elektrolytverschiebungen aktiviert und produzieren unter anderem TNF-alpha. Der Mechanismus hinter der Erhöhung der Permeabilität ist derselbe wie bei außerhalb des ZNS produzierten Zytokinen. Eine ebenfalls bekannte Nebenwirkung der bei diffusem großzelligem B-Zelllymphom (DLBCL) eingesetzten gegen CD19 gerichteten CAR-T-Zelltherapie, ist die erhöhte Anfälligkeit für neuroinflammatorische Prozesse. Hierbei kommt es zu einer Erhöhung der CD3+ T-Zellen und der CD19+ B-Zellen, welche einen sogenannten Zytokinsturm verursachen. Bei diesem Zytokinsturm kommt es zu einer übermäßigen Freisetzung von IFN-gamma, TNF-alpha und Interleukin-6. Auch dort konnte man statistisch signifikant darstellen, dass der ausgelöste Zytokinsturm zu einer erhöhten interzellulären Permeabilität der BHS führt und die Patienten so anfälliger für Infektionen oder Intoxikationen mit eigentlich nicht ZNS-gängigen Substanzen sind.⁶³

⁵⁹ Labus et al., 2018

⁶⁰ Nitta et al., 2003

⁶¹ Huang et al. 2020

⁶² Hagberg et al. 2015

⁶³ Huang et al. 2020

1.3.2 Schädigung der Endothelzellen und Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten

Nach der anfallsbedingten Schädigung der Neurone im ZNS kommt es zu einer Freisetzung sogenannter Damage-Associated-Molecular-Patterns (DAMPs) in den Extrazellularraum. Gezählt werden hierzu unter anderem Hitzeschockproteine, S100 Proteine, HMGB1 (High-mobility group box 1), IFN-gamma und CCL2. Diese binden an den Mikrogliazellen, welche die zentralen Immuneffektorzellen darstellen, an Pathogenerkennungsrezeptoren wie etwa die Toll-like Rezeptoren. Dies führt zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen und es kommt zu einer Produktion von Zyto- und Chemokinen.⁶⁴

Die Produktion von IL-1beta führt durch Rezeptorbindung an Astrozyten zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat, einem wichtigen exzitatorischen Transmitter im zentralen Nervensystem. Ebenfalls führt es autokrin zu einer gesteigerten Transkription des proteolytischen Enzyms Matrix-Metalloprotease-9 (MMP9). Dieses Enzym führt über eine direkte Schädigung der Tight Junctions in den Endothelzellen zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke. Somit ermöglicht es peripheren Immunzellen aber auch weiteren außerhalb des ZNS produzierten löslichen Faktoren das Erreichen des immunprivilegierten Raumes. Des Weiteren führt MMP-9 zu einer gesteigerten Antwort des ZNS auf depolarisierende Reize sowie einer erhöhten Sekretion von IL-1 beta und TNF-alpha aus zentralen und peripheren Immunzellen.⁶⁵ Eine weitere Funktion dieses Enzyms ist die Beeinflussung der neuronalen Plastizität über strukturelle Modifikationen an Synapsen, welches das Entstehen einer Epilepsie bzw. das Auftreten eines erneuten Anfalls begünstigt.^{66,67,68}

Ein weiterer Signalweg ist die hochregulation der Cyclooxygenase 2 (COX2) in den Mikrogliazellen. Dies geschieht durch die Bindung des Protease-Aktivierenden-Faktors an seinen Rezeptor, welcher durch die Aktivierung der Phospholipase A₂ die Expression der COX2 steuert. Das von ihr produzierte Prostaglandin E₂ führt wiederum zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat aus den Astrozyten, welches ebenfalls die neuronale Antwort auf erregende Reize erhöht.⁶⁹

Ebenfalls werden von aktivierten Mikrogliazellen, Astrozyten und Endothelzellen Chemokine produziert, welche die peripheren Immunzellen Richtung ZNS navigieren und zu einer Leukozytenaktivierung führen.^{70,71} Durch die Freisetzung sind sie an der Modulation spannungsabhängiger Natrium-, Kalium- und Kalziumkanäle sowie G-Protein gekoppelter Kalium-Transporter beteiligt. Durch diese Veränderung kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Dopamin, GABA und Glutamat.⁷²

Die Publikation von Bozzi et al.⁷³ stellte unter anderem dar, dass bei Patienten mit Temporallappenepilepsie der CXCR4-Rezeptor vermehrt exprimiert wurde und es durch diese Veränderung der Rezeptordichte zu einer Produktion und Ausschüttung von TNF-alpha kommt. Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie zeigten erhöhte Werte des CC-Chemokin-Ligand 2 (CCL2), dessen Rezeptor sich auf nahezu allen Neuronen, Astrozyten, Mikrogliazellen und Endothelzellen befindet. CCL2 fördert

⁶⁴ Serna-Rodríguez et al., 2022

⁶⁵ Rana et al., 2018

⁶⁶ Brosinz et al., 2016

⁶⁷ Acar et al., 2015

⁶⁸ Konopka et al., 2012

⁶⁹ Rana et al., 2018

⁷⁰ Fabene et al., 2010

⁷¹ Bozzi et al., 2016

⁷² Fabene et al., 2010

⁷³ Bozzi et al., 2016

1. Einleitung

nachweislich den Transport durch die BHS, einschließlich von Monozyten und Makrophagen.^{74,75}

Aufgrund dessen wird die Rolle der Chemokine bei Klärung der Ursache der BHS-Schädigung ein wichtiger Bestandteil zukünftiger Forschungen bleiben und es werden auch mögliche therapeutische Targets diskutiert.⁷⁶

Aktiviert Astrozyten hingegen produzieren den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Dieser erhöht die Aktivität der endothelialen NO-Synthase. Dies führt bei übermäßiger Produktion zu einer Verminderung der Bereitstellung von Occludin und Claudin und schwächt somit die parazelluläre Barriere zusätzlich.⁷⁷ Weitere Mediatoren wie Glutamat, Aspartat, ATP, Endothelin-1, TNF-alpha und Macrophage Inflammation Protein 2 (MIP2) werden durch die Aktivierung der Astrozyten vermehrt freigesetzt. Für diese Mediatoren konnte ein öffnender Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden. Auch diese Mediatoren werden weiterhin als mögliche Therapie-Targets erforscht.⁷⁸

⁷⁴ Faustino et al., 2019

⁷⁵ Huang M et al., 2017

⁷⁶ Fabene et al., 2010

⁷⁷ Huang X. et al., 2020

⁷⁸ Kadry et al., 2020

1.3.3 Periphere Immunzellen

Im Rahmen jeder Inflammationsreaktion kommt es zu einer Rekrutierung von Zellen unseres Immunsystems. Bei einer Inflammationssituation peripher aber auch im ZNS, wie es postiktal der Fall ist, kommt es an den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke zu einer verstärkten Expression verschiedener Oberflächenmarker. Es wurde beobachtet, dass die bei Inflammation vermehrt exprimierten Adhäsionsmoleküle VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1), ICAM-1 (Intercellular- Adhesion-Molecule) und E-Selektin zu einer vermehrten Migration peripherer Immunzellen in das ZNS führen.^{79,80,81}

Ebenfalls wird durch den vermehrten Anfall an Zytokinen die Expression des leukocyte adhesion molecule (LAM) erhöht, welches zu einer verstärkten Bindung der Leukozyten an die endotheliale Matrix führt und ebenfalls deren Migration durch die BHS erleichtert.⁸²

Unter diesen bindenden Leukozyten befinden sich auch CD4+ T-Zellen. Die Th1 Zellen werden durch die Adhäsion zur Produktion und Ausschüttung von IL-2, IFN-gamma und TNF-alpha angeregt. Diese Mediatoren stimulieren die mikrogliale Differenzierung zu M1-Mikrogliazellen. Sie produzieren unter anderem wiederum TNF-alpha und IL-12, welches eine Veränderung in der Dichte der Tight Junctions und einer Herunterregulierung kritischer Efflux-Transporter bewirkt.⁸³ TNF-alpha führt außerdem zu einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die ZNS-Region und fördert deren Diapedese durch die BHS. Die durch die Granulozyten freigesetzten Mediatoren IL1beta, IL-6, IL-12 führen zu einer weiteren Destabilisierung der Barriere zwischen Blut und zentralem Nervensystem.^{84,85}

Die regulatorischen T-Zellen bewirken hingegen eine Immuntoleranz, unterdrücken die Aktivierung weiterer Immunzellen, wirken sich positiv auf die endotheliale Funktion aus und können übermäßige Entzündungsreaktionen eindämmen. Aufgrund dessen wird ihnen eine neuroprotektive Funktion sowie eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität zugeschrieben.⁸⁶

Durch eine Adhäsion der NK-Zellen an das Endothel der BHS entsteht ein Signal zur Freisetzung von IFN-gamma und CXCL-10, was zur weiteren Destabilisierung der selektiven Permeabilität der BHS beiträgt.⁸⁷

⁷⁹ Yu et al., 2020

⁸⁰ Presta et al., 2018

⁸¹ Souza et al., 2017

⁸² Kadry et al., 2020

⁸³ Huppert et al., 2010

⁸⁴ Aubé et al., 2014

⁸⁵ McKittrick et al., 2015

⁸⁶ Saand et al., 2019

⁸⁷ Sonar et al., 2017

1.3.4 TNF-alpha

Dieses proinflammatorische Zytokin wird im ZNS hauptsächlich von Mikrogliazellen und Astrozyten freigesetzt. Bei der Detektion niedrigerer Glutamat-Konzentrationen oder einer inflammatorischen Stimulation der Immunzellen, kommt es zur Freisetzung des Tumornekrosefaktors-alpha, welcher dann über eine Glutamatausschüttung zu einer Erhöhung des exzitatorischen Input des ZNS führt.⁸⁸ Gleichzeitig kommt es durch einer verstärkten Endozytose GABAerger Rezeptoren. Dies führt zu einer zusätzlich erleichterten zentralen Erregbarkeit.⁸⁹ Kubota et al.⁹⁰ beschrieben die Regulation von N-Cadherin durch TNF-alpha. N-Cadherin ist ein Molekül welches essenziell für die Organisation exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen ist und bei Erniedrigung durch TNF-alpha zu einer Veränderung der synaptischen Struktur und damit der neuronalen Übertragungen führt.

Der neurotoxische Effekt von TNF-alpha wird über die Erhöhung der AMPA-Rezeptordichte ausgelöst, durch diese Regulation kommt es zu einer übermäßigen Aufnahme von Kalzium in die neuronalen Zellen und somit zu einer Schädigung dieser.⁹¹

Aufgrund seines Einflusses auf diese Signalwege ist TNF-alpha zunehmend in der Diskussion als potenzielles therapeutisches Ziel, denn beispielsweise bei Temporal-lappenepilepsie zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression des TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing-ligand). Allerdings stehen dem therapeutischen Nutzen auch die Risiken einer Infektanfälligkeit und einer erhöhten Tumorentwicklung gegenüber.

⁹²

⁸⁸ Stellwagen et al., 2006

⁸⁹ Stellwagen et al., 2005

⁹⁰ Kubota et al., 2009

⁹¹ Sumi et al., 2010

⁹² Alyu et al., 2016

1.3.5 IL-6

Nicht nur die Aktivierung der Mikrogliazellen oder der Astrozyten führt zu einer Freisetzung des proinflammatorischen Interleukin-6, sondern auch erhöhte Konzentrationen von TNF-alpha, IL-1beta und IFN-gamma. Eine Studie von Erta et al.⁹³ und ebenfalls die der Arbeitsgruppe Levin et al.⁹⁴ konnten mit ihren Ergebnissen unterstreichen, dass eine vermehrte Ausschüttung von IL-6 mit einer vermehrten Gliose der Neurone einher geht. Ebenfalls wurde von ihnen berichtet, dass durch eine übermäßige Ausschüttung des Interleukins die Langzeitpotenzierungsfähigkeit des neuronalen Systems erniedrigt war im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Eine genauere Untersuchung der Rolle des Interleukins-6 bei der Iktogenese zeigt unterschiedliche Ergebnisse. Es konnte zum einen gezeigt werden, dass bei IL-6 Knockout-Mäuse leichter einen epileptischen Anfall durch prokonvulsive Stimuli erzeugt werden konnte als bei den Wildtyp-Kontrollmäusen. Auf der anderen Seite wurde nach nasaler Injektion oder bei (für das IL-6 Gen) transgenetischen Mäusen eine erleichterte Auslösbarkeit von epileptischen Anfällen festgestellt.⁹⁵

Ein weiterer wichtigere Aspekt im Hinblick auf die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke ist die Bindung an den IL-6-Rezeptor auf der Endothelzelloberfläche oder auch die Bindung an den löslichen IL-6-Rezeptor. Beide Rezeptortypen setzen über das Glykoprotein 130 eine Signalkaskade in Gang, welche eine MAP-Kinase-Kaskade und eine JAK/STAT-Kinase-Kaskade aktiviert. In einer Studie im Jahr 2020 konnte eine erhöhte Expression dieses P-Glykoproteins in epileptischen Foki nachgewiesen werden.⁹⁶ Am Ende dieser Kinasenkaskade führt eine Erhöhung der COX2-Expression zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke.⁹⁷ Die Arbeitsgruppe von Melo et al.⁹⁸ konnte 2021 eine Korrelation zwischen hohen IL-6 Werten und verstärktem neuronalen Schaden sowie einem schlechteren neurologischen Outcome herstellen.

Die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse weisen auf eine hoch komplexe Interaktion der immunologischen Strukturen mit der Blut-Hirn-Schranke hin. In Summe kann sie zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke beitragen und so deren Durchlässigkeit für periphere Entzündungszellen bzw. Entzündungsmediatoren erhöhen. Der Mechanismus der Aktivierung der zentralen Immuneffektorzellen bildet einen sich immer selbst aufrechterhaltenden Kreislauf. Eine fehlende Regulation dieses Kreislaufs führt zu einer nachhaltigen Zerstörung neuronaler Zellen. Dies begünstigt die Entstehung neuer Glanarben, welche als neue Foki zur Entstehung weiterer epileptischer Anfälle beitragen können.

⁹³ Erta et al., 2017

⁹⁴ Levin et al., 2017

⁹⁵ Erta et al., 2017

⁹⁶ Kadry et al., 2020

⁹⁷ Zhang et al., 2015

⁹⁸ Melo et al., 2021

1.4 Veränderungen der postiktalen Plasmaproteinexpression

Eine weitere Methode, um die Veränderung der Vorgänge im menschlichen Körper bei epileptischen Anfällen darzustellen ist die Analyse des Plasmaproteoms. Eine 2021 veröffentlichte Studie von Banote et al.⁹⁹ beschäftigte sich mit den unterschiedlichen Expressionen von Plasmaproteinen nach einem epileptischen Anfall und betrachtete diese Veränderungen im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten. Ziel dieser Studie war es einen Biomarker für epileptische Anfälle zu identifizieren. Es konnten Unterschiede in den Konzentrationen von bis zu 41 Proteinen im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden.

Eines der genannten Proteine ist das Pentraxin-related protein (PTX3), welches in erhöhter Konzentration bei Banote et al.¹⁰⁰ nachgewiesen wurde. PTX3 konnte durch eine Studie von Ravizza et al.¹⁰¹ eine neuroprotektive Rolle postiktal zugeschrieben werden. Dort wurde am Modell der Ratte eine deutlich erhöhte Konzentration dieses Proteins postiktal gemessen. Des Weiteren zeigte sich in einer PTX3-Knockout-Kohorte ein deutlich größerer anfallsbedingter neuronaler Schaden als in der Wildtyp-Vergleichsgruppe.

Eine weitere Veränderung konnte, ebenfalls in einem Mausmodell, für den von-Willebrand-Faktor gezeigt werden, welcher von den Endothelzellen der Blutgefäße gebildet wird. Es wurde eine Kontrollgruppe und eine Knockout-Gruppe für vWF hergestellt, im Anschluss wurde via Pilocarpin ein epileptischer Anfall provoziert und mittels Evans Blue die Durchlässigkeit der BHS beurteilt. Hierbei konnte eine durch den epileptischen Anfall provozierte Freisetzung des VWF aus den Endothelzellen dargestellt werden. Es zeigte sich für die Knockout-Gruppe eine undurchlässigere Blut-Hirn-Schranke. Zwar steht ein VWF-Mangel mit einer gestörten P-Selektin-Expression der Endothelzellen in Zusammenhang, dieser ist aber laut dieser Studie nicht die Ursache der verminderten Permeabilität. Diese Verstärkung der Barriere führt allerdings nicht zu einem Schutz der neuronalen Strukturen, dies konnte anhand der deutlich erhöhten S100B Konzentrationen im Western-Blot in der Gruppe der vWF-Defizienten Mäusen nachgewiesen werden. S100B Übertritt in das Blutplasma gilt als Indikator neuronalen Hirnschadens.¹⁰²

Innerhalb eines Zeitraumes von 120 Minuten postiktal starben 100% der Knockout-Mäuse. Dementsprechend ist auch hier dem von Willebrand-Faktor eine protektive Wirkung hinsichtlich des neuronalen Schadens als auch des postiktalen Outcomes zuzuschreiben.¹⁰³

Li et al.¹⁰⁴ beschrieben 2019 die Beteiligung der mitogen-activated protein kinase-14 (MAPK14) an der Epileptogenese. MAP-Kinasen fungieren als Integrationspunkt für verschiedenste chemische Botenstoffe, vornehmlich proinflammatorische Zytokine und induzieren eine Transkription, Proliferation und Differenzierung der Zelle. Durch eine Ausschaltung der Phosphorylierung der MAP-Kinase durch Losmapimod konnte eine deutlich geringere Anfallsstärke im Rattenmodell gezeigt werden. Dieser Marker stellte sich bei Banote et al. im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant, mit einem p-Wert von 0,022 niedriger dar.¹⁰⁵

⁹⁹ Banote, Larsson, Berger, Kumlien, Zelano, 2021

¹⁰⁰ Banote, Larsson, Berger, Kumlien, Zelano, 2021

¹⁰¹ Ravizza et al., 2001

¹⁰² Lopez et al., 2011

¹⁰³ Suidan, Brill, De Meyer, Voorhees, Cifuni, Cabral, Wagner, 2013

¹⁰⁴ Li, Cui, Feng, Wang, Zhang, Wang, Ding, Zhao, 2019

¹⁰⁵ Banote, Larsson, Berger, Kumlien, Zelano, 2021

Ebenfalls konnten in der Arbeit von Banote et al. eine signifikante Erniedrigung ($p=0,047$) der Konzentration der Laminin-Untereinheit beta-2 (LAMB2) im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden.¹⁰⁶ Diese Untereinheit ist Bestandteil der kortikalen Basalmembran und an der Synapsenformation und deren Morphogenese beteiligt. Für genau dieses Protein fanden Fu et al.¹⁰⁷ bei einer vermehrten Expression eine Korrelation zu erhöhten Anfallsfrequenzen.

Nach Zusammenschau der derzeitigen Studienlage bleiben einige Fragen offen: ist eine Detektion weiterer Veränderungen der Zellpopulationen sowie Zytokin-expressionen anhand der postiktalen venösen Blutanalyse möglich und lassen sich im Anschluss aus den Ergebnissen potenzielle therapeutische Targets identifizieren? Im Rahmen dieser wird der Versuch unternommen, Antworten mithilfe einer FACS-Analyse von PBMCs aus peripherem Blut auf diese bisher noch ungeklärten Fragestellungen zu finden.

Im Bereich der Proteomik ist das Ziel dieser Arbeit nun weitere fluide Marker im peripheren Plasma zu identifizieren und deren protektive oder induzierende Rolle in der Iktogenese aufzudecken. Hierzu wurde das Plasmaproteom von Patienten mit epileptischen Anfällen mittels Proteomik untersucht.

¹⁰⁶ Banote, Larsson, Berger, Kumlien, Zelano, 2021

¹⁰⁷ Fu, Wu, Guo, Chen, Ma, Wang, Xiao, Wang, 2019

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Eingeschlossen in die Studie wurden insgesamt 21 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 52,5 Jahren in stationärem Aufenthalt nach einem gesicherten generalisierten epileptischen Anfall. Die Auswahl der Patienten erfolgte anhand ihrer Vorgeschichte und auch derer präklinischen Medikation durch den Rettungsdienst. Essenziell für den Einschluss war, dass keine strukturelle Hirnerkrankung und kein infektiöses Geschehen zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestanden. In der Fallgruppe hatten 14 Patienten bereits die Diagnose Epilepsie und erlitten einen Krampfanfall, wohingegen 7 zum ersten Mal einen Anfall erlitten. In der Gruppe mit den Patienten, bei welchen bereits Epilepsie diagnostiziert wurde, hatten lediglich zwei von ihnen eine dauerhafte antiepileptische Therapie mit Levetiracetam in ihrer Medikation. Das direkt bei Aufnahme abgenommene Labor zeigte CK-Werte im Bereich von 70 bis 5919 mg/dl. Ebenfalls wurden relevante Vordiagnosen ausgeschlossen und es wurde anamnestisch sowie laborchemisch versucht Krampfanfälle im Rahmen einer Entzugerscheinung auszuschließen.

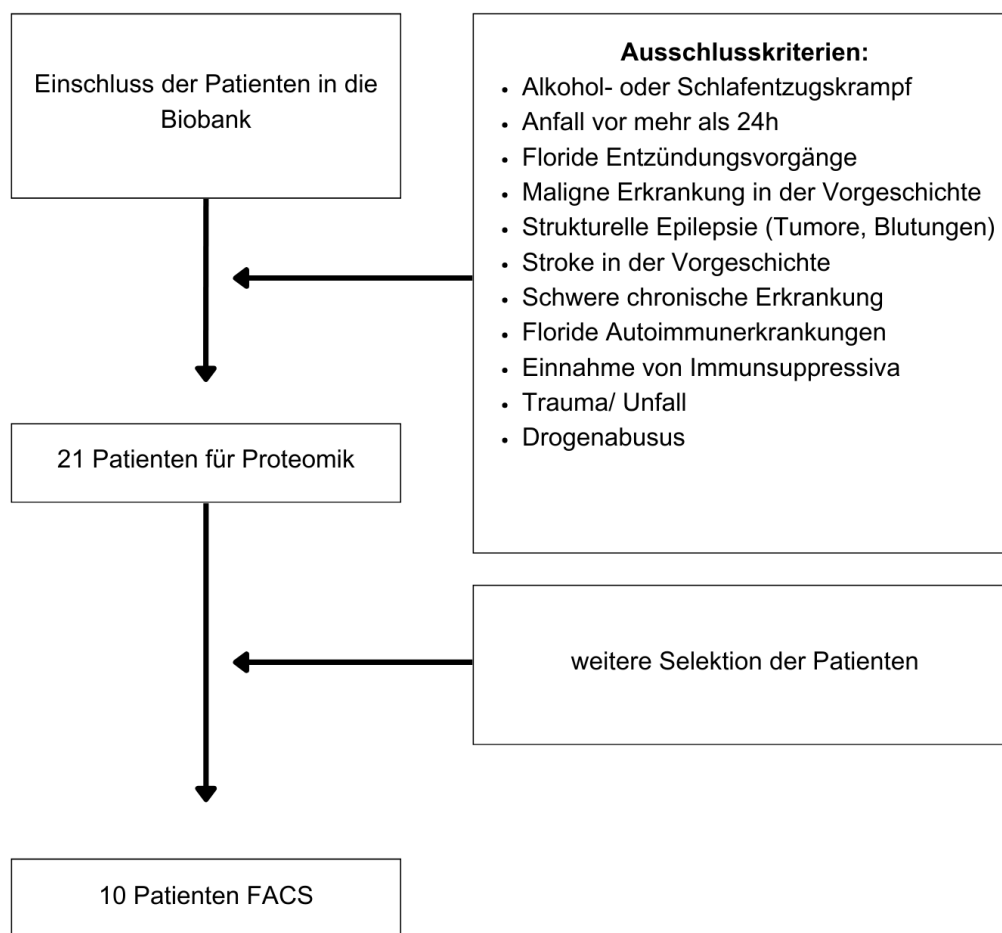


Abbildung 1: Darstellung der Patientenselektion für die Fallgruppe¹⁰⁸

¹⁰⁸ Eigene Darstellung, erstellt mit Hilfe von Canva

Im Anschluss wurden 20 Kontrollen mit einem Durchschnittsalter von 62,57 Jahren eingeschlossen. Hierbei wurden ambulante Patienten aus der ZNA sowie bereits vorbestehende Patienten aus der Biobank ausgewählt. Bei der Rekrutierung dieser lag ein besonderes Augenmerk auf einer blanden Vorgeschichte in Bezug auf ischämische Ereignisse jeglicher Art oder Tumorgeschehen. Ebenfalls durften die Kontrollpatienten in ihrer Krankengeschichte keine Form eines epileptischen Anfalls aufweisen.

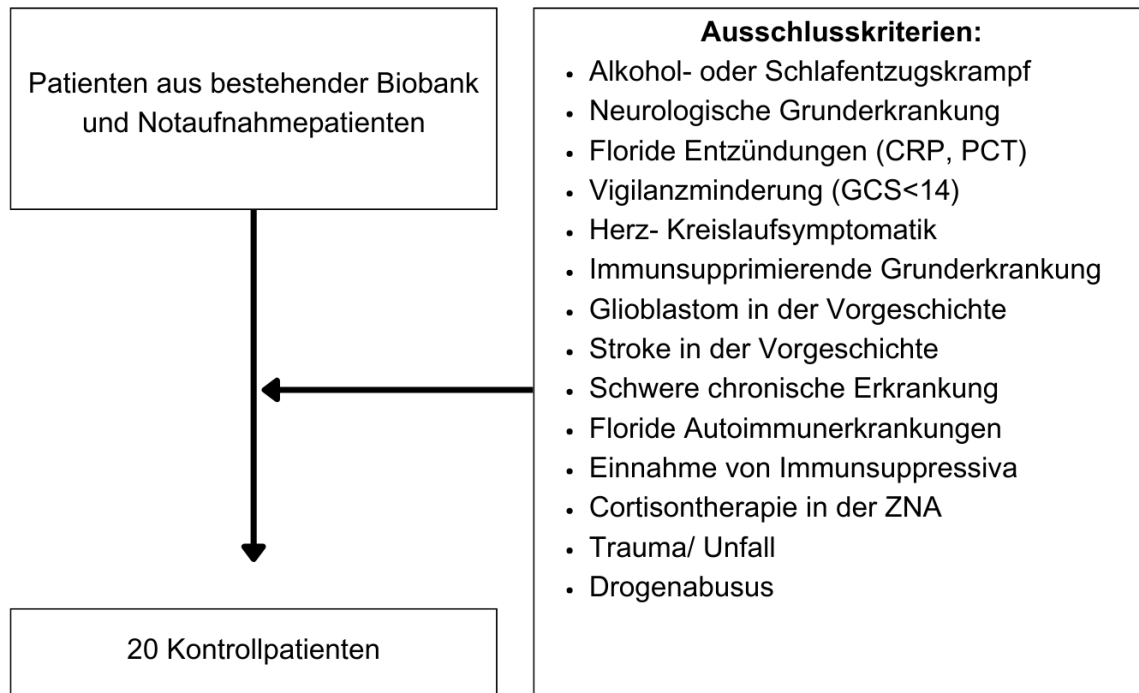


Abbildung 2: Darstellung der Selektion der Kontrollpatientengruppe¹⁰⁹

2.2 Studienablauf

In dem Zeitraum von April 2021 bis März 2022 wurden die Patienten entweder direkt in der zentralen Notaufnahme des Universitätsklinikum Mannheim oder im anschließenden stationären Setting auf ihre Eignung zur Teilnahme an der Studie untersucht. Dies bestand aus ausführlicher Anamnese, körperlicher Untersuchung sowie auch Sichtung der Patientenakte. Dies diente der Identifizierung möglicher Ausschlusskriterien (vgl. Abbildung 2).

Im Anschluss wurde bei bestehender Zustimmung das Einverständniserklärungsformular ausgehändigt.

Mittels neuer Venenpunktion wurden jeweils eine EDTA-, Serum- und zwei Heparin-Monovetten entnommen. Das gewonnene Blut wurde direkt ins Labor zur Bearbeitung gebracht, der Transport erfolgte bei Raumtemperatur.

¹⁰⁹ Eigene Darstellung, erstellt mit Hilfe von Canva

Für das EDTA-Plasma war die Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge 5430, 230V/50-60Hz) innerhalb einer Stunde nach Punktion für die Qualitätssicherung essentiell. Dieser Zentrifugationsschritt erfolgte für 10 Minuten bei 1500x g mit ausgeschalteter Bremse in der Zentrifuge. Der entstandene Überstand wurde überführt und bei weiteren 10 Minuten bei 15 °C und 15000x g erneut zentrifugiert. Anschließend wurde die gewonnene Menge an Plasma notiert und es erfolgte die Lagerung bei -80°C. Für weitere Fragestellungen und potentielle Untersuchungsmethoden wurden auch das EDTA-Blut bei -80°C eingefroren. (Vergleiche Protokoll EDTA-Plasma in Anhang)

Die Heparinmonovette wurde bis zur weiteren Aufbereitung aufrecht bei Raumtemperatur gelagert. Die entsprechenden Leukosept-Seperationstubes mit Separationsmedium vorbereitet und 30 Sekunden bei 430x g abzentrifugiert. Bevor die Probe aufgetragen werden konnte, wurde der Filter noch mit 5ml PBS befeuchtet. Im Anschluss kamen 15-20ml des Heparinblutes auf den Filter und das Separationstube wurde mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Es erfolgte die Zentrifugation über 20 Minuten bei 800x g. Der Überstand wurde in ein Falcontube durch Abkippen überführt, es wurde erneut auf 50ml mit PBS aufgefüllt und für weitere 10 min bei 430x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 6-7ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde aus der entstandenen Lösung 20µl abpipettiert und mit 180µl Türk'sche Lösung verdünnt. Daraufhin wurde mithilfe einer Zählkammer die Zellzahl in der Stichprobe bestimmt und durch eine Formel auf die gesamte Probe hochgerechnet. Bei ausreichender Zellzahl füllte man erneut mit PBS auf 50ml im Falcontube auf und zentrifugierte es bei 320x g für 10 Minuten. Der entstandene Überstand wurde abgekippt und die restliche Flüssigkeit mittels Pipette entfernt. Dann konnte das Pellet in Einfriermedium A resuspendiert werden und vor dem Einfrieren dann mit Einfriermedium B versetzt werden (Verhältnis 1:1 zwischen Einfriermedium A und B). Die Proben wurden dann bei -80°C eingefroren und innerhalb von 7 Tagen in einen Stickstofftank überführt, um dort hinreichende Kühlung zu erlangen.

2.3 FACS

Die Identifikation der einzelnen Leukozytensubpopulationen erfolgte mittels einer Durchflusszytometrie im Rahmen einer Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) mittels des Gerätes: BD FACS Lyrik. Das exakte Vorgehen ist mit Hilfe der Protokolle den Protokollen im Anhang zu entnehmen.

Im Anhang findet sich die Tabelle der verwendeten Antikörper für die jeweiligen zu identifizierenden Oberflächenantigene.

Die Identifikation der Zellen wurde mittels 8 verschiedener Panels durchgeführt. Abbildung 3 zeigt die verwendeten Antikörper der Panels und den jeweils verwendeten Fluoreszenzkanal pro Antikörper (linke Spalte). Die beiden rechts abgebildeten Gruppierungen sind Tcell 5 (CD/THh1) und Tcell 6 (TH2/TH17). Dort wurden die Zellen mittels CD3/CD28 beads stimuliert, um deren Reaktion auf einen aktivierenden Reiz zu testen. Zu betonen ist hier, dass es sich um eine relativ unspezifische Stimulation handelte. Im Anhang finden sich die detaillierten Protokolle zum Vorgehen der Stimulation in Tcell 5 und Tcell 6.

	TBnKDC-Panel	MDSC***	T cell 1	Tcell 2***	T cell3***	T cell 4		CDTHt1***	Th2/Th17T-
BV421	CD14		PD1	CTLA4	CD56	CCR4		***IFN	***IL21
BV510	CD3	CD3/19/56	TIGIT	CD39*		CXCR3		CD3	CD3
BV605	CD16	CD16	CD4	CD4	CD4	CD4		CCR7	CCR7
BV711	CD19	CD33	CCR7	CD25	***T-bet	CXCR5		***Ki67	***IL13
BV786	CD56	CD15	CD3	CD3	CD3	CD3		CD4	CD4
BB515/FITC/Alf488	CD33		Tim3	CD127	*** EOMES	CCR10		***IL-2	***TGF
PE	CD15	PDL-1	CD27	PD1	SLAMF6			***GrzmB	***IL17a
PerCP-Cy5.5/BB700	CD11c	CD11b	CD8	***FOXP3	CD244	CD8		CD8	***IL4
PE-Cy7		HLA-DR	CD45RA	LAG3	CD160			CD45RA	CD45RA
APC		***Arginase	CD57	BTLA	CD57	CCR6		***TNF	***IL10
APC-H7	HLA-DR	CD14	CD28	CD8	CD8				
APC-eFluor700	DCM	DCM	DCM	DCM	DCM	DCM		DCM	DCM
.
.				
.				

Abbildung 3: Übersichtstabelle der einzelnen Panels, hieraus werden die verwendeten Antikörper zur jeweiligen Selektion der Zellpopulationen ersichtlich

2. Material und Methoden

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mittels FlowJo (Version 10). Abbildung 4 zeigt repräsentative Gates für CD3+ Zellen.

Eine Besonderheit ergab sich bei den stimulierten Panels. Die Stimulation erfolgte mittels CD3/CD28 beads, das genaue Vorgehen lässt sich aus den im Anhang befindlichen Übersichten entnehmen. Abbildung 4 zeigt die als CD3+ identifizierten Zellen vor (links) und nach (rechts) Stimulation. Wie deutlich zu erkennen ist, zeigten die Zellen durch die Stimulation eine deutliche Veränderung ihrer CD3-Oberflächenmarkerexpression. Somit war es im Vergleich zu vor der Stimulation deutlich erschwert zwei Populationen voneinander abzugrenzen. Da dies ein normaler und bekannter Prozess bei Stimulation ist, musste das Gate der Zellen angepasst werden. Hierfür wurde ein Gate Namens „Lympho“ verwendet. Im Anschluss an das Lympho-Gate wurde eine Differenzierung in CD4+, CD8+ und CD4- CD8- Zellen vorgenommen. Durch diese neuen Gruppen konnten dann präzisere Aussagen über das Verhalten durch Stimulation getroffen werden. Die exakte Gate-Setzung innerhalb der einzelnen Workspaces finden sich ebenfalls im Anhang.

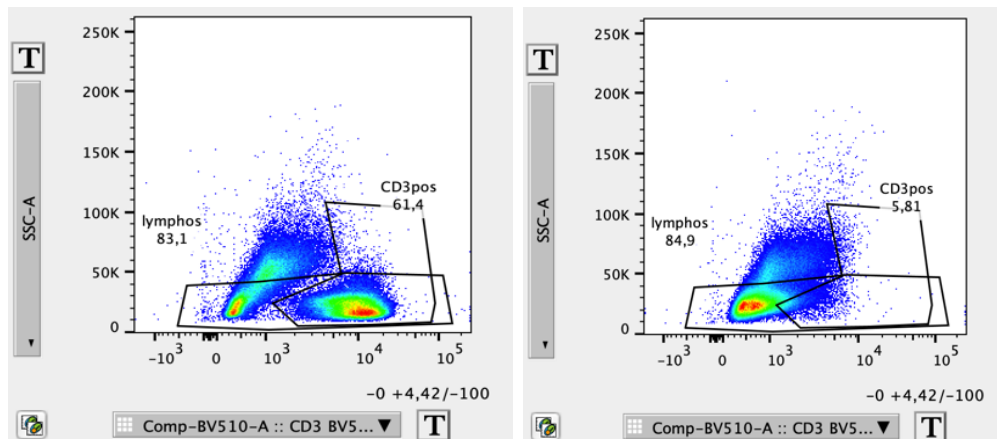


Abbildung 4: Darstellung des Gatings der CD3 positiven Zellen vor (links) und nach (rechts) Stimulation

2.4 Proteomik

Mithilfe der Proteomik lässt sich die Gesamtheit der zum Messzeitpunkt vorliegenden Proteine in der jeweiligen Probe darstellen. Die Schwierigkeit des Proteoms ergibt sich darin, dass es anders als das statische Genom hoch variabel ist. Da es zusätzlich auch sehr sensitiv gegenüber Umwelteinflüssen wie Temperatur, Wirkstoffapplikation und auch Genexpression ist kann sich die qualitative und auch quantitative Zusammensetzung des Proteoms stetig ändern. Hierbei ist hervorzuheben, dass die hier durchgeführte Messung lediglich eine Abbildung des Proteoms zu einem bestimmten Zeitpunkt (t) postiktal darstellt. Aufgrund dessen ist der zeitliche Rahmen für die Blutabnahme und die direkte Weiterverarbeitung des EDTA-Plasmas essenziell, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu schaffen.

Es wurden insgesamt 10µl des EDTA-Plasmas verwendet. Diese Probe wurde mit Tris-Urea auf 1:100 verdünnt. Es folgte eine Aufbewahrung über 5 Minuten im Thermoblock bei 90°C. Nach Zugabe von 2µl Dithiothreitol (DTT) zur Konservierung zellinnerer Proteine in ihrer funktionellen Form, wurde bei 60°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 10µl Iodacetamid zur Peptidasehemmung hinzugegeben, ab diesem Schritt sollten der nächste Inkubationsschritt im Thermoshaker über 30 Minuten bei Raumtemperatur und 500rpm unter Lichtabschirmung mithilfe einer Aluschale stattfinden. Unterdessen wurden die Microcon Filter (30kD) durch aufpipettieren von 250µl Tris/Urea und zentrifugieren bei 22°C über 15min mit 8000x g gewaschen. Dann erfolgte das Auftragen der gesamten Probe (Volumen ca. 120µl) mit zusätzlich 100µl Tris-Urea auf den Filter. Dieser wurde dann 15 Minuten bei 8000x g und 22°C zentrifugiert und das entstandene Filtrat verworfen. Zu Gründlichkeit des Waschschrittes erfolgte eine dreimalige Spülung des Filters mit 250µl NH_4HCO_3 (100mM) mit je einer anschließenden Zentrifugation über 15 Minuten bei 8000x g und 22°C. Der Filter sollte nach Abschluss dieser Schritte trocken sein, falls dies nicht der Fall ist sollte erneut ein Zentrifugationsschritt durchgeführt werden.

Um den Verdau zu starten, wurden 200µl NH_4HCO_3 / CaCl_2 (4:1) (also bspw.: 160µl:40µl für eine Probe. (Endkonzentration: CaCl_2 1mM)) auf den Filter gegeben. Im Anschluss wurden dann 7,5µl einer Trypsin-1%-Essigsäurelösung (Trypsinkonzentration 0,2µg/µl) auf den Filter pipettiert. Der Prozess wurde dann über Nacht in einem Thermoblock bei 37°C inkubiert. Nach ca. 18 Stunden wurde der Filter dann mit 200µl NH_4HCO_3 gewaschen und das Filtrat aufgefangen und bei -80°C bis zur massenspektroskopischen Messung bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurde mittels der SWATH-Aquisition MicroApp 2.0 in der PeakView Software die Protein-identifikation vorgenommen. Diese Identifikation basierte auf folgenden sechs Parametern: 4 Peptide pro protein, 3 Transitionen pro Peptid, 99% Peptidsicherheit, 1% FDR, Fragment ion extraction window über 5 min und einer Massentoleranz von 50ppm. Die gesammelten Daten wurden im Anschluss dann in MarkerView (AB Sciex Framingham, MA, USA) überführt. Mittels t-Test wurde eine Normalisierung der Most likely ratio (MLR) und eine Gruppendifferenzierung erreicht. (Vergleiche Anhang Protokoll Proteomik-EDTA-Plasma und Protokoll Massenspektroskopie Anhang).

Zur weiteren Probenverarbeitung wurden die Proteine (10 µg) durch Trypsinverdau unter Verwendung eines AssayMAP Bravo Flüssigkeitshandlingssystems (Agilent Technologies) aufgeschlossen, wobei das autoSP3-Protokoll gemäß Müller et al.¹¹⁰ angewendet wurde. Die LC-MS/MS-Analyse erfolgte mittels eines Vanquish Neo UPLC-Systems (Thermo Fisher Scientific), das direkt mit einem Orbitrap Exploris 480 Massenspektrometer gekoppelt war. Die Gesamtanalysedauer betrug 120 Minuten. Die Peptide wurden in einem Online-Entsalzungsprozess auf einer Trapping-Kartusche (Acclaim PepMap300 C18, 5 µm, 300 Å Porengröße; Thermo Fisher Scientific) für zwei Minuten bei einer Flussrate von 30 µl/min und einem Ladevolumen von 60 µl vorgereinigt. Die anschließende Peptidtrennung erfolgte bei einer Flussrate von 300 nl/min über einen analytischen Mehrstufen-Gradienten auf einer nanoEase MZ Peptid-Analysesäule (300 Å, 1,7 µm, 75 µm × 200 mm, Waters) unter Verwendung von Lösungsmittel A (0,1 % Ameisensäure in Wasser) und Lösungsmittel B (0,1 % Ameisensäure in Acetonitril). Die Konzentration von Lösungsmittel B wurde über 105 Minuten kontinuierlich von 4 % auf 27 % erhöht, gefolgt von einer schnellen Steigerung auf 78 %. Nach zwei Minuten wurde die Konzentration von Lösungsmittel B auf 2 % gesenkt und ein zehnminütiger Gleichgewichtsschritt durchgeführt. Die eluierenden Peptide wurden im DIA-Modus (data-independent acquisition) des Massenspektrometers analysiert. Es wurde zunächst ein Vollscan mit einer Auflösung von 120.000 (380-1400 m/z, 300 % AGC-Ziel, 45 ms maximale Injektionszeit) durchgeführt, gefolgt von 40 DIA-MS2-Fenstern variabler Länge, die den Massenbereich von 400-1000 m/z abdeckten. Die DIA-MS2-Scans wurden mit einer Auflösung von 30.000 (1000 % AGC-Ziel, 54 ms maximale Injektionszeit, Zentroidmodus, 28 % Normalized Collision Energy (NCE)) aufgezeichnet. Um eine Probenübertragung zwischen den Läufen zu minimieren, wurde nach jeder Probe ein Waschlauf (40 Minuten) durchgeführt. Die Leistungsfähigkeit des Systems wurde über den gesamten Zeitraum der Messung durch regelmäßige Injektionen (etwa alle 48 Stunden) einer Standardprobe und durch eine hausintern entwickelte Shiny-Applikation überwacht.

Sämtliche Schritte der Probenverarbeitung, einschließlich der Probenvorbereitung und der LC-MS/MS-Analyse, wurden in blockrandomisierter Reihenfolge durchgeführt (Burger, Bram, Marc Vaudel, und Harald Barsnes. "Die Bedeutung der Blockrandomisierung bei der Planung von Proteomik-Experimenten." *Journal of Proteome Research* 20.1 (2020): 122-128).

Die Analyse der DIA-RAW-Daten erfolgte mithilfe von Spectronaut (Biognosys, Version 18.6.231227.55695) im directDIA+ (deep)-Modus ohne Verwendung einer Vorlaufbibliothek. Es wurden die Standardeinstellungen angewendet, jedoch mit folgenden Modifikationen: In der DIA-Analyse wurde der Precursor-PEP-Grenzwert auf 0,01 gesetzt, der Protein-Qvalue-Grenzwert (Lauf) auf 0,01 sowie der Protein-PEP-Grenzwert ebenfalls auf 0,01. Für die Quantifizierung wurde der Proteotypizitätsfilter auf "Nur proteinspezifische Gruppen" eingestellt, die LFQ-Methode auf MaxLFQ und das Quantifizierungsfenster auf "Nicht synchronisiert" (SN 17). Die Daten wurden gegen das humane Proteom aus der Uniprot-Datenbank (humane Referenzdatenbank mit einer Proteinsequenz pro Gen, 20.597 Einträge, Stand 9. Februar 2024) sowie gegen die Kontaminanten-FASTA von MaxQuant (246 Einträge, Stand 22. Dezember 2022) durchsucht.

¹¹⁰ Müller et al., 2020

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden zwischen 2019 und 2022 21 Patienten nach einem unmittelbar zuvor erfolgten Anfall eingeschlossen, diese bildeten mit einem Durchschnittsalter von 52,50 Jahren die Fallgruppe. In derselben Zeit wurden eine weitere Kohorte von 17 Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 62,57 Jahren an Patienten eingeschlossen, welche keine neurologischen Vorerkrankungen hatten bzw. sich auch nicht aufgrund einer solchen in der Notaufnahme befanden. Abbildung 5 veranschaulicht die Altersverteilungen der beiden Kohorten sowie deren Vergleich. Diese Einteilung wurde für die Untersuchung des Plasmaproteoms beibehalten.

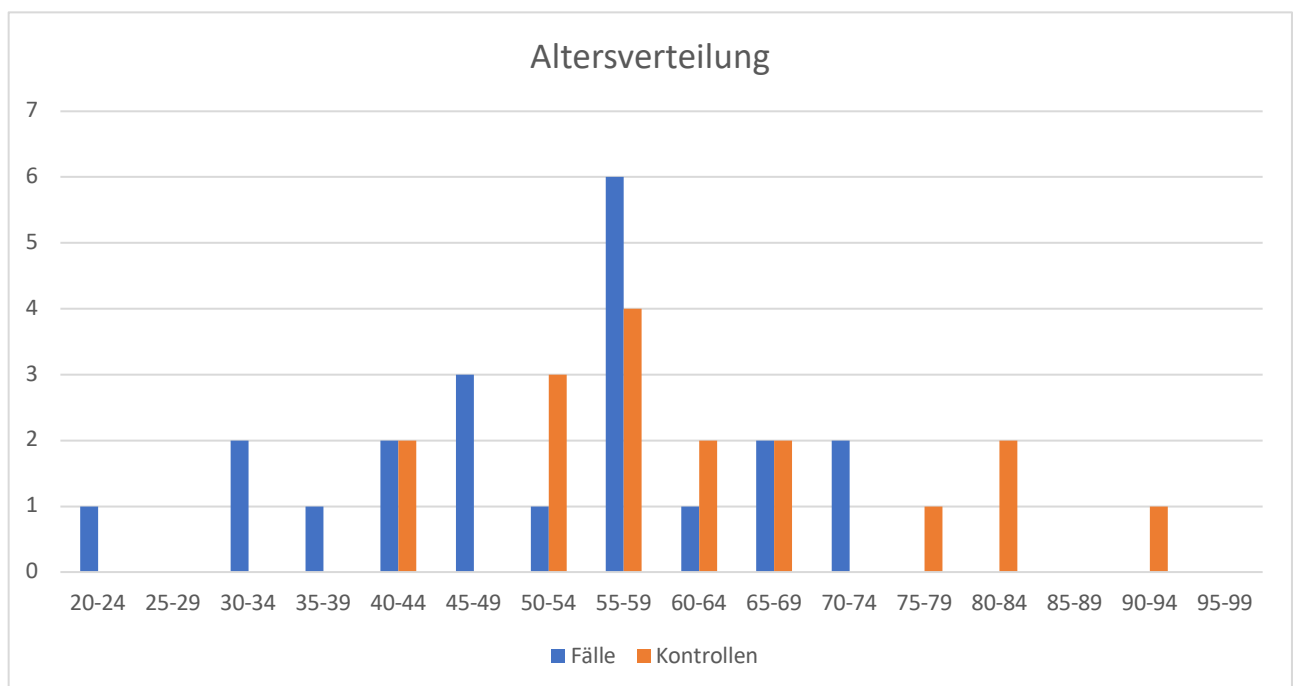


Abbildung 5: Darstellung der Altersverteilung aller eingeschlossenen Patienten in den jeweiligen Kohorten, gleichbedeutend mit der Altersverteilung bei der Proteomik-Analyse

3. Ergebnisse

Aufgrund der unterschiedlichen Eignung der entnommenen Blutproben wurden im Anschluss zwei Gruppen zu je 10 Patienten gebildet. In der Anfallskohorte waren es fünf männliche und fünf weibliche Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 50,39 Jahren. In der Kontrollgruppe waren es 6 weibliche und 4 männliche Patienten mit einem Durchschnittsalter von 54,65 Jahren. Deren durch eine periphere Blutentnahme gewonnenen „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMCs) wurden mit einer FACS-Analyse genau differenziert, um mögliche Auswirkungen eines Anfalls herauszuarbeiten. Abbildung 6 veranschaulicht die Altersverteilung der beiden Kohorten in der FACS-Analyse.

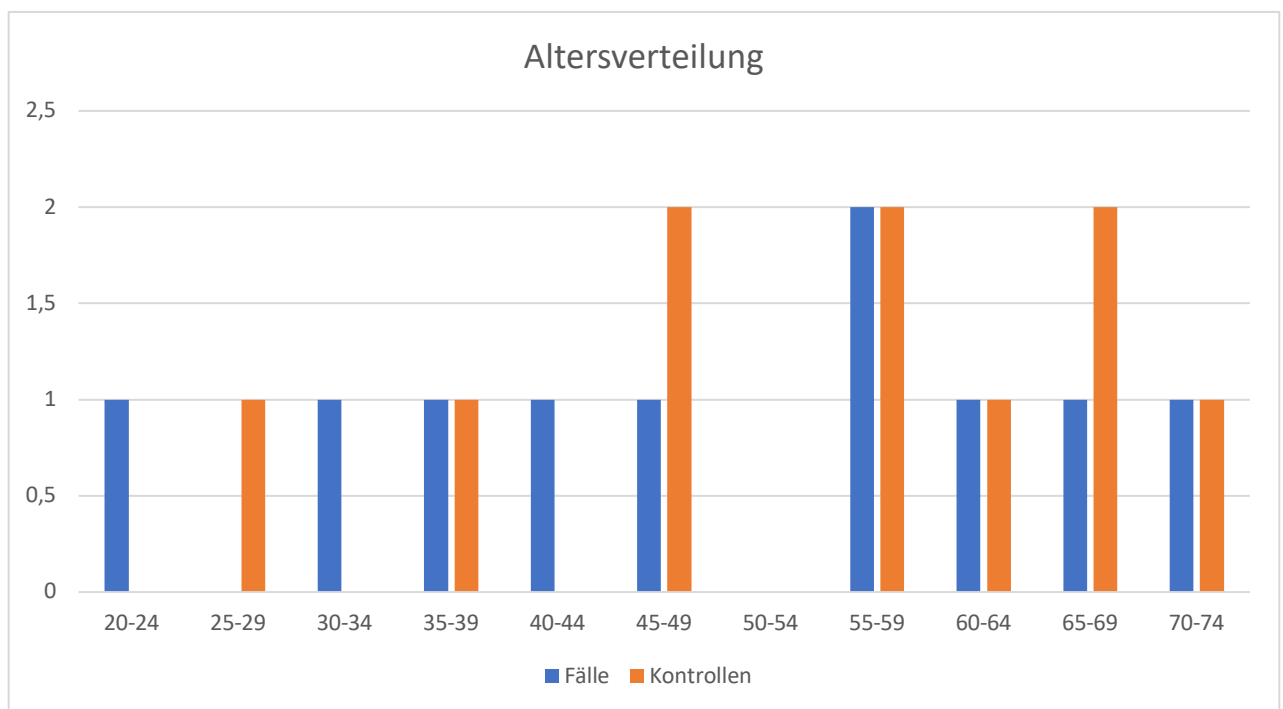


Abbildung 6: Darstellung der Altersverteilung von Fall- und Kontrollpatienten in der FACS-Analyse

3.2 Ergebnisse FACS

3.2.1 Übersicht

Um zunächst einen Überblick über die Gesamtpopulationen zu erhalten, stellt Abbildung 7 die Anteile der jeweiligen nicht weiter spezifizierten Zellpopulationen an allen als lebend identifizierten Zellen dar. Deutlich wird hier, dass jegliche untersuchte Zellart in der Fallgruppe signifikant höhere Anteile besaß als in der Kontrollgruppe. Es wurde zudem eine Korrelationsanalyse der jeweiligen Populationen zu Entnahmezeitpunkt, CK-Wert, Lymphozytenzahl und Alter der Patienten durchgeführt, wobei sich keine Korrelation zwischen den Zellen und den klinischen Parametern nachweisen ließ. Zellen welche in der untenstehenden Abbildung als „Lineage negative cells“ bezeichnet werden, wiesen keine Fluoreszenz für CD3, CD19 und CD56 auf. Es sind also weder T-, B- oder NK-Zellen (CD3+ Zellen: $p = 0,013$; CD4+ Zellen: $p = 0,0017$; Lineage negative Zellen: $p = 0,0031$; regulatorische T-Zellen: $p = 0,0203$; Monozyten: $p = 0,0093$; dendritische Zellen: $p = 0,0003$).

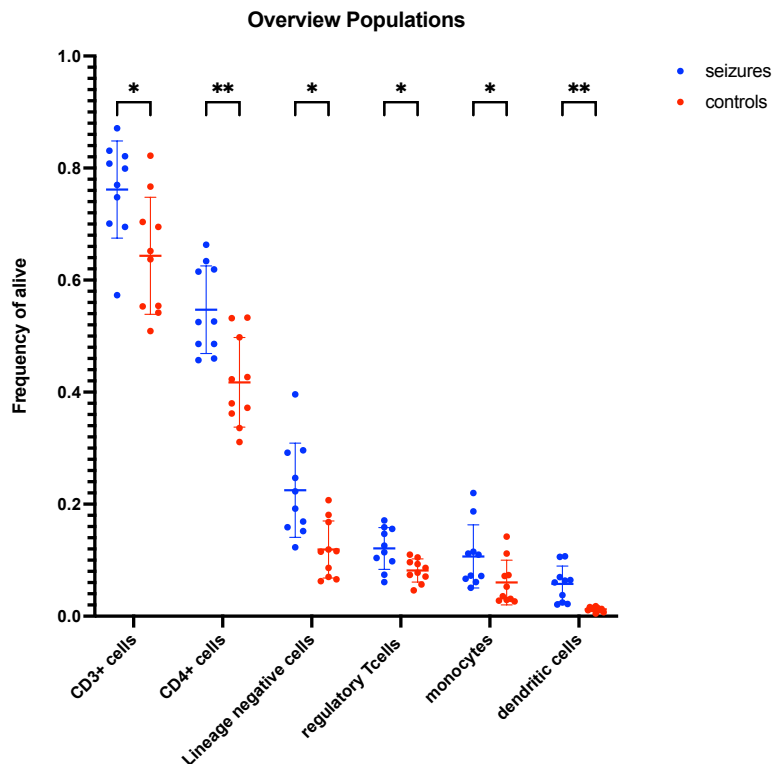


Abbildung 7: Darstellung des Anteils der jeweiligen Zellpopulationen an allen lebend gemessenen Zellen

3. Ergebnisse

3.2.2 T-Zellpopulationen

T-Gedächtniszellen (central memory T cells)

Die Analyse der T-Gedächtniszellen (central memory T cells) zeigte signifikante Unterschiede in der Verteilung der CD28+ und CD28- Subpopulationen zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe. In der Fallgruppe war der Anteil der CD28- Zellen, die typischerweise als weniger funktionsfähig gelten, deutlich erhöht ($p=0,00016$). Im Gegensatz dazu war in der Kontrollgruppe der Anteil an CD28+ Zellen, die als aktivierungsfähiger gelten, überwiegend höher ($p=0,00014$; Abbildung 8). Dieses Muster deutet auf eine reduzierte T-Zellfunktion in der Fallgruppe hin, da CD28 als wichtiger Kostimulationsmarker für die T-Zell-Aktivierung dient.

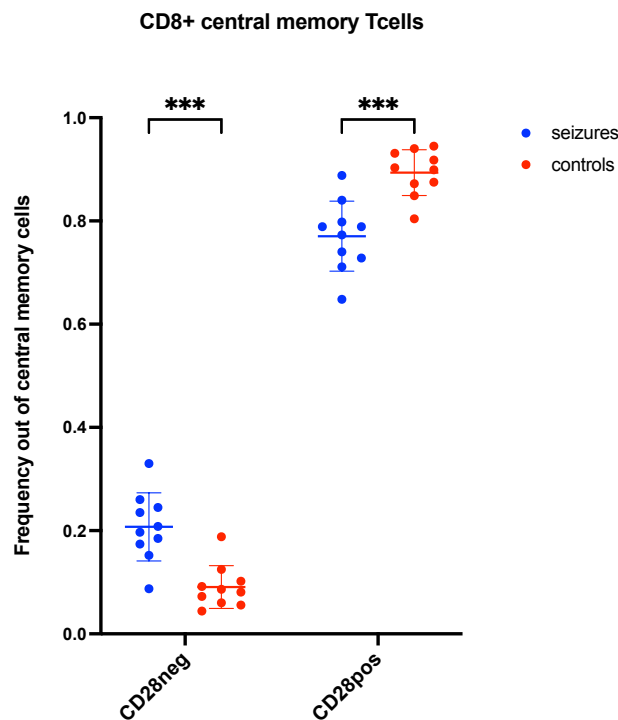


Abbildung 8: Darstellung der Anteile der CD28+ und CD28- T-Gedächtniszellen gemessen an allen T-Gedächtniszellen

3. Ergebnisse

Diese Verteilung konnte auch bei der genaueren Untersuchung der CD8+-T-Gedächtniszellen bestätigt werden. In mehreren Referenzpopulationen war der Anteil der CD8+ CD28- Zellen in der Fallgruppe signifikant höher (p (out of alive)= 0,0033; p (out of CD8)= 0,0024) als in der Kontrollgruppe, was darauf hindeutet, dass CD8+-T-Gedächtniszellen in der Fallgruppe eine abgeschwächte Reaktionsfähigkeit aufweisen könnten (Abbildung 9).

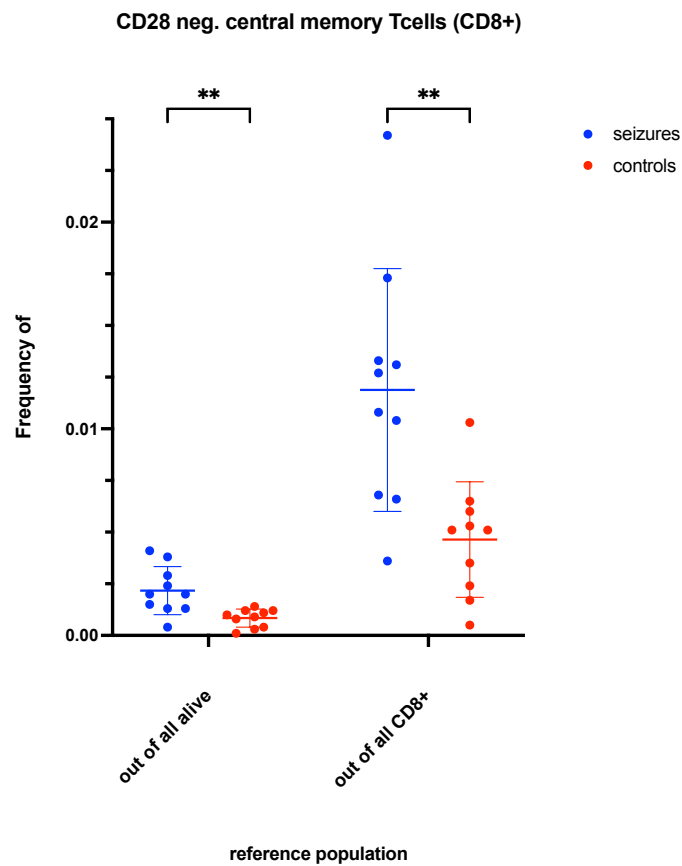


Abbildung 9: Darstellung der Anteile der CD8+CD28- T-Gedächtniszellen an den jeweiligen Bezugspopulationen

3. Ergebnisse

Ein ähnliches Muster wurde auch bei den CD4+-T-Gedächtniszellen festgestellt. Wie Abbildung 10 zeigt, war der Anteil der CD4+ CD28- T-Gedächtniszellen in der Fallgruppe signifikant höher, was darauf hinweist, dass sowohl CD4+- als auch CD8+-T-Gedächtniszellen in der Fallgruppe eine reduzierte Fähigkeit zur Immunaktivierung aufweisen könnten. Diese Unterschiede verdeutlichen eine systemische Reaktion des Immunsystems in der Fallgruppe, bei der sowohl CD4+- als auch CD8+-T-Zellen nach einem epileptischen Anfall eine ähnliche Form der Abschwächung der T-Zell-Aktivierung durchlaufen. (p (out of alive) = 0,0008; p (out of CD4) = 0,0083; p (out of all central memory cells)= 0,0024).

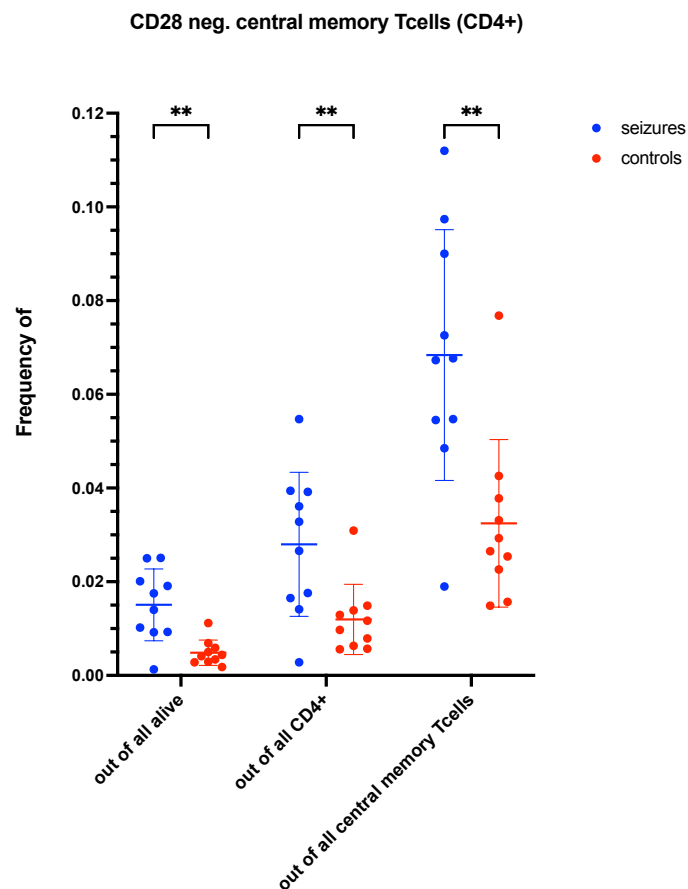


Abbildung 10: Darstellung der Anteile der CD4+ CD28- T-Gedächtniszellen an den jeweiligen Bezugspopulationen

3. Ergebnisse

Eine tiefergehende Betrachtung der Subpopulationen brachte ein signifikantes Ergebnis innerhalb der terminal differenzierten T-Gedächtniszellen (T effector memory cells re-expressing CD45RA) hervor. Es zeigten sich parallelen zu den zuvor erhobenen Daten, denn auch hier waren die CD28- Anteile deutlich höher ($p=0,0008$) als in der Fallgruppe und die CD28+ Anteile in der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p=0,0001$).

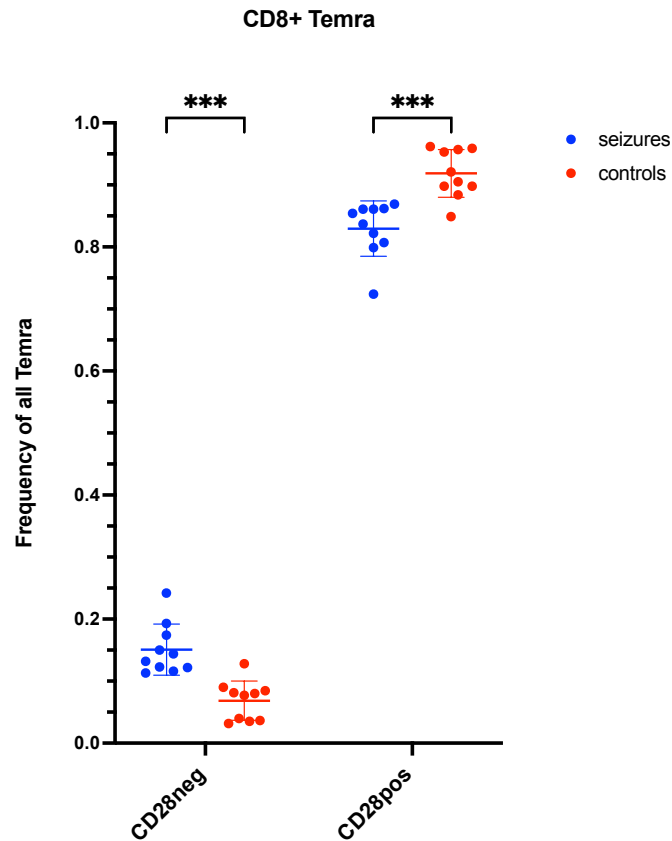


Abbildung 11: Darstellung der Anteile CD28- und CD28+ CD8+- Temra Zellen gemessen an allen Temra Zellen

3. Ergebnisse

Nicht aktivierte T-Zellen (naive Tcells)

Neben den Gedächtniszellen wurden auch die naiven T-Zellen untersucht, um festzustellen, ob Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl bei den CD4+- (p(out of all)= 0,0007; p(out of CD4)= 0,0006; p(out of all naive Tcells)= 0,0159) als auch bei den CD8+-naiven T-Zellen (p(out of all alive)= 0,0001; p(out of CD8)= 0,00008) in der Fallgruppe signifikant höhere Anteile an CD28-Zellen zu finden waren (Abbildung 12). Da naive T-Zellen eine zentrale Rolle in der Primärantwort des Immunsystems spielen, deutet dieser Befund darauf hin, dass die Differenzierung und Reifung dieser Zellen in der Fallgruppe möglicherweise beeinträchtigt ist. Der Verlust von CD28 als wichtiges Kostimulationsmolekül könnte auf eine eingeschränkte Fähigkeit der naiven T-Zellen hinweisen, eine adäquate Immunantwort zu initiieren. Somit zeigte sich, dass nicht nur die Gedächtniszellen, sondern auch die naiven T-Zellen von einer postiktalen Modulation betroffen sind.

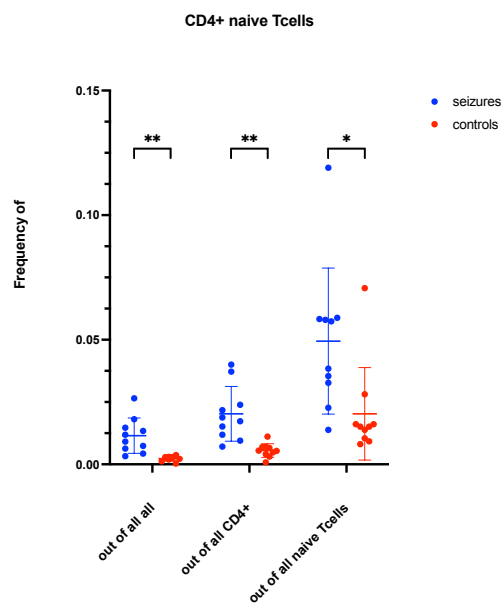


Abbildung 12: Darstellung der Anteile an CD4+ (links) und CD8+ (rechts) naiven T-Zellen an unterschiedlichen Referenzpopulationen

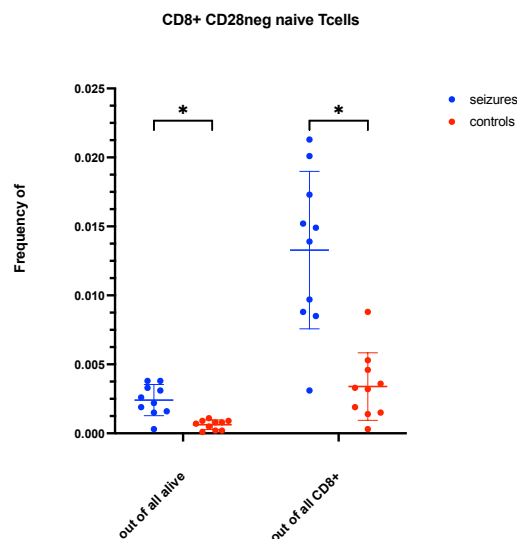


Abbildung 13: Darstellung der Anteile der CD28- T-Gedächtniszellen gemessen an den angegebenen Referenzpopulationen

3. Ergebnisse

TIGIT T-Zellen

TIGIT-exprimierende T-Zellen, die eine regulatorische Funktion im Immunsystem ausüben, zeigten ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. In der Fallgruppe war der Anteil der TIGIT-exprimierenden CD4⁺- (p(out of alive)= 0,0185; p(out of CD4)= 0,0003) und CD8⁺-T-Zellen (p(out of alive)= 0,0002; p(out of CD8) = 0,00002) signifikant reduziert (Abbildungen 14 und 15). TIGIT spielt eine Schlüsselrolle bei der Hemmung übermäßiger Immunantworten und fördert die Toleranz. Die verminderte Expression von TIGIT in der Fallgruppe könnte auf eine gestörte Immunregulation hindeuten, was möglicherweise zu einer geringeren Kontrolle über entzündliche Prozesse führt.

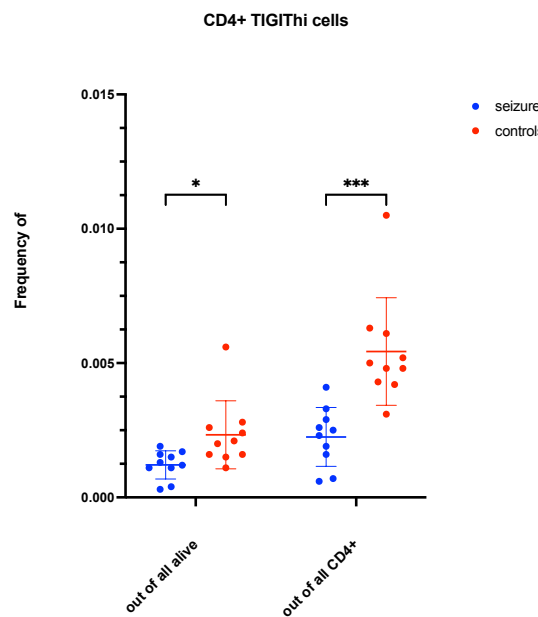


Abbildung 14: Darstellung der Anteile an CD4⁺ TIGIT⁺ exprimierenden T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

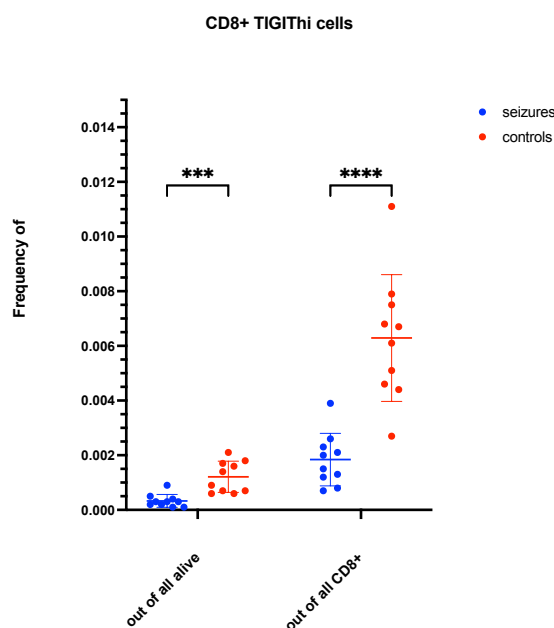


Abbildung 15: Darstellung der Anteile der CD8⁺ TIGIT⁺ exprimierenden T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

3. Ergebnisse

Regulatorische T-Zellen

Die Untersuchung der regulatorischen T-Zellen (Tregs), die durch den FoxP3-Marker identifiziert wurden und eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase spielen, ergab interessante Ergebnisse. In der Fallgruppe waren signifikant höhere Anteile von CD4+-regulatorischen T-Zellen vorhanden (Abbildung 16; p (out of alive)= 0,0203, p (out of CD4)= 0,0295). Tregs sind entscheidend für die Unterdrückung überschießender Immunantworten, und ihre erhöhte Präsenz in der Fallgruppe könnte auf eine adaptive Reaktion des Immunsystems hinweisen, die versucht, übermäßige Entzündungen nach einem epileptischen Anfall zu kontrollieren.

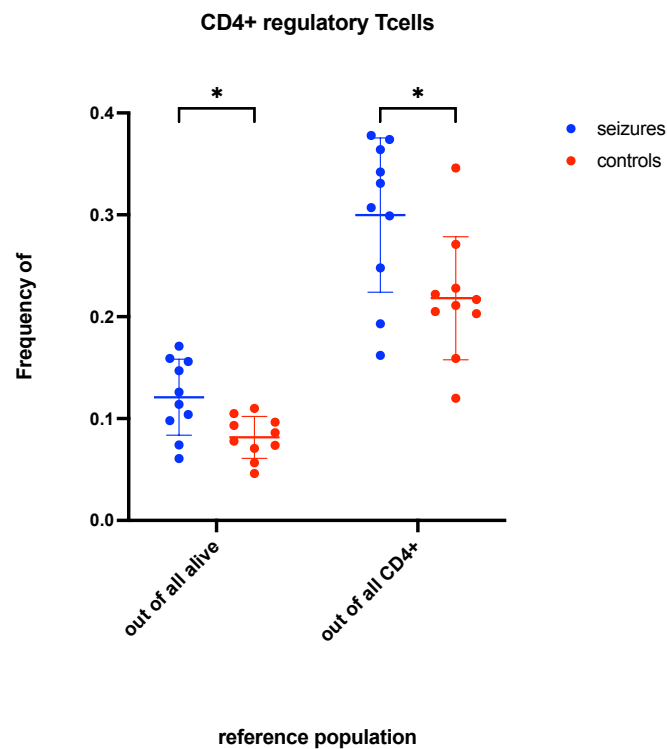


Abbildung 16: Darstellung der Anteile der CD4+ regulatorischen T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen.

3.2.3 Erschöpfte T-Zellen (exhausted T cells)

Exhausted T-Zellen sind eine spezifische Subpopulation von T-Zellen, die während chronischer Infektionen oder im Tumormikromilieu aufgrund anhaltender Antigenstimulation ihre volle Funktionsfähigkeit verlieren. Sie zeichnen sich durch eine eingeschränkte Proliferation, reduzierte Zytokinproduktion und eine verminderte zytotoxische Aktivität aus. Charakteristisch für erschöpfte T-Zellen ist die Überexpression von inhibitorischen Rezeptoren, wie Tim-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3) und Lag-3 (Lymphocyte-activation gene 3). Diese Moleküle tragen zur Dysfunktion der Zellen bei, indem sie Signale vermitteln, die die T-Zell-Aktivität dämpfen und so die Immunantwort gegen persistierende Antigene hemmen. Therapeutische Ansätze, die auf die Blockade dieser inhibitorischen Signale abzielen, werden intensiv erforscht, um die Immunfunktion erschöpfter T-Zellen wiederherzustellen und eine effektive Immunantwort zu fördern.

Tim3+ T-Zellen

Bei der Analyse der Tim3+-exprimierenden T-Zellen, die als Marker für erschöpfte T-Zellen dienen, wurden sowohl in der CD4+- als auch in der CD8+-T-Zellpopulation signifikant erhöhte Werte festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass in beiden Zellpopulationen eine verstärkte Expression von Tim3+ auftritt, was auf einen erschöpften Zustand der Zellen hindeutet. Ein weiterer Vergleich der T-Zell-Subpopulationen zwischen den beiden untersuchten Kohorten zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied im Anteil der Tim3-positiven T-Zellen an der Gesamtpopulation ($p = 0,0086$). Wie in Abbildung 17 ersichtlich, lag der durchschnittliche Anteil der Tim3-positiven CD4+-T-Zellen an der Gesamtpopulation in der Anfallsgruppe bei 13,37 %, während dieser Anteil in der Kontrollgruppe mit 8,29 % deutlich geringer war. Dies verdeutlicht eine klare Tendenz zu einer erhöhten Präsenz erschöpfter T-Zellen in der Anfallsgruppe.

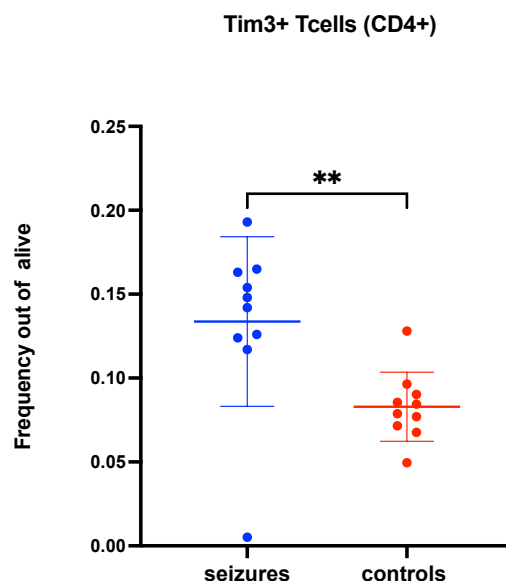


Abbildung 17: Darstellung der Anteile an CD4+ Tim3 exprimierenden T-Zellen an allen lebenden Zellen

3. Ergebnisse

Besonders auffällig war der Anteil der CD8⁺ Tim3⁺ T-Zellen, der in der Fallgruppe mit einem Mittelwert von 31,48 % einen deutlich höheren Wert erreichte als in der Kontrollgruppe, in der dieser Anteil bei 24,07 % lag. Auch hier konnte ein signifikantes Ergebnis erzielt werden, mit einem ($p = 0,0015$). Diese Unterschiede unterstreichen die Bedeutung von Tim3 als Marker für die Erschöpfung von T-Zellen in verschiedenen Zelltypen und geben Aufschluss über die Veränderungen in der Immunzellpopulation zwischen den untersuchten Gruppen.

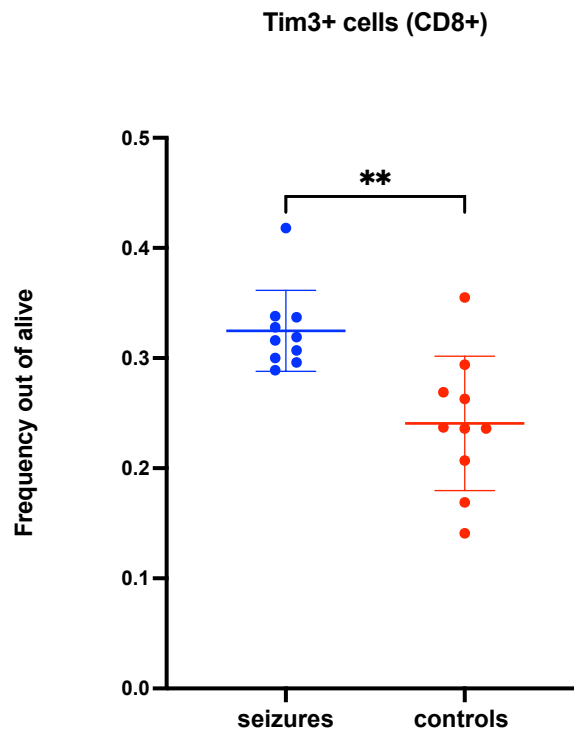


Abbildung 18: Darstellung der Anteile an CD8⁺ Tim3⁺ exprimierenden T-Zellen an allen lebenden Zellen

3. Ergebnisse

Lag3+ T-Zellen

Für den Marker Lag3, der ebenfalls auf erschöpften T-Zellen exprimiert wird, konnten parallele Ergebnisse zu den Tim3+-Zellen beobachtet werden. In der Fallgruppe zeigten sich signifikant erhöhte Anteile von Lag3+-T-Zellen, sowohl in der CD4+- ($p=0,045$) als auch in der CD8+-Zellpopulation ($p=0,006$). Diese konsistenten Ergebnisse über beide Zellpopulationen hinweg weisen darauf hin, dass Lag3 neben Tim3 als weiterer wichtiger Marker für die Erschöpfung von T-Zellen in Betracht gezogen werden kann. Die erhöhten Anteile von Lag3+-Zellen in der Fallgruppe deuten darauf hin, dass dieser Marker ebenfalls eine zentrale Rolle im Verständnis der Erschöpfung von T-Zellen spielt.

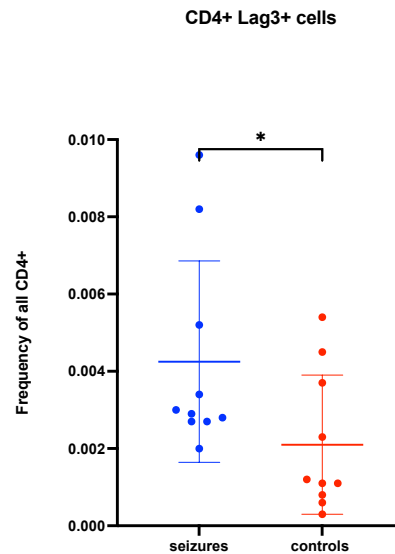


Abbildung 19: Darstellung der Anteile an CD4+ Lag3 exprimierenden T-Zellen an allen CD4+

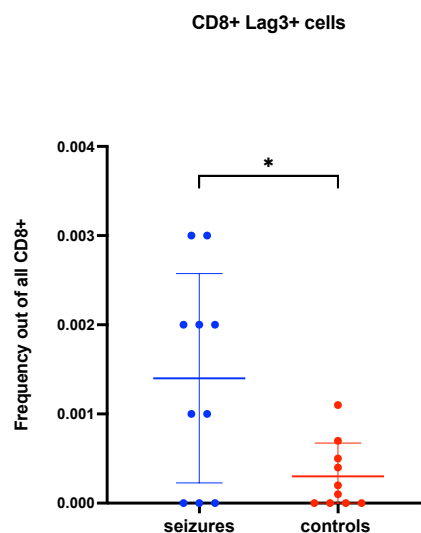


Abbildung 20: Darstellung der Anteile an CD4+ Lag3 exprimierenden T-Zellen an allen CD8+

3. Ergebnisse

3.2.4 Immunregulation und Aktivierung

CTLA-4 + T-Zellen

Der vielseitige Marker CTLA4, der eine Schlüsselrolle in der Immunregulation und bei der Aufrechterhaltung der Toleranz des Immunsystems spielt, zeigte hingegen überwiegend in der Kontrollgruppe höhere Anteile. Abbildung 21 illustriert, dass der Anteil der CTLA4⁺-CD4⁺-T-Zellen an allen lebenden Zellen in der Kontrollgruppe signifikant höher ($p=0,005$) war als in der Fallgruppe. Dies deutet auf unterschiedliche Mechanismen der Immunregulation zwischen den beiden Gruppen hin, wobei in der Kontrollgruppe eine höhere Expression von CTLA4 möglicherweise auf eine stärkere immunregulatorische Aktivität schließen lässt.

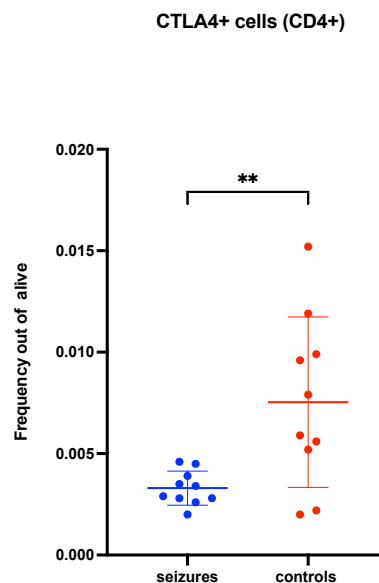


Abbildung 21: Darstellung der Anteile an CD4⁺ CTLA4 exprimierenden T-Zellen an allen lebenden Zellen

3. Ergebnisse

Darüber hinaus konnten für die CD8+ CTLA4+-T-Zellen sogar in zwei Referenzpopulationen signifikante Unterschiede festgestellt werden. Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, wurde sowohl in Bezug auf alle lebenden Zellen als auch innerhalb der CD8+-Population ein signifikanter Unterschied ermittelt ($p = 0,013$). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von CTLA4 in der Immunantwort und heben hervor, dass Unterschiede in der Expression dieses Markers zwischen den Kohorten bestehen, die möglicherweise zu den beobachteten Veränderungen in der Immunzellfunktion beitragen.

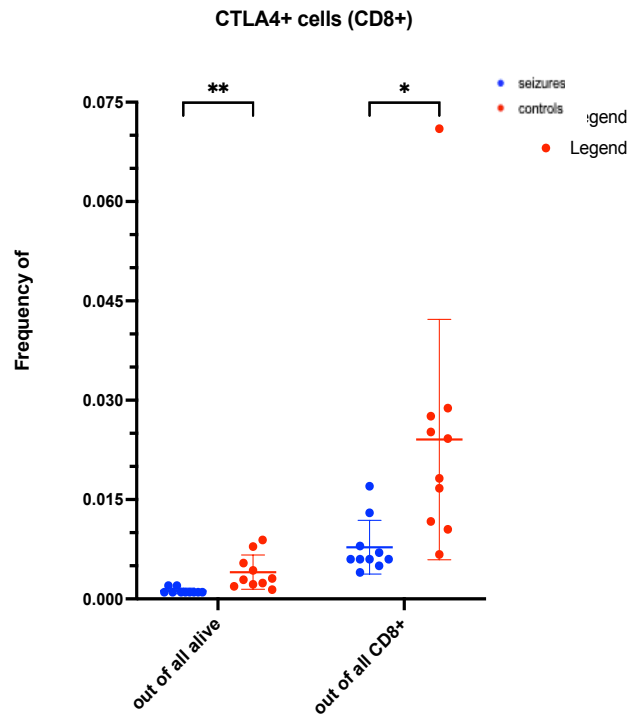


Abbildung 22: Darstellung der Anteile an CD8+ CTLA4 exprimierenden T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

T-Helferzellen

In einem weiteren Panel wurden die T-Helferzellen mittels FACS analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Anteil der Th2-Zellen, bezogen auf alle lebenden Zellen, in der Fallgruppe signifikant erniedrigt war (Abb. 23; $p = 0,032$). Dies weist auf eine deutliche Verschiebung in der Zusammensetzung der T-Helferzell-Populationen hin, die möglicherweise auf immunologische Veränderungen innerhalb der Fallgruppe hindeutet.

Zusätzlich verdeutlicht Abbildung 23 den Anteil der Th9-Zellen an der Gesamtheit der lebenden Zellen. Hier zeigte sich ein klarer Unterschied zwischen den Gruppen, wobei der Anteil der Th9-Zellen in der Fallgruppe signifikant höher war als in der gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,018$). Dies könnte auf eine veränderte Differenzierung der T-Helferzellen innerhalb der Fallgruppe hinweisen und unterstreicht die Rolle der Th9-Zellen in dieser spezifischen immunologischen Situation.

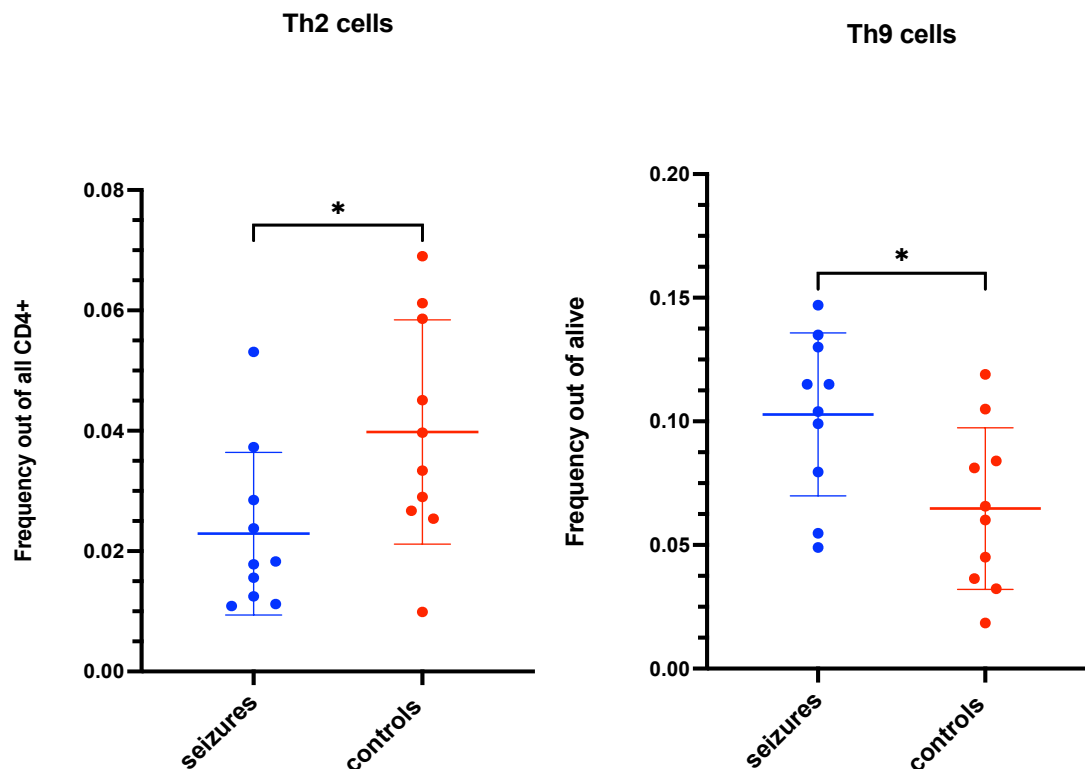


Abbildung 23: Darstellung der Anteile an Th2-Zellen exprimierenden T-Zellen an allen CD4+ Zellen (links) sowie Darstellung der Anteile an Th9-Zellen exprimierenden T-Zellen an allen lebenden Zellen (rechts)

3. Ergebnisse

3.2.5 Myeloide Zellen

Monozyten

Wie bereits eingangs erwähnt, konnte auch bei den Monozyten ein signifikanter Unterschied im Anteil an allen lebenden Zellen festgestellt werden. Abbildung 24 veranschaulicht diesen Unterschied grafisch, wobei deutlich wird, dass die Fallgruppe signifikant höhere Anteile der Monozyten aufwies ($p=0,0093$). Um die Robustheit dieser Ergebnisse weiter zu bestätigen, wurde eine zusätzliche Messung derselben Monozyten in einem separaten FACS-Panel durchgeführt, wie in Abbildung 25 dargestellt ($p=0,0098$). Diese Darstellung dient der Validierung der ursprünglichen Ergebnisse.

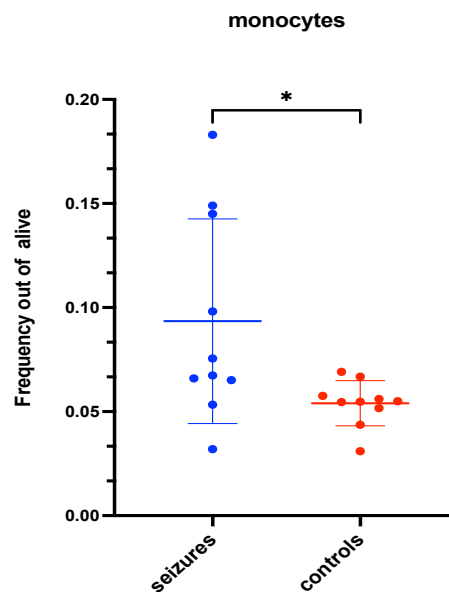


Abbildung 24: Darstellung der Anteile der Monozyten an allen lebenden Zellen

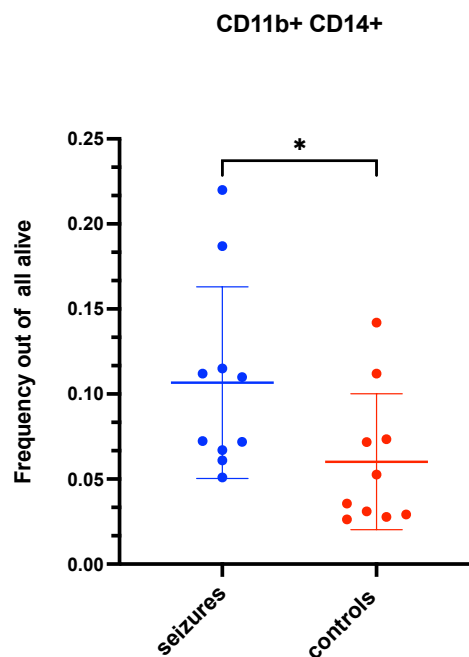


Abbildung 25: Darstellung der Anteile der Monozyten (CD11b+ CD14+) an allen lebenden Zellen

3. Ergebnisse

Eine weiterführende Analyse offenbarte zusätzlich Unterschiede in den Subpopulationen der Monozyten. In einem weiteren Panel wurden sowohl klassische Monozyten (CD14++ CD16-) als auch nicht-klassische Monozyten (CD14+ CD16++) näher untersucht. Abbildung 26 zeigt die Anteile dieser Subpopulationen, gemessen an allen CD14+-Zellen, und verdeutlicht, dass die Fallgruppe signifikant höhere Anteile an klassischen Monozyten aufwies ($p=0,010$). Im Gegensatz dazu waren die Anteile der nicht-klassischen Monozyten in der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p=0,0134$). Auch diese Analyse wurde zur Validierung in zwei verschiedenen Panels durchgeführt, wobei die Ergebnisse im TBNK-Panel in Abbildung 27 ebenfalls eine Übereinstimmung der Daten zeigten.

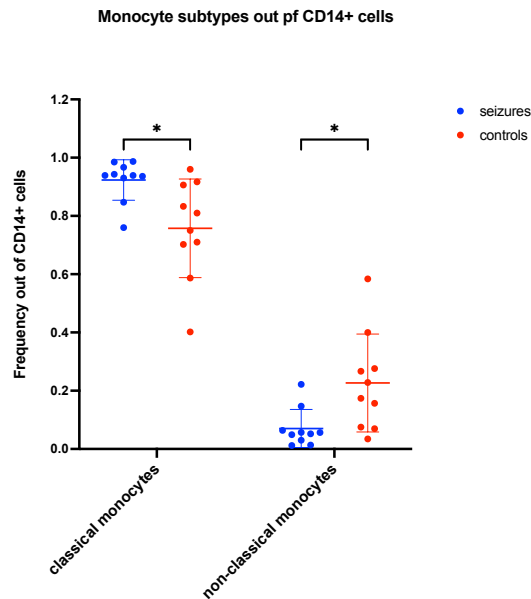


Abbildung 26: Darstellung der Anteile der Monozytensubpopulationen MDSC-Panel

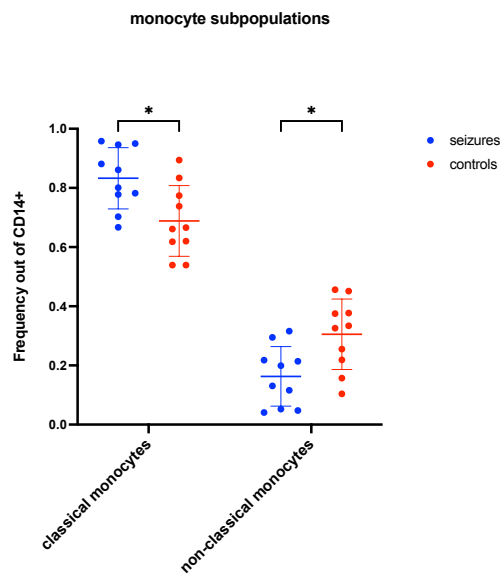


Abbildung 27: Darstellung der Anteile der Monozytensubpopulationen im TBNK-Panel

3. Ergebnisse

Des Weiteren zeigte sich bei den klassischen Monozyten, auch in Relation zu allen als lebend detektierten Zellen, ein signifikanter Unterschied. Der Anteil klassischer Monozyten war in der Fallgruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,0054$), wie in Abbildung 28 ersichtlich. Diese Ergebnisse unterstreichen die relevanten Unterschiede in der Monozyten-Population zwischen den untersuchten Gruppen und heben die potenziellen immunologischen Unterschiede hervor.

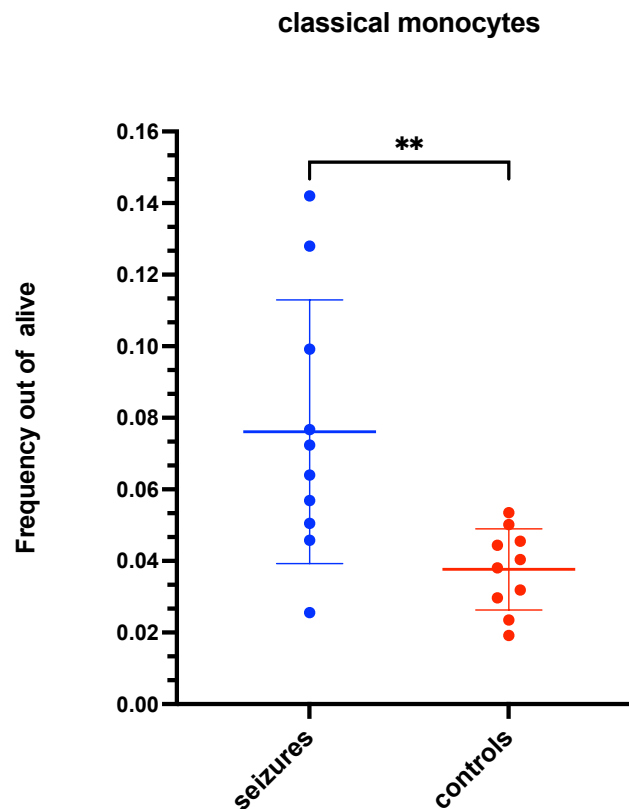


Abbildung 28: Darstellung der Anteile der klassischen Monozyten an allen lebenden Zellen

Neutrophile Granulozyten

Die Identifikation dieser Zellreihe wurde durch die Analyse der Expression von CD11b und CD15 auf derselben Zelloberfläche ermöglicht. Abbildung 29 zeigt die Anteile der Neutrophilen, gemessen an allen lebenden Zellen. Auch in diesem Fall konnten signifikant höhere Werte in der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden ($p = 0,0173$). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Unterschiede in der Neutrophilen-Population zwischen den Gruppen und unterstreichen die Relevanz dieser Zellreihe für die untersuchte Fragestellung.

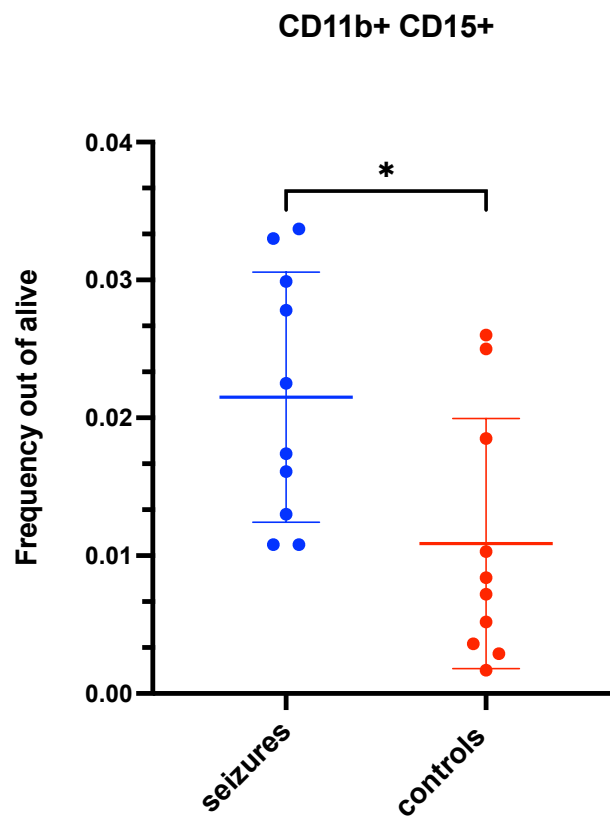


Abbildung 29:: Darstellung der Anteile der Neutrophilen an allen lebenden Zellen

3. Ergebnisse

MDSC (myeloid derived suppressor cells)

Die Identifikation dieser Zellen erfolgte durch die gleichzeitige Expression von CD11b und CD33 im entsprechenden Panel. Die Analyse ergab, dass der Anteil dieser Zellen in der Fallgruppe signifikant höher war ($p=0,032$). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der simultanen Expression von CD11b und CD33 für die Charakterisierung dieser Zellpopulation und deren Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

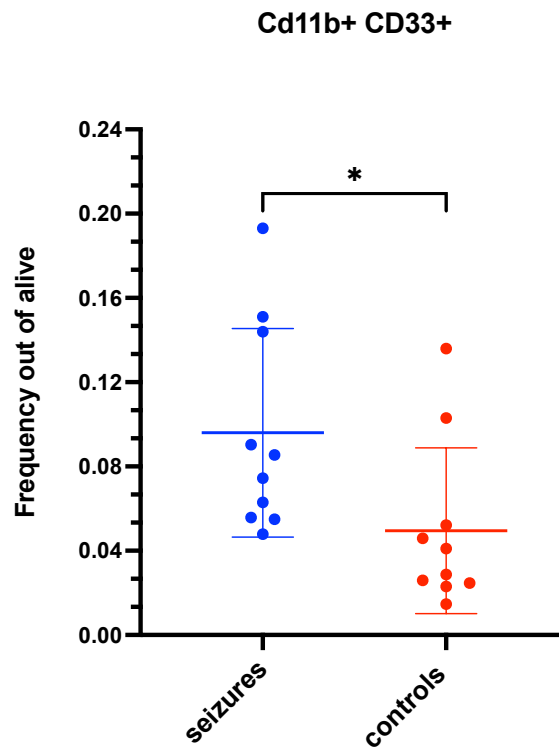


Abbildung 30: Darstellung der Anteile der MDSC an allen lebenden Zellen

Dendritische Zellen

Mittels des MDSC-Panels konnten verschiedene signifikante Ergebnisse für die dendritischen Zellen in Bezug auf ihre unterschiedlichen Subpopulationen ermittelt werden. Abbildung 31 veranschaulicht die Anteile der dendritischen Zellen, dargestellt in Relation zu den auf der x-Achse aufgeführten Subpopulationen. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch die verschiedenen Signifikanzniveaus (p (out of alive)= 0,0003; p (out of CD11b+)= 0,0071; p (out of all Lin-)= 0,0089) gekennzeichnet, was die Relevanz dieser Subpopulationen für die Analyse unterstreicht.

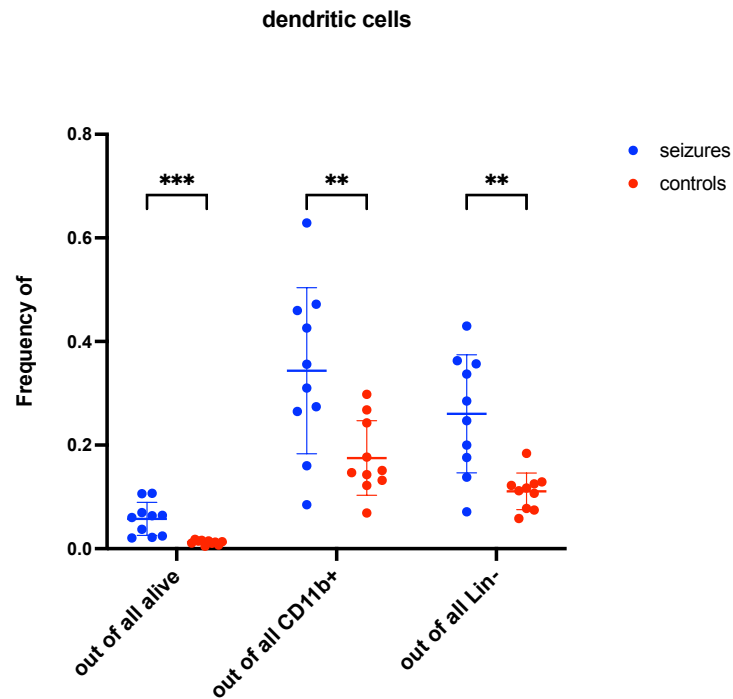


Abbildung 31: Darstellung der Anteile der dendritischen Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

3. Ergebnisse

3.2.6 Zusammenfassung der Immunologischen Veränderungen in T- und Myeloid-Zellpopulationen

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen deutliche immunologische Unterschiede zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe, insbesondere in den T-Zellpopulationen und den myeloiden Zellen. In der Fallgruppe ist eine signifikante Verschiebung hin zu weniger funktionsfähigen T-Zellen zu erkennen, wie die erhöhten Anteile an CD28- T-Gedächtniszellen sowie naiven T-Zellen belegen. Dies deutet auf eine abgeschwächte Immunaktivierung und Differenzierung hin, was möglicherweise zu einer ineffizienten Immunantwort beiträgt.

Darüber hinaus wurde in der Fallgruppe eine Reduktion regulatorischer Marker wie TIGIT beobachtet, was auf eine gestörte Immunregulation hindeutet. Gleichzeitig war der Anteil an erschöpften T-Zellen, markiert durch Tim3 und Lag3, in der Fallgruppe signifikant erhöht, was auf eine chronische Aktivierung und Erschöpfung des Immunsystems schließen lässt. Die unterschiedlichen Anteile an CTLA4-exprimierenden Zellen zwischen den Gruppen unterstreichen zudem die Unterschiede in der Immunregulation und Toleranz.

In den myeloiden Zellen zeigte sich, dass Monozyten und Neutrophile in der Fallgruppe vermehrt vorkommen, was auf eine verstärkte Aktivierung der angeborenen Immunantwort hinweist. Gleichzeitig war der Anteil an myeloischen Suppressorzellen (MDSCs) in der Fallgruppe erhöht, was auf eine potenziell unterdrückte adaptive Immunantwort hindeutet. Diese Verschiebungen in den Zellpopulationen deuten darauf hin, dass die Fallgruppe sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunantwort dysreguliert ist.

Insgesamt weisen diese Ergebnisse auf ein komplexes Zusammenspiel zwischen der Erschöpfung, der Dysregulation und der verstärkten Aktivierung der Immunzellen in der Fallgruppe hin, was möglicherweise zur pathophysiologischen Entwicklung und dem Fortschreiten der Erkrankung beiträgt.

3.2.7 Stimulierte Panels

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der FACS-Analyse für Zellen nach Stimulation beschrieben. Die Stimulation von Immunzellen dient dazu, ihre Aktivierung und Reaktion auf bestimmte Signale zu untersuchen, was Aufschluss über ihre Funktionalität und ihr Verhalten in unterschiedlichen Zuständen gibt. Besonders relevant sind hierbei die signifikanten Unterschiede in der Zellzusammensetzung und Expression von Oberflächenmarkern vor und nach der Stimulation. Außerdem wird der Vergleich der durch die Stimulation ausgelösten Veränderungen zwischen den untersuchten Gruppen hervorgehoben.

CD4+ T-Zellen

Innerhalb des bereits beschriebenen Lymphozyten-Gates zeigte sich nach der Stimulation ein signifikant erhöhter Anteil der CD4+-Zellen in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Fallgruppe ($p = 0,0483$). Interessanterweise konnte hierbei keine Korrelation zu äußeren Faktoren wie Entnahmezeitpunkt, Alter oder CK-Wert festgestellt werden. Ein weiteres bemerkenswertes Ergebnis ist, dass es in der Kontrollgruppe nach der Stimulation zu einer Verringerung der CD4-Oberflächenmerkmalexpression kam. Dieser Effekt war in der Fallgruppe nicht zu beobachten. Im Gegenteil, in der Fallgruppe stieg die Expression im Durchschnitt sogar an, was sich statistisch als signifikant herausstellte ($p = 0,0026$). Diese Beobachtungen verdeutlichen die Unterschiede in der Reaktion auf die Stimulation zwischen den beiden Gruppen und liefern wertvolle Hinweise auf mögliche Mechanismen der Immunantwort.

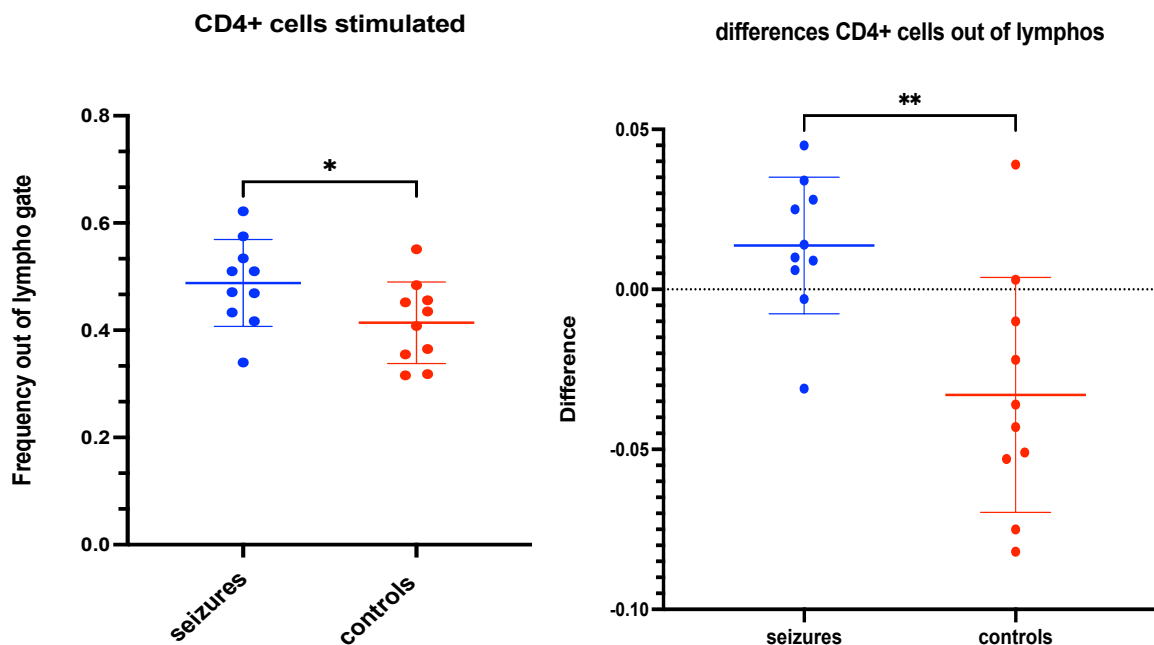


Abbildung 32: Darstellung der Anteile der CD4+ T-Zellen gemessen an allen Lympho-Gate Zellen (links) sowie die Darstellung der Differenzen der CD4+ T-Zellen nach Stimulation an allen Lympho-Gate Zellen (rechts)

Chemo und Zytokine

Interferon- γ

In der stimulierten CD4+-Zellpopulation wurde eine signifikante Erhöhung des Anteils an Interferon- γ (IFN- γ) exprimierenden Zellen in der Fallgruppe festgestellt. Diese Zunahme zeigte sich sowohl in Bezug auf die CD4+-Zellen als auch in der Gesamtpopulation aller Zellen, die durch das Lymphozyten-Gate erfasst wurden (Abb. 33; $p(\text{out of CD4}) = 0,0022$; $p(\text{out of lymphos}) = 0,0019$). IFN- γ , ein Schlüsselfaktor in der Aktivierung von Makrophagen und der Regulierung der adaptiven Immunantwort, ist ein entscheidender Marker für die Aktivierung von T-Helferzellen des Typs Th1. Seine erhöhte Expression weist auf eine verstärkte proinflammatorische Aktivität hin, die insbesondere bei entzündlichen oder immunologischen Prozessen eine zentrale Rolle spielt.

Die Abbildungen verdeutlichen, dass der Anteil der IFN- γ -exprimierenden Zellen in der Fallgruppe signifikant höher war als in der Kontrollgruppe. Dies deutet auf eine verstärkte zelluläre Immunantwort in der Fallgruppe hin, was möglicherweise auf eine spezifische Aktivierung der CD4+-Zellen bei diesen Patienten zurückzuführen ist.

In Abbildung 33 sind die signifikanten Unterschiede in den Veränderungen der IFN- γ -Expression vor und nach der Stimulation dargestellt. Hier zeigt sich deutlich, dass die Expression von IFN- γ in der Fallgruppe nach der Stimulation sowohl bei den CD4+-Zellen als auch bei den durch das Lymphozyten-Gate erfassten Zellen signifikant stärker Anstieg als in der Kontrollgruppe ($p(\text{out of CD4}) = 0,0022$; $p(\text{out of lymphos}) = 0,0018$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zellen der Fallgruppe auf die Stimulation mit einer insgesamt stärkeren Reaktion antworten, was auf eine erhöhte Aktivität der zellulären Immunantwort in dieser Gruppe hindeutet.

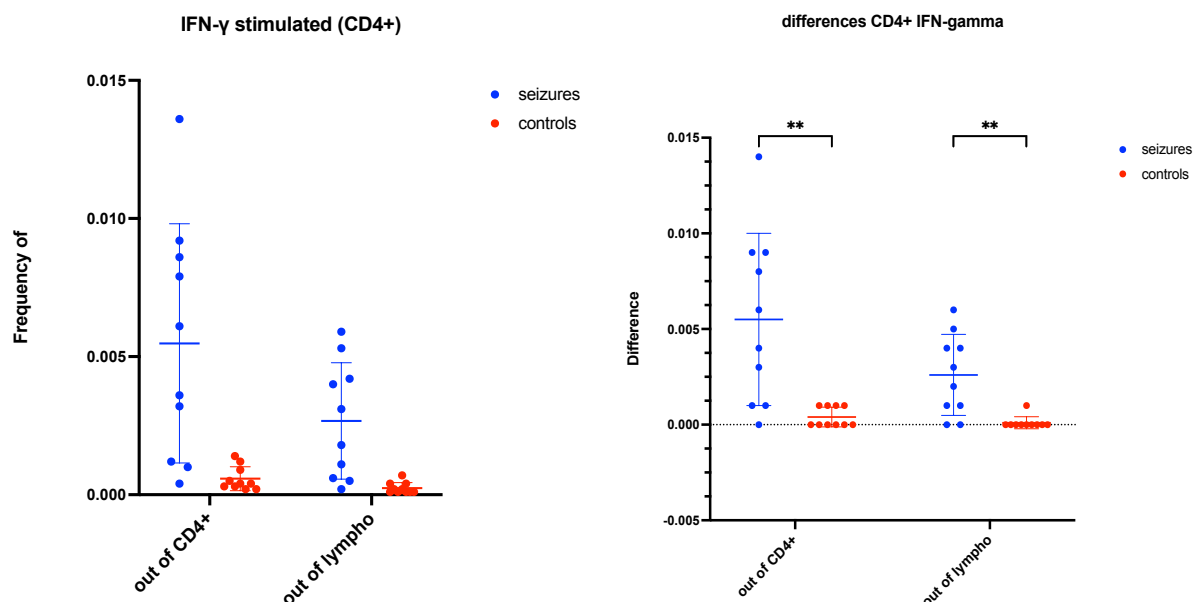


Abbildung 33: Darstellung der Anteile der stimulierten IFN-gamma exprimierenden CD4+ T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen (links) sowie die Darstellung der Differenzen der IFN-gamma exprimierenden CD4+ T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen (rechts)

3. Ergebnisse

Ein ähnliches Muster konnte auch bei den CD8+-IFN- γ -exprimierenden Zellen beobachtet werden, jedoch war die statistische Signifikanz in diesem Fall geringer ($p(\text{out of CD8}) = 0,0106$; $p(\text{out of lympho}) = 0,0331$). Auch hier war der Anstieg der IFN- γ -Expression in der Fallgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p(\text{out of CD8}) = 0,0215$; $p(\text{out of lympho}) = 0,04984$). Dies deutet darauf hin, dass nicht nur CD4+-T-Zellen, sondern auch CD8+-T-Zellen in der Fallgruppe verstärkt aktiviert wurden.

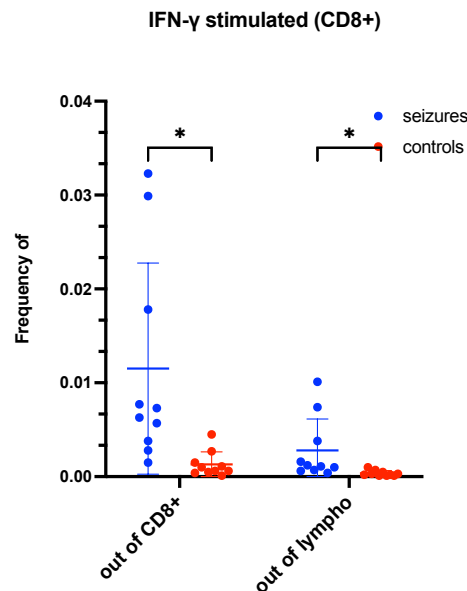


Abbildung 34: Darstellung der Anteile der stimulierten IFN-gamma exprimierenden CD8+ T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

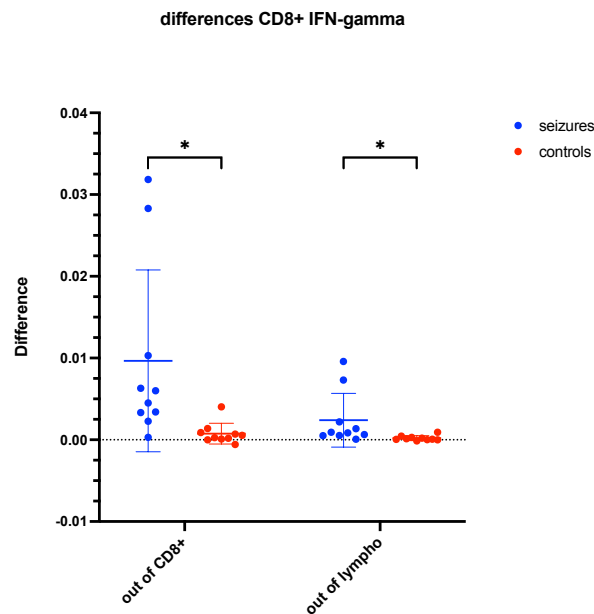


Abbildung 35: Darstellung der Differenzen der IFN-gamma exprimierenden CD8+ T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

3. Ergebnisse

Im Gegensatz dazu konnte für die CD4- CD8- Zellen nur in Bezug auf die gesamte Zellpopulation, die durch das Lymphozyten-Gate erfasst wurde, eine relevante Erhöhung der IFN- γ -Expression festgestellt werden ($p= 0,0030$). Allerdings zeigte sich hier kein signifikanter Anstieg der Expression durch die Stimulation, was darauf hindeutet, dass diese Zellpopulation in ihrer Reaktion auf die Stimulation weniger stark ausgeprägt war.

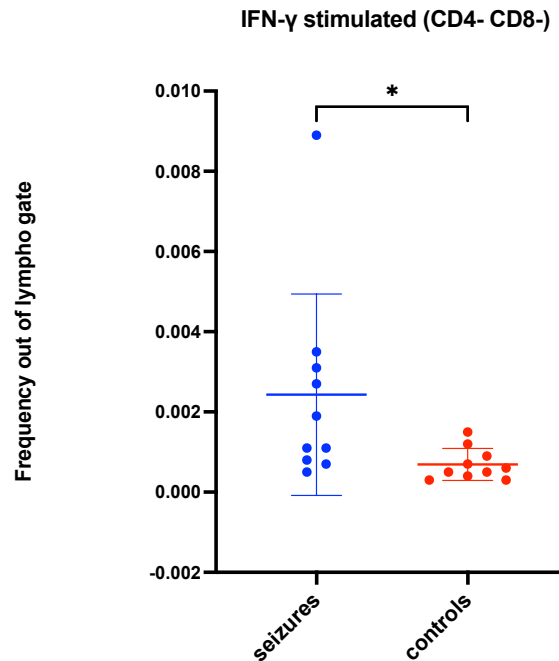


Abbildung 36: Darstellung der Anteile der stimulierten IFN-gamma exprimierenden CD8+ T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

TNF-alpha

Darüber hinaus wurden die T-Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Reaktion auf TNF- α -Expression nach Stimulation untersucht, um potenziell bereits erfolgtes Priming der Zellen darzustellen. TNF- α ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, das an der Regulierung von Immunantworten beteiligt ist. In Abbildung 37 wird der Anteil der TNF- α -exprimierenden stimulierten Zellen innerhalb der CD4⁺-T-Zellpopulation gezeigt. Es zeigte sich, dass dieser Anteil in der Fallgruppe höher war als bei den gesunden Kontrollpatienten, was auf eine gesteigerte Aktivierung dieser Zellen in der Fallgruppe hinweist ($p = 0,0330$).

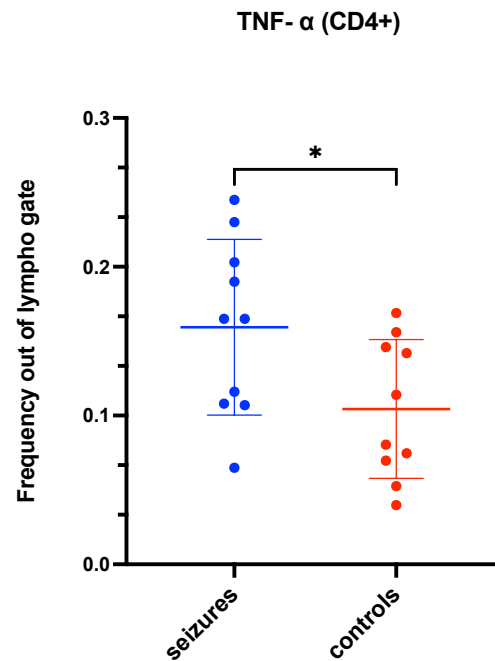


Abbildung 37: Darstellung der Anteile der stimulierten TNF-alpha exprimierenden CD4⁺ T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

3. Ergebnisse

Um die unterschiedliche Reaktivität der Zellen zwischen den Gruppen genauer zu bewerten, wurden die Differenzen zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen in beiden Gruppen verglichen und mittels t-Test statistisch untersucht. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Abbildung 38 dargestellt. Der Anstieg der TNF- α -Expression nach Stimulation war in der Fallgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,0283$), was eine erhöhte Reaktionsfähigkeit der CD4+-Zellen in der Fallgruppe nahelegt.

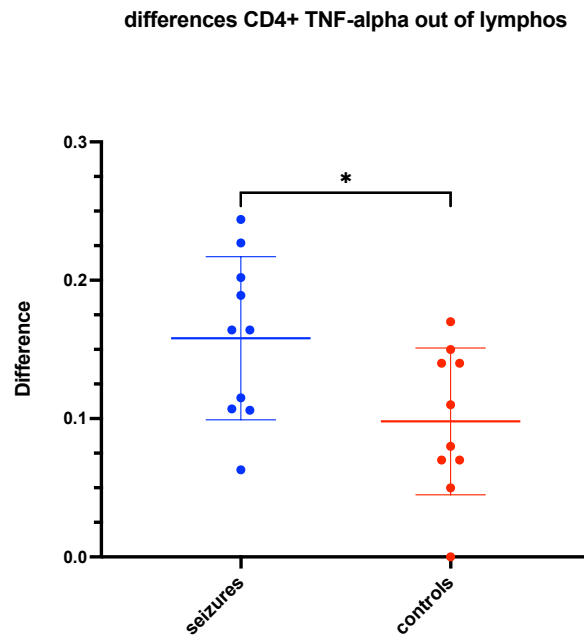


Abbildung 38: Darstellung der Differenzen der TNF-alpha exprimierenden CD4+ T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

3. Ergebnisse

Ähnlich wie bei den Ergebnissen für IFN- γ konnte auch für TNF- α eine signifikante Reaktion in der CD8+-T-Zellpopulation festgestellt werden. Abbildung 39 veranschaulicht den deutlich stärkeren Anstieg der TNF- α -Expression zwischen dem Nativzustand und der Stimulation in der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p= 0,0097$). Diese signifikanten Unterschiede weisen darauf hin, dass CD8+-Zellen in der Fallgruppe ebenfalls eine verstärkte proinflammatorische Reaktion auf die Stimulation zeigten.

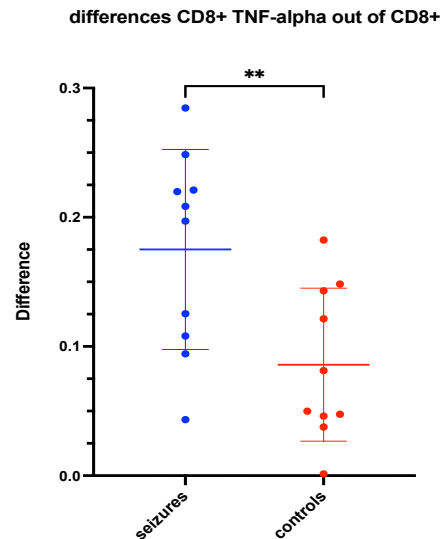


Abbildung 39: Darstellung der Anteile der stimulierten TNF-alpha exprimierenden CD8+ T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

Auch die CD4- CD8- T-Zellen, die keiner der klassischen T-Zellpopulationen angehören, reagierten bei den Patienten in der Fallgruppe signifikant anders auf die Stimulation als in der Kontrollgruppe. Wie in Abbildung 40 zu erkennen ist, war der Unterschied in der TNF- α -Expression in dieser Zellpopulation hoch signifikant ($p= 0,0002$), was auf eine stark unterschiedliche Reaktivität dieser Zellpopulationen in der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe hinweist.

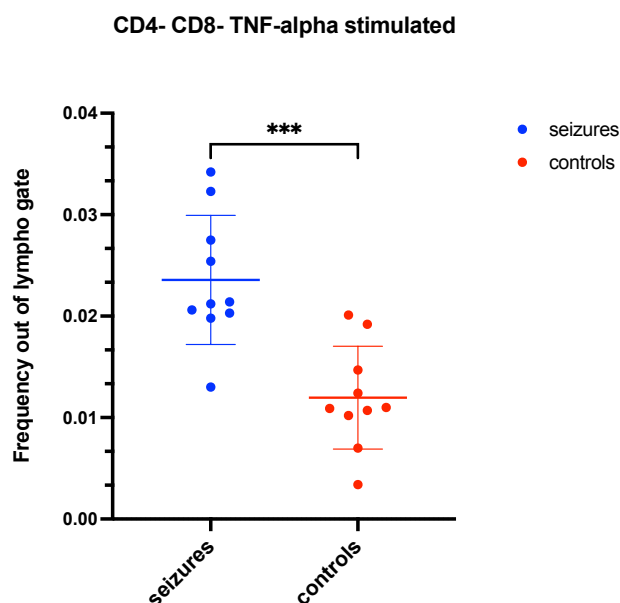


Abbildung 40: Darstellung der Anteile der stimulierten TNF-alpha exprimierenden CD4- CD8- T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

3. Ergebnisse

Antiinflammatorisches Zytokin: IL-10

Interleukin-10 (IL-10) ist als potentes antiinflammatorisches Zytokin bekannt, das eine Schlüsselrolle bei der Hemmung übermäßiger Immunantworten spielt. In der vorliegenden Analyse zeigte die Fallgruppe jedoch deutlich niedrigere IL-10-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, sowohl in der CD4⁺-T-Zellpopulation ($p=0,114$) als auch im gesamten Lymphozyten-Gate ($p=0,0138$). Obwohl beide Gruppen nach der Stimulation eine Erhöhung der IL-10-Expression aufwiesen, blieben die Werte der Kontrollpatienten signifikant höher. Betrachtet man die beiden Gruppen getrennt, zeigte sich in beiden Populationen ein signifikanter Anstieg nach Stimulation ($p(\text{out of CD4})=0,0067$; $p(\text{out of lymphos})=0,0085$). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die Fallgruppe eine weniger ausgeprägte antiinflammatorische Reaktion zeigt, was möglicherweise zu einem Ungleichgewicht in der Immunregulation beiträgt.

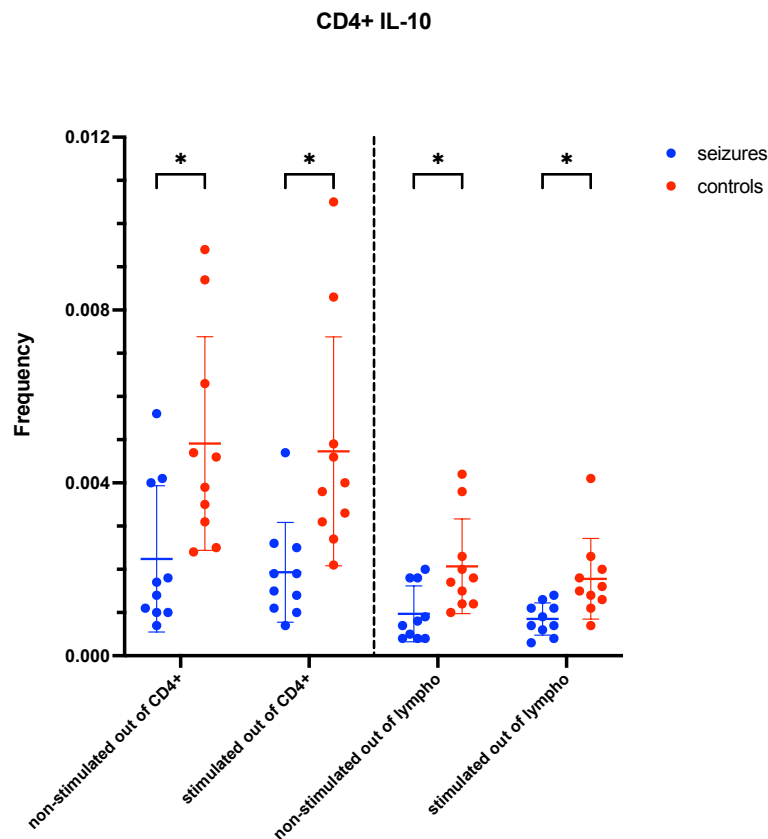


Abbildung 41: Darstellung der Anteile der IL-10 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen vor und nach Stimulation an allen angegebenen Referenzpopulationen

3. Ergebnisse

Proinflammatorische Zytokine: IL-13 und IL-17

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den proinflammatorischen Zytokinen signifikante Erhöhungen in der Fallgruppe. Interleukin-13 (IL-13), ein Zytokin, das typischerweise mit der Th2-Immunantwort assoziiert ist, war im Nativzustand signifikant höher in der Fallgruppe ($p=0,0431$). Dieser Anstieg in der IL-13-Expression deutet auf eine verstärkte Th2-Aktivität hin, die häufig mit allergischen Reaktionen oder chronisch entzündlichen Prozessen verbunden ist.

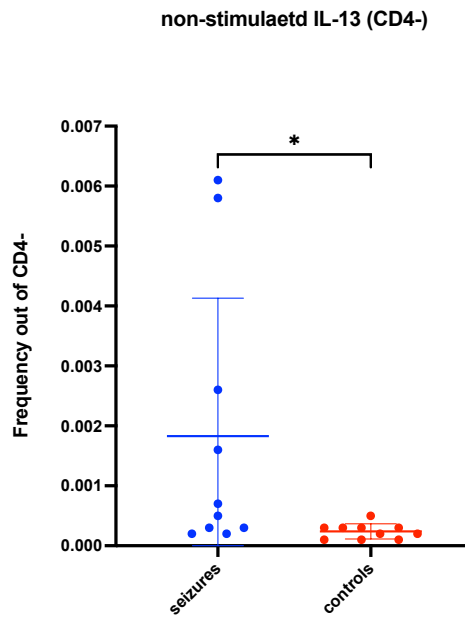


Abbildung 42: Darstellung der Anteile der nicht stimulierten IL-13 exprimierenden CD4- T-Zellen an allen CD4- Zellen

3. Ergebnisse

Auch bei Interleukin-17 (IL-17), das eine zentrale Rolle in der Th17-vermittelten proinflammatorischen Immunantwort spielt, wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Sowohl vor als auch nach der Stimulation zeigten die CD4⁺-T-Zellen in der Fallgruppe erhöhte IL-17-Werte, was auf eine verstärkte proinflammatorische Reaktion hindeutet. Abbildung 43 zeigt diese Unterschiede sowohl für die CD4⁺-Zellen ($p(\text{non-stimulated}) = 0,0002$; $p(\text{stimulated}) = 0,0062$) als auch für die Zellen im Lymphozyten-Gate ($p(\text{non-stimulated}) = 0,0002$; $p(\text{stimulated}) = 0,0024$). Darüber hinaus wiesen die CD4-negativen Zellen im nicht stimulierten Zustand ein signifikant höheres IL-17-Expressionsniveau auf ($p(\text{out of CD4-}) = 0,0032$; $p(\text{out of lymphos}) = 0,0251$), was ebenfalls auf eine verstärkte Th17-Aktivierung in der Fallgruppe hinweist (Abb. 44).

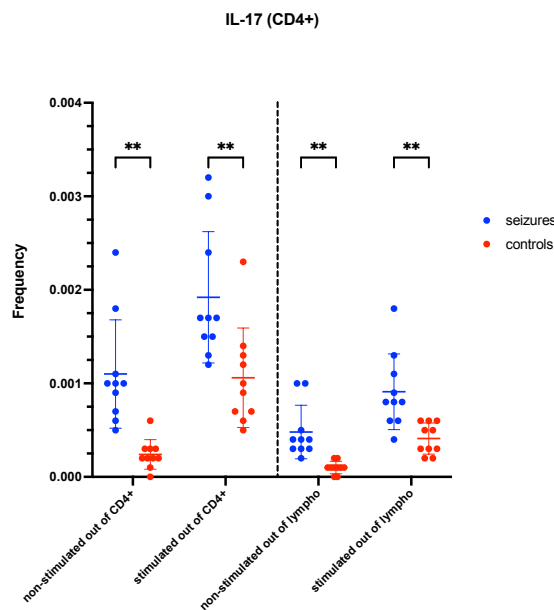


Abbildung 43: Darstellung der Anteile der IL-1 exprimierenden CD4⁺-T-Zellen vor und nach Stimulation an allen angegebenen Referenzpopulationen

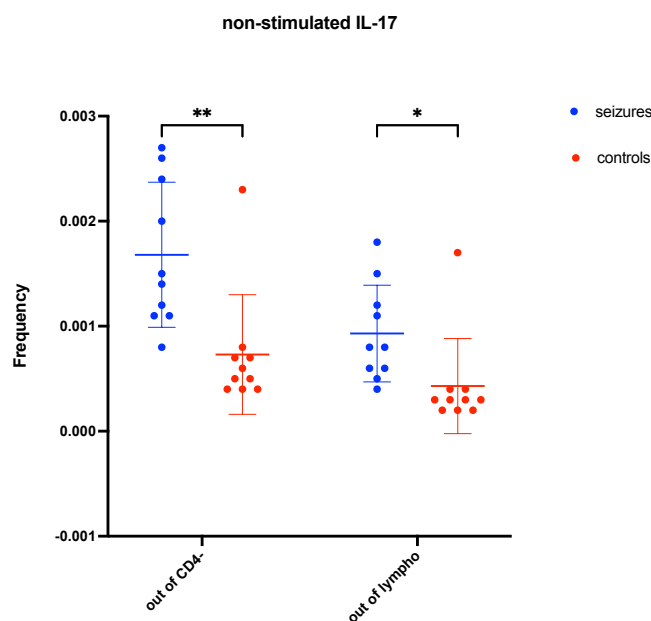


Abbildung 44: Darstellung der Anteile der nicht stimulierten IL-17 exprimierenden CD4⁻-T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

IL-21

Schließlich zeigte Interleukin-21 (IL-21) Unterschiede in der Expression, die sich jedoch ausschließlich auf die CD4-negativen Zellen beschränkten. Diese Zellpopulation zeigte in der Fallgruppe signifikant höhere IL-21-Werte sowohl in Bezug auf alle CD4 negativen Zellen ($p(\text{non-stimulated}) = 0,0089$; $p(\text{stimulated}) = 0,0031$) als auch in Bezug auf die gegateten Lymphozyten ($p(\text{non-stimulated}) = 0,0083$; $p(\text{stimulated}) = 0,0018$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. IL-21 spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung von nicht-CD4+-T-Zellen und könnte somit zur allgemeinen proinflammatorischen Aktivierung in der Fallgruppe beitragen. Die erhöhte Expression von IL-21 könnte auf eine breitere Dysregulation der Immunantwort hindeuten, die über die klassischen CD4+-T-Zellen hinausgeht.

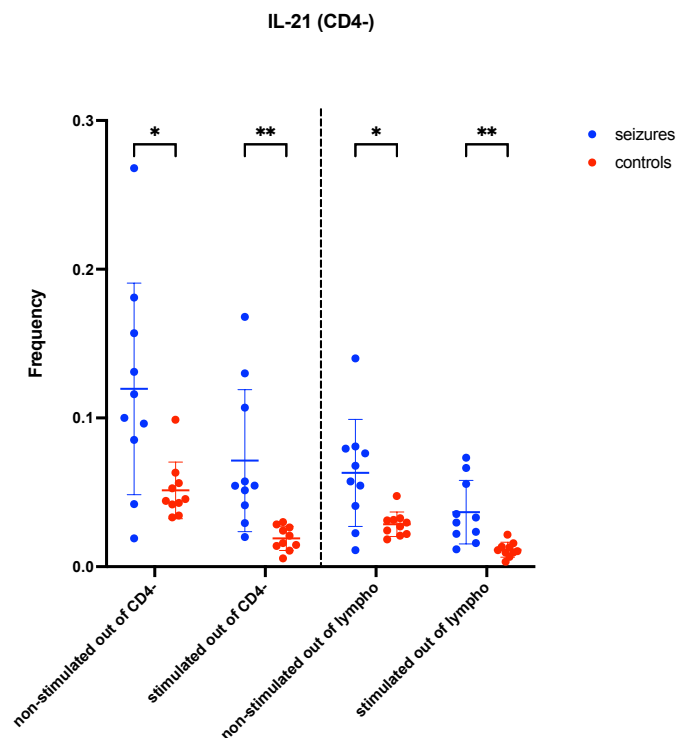


Abbildung 45: Darstellung der Anteile der nicht stimulierten IL-21 exprimierenden CD4- T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

Zusammenfassung der Immunprofile

Insgesamt zeigt sich in der Fallgruppe eine deutliche Verschiebung hin zu einer proinflammatorischen Immunantwort. Während die antiinflammatorischen Mechanismen, vermittelt durch IL-10, reduziert sind, weisen die erhöhten Werte von IL-13, IL-17 und IL-21 auf eine verstärkte proinflammatorische Aktivität hin. Diese Kombination aus verminderten antiinflammatorischen und erhöhten proinflammatorischen Zytokinen könnte ein Hinweis auf ein immunologisches Ungleichgewicht in der Fallgruppe sein, das zu den pathologischen Veränderungen beiträgt.

3. Ergebnisse

Zellproliferations- und Apoptosemarker

Granzym B

Im Gegensatz zu den zuvor erhobenen Daten konnte nach Stimulation für Granzym B kein signifikantes Ergebnis ermittelt werden. Interessanterweise zeigte sich jedoch im Nativzustand ein deutlicher Unterschied: Die Kontrollgruppe wies signifikant niedrigere Granzym B-Expressionswerte auf ($p = 0,0290$).

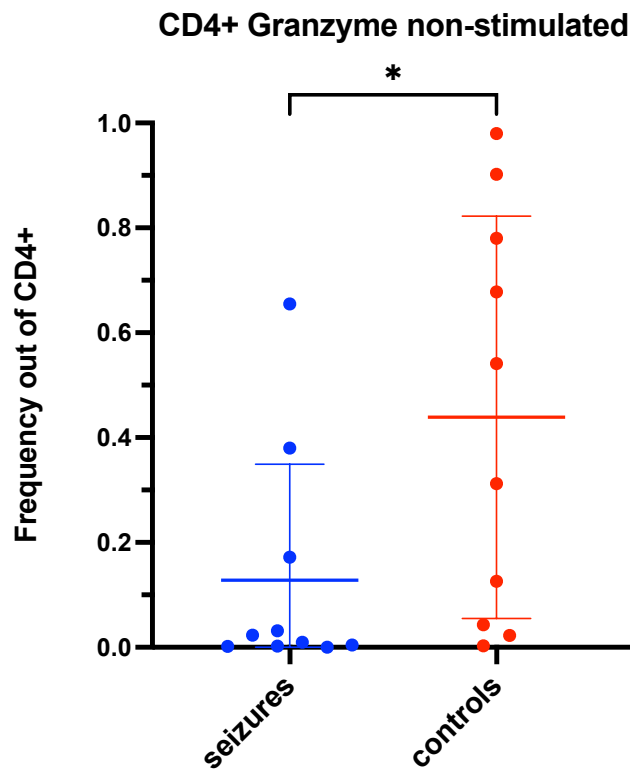


Abbildung 46: Darstellung der Anteile der unstimulierten Granzym exprimierenden CD4+ T-Zellen an allen CD4+ Zellen

3. Ergebnisse

Obwohl der Unterschied in der Granzym B-Expression nach Stimulation nicht signifikant war, konnte für die Stärke des Anstiegs zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen eine statistische Signifikanz festgestellt werden. Dies galt sowohl für die CD4+-Population ($p = 0,0038$) als auch für die Zellen im Lympho-Gate ($p = 0,0035$). Besonders auffällig war die Erniedrigung der Granzym B-Expression in der Kontrollgruppe, während bei den Fallpatienten dieser Effekt ausblieb, was auf eine unterschiedliche Regulation der zytotoxischen Aktivität hinweisen könnte.

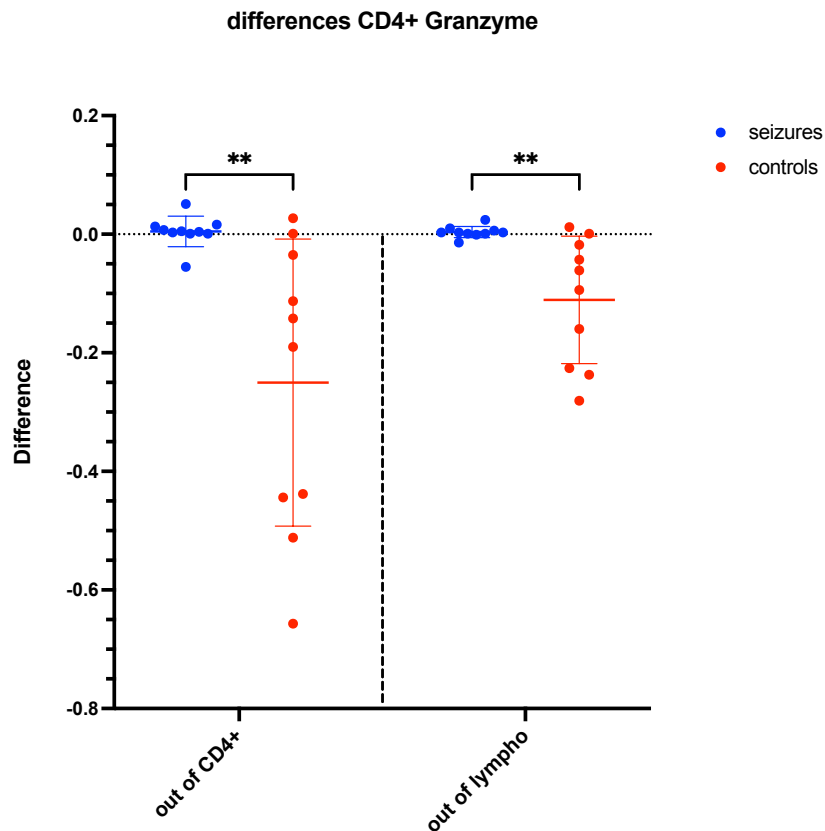


Abbildung 47: Darstellung der Differenzen Granzym exprimierender CD4+ T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

TGF-beta

Der „Transforming Growth Factor Beta“ (TGF- β), dem immunsuppressive Funktionen zugeschrieben werden, zeigte signifikant niedrigere Werte in der Fallgruppe. Diese Erniedrigung konnte sowohl bei den CD4+-Zellen als auch bei den CD4-negativen Zellen beobachtet werden. Abbildung 48 verdeutlicht, dass die Kontrollgruppe sowohl im Nativzustand ($p=0,0404$) als auch nach Stimulation ($p=0,0304$) einen signifikant höheren Anteil an TGF- β -exprimierenden Zellen aufwies.

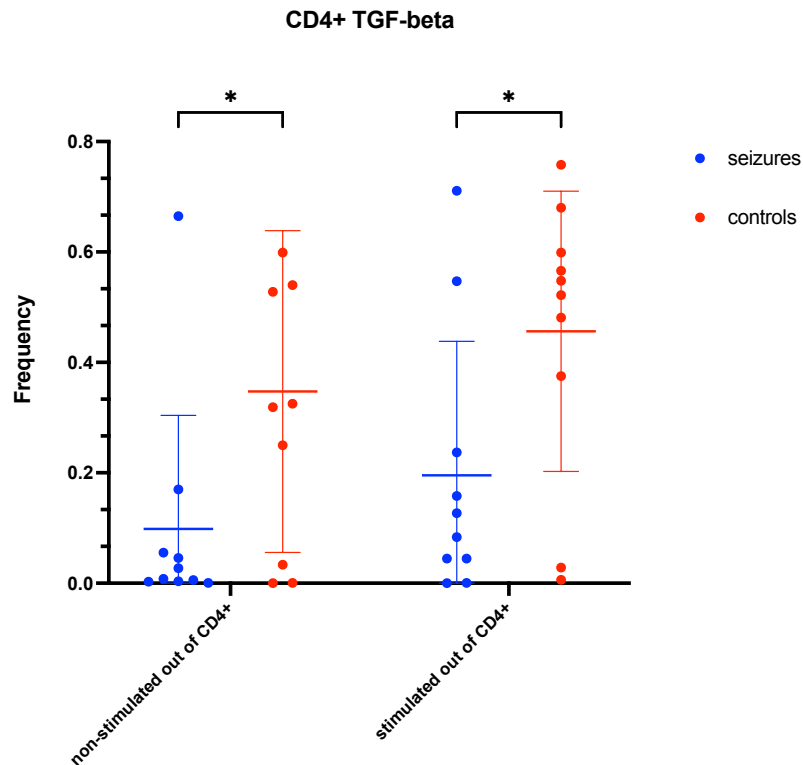


Abbildung 48: Darstellung der Anteile der nicht stimulierten TGF-beta exprimierenden CD4+ T-Zellen an allen CD4+ Zellen

3. Ergebnisse

Diese Unterschiede, grafisch in Abbildung 49 dargestellt, deuten darauf hin, dass TGF- β in der Fallgruppe eine weniger ausgeprägte Rolle spielt. Sowohl in Bezug auf die CD4 negativen $p(\text{non-stimulated}) = 0,0334$; $p(\text{stimulated}) = 0,0284$) als auch in Bezug auf alle Lymphozyten $p(\text{non-stimulated}) = 0,0356$; $p(\text{stimulated}) = 0,0121$) zeigte sich die TGF- β Expression in der Kontrollgruppe höher. was möglicherweise zu einer verminderten immunsuppressiven Regulation führt und das Ungleichgewicht der Immunantwort weiter verstärkt.

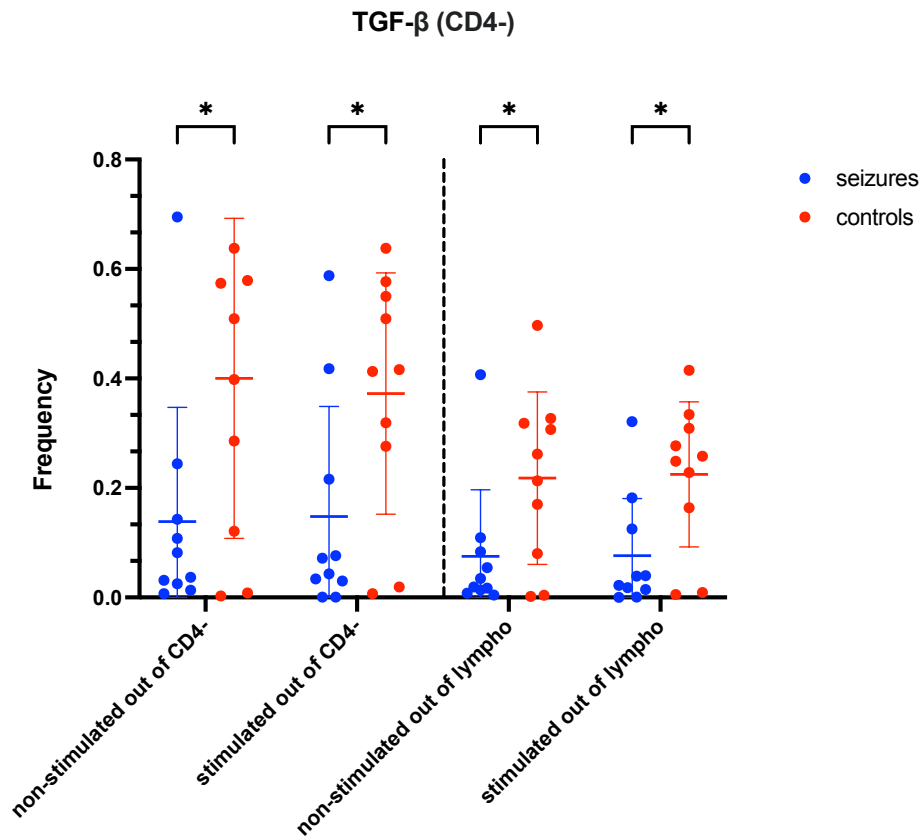


Abbildung 49: Darstellung der Anteile der TGF-beta exprimierenden CD4- T-Zellen vor und nach Stimulation an allen angegebenen Referenzpopulationen

Ki-67

Ein weiterer wichtiger Marker, der in dieser Analyse untersucht wurde, ist der Proliferationsmarker Ki-67, der häufig in onkologischen Fragestellungen verwendet wird, um Zellwachstum und -teilung zu bewerten. Auch hier zeigte die Kontrollgruppe signifikant höhere Anteile im Vergleich zur Fallgruppe, sowohl in Bezug auf alle lebenden Zellen $p(\text{non-stimulated}) = 0,0185$; $p(\text{stimulated}) = 0,0363$ als auch im Lympho-Gate $p(\text{non-stimulated}) = 0,0092$; $p(\text{stimulated}) = 0,0465$. Diese Unterschiede deuten darauf hin, dass die Zellen der Kontrollgruppe eine höhere Proliferationsrate aufweisen, was auf eine robustere zelluläre Aktivität hinweisen könnte, während die Fallgruppe eine reduzierte Proliferation zeigt.

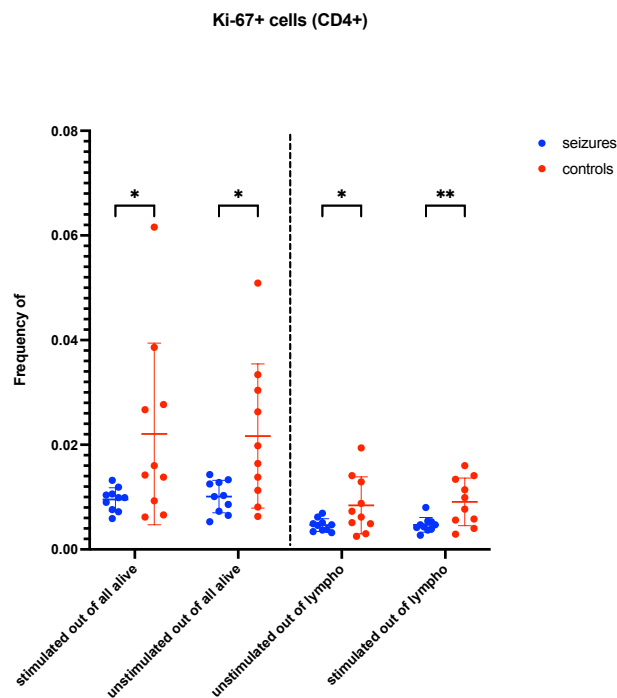


Abbildung 50: Darstellung der Anteile der nicht stimulierten Ki-67 exprimierenden CD4+ T-Zellen an den angegebenen Referenzpopulationen

Zusammenfassung der zytotoxischen, immunsuppressiven und proliferativen Marker

Die Ergebnisse zeigen ein deutliches Ungleichgewicht in der Fallgruppe, das sich durch eine verminderte TGF- β -Expression, eine fehlende Reduktion der Granzym B-Expression nach Stimulation und eine geringere Zellproliferation widerspiegelt. Während TGF- β und Ki-67 in der Kontrollgruppe signifikant höher ausgeprägt sind, bleibt die Granzym B-Expression in der Fallgruppe auch nach Stimulation konstant, was auf eine potenziell dysregulierte Immunaktivität hindeutet. Diese Kombination von Faktoren könnte zur Pathogenese in der Fallgruppe beitragen und weist auf eine unzureichende Immunsuppression und eine verminderte zelluläre Aktivität hin.

3. Ergebnisse

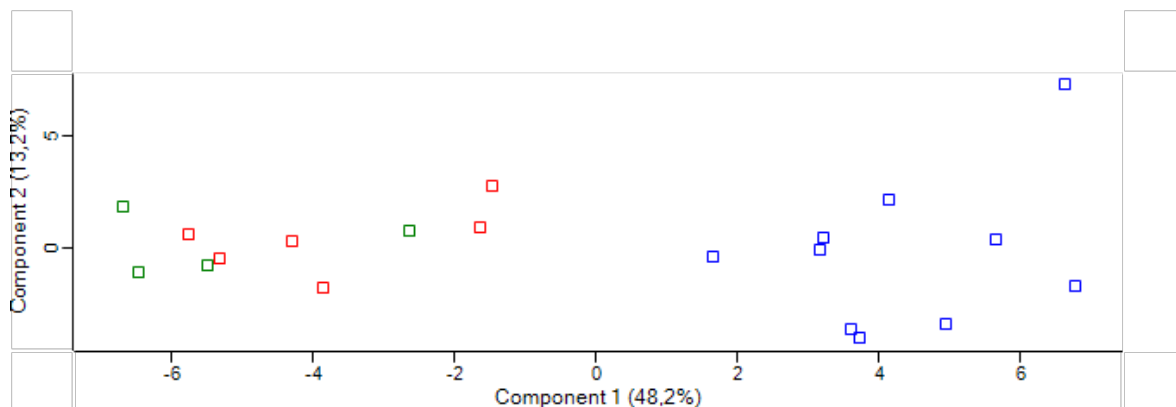
3.2.8 Abhängigkeit der erhobenen Daten von äußeren Einflussfaktoren

Die signifikanten Veränderungen der Zellpopulationen wurden des weiteren auf ihre Abhängigkeit von äußeren Einflussfaktoren untersucht. Dazu gehörten unter anderem die verstrichene Zeit nach dem Anfall bis zur Blutentnahme, die Gesamtzahl der im Kliniklabor bestimmten Leukozyten, das Alter sowie die ebenfalls in der Klinik bestimmte CK. Eine Analyse der Korrelation zwischen den Anteilen der Oberflächenmarkerexpression und der präklinisch erhaltenen antikonvulsiven Medikation (hier Midazolam 10mg und Diazepam 5mg) zeigte keine relevanten Unterschiede.

Es wurde für all diese Einflussfaktoren eine Korrelationsanalyse mit Benjamin-Hochberg Korrektur für multiples Hypothesentesten durchgeführt. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen diesen Parametern und der Zellanteilsverteilung dargestellt werden.

Nun stellte sich anschließend noch die Frage, ob die Zellexpression sich zwischen bestätigten Epilepsiepatienten und Patienten mit einem erstmaligen Anfall signifikant unterscheidet. Anhand der Patientenvorgeschichte konnten 4 Patienten mit bestätigter Epilepsie und 6 Patienten mit erstmaligem Anfall eingeteilt werden.

Abbildung 51 zeigt die Einteilung der Fallproben von Patienten mit bestätigter Epilepsie (rot) und derjenigen, welche einen erstmaligen Anfall erlitten (grün). Hierbei zeigte sich kein eindeutiges Clustering der Proben, dies passt zur statistischen Untersuchung der äußeren Einflussgrößen.



3. Ergebnisse

3.2.9 Hauptkomponentenanalyse

Alle signifikanten Ergebnisse aus dem oberen Ergebnisteil wurden nochmals in einer Hauptkomponentenanalyse untersucht. Abbildung 52 stellt die Anordnung der Patienten nach der Abhängigkeit der zwei Hauptkomponenten dar. Es ist eine deutliche Aufteilung zwischen Fällen (rot) und Kontrollen (blau) in Bezug auf die beiden Hauptkomponenten zu sehen.

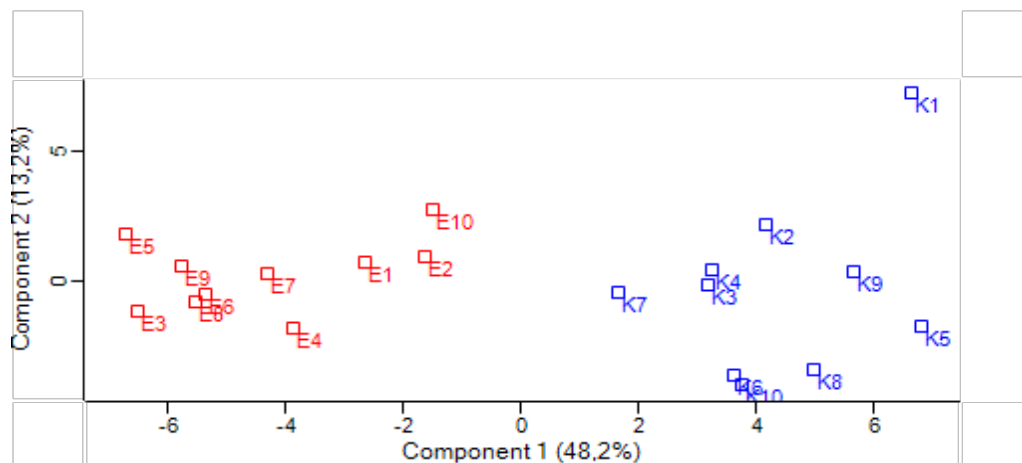


Abbildung 52: Hauptkomponentenanalyse mit dargestelltem Clustering der Fälle (rot) und Kontrollen (blau)

Nun wurde im Verlauf der Einfluss der Unterschiedlichen Zellgruppen auf die beiden einflussreichsten Komponenten der Hauptkomponentenanalyse untersucht und in Abbildung 53 dargestellt.

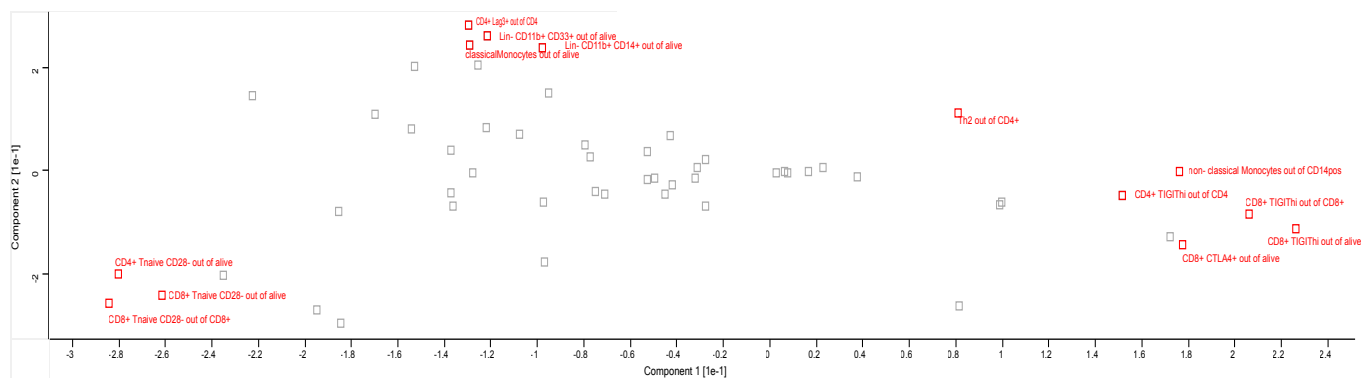


Abbildung 53: Einfluss der Unterschiedlichen Zellgruppen auf die beiden einflussreichsten Komponenten der Hauptkomponentenanalyse

3. Ergebnisse

3.2.10 Volcano-Plot

Ein Volcano-Plot wurde erstellt, um die signifikanten Ergebnisse der FACS-Analyse darzustellen. Die x-Achse zeigt die log2-transformierten Expressionsveränderungen und die y-Achse die -log10-transformierten p-Werte, wodurch eine übersichtliche Visualisierung der Populationen mit signifikant veränderten Expressionsniveaus ermöglicht wird. Populationen, die eine besonders hohe Signifikanz und große Expressionsänderungen aufweisen, sind in den Randbereichen des Plots zu sehen. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurde die Beschriftung einzelner Populationen entfernt.

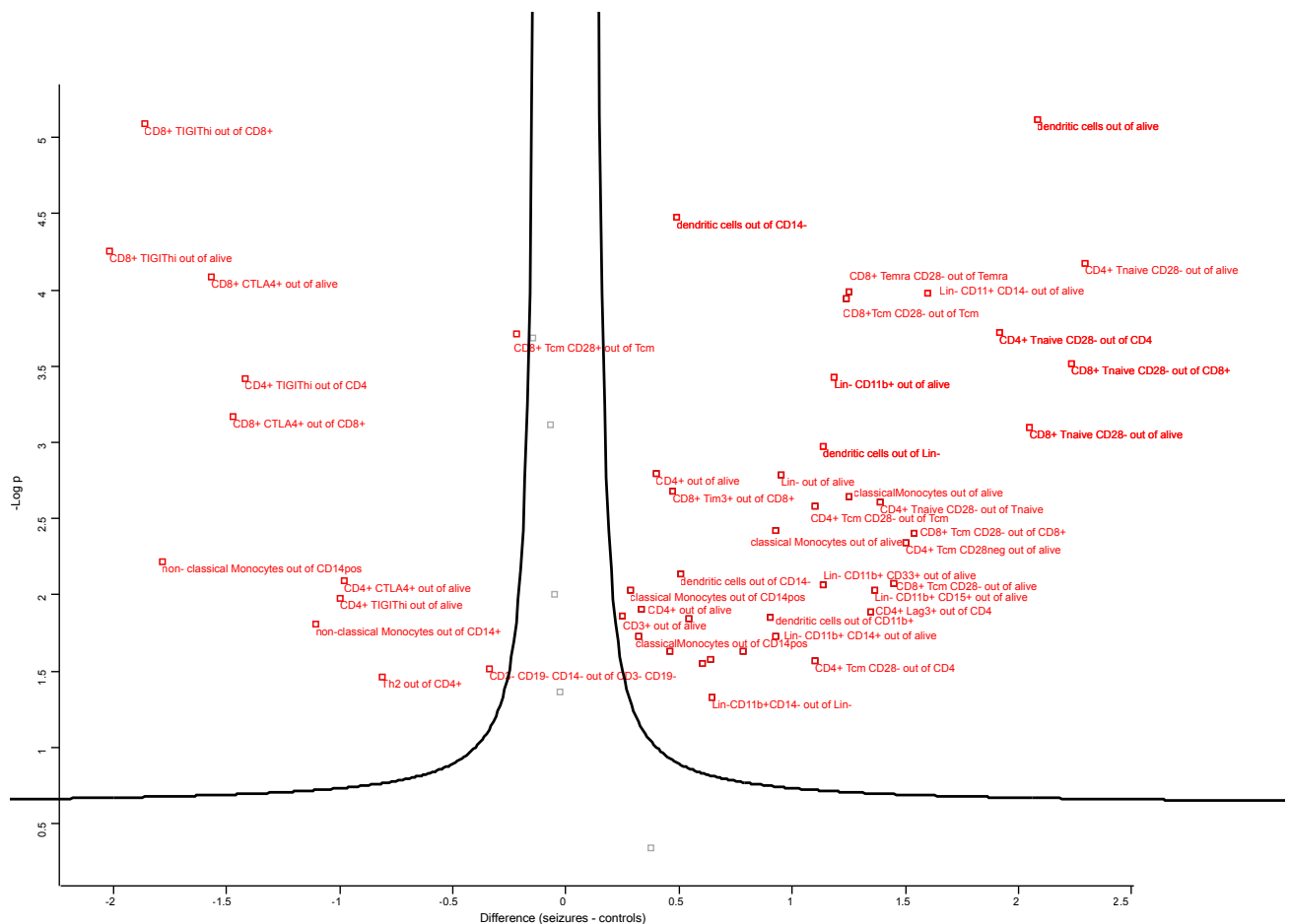


Abbildung 54: Volcano-Plot zur Darstellung der signifikanten Ergebnisse der FACS Panel Tcell1 bis TBNK

3.2.11 Heat-Map

Die Erstellung einer Heat-Map erfolgte zum einen ohne vorherige kategorische Einteilung und im weiteren Verlauf mit einer Einteilung nach bestätigter Epilepsie und erstmaligem Anfall, sowie auch dem Alter und Zeitraum zwischen Anfall und Blutentnahme.

Wie man in Abbildung 55 sehen kann, clusterte sich ohne vorherige Annotation die Heatmap auf der x-Achse sehr gut und teilte sich zwischen Kontrollen und Fällen sichtbar auf. Weitere Heatmaps mit den verschiedenen Annotationen nach CK-Wert, Alter und Abnahmezeitpunkt finden sich im Anhang.

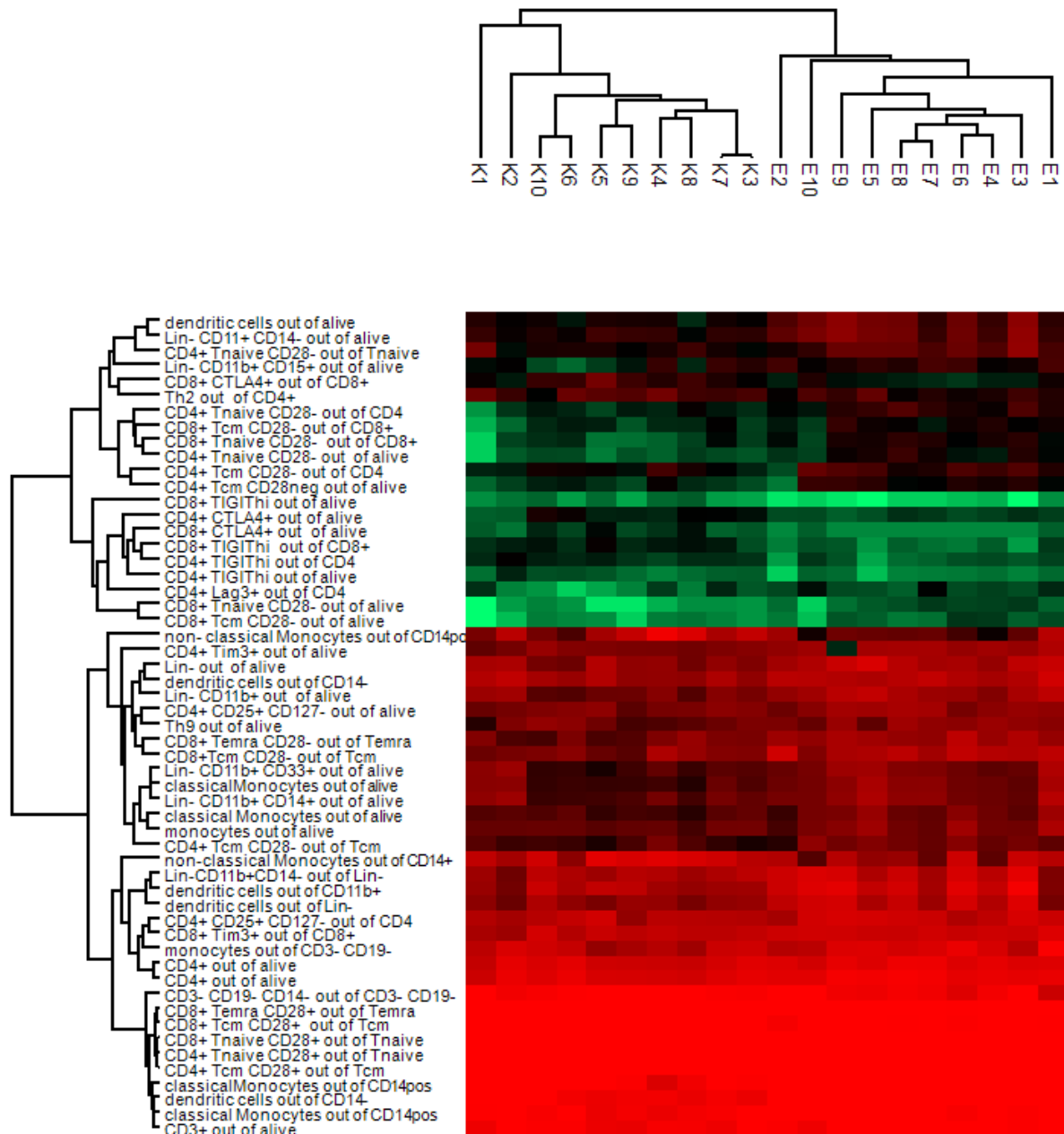


Abbildung 55: HeatMap der Panel Tcell5 und Tcell6 mit automatischem Clustering durch Perseus

3.3 Ergebnisse Proteomik

Bei der differenzierten Betrachtung der erhobenen Proteomik-Daten wurden vornehmlich die Fallgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen. Ebenfalls wurden die Daten auch hinsichtlich verschiedener Gruppenbildungen untersucht, wie es auch bei der FACS-Analyse veranlasst wurde. Die jeweiligen Gruppen zeigten sich weder bei Vergleichen zwischen Kontrollen und Fällen als auch bei dem jeweiligen Clustering nicht signifikant unterschiedlich. Abbildung 56 veranschaulicht in Form eines Volcano-Plots die Ergebnisse bei Vergleich der Fall- mit der Kontrollgruppe. In der gesamten Analyse mit Durchführung einer Korrektur für eine multiple Hypothesentestung ließen sich keine signifikanten Ergebnisse darstellen.

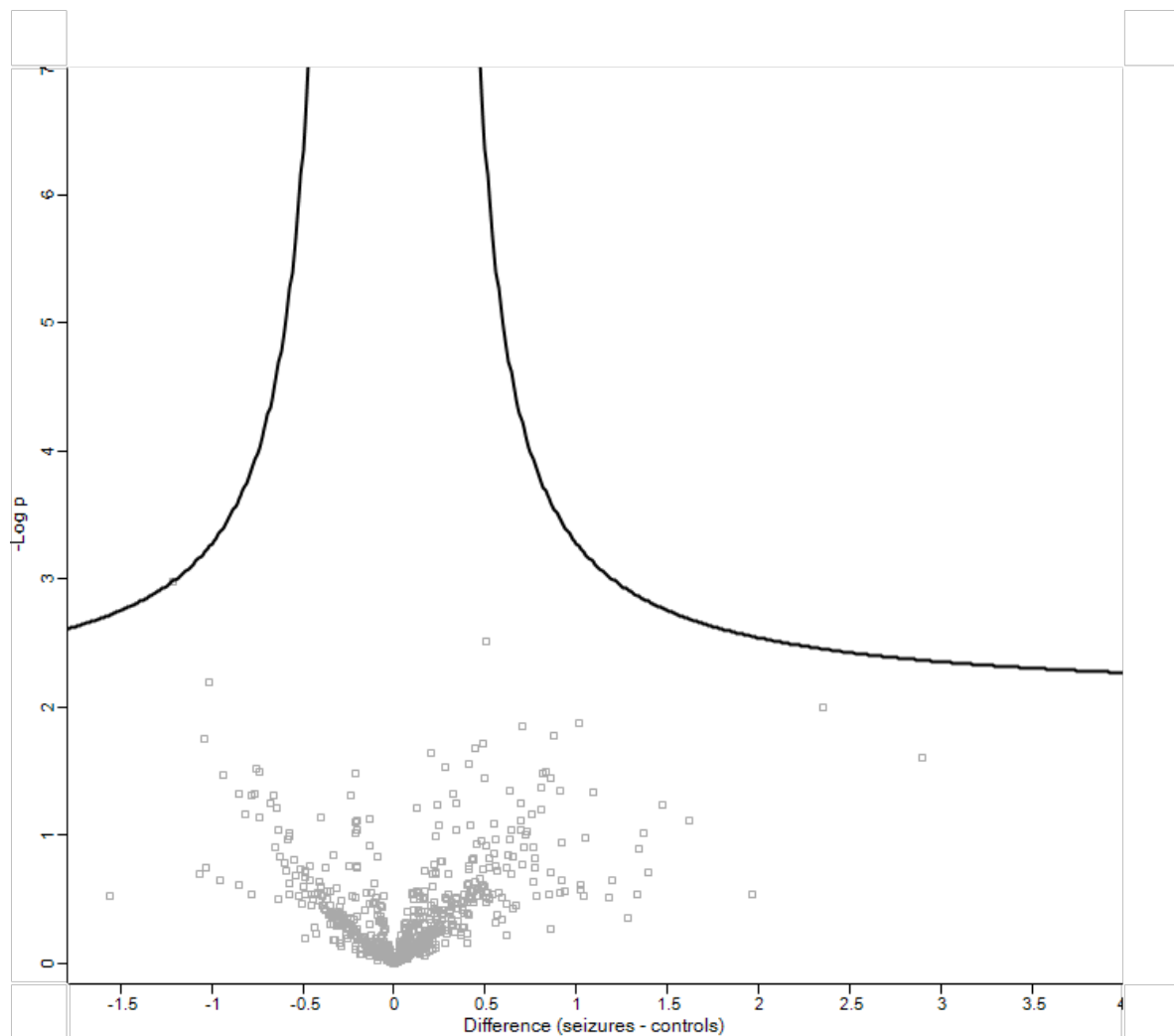


Abbildung 56: Darstellung der Proteomikergebnisse in einem Volcano-Plot

Wie aufgrund der statistischen Ergebnisse erwartet wurde, konnte auch in der Hauptkomponentenanalyse keine eindeutiges Clustering unter den Fall und Kontrollpatienten dargestellt werden.

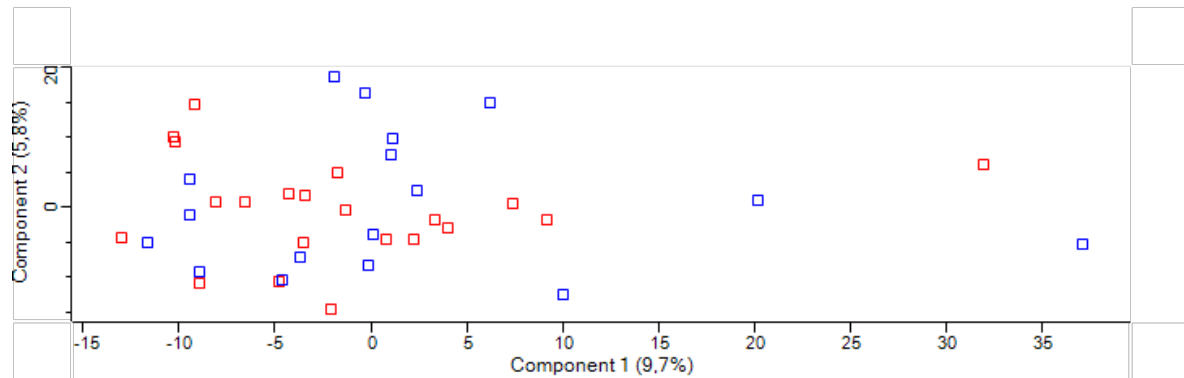


Abbildung 57: Hauptkomponentenanalyse der Proteomikergebnisse

4. Diskussion

Die Erhebung sowie die Auswertung der Daten erfolgte im Sinne der Fragestellung, welche Auswirkungen die epileptischen Anfälle auf den zellulären Immunstatus der jeweiligen Patienten hatten. Mit Hinblick auf den aktuellen wissenschaftlichen Stand sollen nachfolgend die erhobenen Ergebnisse eingeordnet werden.

Die vorbeschriebenen Mechanismen der BHS-Schädigung können durch die Ergebnisse zum Teil bestätigt werden. Teilweise ergaben sich neue, nicht vorbeschriebene Daten, welche in den Gesamtkontext eingeordnet werden müssen.

Betrachtet man nun primär das Auswertungsergebnis der Anteile in Abbildung 7, also die Darstellung der Anteile der CD4+, CD8+, Lineage negativen Zellen, dendritischen Zellen sowie der Monozyten, so ist eindeutig ersichtlich, dass alle Populationen in der Fallgruppe signifikant höher waren als in der Kontrollgruppe. Vor allem die vermehrte Expression der CD3+, CD4+ Zellen, Monozyten sowie auch dendritischer Zellen lässt eine Veränderung der immunologischen Verhältnisse vermuten. Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer vermehrten Expression der genannten Immunzellen, was mit einer verstärkten Immun- oder gar Entzündungsreaktion vereinbar wäre. Sanli et al.¹¹¹ beschrieben ebenfalls eine veränderte Verteilungsbreite der Abwehrzellen bei Patienten mit epileptischen Anfällen ohne erklärbaren Auslöser. Hier zeigten sich ebenfalls die Verhältnisse der CD3+ und der CD4+ Zellen auf Seiten der Fallpatienten erhöht. Postuliert wurde hier eine durch das ZNS ausgelöste übermäßige Entzündungsreaktion, welche zu einer veränderten Oberflächenmarkerexpression führt und so zur Schaffung eines proinflammatorischen Milieus beiträgt. Bekräftigt wird diese Aussage auch durch die Ergebnisse nach Stimulation der CD4+ Zellen. Während die Oberflächen-Markerexpression von CD4 bei den Kontrollen durch die Stimulation sogar einen Rücklauf verzeichnete, kam es bei den Fallpatienten zu einer Erhöhung. Dies ist Ausdruck der erhöhten proinflammatorischen Last des Organismus in der Zeit nach einem epileptischen Anfall. Die Erfassung deutlich höherer Anteile an IL-21 exprimierenden Zellen liefert eine mögliche Erklärung der erhöhten Zellpopulationen. IL-21 beeinflusst die Differenzierung und fördert die Aktivität von B-, T- und monozytären Zellen.¹¹²

Der als signifikant erhöht detektierte Proliferationsmarker Ki-67 in allen lebenden Zellen, sowie auch speziell in der lymphozytären Subpopulation spricht ebenfalls für eine inflammatorische Immunreaktion, welche in einem erhöhten Zellumsatz resultiert und eine stetige Neubildung immunologischer Zellen zur Folge hat. Über die genauen intrazellulären molekulargenetischen Mechanismen kann durch die gewählten Analysen keine Aussage getroffen werden und stellt eine Limitation dieser Studie dar.

¹¹¹ Sanli et al., 2021

¹¹² Wang et al., 2018

4.1 T-Zell-Dysregulation und Erschöpfung

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine deutliche Dysregulation der T-Zell-Antwort in der Fallgruppe, die durch eine signifikante Zunahme von CD28- T-Gedächtniszellen sowie naiven T-Zellen charakterisiert ist. Diese Veränderungen betreffen sowohl die CD4+- als auch die CD8+-T-Zellpopulationen und deuten auf eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit des adaptiven Immunsystems hin.

4.1.1 Erschöpfung durch chronische Aktivierung

Tim3 und Lag3 sind Marker, die auf einen Zustand chronischer T-Zell-Erschöpfung hinweisen. Diese Moleküle werden typischerweise auf T-Zellen exprimiert, die wiederholter oder länger anhaltender Stimulation ausgesetzt sind, wie dies häufig in chronisch entzündlichen Zuständen der Fall ist. In der Fallgruppe konnte eine signifikant erhöhte Expression dieser Marker sowohl bei CD4+- als auch bei CD8+-T-Zellen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die T-Zellen nach epileptischen Anfällen kontinuierlich stimuliert werden und im Laufe der Zeit eine Funktionsminderung durchlaufen.

Die chronische Aktivierung der T-Zellen führt nicht nur zu einer Erschöpfung, sondern auch zu einer Dysregulation der Immunantwort. Erschöpfte T-Zellen verlieren ihre Fähigkeit zur Proliferation und zur effizienten Sekretion von Zytokinen, was die Immunhomöostase destabilisiert und zu einem Zustand persistierender Entzündung führen kann. Diese Dysregulation könnte erklären, warum in der Fallgruppe verstärkte entzündliche Prozesse beobachtet wurden, die durch proinflammatorische Zytokine wie IL-13 und IL-17 verstärkt werden.

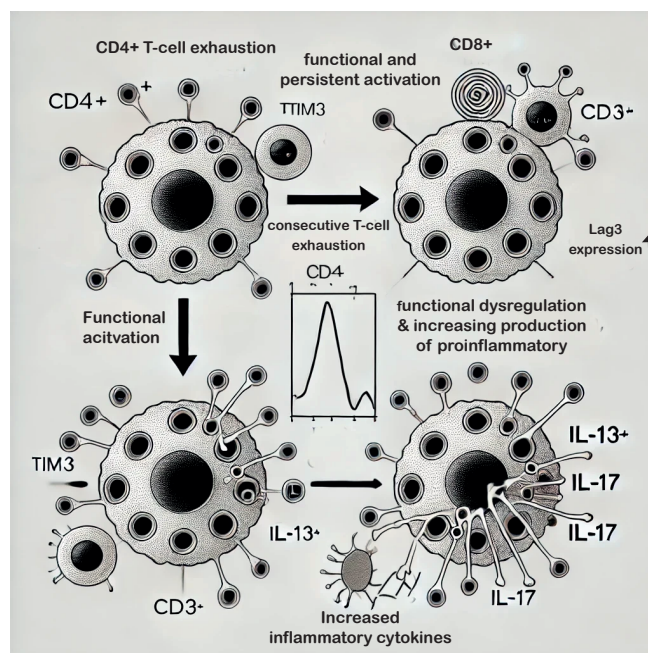


Abbildung 58: Darstellung des Mechanismus der T-cell exhaustion ¹¹³

¹¹³ Eigene Darstellung, Erstellung unterstützt durch KI

4.1.2 Erhöhte Anteile von CD28- T-Zellen

In der Fallgruppe war ein signifikant erhöhter Anteil von CD28- T-Gedächtniszellen und naiven T-Zellen nachweisbar. Bei CD28 handelt es sich um ein essenzielles Kostimulationsmolekül, welches für die vollständige Aktivierung von T-Zellen erforderlich ist. Der Verlust von CD28 auf der Zelloberfläche weist häufig auf eine T-Zell-Erschöpfung hin, da diese Zellen ihre Fähigkeit zur effektiven Reaktion auf antigen-spezifische Signale verlieren.

Die erhöhte Anzahl von CD28- Zellen in der Fallgruppe deutet somit auf eine Abschwächung der Immunantwort hin. Diese Zellen sind weniger fähig, eine adäquate Immunantwort zu initiieren, was eine reduzierte Abwehrfähigkeit gegenüber pathogenen Erregern nahelegt. Zusätzlich zur Abnahme der Funktionalität dieser Zellen wurde eine erhöhte Expression der Erschöpfungsmarker Tim3 und Lag3 in derselben Kohorte beobachtet.

4.1.3 Erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen (Tregs)

Ein interessantes und zugleich gegenläufiges Ergebnis zeigt die gleichzeitige Zunahme von regulatorischen T-Zellen (Tregs) in der Fallgruppe. Tregs, identifiziert durch den Marker FoxP3, spielen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und der Unterdrückung überschießender Immunantworten. In der Fallgruppe wurde eine signifikant höhere Anzahl dieser Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet.

Diese Zunahme könnte als kompensatorischer Mechanismus interpretiert werden, bei dem das Immunsystem versucht, die durch die Erschöpfung verursachte Dysregulation zu regulieren. Tregs könnten eine wichtige Rolle dabei spielen, überschießende Entzündungsreaktionen zu unterdrücken und die Immunantwort nach einem epileptischen Anfall zu stabilisieren. Allerdings bleibt unklar, ob die vermehrte Präsenz von Tregs ausreicht, um die Auswirkungen der T-Zell-Erschöpfung vollständig zu kompensieren.

4.1.4 Unklare Ursachen der Erschöpfung

Während die erhöhte Expression von Erschöpfungsmarkern wie Tim3 und Lag3 auf eine chronische Aktivierung der T-Zellen hinweist, bleibt die genaue Ursache dieser Erschöpfung ungeklärt. Epileptische Anfälle könnten einen Teil dieser Aktivierung erklären, da sie mit systemischen Entzündungsreaktionen assoziiert sind. Es ist jedoch auch denkbar, dass andere Faktoren, wie virale Infektionen oder wiederholte systemische Entzündungen, zur T-Zell-Erschöpfung beitragen. Ohne detaillierte Daten zur Anfallshäufigkeit, zur allgemeinen Gesundheit der Patienten oder zu begleitenden Infektionen bleibt die Beziehung zwischen Anfällen und Erschöpfung weiterhin spekulativ.

4.1.5 Schlussfolgerung

Resümierend weisen die Ergebnisse auf eine Dysregulation der T-Zell-Antwort in der Fallgruppe hin, die durch eine erhöhte Anzahl von CD28- Zellen, eine verstärkte Expression von Erschöpfungsmarkern sowie durch eine erhöhte Präsenz von Tregs gekennzeichnet ist. Die beobachtete T-Zell-Erschöpfung könnte die Abwehrfähigkeit des Immunsystems nach epileptischen Anfällen einschränken und zu einer chronischen Entzündungsreaktion beitragen. Zukünftige Studien sollten sich auf die Identifizierung der genauen Mechanismen konzentrieren, die zur T-Zell-Erschöpfung führen, und auf die Rolle der Tregs bei der Regulation der Immunantwort nach einem epileptischen Anfall.

4.2 Aktivierung und Erschöpfung durch proinflammatorische Zytokine

Die Analyse der proinflammatorischen Zytokine in der Fallgruppe zeigt eine signifikante Erhöhung von IL-13, IL-17, TNF- α und IFN- γ . Diese Zytokine spielen eine zentrale Rolle in der Modulation der Immunantwort und sind mit entzündlichen Prozessen assoziiert. Die erhöhte Expression dieser Zytokine deutet auf eine übermäßige Aktivierung der Immunzellen hin, was zu einer chronischen Entzündungsreaktion und T-Zell-Erschöpfung führen könnte.

4.2.1 Erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine

In der Fallgruppe wurde eine signifikant erhöhte Expression von IL-13 und IL-17 nachgewiesen. Beide Zytokine sind charakteristisch für Th2- bzw. Th17-vermittelte Immunantworten und sind eng mit chronischen Entzündungsprozessen verbunden. IL-13 ist bekannt für seine Rolle in der Förderung von allergischen Reaktionen und der Gewebereparatur, während IL-17 eine proinflammatorische Wirkung hat und oft in Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder multipler Sklerose erhöht ist. In der Fallgruppe könnte die verstärkte Expression dieser Zytokine auf eine dysfunktionale Th2- und Th17-Aktivierung hinweisen, die nach epileptischen Anfällen zu einer anhaltenden Entzündungsreaktion führt.

Zusätzlich wurde eine erhöhte Expression von TNF- α und IFN- γ beobachtet. Diese Zytokine sind entscheidende Mediatoren der zellulären Immunantwort und fördern die Aktivierung von T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen. TNF- α ist ein Schlüsselfaktor in der Entzündungsreaktion, während IFN- γ eine zentrale Rolle in der Aktivierung von Makrophagen und der Verstärkung der adaptiven Immunantwort spielt. Die erhöhte Expression dieser Zytokine in der Fallgruppe könnte eine Folge der Immunaktivierung durch epileptische Anfälle sein, bei denen systemische Entzündungsprozesse ausgelöst werden.

4.2.2 Chronische Entzündung und T-Zell-Erschöpfung

Die persistente Präsenz dieser proinflammatorischen Zytokine könnte zur Erschöpfung der T-Zellen in der Fallgruppe beitragen. Wiederholte oder chronische Stimulation von T-Zellen durch proinflammatorische Zytokine führt oft zur Expression von Erschöpfungsmarkern wie Tim3 und Lag3, die in der Fallgruppe signifikant erhöht waren. Diese Marker sind typische Anzeichen für T-Zellen, die nach wiederholter Aktivierung ihre Funktionalität verlieren und weniger effektiv in der Bekämpfung von Infektionen oder anderen Immunherausforderungen sind.

Die erhöhte Expression von Tim3 und Lag3 untermauert die Hypothese, dass die kontinuierliche Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine zu einem Zustand der T-Zell-Erschöpfung führt. Dieser Zustand könnte dazu beitragen, dass die Immunantwort nach epileptischen Anfällen weniger effizient ist, was das Risiko für chronische Entzündungen oder sekundäre Infektionen erhöht.

4.2.3 Kompensation durch IL-10

Interessanterweise wurde in der Fallgruppe nach Stimulation auch keine Erhöhung von IL-10 beobachtet. IL-10 ist ein potentes antiinflammatorisches Zytokin, das eine zentrale Rolle bei der Hemmung übermäßiger Immunantworten spielt und eine schützende Wirkung gegen chronische Entzündungen vorweist. Eine vermehrte Expression von IL-10 nach Stimulation könnte darauf hinweisen, dass das Immunsystem der Fallgruppe versucht, die durch proinflammatorische Zytokine induzierte Entzündung zu kontrollieren und eine Balance zwischen Entzündung und Immunsuppression herzustellen. Dieser Mechanismus fehlt bei der Fallgruppe.

Die Rolle von IL-10 als möglicher Schutzmechanismus gegen T-Zell-Erschöpfung sollte jedoch weiter untersucht werden. Es bleibt unklar, ob eine vermehrte IL-10-Produktion in der Fallgruppe ausreicht, um die negativen Effekte der chronischen Entzündung und der übermäßigen Aktivierung proinflammatorischer Zytokine vollständig zu kompensieren. Die Frage, ob IL-10 eine langfristig schützende Rolle spielt oder lediglich eine temporäre Reaktion des Immunsystems auf die erhöhte Entzündungsaktivität ist, bedarf weiterer Forschung.

4.2.3 Fehlende Evidenz für spezifische Trigger

Obwohl die proinflammatorischen Zytokine in der Fallgruppe erhöht sind, bleibt dennoch unklar, ob epileptische Anfälle direkt für diese Erhöhung verantwortlich sind. Andere systemische Faktoren wie Infektionen, Autoimmunprozesse oder Umwelteinflüsse könnten ebenfalls zur Aktivierung dieser Zytokine beitragen. Es gibt derzeit keine spezifischen Hinweise darauf, dass epileptische Anfälle allein die Ursache für die verstärkte Expression von IL-13, IL-17, TNF- α und IFN- γ sind.

Es ist möglich, dass die Anfälle lediglich als zusätzlicher Trigger in einem bereits vorhandenen entzündlichen Zustand wirken und die Immunantwort verstärken. Ohne detailliertere Daten zu den Anfallshäufigkeiten, der Schwere der Anfälle oder den allgemeinen gesundheitlichen Bedingungen der Patienten bleibt die genaue Beziehung zwischen epileptischen Anfällen und der Erhöhung proinflammatorischer Zytokine weiterhin ungeklärt.

4.2.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine in der Fallgruppe zu einer übermäßigen Aktivierung des Immunsystems führt, die mit einer chronischen Entzündungsreaktion und der Erschöpfung der T-Zellen einhergeht. Diese Zytokine könnten eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer dysfunktionalen Immunantwort nach epileptischen Anfällen spielen. Gleichzeitig könnte eine vermehrte IL-10-Expression als Schutzmechanismus gegen diese entzündlichen Prozesse fungieren, diese Reaktion fehlt jedoch. Zukünftige Untersuchungen sollten sich darauf konzentrieren, die Ursachen der erhöhten Zytokinexpression und deren Beziehung zu epileptischen Anfällen zu klären sowie den Einfluss von IL-10 auf die Regulation der Immunantwort nach Anfällen weiter zu erforschen.

4.3 Verstärkte Aktivierung der Myeloiden Zellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen eine signifikante Zunahme von Monozyten, Neutrophilen und myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in der Fallgruppe. Diese Zelltypen sind eng mit der angeborenen Immunantwort verknüpft und spielen eine zentrale Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen. Die verstärkte Aktivierung dieser myeloiden Zellen könnte maßgeblich zur Dysregulation der Immunantwort nach epileptischen Anfällen beitragen und adaptive Immunreaktionen unterdrücken.

4.3.1 Erhöhte Anteile von Monozyten und Neutrophilen

In der Fallgruppe wurde eine signifikant erhöhte Anzahl von Monozyten und Neutrophilen nachgewiesen. Diese Zellen sind primäre Akteure der angeborenen Immunantwort und reagieren schnell auf Gewebeschäden oder Infektionen, indem sie proinflammatorische Zytokine freisetzen und zur Rekrutierung weiterer Immunzellen beitragen. Monozyten differenzieren sich zudem in Makrophagen und dendritische Zellen, die für die Präsentation von Antigenen an T-Zellen notwendig sind. Die Zunahme dieser Zellpopulationen deutet auf eine starke Aktivierung der angeborenen Immunantwort in der Fallgruppe hin.

Monozyten und Neutrophile sind außerdem auch dafür bekannt, chronische Entzündungen zu fördern, insbesondere wenn sie über längere Zeit aktiv bleiben. Die erhöhte Präsenz dieser Zellen könnte daher mit der anhaltenden Entzündungsreaktion nach epileptischen Anfällen zusammenhängen, bei der das Immunsystem nicht in der Lage ist, den Entzündungsprozess effektiv zu regulieren. Diese anhaltende Aktivierung könnte zu Gewebeschäden und zur Beeinträchtigung der normalen Immunregulation führen.

4.3.2 Hemmung der adaptiven Immunantwort durch MDSCs

Ein weiteres zentrales Ergebnis ist die erhöhte Anzahl von myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in der Fallgruppe. MDSCs sind für ihre immunsuppressive Wirkung bekannt und werden häufig in chronischen Entzündungszuständen oder Tumorumgebungen gefunden. Sie wirken, indem sie die Aktivierung von T-Zellen und anderen Komponenten der adaptiven Immunantwort unterdrücken. Die erhöhte Anzahl von MDSCs in der Fallgruppe könnte daher eine direkte Ursache für die Dysfunktion der T-Zell-Antwort darstellen, die in dieser Kohorte beobachtet wurde.

MDSCs hemmen die Proliferation von T-Zellen und reduzieren die Produktion von Zytokinen, was die Fähigkeit des adaptiven Immunsystems beeinträchtigt, eine effektive Immunantwort zu generieren. Dies könnte die erhöhte Expression von Erschöpfungsmarkern wie Tim3 und Lag3 auf T-Zellen in der Fallgruppe erklären, da die T-Zellen wiederholt unterdrückt werden und ihre Funktionsfähigkeit verlieren. Darüber hinaus könnten MDSCs die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Prozessen weiter destabilisieren und zur chronischen Entzündung beitragen.

4.3.3 Fehlende direkte Verbindung zu epileptischen Anfällen

Obwohl die erhöhte Anzahl von Monozyten, Neutrophilen und MDSCs in der Fallgruppe signifikant ist, bleibt unklar, ob diese Veränderungen in direktem Zusammenhang mit epileptischen Anfällen in Verbindung stehen. Es gibt derzeit keine eindeutigen Hinweise darauf, dass die Anfälle selbst diese Zellpopulationen aktivieren, da andere systemische Faktoren wie Infektionen, Autoimmunprozesse oder allgemeine Entzündungszustände ebenfalls zu einer Zunahme dieser Zellen führen können. Es ist möglich, dass die Anfälle lediglich eine Verstärkung bereits vorhandener entzündlicher Prozesse bewirken.

Ohne eine detaillierte Analyse der klinischen Vorgeschichte der Patienten, einschließlich der Häufigkeit und Schwere der Anfälle, bleibt die genaue Ursache für die erhöhte Aktivierung der myeloiden Zellen spekulativ. Es ist denkbar, dass epileptische Anfälle als zusätzlicher Trigger wirken, der eine bereits bestehende Entzündungsreaktion verstärkt, anstatt als primärer Auslöser der Zellaktivierung zu fungieren.

4.3.4 Schlussfolgerung

Die erhöhte Anzahl von Monozyten, Neutrophilen und MDSCs in der Fallgruppe deutet auf eine verstärkte Aktivierung der angeborenen Immunantwort hin, die möglicherweise zur Aufrechterhaltung einer chronischen Entzündungsreaktion beiträgt. Diese Zellen könnten die adaptive Immunantwort unterdrücken und die T-Zell-Erschöpfung fördern, was die Fähigkeit des Immunsystems, effizient auf pathogene Herausforderungen zu reagieren, beeinträchtigt. Obwohl diese Ergebnisse die Hypothese einer dysfunktionalen Immunregulation nach epileptischen Anfällen stützen, bleiben die genauen Mechanismen, die zur Aktivierung dieser Zellen führen, unklar. Zukünftige Studien sollten untersuchen, ob epileptische Anfälle direkt die Aktivierung von myeloiden Zellen auslösen oder ob andere systemische Faktoren eine wesentliche Rolle spielen.

4.4 Gegenregulationsmechanismen des Immunsystems

4.4.1 Regulatorische und naive T-Zellen und BHS-Schädigung

Die beobachteten erhöhten Anteile der regulatorischen T-Zellen sind im Gegensatz zu den oben genannten Populationen deutlich schwerer in den Kontext der BHS-Schädigung einzuordnen. Eine Arbeit von Krämer et al. zeigte, dass eine Erniedrigung der regulatorischen T-Zellen mit einer vermehrten Immunzellinfiltration in das ZNS vergesellschaftet ist, und dies in Zusammenhang mit einer vermehrten Durchlässigkeit der BHS steht.¹¹⁴ In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analyse zeigte sich jedoch eine signifikante Erhöhung der Anteile dieser Zellen in den Fallpatientenproben. Diese Beobachtung lässt sich naheliegend als eine immun-regulatorische Reaktion des Organismus auf die übermäßige proinflammatorische Antwort der Anfallspatienten einordnen. Ebenfalls nennenswert ist, dass durch die Expression von FoxP3 auf der Oberfläche der regulatorischen T Zellen eine erleichterte Migration durch die BHS ermöglicht wird.¹¹⁵ Dies führt ebenfalls zu einer Anreicherung peripherer Immunzellen innerhalb des ZNS.

Im Zuge dessen lässt sich hierdurch auch die Erhöhung der naiven T-Zellen einordnen. Eine weitere Differenzierung der naiven T-Zellen wird durch die Tregs kontrolliert und auch herunterreguliert. So kann es zu einer Erhöhung des naiven T-Zellanteils kommen.

4.4.2 Tim3+ Zellen und der neuronale Schaden

Gleichfalls relevant erhöht war der Anteil an Tim-3+ Zellen. Tim-3 wird vor allem von Makrophagen und T-Zellen produziert. Koh zeigte mit seiner Forschungsgruppe, dass Tim-3 bei neuronalem Schaden und vermehrt von dadurch aktivierten Gliazellen sezerniert wird.¹¹⁶ Dieses Molekül führt zu der Entstehung erschöpfter T-Zellen. Erklärbar wäre dies ebenfalls durch einen Mechanismus, welcher der Reduktion der Immunantwort dienen könnte, da die aktuelle Studienlage eine verminderte Immunantwort bei erhöhten Anteilen der exhausted Tcells zeigt.¹¹⁷ Dies könnte ein weiterer Versuch des Organismus darstellen, die Inflammation und somit den voranschreitenden Schaden an der BHS zu stoppen.

4.4.3 Lag3+ T-Zellen und Gegenregulation

Die parallel hierzu erhöhten Anteile der Lag3+ T-Zellen lassen in Bezug auf die Theorie des Versuches einer Gegenregulation eine ähnliche Funktion vermuten. Die Expression von Lag-3, kann ein Indikator für eine regulierende oder hemmende Funktion der Zelle sein. Da dieser Oberflächenmarker beim Gesunden die immunologische Toleranz erhöhen kann, ist er bei übermäßiger Expression vermutlich eher als Suppressionsversuch seitens des Immunsystems zu werten.

¹¹⁴ Krämer et al., 2019

¹¹⁵ Schneider-Hohendorf et al., 2010

¹¹⁶ Koh et al., 2015

¹¹⁷ Gao et al., 2022

4.4.4 Th2-Zellen und glialer Zellschutz

Um folgendes Ergebnis korrekt beschreiben und einordnen zu können, ist an dieser Stelle erneut zu erwähnen, dass die entnommenen Zellen lediglich die Situation im Blut der Patienten darstellen und keine exakte Aussage über das Verhalten der Zellen in anderen Körperkompartimenten getroffen werden kann. Die Th2-Zellen gelten, anders als ihre verwandten Th1 und Th17 Zellen, als neuroprotektiv in Bezug auf den glialen Zellschaden bei neuronalem Zelluntergang.¹¹⁸ Hierbei kommt es durch ein chemotaktisches Signal zu einer vermehrten Migration der Zellen in das ZNS. Deren Ziel ist es, den Schaden durch proinflammatorische Zytokine an der BHS und den neuronalen Zellen selbst abzumildern und die fortschreitende Permeabilitätssteigerung zu verlangsamen. Für eine verstärkte Migration würden auch die Ergebnisse der Auswertungen der Anteile der Th2-Zellen sprechen. Ebenso anzuführen ist, dass das von ihnen produzierte Interleukin-13 in der Fallgruppe signifikant höher exprimiert wurde. Es fördert die Transformation der Makrophagen in ihren M2-Phänotyp. Dieser Subtyp gilt als protektiv in Bezug auf die Erhaltung der BHS-Integrität und generell als antiinflammatorisch.¹¹⁹ Dies ist ein weiteres Indiz für eine erhöhte Gegenregulation und den Versuch die Barrierefunktion der BHS zu erhalten und so einer weiteren Permeabilitätssteigerung entgegenzuwirken.

4.4.5 Rolle der Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) bei der immunologischen Gegenregulation

Die Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) regulieren ebenfalls die Immunantwort. Deren erhöhter Anteil bekräftigt ebenso die Annahme des Versuches einer antiinflammatorischen Gegenregulation des Körpers. Die unter anderem durch eine Erhöhte IFN-gamma Konzentration aktivierten MDSC, produzieren durch einen STAT1 Pathway und der daraus resultierenden iNOS-Induktion (induzierte NO-Synthase) eine vermehrte Freisetzung von NO. Dies führt im Verlauf zu einer T-Zell-Suppression. Auch die bereits in der Einleitung aufgeführte Cyclooxygenase kann in Hinblick auf die immunregulatorische Funktion der MDSCs verstärkend wirken. Die Aktivierung führt außerdem zu einer Hemmung der weiteren Differenzierung der MDSCs zu dendritischen Zellen, was einer zusätzlichen Schädigung der BHS durch den vermehrten Anfall an DCs entgegenwirkt. Diese Annahme deckt sich mit dem bisherigen wissenschaftlichen Stand, laut welchem die Erhöhung der MDSC vor Allem bei Glioblastom- und auch MS-Patienten untersucht wurde.¹²⁰

¹¹⁸ Hendrix et al., 2007

¹¹⁹ Qiu et al., 2021

¹²⁰ Melero-Jerez et al., 2015

4.4.6 Granzym B und T-Zell-Suppression

Die Serinprotease Granzym B, welche nachweislich nach Sekretion durch T-Zellen die Leckage der Blut-Hirn-Schranke verstärkt und somit auch die Extravasation der T-Zellen fördert, zeigte sich in den Ergebnissen signifikant niedriger als bei den Kontrollen.¹²¹ Dieses Finding wäre durch die hemmende Wirkung der stark erhöhten regulatorischen T-Zellen erklärbar. Durch ihre Zell-Zell-Kontakte mit CTLA-4 und PD-1 kommt es zu einer Erniedrigung der Granzym Produktion. Diese These wird durch das Ergebnis der erhöhten IL-10 Expression gestützt. Durch die Bindung an den IL-10-Rezeptor führt es über einen JAK-STAT-Kinasen-Pathway zu einer verminderten Granzym B Expression.¹²² Auch die Differenz durch Stimulation veränderte sich nicht merklich, was ebenfalls für eine stark hemmende Wirkung der regulatorischen T Zellen auf die Granzym-Produktion spricht.

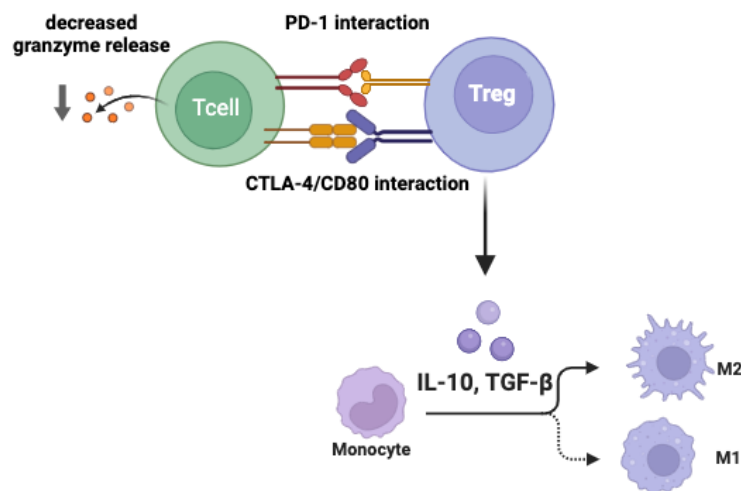


Abbildung 59: Darstellung des Interaktionsmechanismus der T-Zellpopulationen und deren Auswirkung auf die monozytäre Differenzierung¹²³

4.4.7 Schlussfolgerung

Die beobachteten Immunprofile weisen auf eine komplexe, gegenregulatorische Immunantwort des Körpers hin, die offenbar die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu schützen versucht. Die erhöhten Anteile regulatorischer T-Zellen sowie die spezifischen Expressionsmuster immunmodulierender Moleküle (z. B. Tim-3 und Lag-3) und Th2-Zellen deuten darauf hin, dass diese Zellpopulationen eine antiinflammatorische Reaktion fördern. Diese Reaktion scheint auf die Minderung des proinflammatorischen Überhangs abzielen, der mit der BHS-Schädigung durch epileptische Anfälle einhergeht. Parallel zeigt sich durch die erhöhte Expression von MDSCs und die Suppression Granzym B-produzierender T-Zellen eine gesteigerte inhibitorische Immunaktivität, die möglicherweise die Permeabilität der BHS kontrollieren und die neuronale Integrität schützen soll. Diese Ergebnisse verdeutlichen das Potenzial des Immunsystems, durch verschiedene gegenregulatorische Mechanismen die durch epileptische Anfälle induzierte Neuroinflammation abzumildern und die Integrität der BHS zu bewahren.

¹²¹ Prakash et al., 2014

¹²² Cao et al., 2007

¹²³ Eigene Darstellung erstellt mit Hilfe der Biorender-Software

4.5 Verminderte immunregulatorische Aktivität durch TIGIT und CTLA-4

In der vorliegenden Analyse zeigte sich, dass die Fallgruppe signifikant niedrigere Anteile an TIGIT- und CTLA-4-exprimierenden T-Zellen aufwies. TIGIT und CTLA-4 sind zentrale Regulatoren der Immunantwort und spielen eine entscheidende Rolle bei der Hemmung überschießender Immunreaktionen und der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz. Die verminderte Expression dieser beiden Moleküle in der Fallgruppe legt nahe, dass die immunregulatorische Kontrolle in dieser Kohorte beeinträchtigt ist.

4.5.1 Verminderte Expression von TIGIT und CTLA-4

Die Analyse der T-Zellpopulationen ergab, dass sowohl TIGIT- als auch CTLA-4-exprimierende Zellen in der Fallgruppe signifikant reduziert waren. Dies betrifft neben den CD4+- auch die CD8+-T-Zellpopulationen. TIGIT ist als Immun-Checkpoint-Marker bekannt, der die T-Zell-Aktivierung hemmt und eine Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen fördert. Während CTLA-4 primär als negativer Regulator der T-Zell-Kostimulation fungiert und damit eine übermäßige Immunreaktion verhindert. Der Verlust dieser zentralen Regulatoren könnte demzufolge zu einer unkontrollierten T-Zell-Aktivierung und einer proinflammatorischen Immunantwort in der Fallgruppe führen.

4.5.2 Fehlende Kontrolle der Entzündungsreaktion

Die Reduktion dieser regulatorischen Moleküle in der Fallgruppe könnte mit der erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-13 und IL-17 korrelieren, die ebenfalls in dieser Kohorte nachgewiesen wurden. Ohne die notwendige Regulierung durch TIGIT und CTLA-4 könnten T-Zellen in der Fallgruppe weniger effektiv darin sein, ihre eigene Aktivierung zu kontrollieren, was zu einer chronischen Entzündungsreaktion nach epileptischen Anfällen führen könnte. Dies wird durch die signifikant erhöhte Zahl von Tim3+- und Lag3+-T-Zellen in der Fallgruppe unterstützt, die auf eine Erschöpfung der T-Zellen hindeuten und zudem mit einer chronischen Aktivierung verbunden sind.

4.5.3 Verschiebung der Monozytären Subpopulationen

Eine weitere relevante Beobachtung in der Fallgruppe war die Verschiebung der monozytären Subpopulationen. Es wurde eine Erhöhung der klassischen Monozyten festgestellt, während die Anteile der nicht-klassischen Monozyten, die für Gewebereparatur und antientzündliche Funktionen verantwortlich sind, signifikant erniedrigt waren. Diese Verschiebung spricht für eine verminderte Regenerations- und antientzündliche Kapazität, die zur Aufrechterhaltung einer proinflammatorischen Umgebung und möglicherweise zur Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) beiträgt. Die klassischen Monozyten könnten durch ihre proinflammatorische Aktivität die Integrität der BHS weiter schwächen, was in Kombination mit den verminderten regulatorischen Ressourcen eine fortschreitende Schädigung der BHS begünstigen könnte.

4.5.4 Rolle der regulatorischen T-Zellen (Tregs) und Zytokine

Obwohl die Fallgruppe eine verminderte Expression von TIGIT und CTLA-4 zeigte, wiesen die Patienten erhöhte Anteile an FoxP3+-regulatorischen T-Zellen (Tregs) auf, die normalerweise für die Unterdrückung überschießender Immunantworten verantwortlich sind. Allerdings war in der Fallgruppe auch die Expression von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF-beta deutlich reduziert, sowohl im Nativ- als auch im stimulierten Zustand. Diese Zytokine, die ebenfalls von Tregs produziert werden, spielen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und der Regulierung von Entzündungsreaktionen. Die niedrigen Werte an IL-10 und TGF-beta könnten auf eine beeinträchtigte inflammationsregulierende Kompetenz hinweisen. Bei Störungen der immunregulierenden TGF-beta-Achse konnten zunehmende Verschlechterungen inflammatorischer Erkrankungen sowie eine häufigere Entstehung von Tumoren nachgewiesen werden.¹²⁴ Die Tatsache, dass IL-10 bei den Anfallspatienten nach Stimulation sogar weiter erniedrigt wurde, könnte Ausdruck einer verminderten Resilienz des Immunsystems sein. In der derzeitigen Literatur sind im proinflammatorischen Zustand bzw. bei Sepsis die Erhöhung der IL-10 Expression beschrieben, was diese These unterstreicht.¹²⁵ Die auch bereits nach epileptischen Anfällen beobachteten Erhöhungen der IL-10 Anteile, welche eine Potenzierung der Treg Aktivität zur Folge hätte, konnte hier nicht bestätigt werden.¹²⁶

4.5.5 Erhöhte Anteile an CD28-negativen T-Zellen

Zusätzlich zu den regulatorischen Defiziten und den proinflammatorischen Veränderungen wurde in der Fallgruppe ein signifikanter Anstieg der CD28-negativen T-Zellen, sowohl in den CD4+- als auch in den CD8+-T-Zellpopulationen, festgestellt. Diese Zellen sind weniger funktionsfähig und häufiger in inflammatorischen Zuständen zu finden. Erhöhte Anteile an CD28-negativen Zellen wurden in mehreren Studien, einschließlich van Aalderen et al.¹²⁷, mit chronischen Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine Rolle der CD28 negativen Zellen bei übermäßigen oder unkontrollierten Immunreaktionen.¹²⁸ Die hier beobachteten Erhöhungen in naiven T-Zellen, T-Gedächtniszellen und Temra-Zellen unterstützen die Hypothese einer unkontrollierten postiktalen Inflammation. Zudem zeigten sich bei Patienten mit vorbestehenden Epilepsien signifikante Unterschiede im Vergleich zu Patienten mit erstmaligen Anfällen, was ein Indiz auf ein mögliches Priming und die Etablierung einer chronischen Immunaktivierung sein könnte.

¹²⁴ Batlle et al., 2019

¹²⁵ Zhang et al., 2021

¹²⁶ Prodjinotho et al., 2022

¹²⁷ Van Aalderen et al., 2015

¹²⁸ Broadley et al., 2017

4.5.6 Schlussfolgerung

Insgesamt weisen die Ergebnisse auf eine deutliche Dysregulation der immunologischen Kontrollmechanismen in der Fallgruppe hin. Die reduzierte Expression von TIGIT, CTLA-4 sowie antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF-beta deutet auf eine fehlende Immunregulation hin, die eine unkontrollierte T-Zell-Aktivierung und eine chronische Entzündungsreaktion nach epileptischen Anfällen begünstigen könnte. Die erhöhte Anzahl an CD28-negativen T-Zellen sowie die Verschiebung der Monozytensubpopulationen verstärken das Bild einer übermäßigen Immunreaktion, die möglicherweise zur Schädigung der Blut-Hirn-Schranke beiträgt.

4.6 BHS-Störung und postiktale Zustände

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die postiktalen Zustände nach epileptischen Anfällen eine signifikante Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität (BHS) begünstigen könnten. Einer der zentralen Befunde ist die signifikant erhöhte Anzahl an Th9-Zellen in der Fallgruppe. Diese Zellen produzieren das Zytokin Interleukin-9 (IL-9), dessen Einfluss auf die BHS zunehmend anerkannt wird. IL-9 wird direkt mit einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke in Verbindung gebracht, indem es die strukturelle Barrierefunktion der Endothelzellen schwächt.¹²⁹ Die vermehrte Differenzierung zu Th9-Zellen infolge der proinflammatorischen Situation nach epileptischen Anfällen könnte also eine Schwächung der Blut-Hirn-Schranke und eine erhöhte Migration von Immunzellen ins ZNS fördern.

4.6.1 Monozyten und Chemokin-Ligand-2 (CCL-2)

Darüber hinaus wurde eine signifikante Zunahme von Monozyten und eine Veränderung der Monozytensubpopulationen festgestellt. Diese Ergebnisse lassen sich ebenfalls in den Kontext der Schädigung der Blut-Hirn-Schranke einordnen. Die neuronale und gliale Schädigung durch epileptische Anfälle führt zur Freisetzung von Chemokin-Ligand-2 (CCL-2), das eine vermehrte Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten bewirkt.¹³⁰ Diese aktivierten Monozyten können die durch die Entzündung bereits geschwächte Blut-Hirn-Schranke passieren und ins ZNS eindringen, wo sie die Entzündungsreaktion aufrechterhalten.¹³¹ Zusätzlich zur Migration durch die BHS produzieren Monozyten nach Aktivierung Zytokine wie TNF- α , die weiter zur Schwächung der Barriere und zur Verstärkung der neuroinflammatorischen Prozesse beitragen.

4.6.2 IL-17 und TNF- α

Besonders interessant sind die Befunde zu IL-17, einem weiteren proinflammatorischen Zytokin, das in der Fallgruppe signifikant erhöht war. IL-17 ist bekannt dafür, die Produktion von TNF- α zu induzieren, einem Zytokin, das nachweislich eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke bewirkt. Die erhöhten Werte von IL-17 und TNF- α in der Fallgruppe deuten auf eine Verstärkung dieser proinflammatorischen Achse hin, die die strukturelle Integrität der BHS untergräbt. Die signifikanten Unterschiede zwischen den unstimulierten und stimulierten Zuständen der Zellen lassen zudem auf ein mögliches Priming dieser Zellen hin, wodurch sie nach Aktivierung schneller und stärker auf Entzündungsreize reagieren, was zur anhaltenden Produktion von TNF- α führt.

¹²⁹ Savari et al., 2020

¹³⁰ Bosco et al., 2020

¹³¹ Qiu et al., 2021

4.6.3 Dendritische Zellen und neuroinflammatorische Kaskade

Auch die erhöhte Anzahl von dendritischen Zellen in der Fallgruppe könnte eine Rolle in der Schädigung der Blut-Hirn-Schranke spielen. Obwohl die wissenschaftliche Literatur zu diesem Thema begrenzt ist, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass dendritische Zellen im Rahmen einer ablaufenden Entzündungsreaktion weitere T-Zellen aktivieren und die Entzündung aufrechterhalten.¹³² Diese Aktivierung könnte eine neuroinflammatorische Kaskade unterstützen, die sich negativ auf die BHS-Integrität auswirkt.

4.6.4 Neutrophile und IL-8-Signalwege

Zusätzlich wurden signifikant erhöhte Anteile an Neutrophilen in der Fallgruppe beobachtet, deren chemotaktisches Signal IL-8 ist. Hierbei handelt es sich um ein Zytokin, das von Endothelzellen und T-Zellen freigesetzt wird. IL-8 wurde zudem mit einer Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität in Verbindung gebracht.¹³³ Diese chemotaktischen Signale führen zu einer Anreicherung und Proliferationssteigerung der Neutrophilen, was die erhöhten Anteile in der Fallgruppe erklären kann. Über eine Interaktion mit den endothelialen Zellen über PSGL/P-Selectin, very late antigen 4 ($\alpha 4\beta 1$)/VCAM-1 und function-associated antigen-1 (LFA-1)/ICAM-1-Signalwege, ist eine Migration durch die BHS möglich. Ursächlich für die Rekrutierung und Extravasion könnten die Rezeptoren A kinase anchoring protein 7 (AKAP7) und CD74 sein, für welche diese Funktion bereits bei ischämischen Schlaganfällen vorbeschrieben ist. Neutrophile Granulozyten produzieren reaktive Sauerstoffspezies und Proteasen, die eine zusätzliche Schädigung der Blut-Hirn-Schranke bewirken könnten, indem sie die Barrierefunktion der Endothelzellen weiter schwächen.

4.6.5 IFN- γ und CXCL10

Ein weiterer bedeutender Befund ist die erhöhte Anzahl von Interferon-gamma (IFN- γ)-exprimierenden Leukozyten in der Fallgruppe. IFN- γ , ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, trägt maßgeblich zur Erhöhung der BHS-Permeabilität bei.¹³⁴ Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass Endothelzellen direkt auf IFN- γ reagieren, was zu einer erhöhten Permeabilität der BHS führt. Dieser Mechanismus wurde insbesondere bei zentralnervösen Infektionen nachgewiesen, wobei IFN- γ eine zentrale Rolle in der Schwächung der Schrankenfunktion spielt. Die gesteigerte Expression von IFN- γ in der Fallgruppe deutet darauf hin, dass dieses Zytokin auch nach epileptischen Anfällen zu einer sukzessiven Schwächung der Blut-Hirn-Schranke beiträgt, indem es einen Kreislauf aufrechterhält, in dem proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ selbst die Produktion von CXCL10 fördern. CXCL10 verstärkt die Rekrutierung weiterer IFN- γ -exprimierender Leukozyten, was zu einer kontinuierlichen Verstärkung der entzündlichen Prozesse und einer weiteren Schädigung der BHS führt.

¹³² Serna-Rodríguez et al., 2022

¹³³ Kossmann et al., 1997

¹³⁴ Daniels et al. 2014

4.6.6 Schlussfolgerung

Die Studie zeigt somit auf, dass die durch epileptische Anfälle ausgelöste Immunantwort potenziell eine direkte Schädigung der Blut-Hirn-Schranke begünstigt. Diese Schädigung erfolgt über multiple Mechanismen, die durch proinflammatorische Zytokine, aktivierte Monozyten und Neutrophile sowie die gestörte T-Zell-Funktion vermittelt werden. Die Erkenntnisse lassen vermuten, dass eine chronische Inflammation, gekoppelt mit der anhaltenden Aktivierung angeborener und adaptiver Immunzellen, zu einer progressiven Schwächung der Blut-Hirn-Schranke führt. Weitere Untersuchungen auf molekularer Ebene sind erforderlich, um die spezifischen Signalwege und molekularen Mechanismen zu identifizieren, die diese Schädigung vermitteln, insbesondere im Hinblick auf potenzielle therapeutische Ansätze, die auf die Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke abzielen könnten.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Studie wurde die immunologische Reaktion nach epileptischen Anfällen untersucht, wobei der Fokus auf den Mechanismen der Blut-Hirn-Schranke (BHS)-Schädigung und der Dysregulation des zellulären Immunsystems lag. Die erhobenen Daten zeigen deutlich, dass epileptische Anfälle tiefgreifende Auswirkungen auf verschiedene Immunzellpopulationen haben, was eine Verschiebung des immunologischen Gleichgewichts und eine potenzielle Schwächung der BHS zur Folge hat. Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass eine postiktale Immunaktivierung eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung eines entzündlichen Mikromilieus im Zentralnervensystem (ZNS) spielt, welches die Integrität der BHS beeinträchtigen könnte.

Ein zentraler Befund ist die signifikante Zunahme von Monozyten, Neutrophilen und myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in der Fallgruppe. Diese Zellen, die primär in der angeborenen Immunantwort eine Rolle spielen, tragen durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IFN- γ zur Verstärkung der Entzündungsprozesse bei. Monozyten, insbesondere in ihrer aktivierten Form, dringen durch die geschwächte BHS in das ZNS ein, wo sie die Entzündungsreaktion aufrechterhalten und möglicherweise zu einer weiteren Schädigung der BHS beitragen. Darüber hinaus produzieren sie Mediatoren, die die Migration von T-Zellen und anderen Immunzellen ins ZNS fördern, was die entzündlichen Prozesse zusätzlich verstärkt.

Besonders bemerkenswert ist die Erhöhung der Th9-Zellen in der Fallgruppe, die IL-9 produzieren. IL-9 ist in der Literatur zunehmend als proinflammatorisches Zytokin anerkannt, das die Permeabilität der BHS erhöht. Die Beobachtung, dass die Differenzierung zu Th9-Zellen nach epileptischen Anfällen verstärkt erfolgt, legt nahe, dass IL-9 eine zentrale Rolle bei der Schwächung der BHS spielt. Dies könnte erklären, warum postiktale Zustände oft mit einer erhöhten Anfälligkeit für ZNS-Schädigungen einhergehen, da die geschwächte BHS ein Eindringen von Immunzellen in das ZNS erleichtert.

5.1 T-Zell-Dysregulation und Erschöpfung

Ein weiterer wichtiger Befund der Studie ist die deutliche Dysregulation der T-Zell-Antwort in der Fallgruppe. Die erhöhte Anzahl an CD28-negativen T-Zellen deutet auf eine T-Zell-Erschöpfung hin, was eine verminderte Funktionalität des adaptiven Immunsystems zur Folge hat. Diese Zellen, die durch den Verlust des kostimulatorischen Moleküls CD28 gekennzeichnet sind, zeigen eine reduzierte Fähigkeit, auf antigene Stimulation zu reagieren, was die Immunkompetenz der Patienten erheblich beeinträchtigt.

Zusätzlich zur Abnahme der Funktionalität der T-Zellen wurde eine erhöhte Expression von Erschöpfungsmarkern wie Tim3 und Lag3 nachgewiesen, die typischerweise mit chronischer Immunaktivierung assoziiert sind. Diese Ergebnisse legen nahe, dass epileptische Anfälle nicht nur zu einer akuten Immunaktivierung führen, sondern auch langfristige immunologische Konsequenzen haben können, die zu einer chronischen Dysregulation und Erschöpfung der T-Zellen führen. Diese chronische Aktivierung könnte durch die fortlaufende Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-17 und TNF- α aufrechterhalten werden, was die persistierenden entzündlichen Prozesse im ZNS weiter verstärkt.

5.2 Regulatorische Mechanismen

Interessanterweise wurde in der Fallgruppe auch eine signifikante Zunahme regulatorischer T-Zellen (Tregs) beobachtet, was auf einen möglichen Gegenregulationsmechanismus des Immunsystems hindeutet. Tregs sind für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und die Unterdrückung überschießender Immunantworten verantwortlich. Die erhöhte Anzahl dieser Zellen könnte darauf hindeuten, dass das Immunsystem versucht, die durch die chronische T-Zell-Aktivierung und -Erschöpfung induzierten Entzündungsprozesse zu kontrollieren. Dennoch bleibt unklar, ob dieser kompensatorische Mechanismus ausreicht, um die durch die proinflammatorischen Zytokine verursachten Schäden an der BHS und die chronische Entzündungsreaktion effektiv zu unterdrücken.

5.3 Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert wertvolle Erkenntnisse über die immunologischen Veränderungen nach epileptischen Anfällen und deren potenziellen Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke. Die beobachtete Zunahme proinflammatorischer Zytokine wie IL-9, IL-17, TNF- α und IFN- γ sowie die Aktivierung von Monozyten und Neutrophilen deuten darauf hin, dass epileptische Anfälle einen potenziellen Mechanismus für die Schädigung der BHS darstellen. Diese Erkenntnisse eröffnen neue Möglichkeiten für therapeutische Interventionen, die darauf abzielen, die durch Anfälle induzierten Entzündungsreaktionen zu modulieren.

Zukünftige Forschungsarbeiten sollten sich darauf konzentrieren, die genauen molekularen Mechanismen zu identifizieren, die zur Aktivierung der proinflammatorischen Zytokine und zur Dysregulation der T-Zellen nach epileptischen Anfällen führen. Insbesondere die Rolle von IL-9 und Th9-Zellen sollte in zukünftigen Studien genauer untersucht werden, da dieses Zytokin eine zentrale Rolle bei der Permeabilität der BHS zu spielen scheint.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz könnte die gezielte Modulation der T-Zell-Antwort sein. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass CD28-negative T-Zellen eine zentrale Rolle bei der T-Zell-Erschöpfung spielen, könnte die Wiederherstellung der Funktionalität dieser Zellen durch Immuntherapien, die die CD28-Kostimulation wiederherstellen, ein vielversprechender Ansatz sein, um die Immunantwort nach epileptischen Anfällen zu verbessern. Darüber hinaus könnte die Blockade der Erschöpfungsmarker Tim3 und Lag3 eine Möglichkeit darstellen, die chronische T-Zell-Erschöpfung zu reduzieren und die Effektivität der adaptiven Immunantwort zu steigern.

Zukünftige klinische Studien sollten zudem untersuchen, ob therapeutische Ansätze, die auf die Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-17 und TNF- α abzielen, dazu beitragen können, die durch epileptische Anfälle ausgelösten Entzündungsprozesse zu minimieren und die Integrität der BHS zu bewahren. Der Einsatz von Anti-TNF- α -Therapien, wie sie bereits bei chronisch entzündlichen Erkrankungen erfolgreich eingesetzt werden, könnte ein vielversprechender Ansatz sein, um die langfristigen negativen Auswirkungen von epileptischen Anfällen auf die Immunantwort und die BHS zu verringern.

Zusammenfassend verdeutlicht die vorliegende Studie die Bedeutung einer umfassenden Untersuchung der immunologischen Veränderungen nach epileptischen Anfällen. Die Ergebnisse legen nahe, dass eine chronische Entzündungsreaktion zur Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und zur Erschöpfung der T-Zellen beiträgt. Langfristig könnten therapeutische Ansätze, die darauf abzielen, die entzündlichen Prozesse zu modulieren und die Integrität der BHS zu stabilisieren, dazu beitragen, die Immunhomöostase nach epileptischen Anfällen wiederherzustellen und das Risiko für langfristige ZNS-Schädigungen zu verringern.

Die Frage nach einem vorangegangenen Priming der Zellen, welches sich in der unterschiedlichen Reaktion auf Stimulation äußerte, kann mit den hierdurchgeführten Analysen nicht eingehender ermittelt werden und stellt somit eine Grenze dieser Studie dar. Die Untersuchung der intrazellulären molekulargenetischen Veränderungen sollte Gegenstand zukünftiger wissenschaftlicher Arbeiten sein, um einen noch präziseren Einblick in die genauen Auswirkungen der epileptischen Anfälle zu erlangen.

6. Anhang

6.1 Patientenaufklärung



Medizinische Fakultät Mannheim
der Universität Heidelberg
Universitätsklinikum Mannheim



Verantwortlicher Prüfartz:

Klinikdirektor Neurologische Klinik
Prof. Dr. med. M. Platten
Theodor-Kutzer-Ufer 1-3
68167 Mannheim
+49-621-383-2885

Patienteninformation

Zur Spende, Lagerung und Nutzung von Biomaterialien und klinischen Daten für die medizinische Forschung

Biobank der Neurologischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim

Titel der Studie:

Einrichtung einer Biomaterialbank durch die Neurologische Klinik der Universitätsmedizin Mannheim mit dem Ziel des Studiums immunologischer Mechanismen in der Entstehung und Therapieresistenz sowie dem Verlauf von neurovaskulären Erkrankungen (Schlaganfall) in Abgrenzung zu neuroimmunologischen (Multiple Sklerose), neurodegenerativen (Parkinson) und Hirntumorerkrankungen.

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband,

Die Untersuchung von menschlichen Biomaterialien und die Analyse der daraus gewonnenen oder zu gewinnenden Daten sind zu einem wichtigen Instrument medizinischer Forschung geworden. So wissen wir heute, dass zum Beispiel die Erbsubstanz (Gene) bei der Entstehung und Behandlung von Krankheiten eine wichtige Rolle spielt. **Deshalb fragen wir unsere Patienten * und daher auch Sie, ob sie bereit sind, uns bestimmte Körpermaterialien und Daten für die Forschung zur Verfügung zu stellen.** Die

* Im Rahmen dieses Textes schließt die männliche Bezeichnung stets die weibliche Bezeichnung mit ein.



Körpermaterialien wie Blut, biopsiertes Gewebe und Liquor (Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit) sollen in einer sogenannten Biobank gesammelt und mit zugehörigen medizinischen Daten verknüpft werden. Diese Biobank wird betrieben von der Neurologischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie der Universitätsmedizin Mannheim.

Ihre Teilnahme ist freiwillig. Soweit Sie sich nicht beteiligen möchten oder Ihre Zustimmung später widerrufen möchten, erwachsen Ihnen daraus keine Nachteile.

Im Folgenden informieren wir Sie über die Ziele der Biobank, die Verfahrensweisen und die Maßnahmen zum Schutz Ihrer personenbezogenen Daten, damit Sie sich auf dieser Grundlage Ihre eigene Meinung bilden und eine Entscheidung treffen können.

1. Welche Ziele verfolgt die Biobank?

Die Biobank dient der Förderung der medizinischen Forschung. Dazu sollen die gesammelten Biomaterialien und zugehörige Daten langfristig aufbewahrt werden und der Forschung zur Verfügung stehen, um die Vorbeugung, Erkennung und Behandlung von Erkrankungen zu verbessern. **Das Ziel dieser Forschung ist nicht, bei Ihnen oder anderen einzelnen Personen eine Diagnose zu erstellen oder krankheitsauslösende Veranlagungen nachzuweisen.** Vielmehr sollen bei der vergleichenden Untersuchung von größeren Personengruppen biomedizinische Zusammenhänge im Hinblick auf immunologische Mechanismen in der Entstehung und Therapieresistenz sowie dem Verlauf von neurovaskulären Erkrankungen (z.B. Schlaganfall) in Abgrenzung zu neuroimmunologischen (Multiple Sklerose), neurodegenerativen (Parkinson) und Hirntumorimmunerkrankungen ermittelt werden.

2. Um welche Art von Biomaterialien und Daten handelt es sich?

Bei dem Biomaterial handelt es sich um bis zu 20 ml EDTA Blut, bis zu 20 ml Serum, bis zu 60 ml Heparinblut, und bis zu 10 ml (mindestens 5 ml) Liquor, die Ihnen zusätzlich zu Forschungszwecken entnommen werden sollen. Gewebe, Blut und eventuell Liquor werden im Rahmen medizinisch notwendiger Entnahmen gewonnen, sodass Ihnen keine zusätzlichen Schmerzen oder Belastungen durch die Abnahme eines zusätzlichen Röhrchens entstehen. Bei Patienten, bei denen aus diagnostischen oder therapeutischen Zwecken sowieso mehr Liquor entnommen wird (z.B. bei Normaldruckhydrozephalus oder bei Idiopathischer intrakranieller Hypertension) soll bis zu 30 ml Liquor zusätzlich entnommen werden. Hierbei handelt es sich um Liquor, der ansonsten verworfen wird. Bei der Durchführung von Biopsien (z.B. Nervenbiopsie, Muskelbiopsie, Hautbiopsie) soll die Asservierung des Gewebes erfolgen. Zudem werden ggf. auch weitere Biomaterialien, deren Gewinnung nicht mit einer medizinischen



Maßnahme verbunden ist (z.B. Stuhlprobe, Urinprobe, Haare, Speichelprobe) gesammelt. Die erhobenen Daten umfassen Informationen zu Ihrer Person, insbesondere medizinische Daten wie Diagnose, Therapie, klinische und bildgebende Befunde, Alter und Geschlecht.

3. Wie werden die Biomaterialien und Daten verwendet?

Die von Ihnen zur Verfügung gestellten Biomaterialien und Daten werden ausschließlich für die Erforschung immunologischer Mechanismen in der Entstehung und Therapieresistenz sowie dem Verlauf von neurovaskulären Erkrankungen (z.B. Schlaganfall) in Abgrenzung zu neuroimmunologischen (z.B. Multiple Sklerose), neurodegenerativen (z.B. Parkinson) und Hirntumorerkrankungen verwendet.

Die genauen Fragestellungen können jedoch zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht konkret benannt werden. **Deshalb werden an Ihren Biomaterialien möglicherweise auch genetische Untersuchungen durchgeführt, und zwar unter Umständen auch eine Untersuchung Ihrer gesamten Erbsubstanz (Genom). Die Durchführung von Untersuchungen zum Zwecke der Identifikation des Spenders sind allerdings ausgeschlossen.**

Die Biomaterialien und Daten sollen zunächst unbegrenzt (bzw. bis zum Widerruf durch Sie) aufbewahrt und für die medizinische Forschung bereitgestellt werden.

Aus logistischen Gründen ist es der Biobank nicht möglich, individuelle Eingrenzungen (z.B. Ausschluss bestimmter Forschung, Ausschluss der Weitergabe der Materialien an Dritte) vorzunehmen. Wenn Sie mit der beschriebenen Art und Dauer der Nutzung nicht in vollem Umfang einverstanden sind, sollten Sie Ihre Einwilligung nicht erteilen.

4. Welche Risiken sind mit Ihrer Spende verbunden?

a. Gesundheitliche Risiken

Bei Ihnen ist aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen ohnehin eine Blut- und/oder Liquorentnahme sowie ggf. eine Biopsie geplant. In deren Rahmen möchten wir insgesamt bis zu 100 ml Blut zusätzlich abnehmen (das entspricht etwa 6,5 Esslöffeln). Außerdem würden wir bei einer geplanten Liquorabnahme bis zu 10 ml (mindestens 5 ml) Liquor zusätzlich abnehmen. Wenn bei Ihnen aus medizinischen/therapeutischen Gründen sowieso mehr Liquor entnommen werden soll (z.B. bei Normaldruckhydrozephalus oder bei Idiopathischer intrakranieller Hypertension), wird dieser zusätzliche Liquor (bis zu 30 ml), der sonst verworfen werden würde, ebenfalls aufbewahrt.



Erwachsene haben 120 – 200 ml Liquor. Pro Minute werden 0.3 – 0.4 ml Liquor produziert (ca. 500 – 700 ml pro Tag). Die maximal 10 entnommenen Milliliter werden somit in ca. 25 min. wieder gebildet. Die Prozedur dauert etwa 5 – 15 min.

Bei der Durchführung von Biopsien (Nervenbiopsie, Muskelbiopsie, Hautbiopsie) aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen, wird Gewebe, welches nicht für die Routinediagnostik genutzt wird, ebenfalls aufbewahrt.

Diese Entnahmen sind für Sie mit keinem zusätzlichen gesundheitlichen Risiko verbunden.

b. Weitere Risiken

Bei jeder Erhebung, Speicherung und Übermittlung von Daten aus Ihren Biomaterialien im Rahmen von Forschungsprojekten bestehen Vertraulichkeitsrisiken (z.B. die Möglichkeit, Sie zu identifizieren), insbesondere im Hinblick auf die Information zu Ihrer Erbsubstanz. Diese Risiken lassen sich nicht völlig ausschließen und steigen, je mehr Daten miteinander verknüpft werden können, insbesondere auch dann, wenn Sie selbst (z.B. zur Ahnenforschung) genetische Daten im Internet veröffentlichen. Unter Punkt 7 „Wer hat Zugang zu Ihren Biomaterialien und Daten?“ erläutern wir Ihnen genauer, wie Ihre Privatsphäre geschützt wird.

5. Welcher Nutzen ergibt sich für Sie persönlich?

Persönlich können Sie für Ihre Gesundheit keinen unmittelbaren Vorteil oder Nutzen aus der Spende Ihrer Proben und Daten erwarten. Deren Auswertung dient ausschließlich Forschungszwecken und nicht dazu, Rückschlüsse auf Ihre Gesundheit zu ziehen. Es ist jedoch im Einzelfall möglich, dass ein Forscher zu der Einschätzung gelangt, dass ein Auswertungsergebnis für Ihre Gesundheit von erheblicher Bedeutung ist. Das ist insbesondere der Fall, wenn sich daraus ein dringender Verdacht auf eine schwerwiegende, bisher möglicherweise nicht erkannte Krankheit ergibt, die behandelt oder deren Ausbruch verhindert werden könnte. In einem solchen Fall kann eine Rückmeldung an Sie erfolgen (siehe unten Punkt 9).

Falls Sie keine Rückmeldung erhalten möchten, streichen Sie bitte die Möglichkeit einer erneuten Kontaktaufnahme (siehe auch unten Punkt 9). Sie können Ihre Entscheidung für oder gegen eine Rückmeldungsmöglichkeit jederzeit durch Mitteilung an uns ändern. Beachten Sie dabei, dass Sie Gesundheitsinformationen, die Sie durch eine solche Rückmeldung erhalten, unter Umständen bei



Medizinische Fakultät Mannheim
der Universität Heidelberg
Universitätsklinikum Mannheim



anderen Stellen (z.B. vor Abschluss einer Kranken- oder Lebensversicherung) offenbaren müssen und dadurch Nachteile erleiden können.

Da auch Untersuchungen Ihrer Erbsubstanz möglich sind, kann sich der vorstehende Text auch auf Ihre genetische Veranlagung für bestimmte Erkrankungen beziehen. Informationen zu Ihrer Erbsubstanz können auch Bedeutung für Ihre Familienangehörigen und die Familienplanung haben.

6. Welcher Nutzen ergibt sich für unsere Gesellschaft?

Medizinisch-wissenschaftliche Forschungsvorhaben zielen auf eine Verbesserung unseres Verständnisses der Krankheitsentstehung und der Diagnosestellung und auf dieser Basis auf die Neuentwicklung von verbesserten Behandlungsansätzen. Mit der Spende Ihrer Biomaterialien für die Biobank der neurologischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim leisten Sie einen wichtigen Beitrag zur Forschung und damit auch zur weiteren Verbesserung der Behandlung und Prävention neurologischer Erkrankungen.

7. Wer hat Zugang zu Ihren Biomaterialien und Daten und wie werden sie geschützt?

a. Alle unmittelbar Ihre Person identifizierenden Daten (Name, Geburtsdatum, Anschrift etc.) werden unverzüglich nach Gewinnung der Biomaterialien durch einen Identifizierungscode ersetzt (pseudonymisiert). Erst in dieser Form werden die Biomaterialien und Daten für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt.

Der gesamte Probenerfassungs- und Datenverwaltungsprozess wird über i-Med und über Kairos, die zentralen Konzepte der Universitätsmedizin Mannheim abgebildet, sobald diese finalisiert sind. Für die Pseudonymisierung erfolgt ebenfalls eine Angliederung an das zentrale UMM Konzept, sobald dieses finalisiert ist.

b. Die Sie unmittelbar identifizierenden Daten bleiben in der Einrichtung, in der die Proben und Daten gewonnen wurden, und werden dort getrennt von den Biomaterialien und medizinischen Daten gespeichert. Die Proben und Daten können deshalb nicht ohne Mitwirkung dieser Einrichtung Ihrer Person zugeordnet werden. Eine solche Zuordnung erfolgt nur, um zusätzliche Daten aus Ihren Krankenunterlagen zu ergänzen oder erneut mit Ihnen in Kontakt zu treten, falls Sie der Kontaktaufnahme zugestimmt haben (siehe unten Punkt 9). **Eine Weitergabe der Ihre Person identifizierenden Daten an**



Forscher oder andere unberechtigte Dritte, etwa Versicherungsunternehmen oder Arbeitgeber, erfolgt nicht.

c. Die kodierten Biomaterialien und medizinischen Daten können für genauer bestimmte medizinische Forschungszwecke nach zuvor festgelegten Kriterien an Universitäten, Forschungsinstitute und forschende Unternehmen, ggf. auch im Ausland, weitergegeben werden. Dabei werden die Daten unter Umständen auch mit medizinischen Daten in anderen Datenbanken verknüpft, sofern die gesetzlichen Voraussetzungen hierfür erfüllt sind. Biomaterialien und Daten, die an Forscher herausgegeben wurden, dürfen nur für den vorbestimmten Forschungszweck verwendet und vom Empfänger nicht zu anderen Zwecken weitergegeben werden. Nicht verbrauchtes Material wird an die Biobank zurückgegeben oder vernichtet.

d. Voraussetzung für die Verwendung der Biomaterialien und Daten für ein konkretes medizinisches Forschungsprojekt ist grundsätzlich, dass das Forschungsvorhaben durch eine Ethik-Kommission bewertet wurde.

e. Wissenschaftliche Veröffentlichungen von Ergebnissen erfolgen ausschließlich anonymisiert, also in einer Form, die keine Rückschlüsse auf Ihre Person zulässt. Eine Veröffentlichung der Gesamtheit Ihrer Erbinformation (Gesamtenom) ist ohne Ihre ausdrückliche schriftliche Einwilligung ausgeschlossen.

8. Erlangen Sie oder die Biobank einen finanziellen Vorteil aus der Nutzung Ihrer Biomaterialien und Daten?

Für die Überlassung Ihrer Biomaterialien und Daten erhalten Sie kein Entgelt. Sollte aus der Forschung ein kommerzieller Nutzen erzielt werden, werden Sie daran nicht beteiligt.

Mit der Überlassung der Biomaterialien an die Neurologische Klinik der Universitätsmedizin Mannheim werden diese Eigentum dieser Biomaterialbank. Ferner ermächtigen Sie die Universitätsmedizin Mannheim Ihre Daten zu nutzen.

Die Biobank verwendet Ihre Biomaterialien und Daten ausschließlich für wissenschaftliche Zwecke. Die Proben und Daten werden nicht verkauft. Die Biobank kann jedoch für die Bereitstellung der Biomaterialien und Daten von den Nutzern eine Aufwandsentschädigung erheben.

9. Erfolgt eine erneute Kontaktaufnahme mit Ihnen?



Medizinische Fakultät Mannheim
der Universität Heidelberg
Universitätsklinikum Mannheim



Zur Erhebung von weiteren Verlaufsdaten kann es sinnvoll werden, zu einem späteren Zeitpunkt erneut Kontakt mit Ihnen aufzunehmen, um ergänzende Informationen und/oder Biomaterialien von Ihnen zu erbitten. Zudem kann die erneute Kontaktaufnahme genutzt werden, um z. B. Ihre Einwilligung in die Verknüpfung mit medizinischen Daten aus anderen Datenbanken einzuholen oder Ihrem behandelnden Arzt eine Rückmeldung über für Sie gesundheitlich relevante Ergebnisse zu geben (siehe oben Punkt 5).

Falls eine Kontaktaufnahme notwendig werden sollte, wird Ihr behandelnder Arzt durch einen Arzt der Neurologischen Klinik schriftlich oder telefonisch kontaktiert werden.

Falls Sie eine erneute Kontaktaufnahme nicht wünschen, kreuzen Sie bitte das entsprechende Kästchen in der Einwilligungserklärung an.

10. Wer ist Eigentümer der Biomaterialien?

Die Biomaterialien werden mit der Überlassung Eigentum der Neurologischen Klinik. Mit Ihrer Einwilligungserklärung ermächtigen Sie uns für unbestimmte Zeit, über die Proben zu verfügen, diese zu lagern und zu nutzen.

11. Was beinhaltet Ihr Widerrufsrecht?

Sie können Ihre Einwilligung zur Verwendung Ihrer Biomaterialien und Daten jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für Sie widerrufen.

Im Falle des Widerrufs können Sie entscheiden, ob Ihre Biomaterialien vernichtet werden sollen oder in anonymisierter Form für weitere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden dürfen. Anonymisierung bedeutet, dass der Identifizierungscode gelöscht wird, über den ermittelt werden kann, von welcher Person die Probe stammt (siehe oben Punkt 8a/b). Eine solche Anonymisierung Ihrer Biomaterialien kann eine spätere Zuordnung des genetischen Materials zu Ihrer Person über andere Quellen allerdings niemals völlig ausschließen.

Ebenso können Sie entscheiden, ob Ihre bereits erhobenen Daten gelöscht werden sollen oder in anonymisierter Form weiterverwendet werden dürfen. Eine Datenlöschung kann allerdings nur erfolgen, soweit dies mit zumutbarem technischem Aufwand möglich ist.

Sobald der Bezug der Biomaterialien und der übrigen Daten zu Ihrer Person gelöscht wurde (Anonymisierung), ist eine Vernichtung nicht mehr möglich. Zudem können Daten aus bereits durchgeführten Analysen nicht mehr entfernt werden.

Probandeninformation zur Sammlung von Biomaterialien in der Neurologischen
Klinik der Universitätsmedizin Mannheim, Version 2.1
8. Oktober 2020

Seite 7 von 11

6. Anhang



Medizinische Fakultät Mannheim
der Universität Heidelberg
Universitätsklinikum Mannheim



Wenden Sie sich für einen Widerruf bitte an untenstehende Adresse.

12. Welche weiteren Datenschutzrechte haben Sie?

Zusammengefasst gelten gemäß der Europäischen Datenschutz-Grundverordnung (DSGVO) folgende weitere Regeln und Rechte im Umgang mit Ihren personenbezogenen und studienbezogenen Daten: Nach dem Gesetz hat jeder Studienteilnehmer das Recht, sich bei der zuständigen Datenschutzaufsichtsbehörde zu beschweren. In Ihrem Fall handelt es sich um folgende Institutionen:

Landesbeauftragte für den Datenschutz- Baden- Württemberg Postfach 10 29 32, 70025 Stuttgart
Tel.: 0711 61 55 41 0
Email: poststelle@lfdi.bwl.de

Bei allen Anfragen bezüglich ihrer Daten wenden Sie sich hierzu bitte an ihren Prüfer oder an den Datenschutzbeauftragten des Prüfzentrums. Für die Datenverarbeitung ist die Universitätsmedizin Mannheim vertreten durch den Studienleiter Prof. Dr. med. Michael Platten verantwortlich, sowie der Datenschutzbeauftragte des Universitätsklinikum Mannheim GmbH:

Reiner Sachse
Universitätsklinikum Mannheim GmbH Theodor-Kutzer-Ufer 1-3
68167 Mannheim
Tel.: 0621 383 6710
Email: reiner.sachse@umm.de

13. Wo kann ich weitere Informationen erhalten?

Sollte Ihnen etwas unklar sein, fragen Sie bitte Ihren behandelnden Arzt bzw. Ihren Studienarzt, bevor Sie Ihre Zustimmung erteilen. Sie können sich wegen Rückfragen auch zu einem späteren Zeitpunkt an folgende Adresse wenden:

Studienzentrum Neurologie
Universitätsmedizin Mannheim
Neurologische Klinik
Theodor-Kutzer-Ufer 1-3
D-68167 Mannheim
Tel. +49 621 383-3085
Fax +49 621 383-1465
E-Mail: studienzentrum-neurologie@umm.de

www.umm.de

Indem Sie beiliegende Einverständniserklärung unterschreiben, geben Sie Ihre Zustimmung zur oben beschriebenen Handhabung Ihrer Proben und Daten.

Wir danken Ihnen für Ihre Zeit und Unterstützung und wünschen Ihnen eine gute Genesung!

Probandeninformation zur Sammlung von Biomaterialien in der Neurologischen
Klinik der Universitätsmedizin Mannheim, Version 2.1
8. Oktober 2020

Seite 8 von 11

6. Anhang



Medizinische Fakultät Mannheim
der Universität Heidelberg
Universitätsklinikum Mannheim



Probandeninformation zur Sammlung von Biomaterialien in der Neurologischen
Klinik der Universitätsmedizin Mannheim, Version 2.1
8. Oktober 2020

Seite 9 von 11



Einwilligungserklärung

Patient/In (Name, Vorname): _____

Geb.-Datum: _____

Ich willige ein, dass meine Biomaterialien und Daten, wie in der Informationsschrift beschrieben, an die Neurologische Klinik der Universitätsmedizin Mannheim gegeben und für medizinische Forschungszwecke **mit dem Ziel des Studiums** immunologischer Mechanismen in der Entstehung und Therapieresistenz sowie dem Verlauf von neurovaskulären Erkrankungen (z.B. Schlaganfall) in Abgrenzung zu neuroimmunologischen (Multiple Sklerose), neurodegenerativen (Parkinson) und Hirntumorerkrankungen verwendet werden.

Ich habe die Informationsschrift gelesen und hatte die Gelegenheit, Fragen zu stellen. Ich weiß, dass meine Teilnahme freiwillig ist und ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus irgendwelche Nachteile entstehen.

Ich willige ein, dass ich evtl. zu einem späteren Zeitpunkt erneut kontaktiert werde (falls nicht gewünscht, bitte „nein“ ankreuzen)

- zum Zweck der Gewinnung weiterer Informationen / Biomaterialien, ☐ nein
- zum Zweck der Einholung meiner Einwilligung in die Verknüpfung mit
medizinischen Daten aus anderen Datenbanken, ☐ nein
- zum Zweck der Rückmeldung für mich gesundheitsrelevanter Ergebnisse ☐ nein

Diese Rückmeldung soll erfolgen über die Einrichtung, in der meine Biomaterialien / Daten gewonnen wurden oder über folgenden Arzt (falls gewünscht, bitte angeben):

Name und Anschrift des Arztes über den die Rückmeldung erfolgen soll: :

.....
.....



Datenschutzerklärung:

Ich willige ein, dass die Biobank der Neurologischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim wie in der Information beschrieben

- **meine** personenbezogenen Daten aus dem Klinikinformationssystem entnimmt und speichert,
- weitere Angaben über meine Gesundheit (z.B. Diagnosen) aus meinen Krankenunterlagen entnimmt,
- die Daten gemeinsam mit meinen Biomaterialien pseudonymisiert (d.h. kodiert) für medizinische Forschungsvorhaben zur Verfügung stellt.

Meine Biomaterialien und Daten dürfen unbefristet für medizinische Forschungsvorhaben verwendet werden.

Sie dürfen pseudonymisiert an Universitäten, Forschungsinstitute und forschende Unternehmen zu Zwecken medizinischer Forschung weitergegeben werden. Dies schließt unter Umständen auch die Weitergabe für Forschungsprojekte im Ausland mit möglicherweise niedrigerem Datenschutzniveau ein.

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich meine Einwilligung gegenüber der Biobank der Neurologischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim ohne Angabe von Gründen jederzeit widerrufen kann. Beim Widerruf werden auf mein Verlangen die verbliebenen Biomaterialien und die erhobenen Daten vernichtet bzw. gelöscht oder anonymisiert. Daten aus bereits durchgeführten Analysen können nicht mehr entfernt werden.

Eine Kopie der Patienteninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt bei der Neurologischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim.

Name des Patienten in Druckbuchstaben

Ort, Datum (vom Probanden einzutragen), Unterschrift des Patienten

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Patienten eingeholt.

Name der aufklärenden Person in Druckbuchstaben

Ort, Datum, Unterschrift der aufklärenden Person

Probandeninformation zur Sammlung von Biomaterialien in der Neurologischen
Klinik der Universitätsmedizin Mannheim, Version 2.1
8. Oktober 2020

Seite 11 von 11

6.2 Protokolle Probenverarbeitung

6.2.1 Isolation von PBMCs aus 3 HepBlut Röhrchen - ca.18ml Blut

Materialien:

- Ficoll
- DPBS
- 1 Leucosep Tube
- Einfriermedium A und B aus PBMC Medien Kit
- Einfrierbox
- 50 ml Falcon Tubes und Ständer
- Plastikpipetten und Pipetboy
- Neubauer-Zählkammer
- Proben Etiketten
- 1-3 Cryotubes oder **3 Barcode Tubes**

Vorbereitung:

1. Bei -20°C gelagerte Einfriermedien A und B im Wasserbad bei 37°C auftauen und entnehmen sobald sie aufgetaut sind.
2. Während der Isolation Einfriermedien A und B auf Raumtemperatur bringen.
3. Eine Einfrierbox auf Raumtemperatur bringen.
4. Pro 15-20ml Blut wird 1 Separationstube verwendet.

Durchführung:

- 1) Blutprobe bis zur Aufarbeitung auf Raumtemperatur lagern
- 2) 15,5 ml Separationsmedium in jedes Leukosept Separationstube füllen.
- 3) Die Separationstubes bei Raumtemperatur, 30 sek, 430xg abzentrifugieren. Das Separationsmedium soll sich nun unterhalb des Filters befinden. Überschüssiges Separationsmedium, das sich nach Zentrifugation auf dem Filter befindet wird abpipettiert.
- 4) 5 ml PBS in die einzelnen Separationstubes vorlegen
- 5) Mithilfe einer 10 ml serologischen Pipette 15 - 20 ml Blut in Separationstube überführen. Beim Überführen in die Separationstubes das genaue Blutvolumen bestimmen und notieren.

- 6) Mithilfe einer Pipette Separationstube mit PBS auf 50 ml auffüllen.
- 7) Die Bremse der Zentrifuge ausschalten. Sicherstellen, dass die Zentrifuge austariert ist. Die Separationstubes bei Raumtemperatur, 20 min, 800xg abzentrifugieren (geringe Beschleunigung). **Hereaus Zentrifuge: Beschleunigung 4, Abbremsung 3 einstellen (Progr.1)**
- 8) Nach Ende der Zentrifugation die Separationstubes vorsichtig herausnehmen und darauf achten, dass die Phasen intakt bleiben.
- 9) Die komplette Flüssigkeit in ein 50ml Falcon abkippen, auf 50 ml mit PBS auffüllen.
- 10) Mit Bremse und max. Beschleunigung (**Hereaus Zentrifuge: Progr.2**) bei Raumtemperatur, 10 min, 430xg abzentrifugieren .
- 11) Überstand verwerfen.
- 12) Das Pellet in 6-7ml PBS resuspendieren. Zellsuspension **Volum genau bestimmen und notieren**

Zählen und Aliquotieren vorbereiten:

Die Zellen sind vor der Zellzahlbestimmung gut resuspendieren!

Bestimmung der Gesamtzellzahl „Leukozyten“ (G):

- 13) 20 µl der PBMC-Suspension in ein 0,5 ml tube füllen.
- 14) 180µl Türk'sche Lösung (Verdünnung: 1:10) zugeben und gut vermischen.
10µl in eine Seite der Neubauerkammer geben
- 15) Es werden alle 4 Quadranten ausgezählt (a1, a2, a3 und a4).
- 16) Die Gesamtzellzahl „Leukozyten“ G errechnet sich wie folgt:

$$G = \frac{a1+a2+a3+a4}{4} * VF * 10^4 * Vol.ml$$

Beispiel: (75+70+62+80) : 4 x 10 x 10⁴ x 6ml Zellsuspension = 43 x 10⁶ PBMC

Einfrieren 10-15x10⁶ PBMC/cryotube/Barcode Tube in 1000 µl Medium/cryotube: 500 µl Resuspendierungsmedium **A** + 500 µl Eifriermedium **B**.

Kryokonservierung PBMCs

- 1) Die PBMCs Falcon bis 50 ml mit PBS auffüllen und bei Raumtemperatur, 10 min, 320xg abzentrifugieren (Hereaus Progr.2)
- 2) Vorsichtig den Überstand abkippen und restliche Flüssigkeit mit einer 1000µl Pipette abnehmen.
- 3) Das Pellet in raumtemperiertem Einfriermedium A gut resuspendieren. Maximal 5 mal vorsichtig auf- und abpipettieren.
- 4) Die PBMC Suspension wird zu je 500 µl auf die vorbereiteten und korrekt beschrifteten Cryovials oder Barcode Tubes verteilt. Dasselbe Volumen Einfriermedium B langsam dazu tropfen, sodass ein 1:1 Verhältnis des Einfriermedium A und B entsteht.
- 5) Die Cryotubes/Barcodes verschließen und in eine raumtemperierte Einfrierbox stellen. Die Einfrierbox schließen und sofort in einen -80°C Gefrierschrank bringen.
- 6) Innerhalb von 7 Tagen in einen Stickstofftank überführen – dabei die Proben in ausreichend Trockeneis unter und über der Box zum Stickstofftank bringen, sofern der Stickstofftank nicht im selben Raum wie der -80°C Gefrierschrank steht.

6.2.2 Präparation von Plasma aus 2ml EDTA Blut

Materialien:

- LoBind Eppis 1,5 mL, **2,0 ml, und 2 Barcode Röhrchen**
- Zentrifugen
- Eppendorf-Zentrifuge
- Pipette
- Cryo Etiketten (**nicht für Barcodes**)

Das EDTA-Blut, aus dem das Plasma präpariert wird, muss **unbedingt innerhalb von einer Stunde** nach der Blutabnahme zentrifugiert werden.

Durchführung:

- 1) Das EDTA Blut bei Raumtemperatur, 10 min, 1500xg zentrifugieren. **Die Bremse der Zentrifuge ausschalten** (Beschleunigung 9, Abbremsung 1). **Progr.3**
- 2) Während der Zentrifugationszeit eine kühlbare Eppendorf-Zentrifuge auf 15°C, 10 min, 15.000xg einstellen.
- 3) ein 1,5ml LoBind Eppi mit der korrekten Patienten-ID für **Plasma** und ein 1,5ml LoBind Eppi mit den Cryo Aufkleber **EDTA Blut** beschriften. Zum Beispiel: AB150575. **Nicht bei Barcodes.**
- 4) Nach der Zentrifugation das Plasma Überstand bis auf ca. 5 mm über der Interphase vorsichtig abnehmen und in ein 2,0 ml LoBind Eppi transferieren.
- 5) Das Röhrchen bei 15°C, 10 min, 15.000xg in Tischzentrifuge zentrifugieren.
- 6) Das Plasma ohne Zellpellet in die mit den korrekten Patienten-ID Aufklebern versehenen 1,5ml LoBind Eppi oder **2 Barcode Röhrchen** überführen (0,7-1,0ml).
- 7) Die Menge an gewonnenem Plasma notieren.
- 8) Sofort bei -80°C einfrieren.

- 9) **EDTA Blut** ohne Plasma (von Punkt 4 nach der Abnahme von Überstand) re-suspendieren (oder leicht schwenken) und in eine mit den korrekten Patienten-ID Cryo Aufklebern „EDTA Blut“ versehenen 1,5ml LoBind Eppis oder **1 Barcode Röhrchen** überführen (ca. 1,2 ml).
- 10) Bei -80°C einfrieren und lagern.

6.2.3. Präparation von Serum

Materialien:

- 1,5ml LoBind Eppis oder **2-4 Barcode Röhrchen**
- Cryo Etiketten (**keine für Barcodes**)
- 1000er Pipette
- Zentrifuge

Vorbereitung:

Das Serum sollte innerhalb von **3 Stunden** nach Blutabnahme isoliert sein.

- 1) Das 7 ml Serumröhrchen 15-30 min bei Raumtemperatur aufrecht stehen lassen.
- 2) Drei 1,5ml Eppendorf-Gefäße mit den korrekten Patienten-ID Aufklebern **Serum** versehen. **Bei Barcodes nicht notwendig.**

Durchführung:

- 1) Das Serumröhrchen bei 1500 x g, 10 min bei Raumtemperatur zentrifugieren (Progr.4).
- 2) Den Überstand (Serum) mit einer 1000er Pipette in drei Eppis oder **2-4 Barcode Röhrchen** je 0,7-1,0ml verteilen und bei -80°C einfrieren.
- 3) Die Menge an gewonnenem Serum notieren.

6. Anhang

6.3 Antikörperliste FACS

Marker	Fluorochrome	Clone	Supplier	Order No
EOMES	Alf488	644730	Biotechnie R+D systems	IC6166G
GrzmB	PE	GB11	BD	561142
IFN	BV421	4S.B3	BD	564791
IL-2	Alf488	MQ1-17H12	Biolegend	500314
Ki67	BV711	B56	BD	563755
TNF	APC	MAb11	Biolegend	502913
Arginase	APC	14D2C43	Biolegend	369706
BTLA	APC	J68-540	BD	564800
CCR10	BB515	1B5	BD Horizon	564769
CCR4	BV421	1G1	BD	562579
CCR6	APC	11A9	BD Pharmingen	560619
CCR7	BV711	150503	BD	566602
CCR7	BV605	G043H7	Biolegend	353224
CD11b	BB700	ICRF44	BD	742210
CD11c	BB700	S-HCL-3	BD	746106
CD127	BB515	HIL-7RM21	BD	564423
CD14	BV421	MOP9	BD	563743
CD14	APC-H7	MOP9	BD	560180
CD15	PE	HI98	BD	555402
CD15	BV786	HI98	BD	563838
CD16	BV605	3G8	BD	563172
CD160	PE-Cy7	BY55	Biolegend	341212
CD19	BV711	SJ25C1	BD	563038
CD19	BV510	HIB19	BD	740164
CD244	PerCP-Cy5.5	C1.7	Biolegend	329516
CD25	BV711	2A3	BD	563159
CD27	PE	M-T271	Biolegend	356406
CD28	APC-H7	CD28.1	BD	561368
CD3	BV510	HIT3a	BD	564713
CD3	BV786	UCHT1	BD	565491
CD33	BB515	WM53	BD	564588
CD33	BV711	WM54	BD	563171
CD39*	BV510	A1	Biolegend	328219
CD4	BV605	SK3	BD	565998
CD4	BV786	SK3	BD	563877
CD45RA	PE-Cy7	HI100	BD	560675
CD56	BV786	NCAM16.2	BD	564058
CD56	BV510	NCAM16.2	BD	563041
CD56	BV421	NCAM16.2	BD	562751
CD57	APC	HNK-1	Biolegend	359610
CD8a	PerCP-Cy5.5	RPA-T8	Invitrogen	45-0088-42
CD8	APC-H7	SK1	BD	560179
CTLA4	BV421	BNI3	BD	562743
CXCR3	BV510	1C6/CXCR3	BD OptiBuild	740183
CXCR5	BV711	RF8B2	BD	740737
FOXP3	BB700	236A/E7	BD	566526
HLA-DR	APC-H7	G46-6	BD	561358
HLA-DR	PE-Cy7	G46-6	BD	560651

6.4 Worksheets FACS-Analysen

6.4.1 Worksheet FACS staining PBMCs Niklas Grassl Tcell1 Panel

DATE _____

OPERATOR _____

PATIENT ID _____

Assayvorlage am FACS Lyric: **Tcell1_UD****Preparation before staining**

↓ check after completion

	1. Spin down antibody vials and keep on ice in the dark!	
	2. Prepare Fix/Via Stain 700 (1:1000 in 1x PBS) and keep on ice until further use. (Calculate 200µl/well)	
	3. Prepare Fc Block Reagent (1:20 in FACS buffer) and keep on ice until further use. (Calculate 50µl/well)	
	4. Prepare Antibody Mastermixes (extra and intracellular) according to table 1 (see page 3) and keep on ice in the dark until use.	
	5. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	6. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	
	7. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	

FACS staining

↓ check after completion

	1. Add 200µl of 1:1000 (1µl in 1000µl PBS) diluted Fix/Via Stain 700 dye into all wells (see plate layout), resuspend and incubate for 10 min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	2. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	3. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	4. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	5. Add 50µl of 1:20 diluted BD Fc Block Reagent into all wells.	
	6. Resuspend all wells and incubate 10min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	7. Add 150µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	8. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	9. Add 50µl of Mastermix 1 into well "stain" (see plate layout).	
	10. Add 50µl of Mastermix 2 into well "FMO TIM3" (see plate layout)	
	11. Resuspend all wells and incubate 20 min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	12. Add 150µl of FACS Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	13. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	14. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	15. Resuspend the cell pellet of each well by adding 300µl FACS Buffer and transfer into labeled FACS tubes. Keep FACS tubes on ice until analyzing on BD FACS Lyric.	
	16. After recording the data save fcs files in following format: "SampleID_Task Name_Tube Name." Note: always check order of format under "preferences" → "Work-lists" → "fcs files" and adjust them if necessary.	

Table 1: Mastermixes “Tcell1-Panel”

Tcell1		Mastermix 1 full stained antibody per sample [μl]	Mastermix 2 FMO TIM3 antibody per sample [μl]
BV421	PD1	1	1
BV510	TIGIT	1	1
BV605	CD4	1	1
BV711	CCR7	2,5	2,5
BV786	CD3	5	5
BB515	Tim3	2,5	
PE	CD27	5	5
PerCP-Cy5.5	CD8	2,5	2,5
PE-Cy7	CD45RA	1	1
APC	CD57	5	5
APC-H7	CD28	1	1
APC-eFluor700	DCM		
FACS buffer		22,5	25
total stain volume		50	50

Tcell1		Anzahl Samp- les: ____	Mastermix 1 full stained antibody total [μl]	Mastermix 2 FMO TIM3 antibody total [μl]
BV421	PD1			
BV510	TIGIT			
BV605	CD4			
BV711	CCR7			
BV786	CD3			
BB515	Tim3			
PE	CD27			
PerCP-Cy5.5	CD8			
PE-Cy7	CD45RA			
APC	CD57			
APC-H7	CD28			
APC-eFluor700	DCM			
FACS buffer				
total stain volume				

6.4.2 Worksheet FACS staining PBMC Niklas Grassl_Tcell2-Panel

DATE _____

OPERATOR _____

PATIENT ID _____

Assayvorlage am FACS Lyric: **Tcell2_UD****Preparation before staining**

↓ check after completion

	5. Spin down antibody vials and keep on ice in the dark!	
	6. Prepare Fix/Via Stain 700 (1:1000 in 1x PBS) and keep on ice until further use. (Calculate 200µl/well)	
	7. Prepare Fc Block Reagent (1:20 in FACS buffer) and keep on ice until further use. (Calculate 50µl/well)	
	8. Prepare Antibody Mastermixes (extra and intracellular) according to table 1 (see page 3) and keep on ice in the dark until use.	
	5. Prepare 1x Fix/Perm Solution (1:4 dilution TF Fix/Perm Buffer in TF diluent Buffer) and 1x TF Perm/Wash Buffer in H₂O (Stock concentration indicated on bottle). (Calculate 200µl/well) → eBioscience Fix/Perm Kit	
	6. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	7. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	
	8. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	

FACS staining

↓ check after completion

	1. Add 200µl of 1:1000 (1µl in 1000µl PBS) diluted Fix/Via Stain 700 dye into all wells (Panel 1, see plate layout), resuspend and incubate for 10 min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	2. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	3. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	4. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	5. Add 50µl of 1:20 diluted BD Fc Block Reagent into all wells.	
	6. Resuspend all wells and incubate 10min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	7. Add 150µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	8. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	9. Add 50µl of Mastermix 1 (extra) into well "stain" (see plate layout).	
	10. Add 50µl of Mastermix 3 into well "FMO BTLA" (see plate layout).	
	10. Resuspend all wells and incubate 20 min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	11. Add 150µl of FACS Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	12. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	13. Add 200µl Fix/Perm Solution into all wells and incubate on ice for 20min in the dark.	Time in:
		Time out:
	14. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	15. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	16. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	17. Add 50µl of Mastermix 2 (intra) into wells "stain" and "FMO BTLA" (see plate layout)	
	18. Resuspend all wells and incubate for 30' min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	19. Add 150µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	20. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	21. Resuspend the cell pellet of each well by adding 300µl FACS Buffer and transfer into labeled FACS tubes. Keep FACS tubes on ice until analyzing on BDFACS Lyric.	

	<p>22. After recording the data save fcs files in following format: <i>“SampleID_Task Name_Tube Name.”</i> Note: always check order of format under “preferences” → “Work-lists” → “fcs files” and adjust them if necessary.</p>	
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Table 1: Mastermixes “Tcell2-Panel”

Tcell2		Mastermix 1 extra antibody per sam- ple [μl]	Mastermix 2 intra antibody per sam- ple [μl]	Mastermix 3 FMO BTLA antibody per sample [μl]
BV421	CTLA4	2,5		2,5
BV510	CD39*	1		1
BV605	CD4	1		1
BV711	CD25	5		5
BV786	CD3	5		5
BB515	CD127	0,5		0,5
PE	PD1	2,5		2,5
BB700	<i>FOXP3*</i>		5	
PE-Cy7	LAG3	5		5
APC	BTLA	5		
APC-H7	CD8	5		5
APC-eFluor700	DCM			
FACS buffer/ <i>Perm buf-</i> <i>fer</i>		17,5	95	22,5
total stain volume		50	100	50

*intracellular

6. Anhang

Tcell2		Anzahl Samples: ____	Mastermix 1 extra antibody total [μl]	Mastermix 2 intra antibody total [μl]	Mastermix 3 FMO BTLA antibody total [μl]
BV421	CTLA4				
BV510	CD39*				
BV605	CD4				
BV711	CD25				
BV786	CD3				
BB515	CD127				
PE	PD1				
BB700	<i>FOXP3*</i>				
PE-Cy7	LAG3				
APC	BTLA				
APC-H7	CD8				
APC-eFluor700	DCM				
FACS buffer/ <i>Perm buffer</i>					
total stain volume					

6.4.3 Worksheet FACS staining PBMC Niklas Grassl_Tcell3-Panel

DATE _____

OPERATOR _____

PATIENT ID _____

Assayvorlage am FACS Lyric: **Tcell3_UD****Preparation before staining**

↓ check after completion

	9. Spin down antibody vials and keep on ice in the dark!	
	10. Prepare Fix/Via Stain 700 (1:1000 in 1x PBS) and keep on ice until further use.	
	11. Prepare Fc Block Reagent (1:20 in FACS buffer) and keep on ice until further use.	
	12. Prepare Antibody Mastermixes (extra and intracellular) according to table 1 (see page 3) and keep on ice in the dark until use.	
	5. Prepare 1x Fix/Perm Solution (1:4 dilution TF Fix/Perm Buffer in TF diluent Buffer) and 1x TF Perm/Wash Buffer in H2O (Stock concentration indicated on bottle). (Calculate 200µl/well) → eBioscience Fix/Perm Kit	
	6. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	7. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	
	8. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	

FACS staining

↓ check after completion

	1. Add 200µl of 1:1000 (1µl in 1000µl PBS) diluted Fix/Via Stain 700 dye into all wells (Panel 1, see plate layout), resuspend and incubate for 10 min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	2. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	3. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	4. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	5. Add 50µl of 1:20 diluted BD Fc Block Reagent into all wells.	
	6. Resuspend all wells and incubate 10min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	7. Add 150µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	8. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	9. Add 50µl of Mastermix 1 (extra) into well "stain" (see plate layout).	
	10. Add 50µl of Mastermix 3 into well "FMT Tbet/SLAMF6" (see plate layout).	
	10. Resuspend all wells and incubate 20 min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	11. Add 150µl of FACS Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	12. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	13. Add 200µl Fix/Perm Solution into all wells and incubate on ice for 20 min in the dark.	Time in:
		Time out:
	14. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	15. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	16. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	17. Add 50µl of Mastermix 2 (intra) into well "stain".	
	18. Add 50µl of Perm Puffer into well "FMT Tbet/SLAMF6 and add 5µl of EOMES antibody!	
	19. Resuspend all wells and incubate for 30' min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	20. Add 150µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	21. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	21. Resuspend the cell pellet of each well by adding 300µl FACS Buffer and transfer into labeled FACS tubes. Keep FACS tubes on ice until analyzing on BDFACS Lyric.	

	<p>22. After recording the data save fcs files in following format: <i>“SampleID_Task Name_Tube Name.”</i> Note: always check order of format under “preferences” → “Work-lists” → “fcs files” and adjust them if necessary.</p>	
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Table 1: Mastermixes “Tcell3-Panel”

T-cell 3 Panel		Mastermix 1 extra antibody per sam- ple [μl]	Mastermix 2 in- tra antibody per sample [μl]	Mastermix 3 FMT Tbet/ SLAMF6
BV421	CD56	1		1
BV605	CD4	1		1
BV711	T-bet*		2,5	
BV786	CD3	5		5
Alf488	EOMES*		5	
PE	SLAMF6	1		
PerCP-Cy5.5	CD244	2,5		2,5
PE-Cy7	CD160	5		5
APC	CD57	5		5
APC-H7	CD8	5		5
APC-eFluor700	DCM			
FACS buffer/Perm buffer		24,5	42,5	25,5
total stain volume		50	50	50

*intracellular

T-cell 3 Panel	Anzahl Samp- les: _____	Mastermix 1 extra antibody per sam- ple [μl]	Mastermix 2 intra antibody per sam- ple [μl]	Mastermix 3 FMT Tbet/ SLAMF6
BV421	CD56			
BV605	CD4			
BV711	T-bet*			
BV786	CD3			
Alf488	EOMES*			
PE	SLAMF6			
PerCP-Cy5.5	CD244			
PE-Cy7	CD160			
APC	CD57			
APC-H7	CD8			
APC-eFluor700	DCM			
FACS buffer/Perm buffer				
total stain volume				

6.4.4 Worksheet FACS staining PBMCs Niklas Grassl T-cell4 Panel

DATE _____

OPERATOR _____

PATIENT ID _____

Assayvorlage am FACS Lyric: **T-cell4_UD****Preparation before staining**

↓ check after completion

	13. Spin down antibody vials and keep on ice in the dark!	
	14. Prepare Fix/Via Stain 700 (1:1000 in 1x PBS) and keep on ice until further use. (Calculate 200µl/well)	
	15. Prepare Fc Block Reagent (1:20 in FACS buffer) and keep on ice until further use. (Calculate 50µl/well)	
	16. Prepare antibody Mastermix according to table 1 (see page 3) and keep on ice in the dark until use.	
	5. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	6. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	
	7. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	

FACS staining

↓ check after completion

	1. Add 200µl of 1:1000 (1µl in 1000µl PBS) diluted Fix/Via Stain 700 dye into all wells (Panel 1, see plate layout), resuspend and incubate for 10 min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	2. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	3. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	4. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	5. Add 50µl of 1:20 diluted BD Fc Block Reagent into all wells.	
	6. Resuspend all wells and incubate 10min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	7. Add 150µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	8. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	9. Add 50µl of Mastermix 1 into well "stain" (see plate layout).	
	10. Resuspend and incubate 20 min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	11. Add 150µl of FACS Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	12. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	13. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	14. Resuspend the cell pellet of each well by adding 300µl FACS Buffer and transfer into labeled FACS tubes. Keep FACS tubes on ice until analyzing on BD FACS Lyric.	
	15. After recording the data save fcs files in following format: "SampleID_Task Name_Tube Name." Note: always check order of format under "preferences" → "Work-lists" → "fcs files" and adjust them if necessary.	

Table 1: Mastermixes “Tcell4-Panel”

Tcell4 Panel		Mastermix 1 antibody per sample [µl]
BV421	CCR4 (CD194)	1
BV510	CXCR3 (CD183)	5
BV605	CD4	1
BV711	CXCR5 (CD185)	0,5
BV786	CD3	5
BB515	CCR10	1
PerCP-Cy5.5	CD8	2,5
APC	CCR6 (CD196)	5
APC-eFluor700	DCM	
FACS buffer		29
total stain volume		50

Tcell4 Panel	Anzahl Samples: ____	Mastermix 1 antibody total [µl]
BV421	CCR4 (CD194)	
BV510	CXCR3 (CD183)	
BV605	CD4	
BV711	CXCR5 (CD185)	
BV786	CD3	
BB515	CCR10	
PerCP-Cy5.5	CD8	
APC	CCR6 (CD196)	
APC-eFluor700	DCM	
FACS buffer		
total stain volume		

6.4.5 Worksheet FACS staining PBMC Niklas Grassl_Tcell5-Panel

DATE _____

OPERATOR _____

PATIENT ID _____

Assayvorlage am FACS Lyric: **Tcell5_UD****Preparation before staining → 400.000 cells/well**

↓ check after completion

Day 1	1. Thaw PBMCs according to SOP_D170_IM_LP_013.	
	2. Count PBMCs according to SOP_D170_IM_LP_011 and adjust cell suspension by using x-vivo 20 medium to a final concentration of 2x10⁶cells/ml .	
	3. Distribute 200µl of the cell suspension (= 400.000 PBMCs) per well according to 96 well plate layout (see page 4).	
	4. To stimulate the cells add 2.7µl of TransAct™ human beads from Miltenyi (according to the manufacture protocol) into appropriate wells labeled with “stim.” (see plate layout page 4).	
	5. Resuspend wells and incubate over night at 37°C.	
Day 2	1. Spin down antibody vials and keep on ice in the dark!	
	2. Prepare Fix/Via Stain 700 (1:1000 in 1x PBS) and keep on ice until further use. (Calculate 200µl/well)	
	3. Prepare Fc Block Reagent (1:20 in FACS buffer) and keep on ice until further use. (Calculate 50µl/well)	
	4. Prepare antibody Mastermixes (extra and intracellular) according to table 1 (see page 3) and keep on ice in the dark until use.	
	5. Prepare 1x Fix/Perm Solution (1:4 dilution TF Fix/Perm Buffer in TF diluent Buffer) and 1x TF Perm/Wash Buffer in H₂O (Stock concentration indicated on bottle). (Calculate 200µl/well) → eBioscience Fix/Perm Kit	
	6. Spin the plate at 700xg for 4´min and discard supernatant carefully.	
	7. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4´min and discard supernatant.	
	8. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4´min and discard supernatant.	

FACS staining

↓ check after completion

	1. Add 200µl of 1:1000 (1µl in 1000µl PBS) diluted Fix/Via Stain 700 dye into all wells (Panel 1, see plate layout), resuspend and incubate for 10 min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	2. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	3. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	4. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	5. Add 50µl of 1:20 diluted BD Fc Block Reagent into all wells.	
	6. Resuspend all wells and incubate 10min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	7. Add 150µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	8. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	9. Add 50µl of Mastermix 1 (extra) into well "stain" (see plate layout).	
	10. Resuspend all wells and incubate 20 min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	11. Add 150µl of FACS Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	12. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	13. Add 200µl Fix/Perm Solution into all wells and incubate on ice for 20min in the dark.	Time in:
		Time out:
	14. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	15. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	16. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	17. Add 100µl of Mastermix 2 (intra) into wells "ns" and "stim" (see plate layout).	
	18. Resuspend all wells and incubate for 30' min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	19. Add 150µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	20. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	21. Resuspend the cell pellet of each well by adding 200µl FACS Buffer and transfer into labeled FACS tubes (already pre-filled with 250µl of FACS buffer, total measure volume = 450µl). Keep FACS tubes on ice until analyzing on BD FACS Lyric.	

<p>22. After recording the data save fcs files in following format: <i>"SampleID_Task Name_Tube Name."</i></p> <p>Note: always check order of format under "preferences" → "Worklists" → "fcs files" and adjust them if necessary.</p>	
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Table 1: Mastermixes "Tcell5-Panel"

Tcell5 Panel		Mastermix 1 extra antibody per sample [µl]	Mastermix 2 intra antibody per sample [µl]
BV421	***IFN		5
BV510	CD3	2,5	
BV605	CCR7	5	
BV711	***Ki67		2,5
BV786	CD4	1	
Alf488	***IL-2		2,5
PE	***GrzmB		1
PerCP-Cy5.5	CD8	2,5	
PE-Cy7	CD45RA	1	
APC	***TNF		5
APC-H7			
APC-eFluor700	DCM		
FACS buffer/Perm buffer		76	68
total stain volume		100	100

Tcell5 Panel	Amount of samples: ____	Mastermix 1 extra antibody total [µl]	Mastermix 2 intra antibody total [µl]
BV421	***IFN		
BV510	CD3		
BV605	CCR7		
BV711	***Ki67		
BV786	CD4		
Alf488	***IL-2		
PE	***GrzmB		
PerCP-Cy5.5	CD8		
PE-Cy7	CD45RA		
APC	***TNF		
APC-H7			
APC-eFluor700	DCM		
FACS buffer/Perm buffer			
total stain volume			

* 1x unstim.; 1x stim. mit Miltenyi stim beads (T-cell TransAct human, Miltenyi, Cat#130-128-758)

6. Anhang

Plate Layout

[illegible]

6.4.6 Worksheet FACS staining PBMC Niklas Grassl_Tcell6-Panel

DATE _____

OPERATOR _____

PATIENT ID _____

Assayvorlage am FACS Lyric: **Tcell6_UD****Preparation before staining → 400.000 cells/well**

↓ check after completion

Day 1	6. Thaw PBMCs according to SOP_D170_IM_LP_013.	
	7. Count PBMCs according to SOP_D170_IM_LP_011 and adjust cell suspension by using x-vivo 20 medium to a final concentration of 2x10⁶cells/ml .	
	8. Distribute 200µl of the cell suspension (= 400.000 PBMCs) per well according to 96 well plate layout (see page 4).	
	9. To stimulate the cells add 2.7µl of TransAct™ human beads from Miltenyi (according to the manufacture protocol) into appropriate wells labeled with “stim.” (see plate layout page 4).	
	10. Resuspend wells and incubate over night at 37°C.	
Day 2	1. Spin down antibody vials and keep on ice in the dark!	
	2. Prepare Fix/Via Stain 700 (1:1000 in 1x PBS) and keep on ice until further use. (Calculate 200µl/well)	
	3. Prepare Fc Block Reagent (1:20 in FACS buffer) and keep on ice until further use. (Calculate 50µl/well)	
	4. Prepare antibody Mastermixes (extra and intracellular) according to table 1 (see page 3) and keep on ice in the dark until use.	
	5. Prepare 1x Fix/Perm Solution (1:4 dilution TF Fix/Perm Buffer in TF diluent Buffer) and 1x TF Perm/Wash Buffer in H₂O (Stock concentration indicated on bottle). (Calculate 200µl/well) → eBioscience Fix/Perm Kit	
	6. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	7. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	
	8. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	

FACS staining

↓ check after completion

	1. Add 200µl of 1:1000 (1µl in 1000µl PBS) diluted Fix/Via Stain 700 dye into all wells (Panel 1, see plate layout), resuspend and incubate for 10 min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	2. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	3. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	4. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	5. Add 50µl of 1:20 diluted BD Fc Block Reagent into all wells.	
	6. Resuspend all wells and incubate 10min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	7. Add 150µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	8. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	9. Add 50µl of Mastermix 1 (extra) into wells “ns” and “stim” (see plate layout).	
	10. Resuspend all wells and incubate 20 min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	11. Add 150µl of FACS Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	12. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	13. Add 100µl of fixation/permeabilization solution (brown bottle, ready to use) into all wells and incubate on ice for 20min in the dark.	Time in:
		Time out:
	14. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	15. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	16. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	17. Add 200µl of Mastermix 2 (intra) into wells “ns” and “stim” (see plate layout)	
	18. Resuspend all wells and incubate for 30' min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	19. Add 150µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	20. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	21. Resuspend the cell pellet of each well by adding 200µl FACS Buffer and transfer into labeled FACS tubes (already pre-filled with 250µl of FACS buffer, total measure volume = 450µl). Keep FACS tubes on ice until analyzing on BD FACS Lyric.	
	22. After recording the data save fcs files in following format:	

<p>“SampleID_Task Name_Tube Name.”</p> <p>Note: always check order of format under “preferences” → “Work-lists” → “fcs files” and adjust them if necessary.</p>	
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Table 1: Mastermixes “Tcell6-Panel”

Tcell6 panel		Mastermix 1 extra antibody per sample [μl]	Mastermix 2 intra antibody per sample [μl]
BV421	IL21*		5
BV510	CD3	2,5	
BV605	CCR7	5	
BV711	IL13*		5
BV786	CD4	1	
Alf488	TGF*		5
PE	IL17a*		20
PerCP-Cy5.5	IL4*		5
PE-Cy7	CD45RA	1	
APC	IL10*		2,5
APC-eFluor700	DCM		
FACS buffer/Perm buffer		71	57,5
total stain volume		100	100

*intracellular

Tcell6 panel	Anzahl Samples: _____	Mastermix 1 extra antibody total [μl]	Mastermix 2 intra antibody total [μl]
BV421	***IL21		
BV510	CD3		
BV605	CCR7		
BV711	***IL13		
BV786	CD4		
Alf488	***TGF		
PE	***IL17a		
PerCP-Cy5.5	***IL4		
PE-Cy7	CD45RA		
APC	***IL10		
APC-eFluor700	DCM		
FACS buffer/Perm buffer			
total stain volume			

* 1x unstim.; 1x stim. mit Miltenyi stim beads (T-cell TransAct human, Miltenyi, Cat#130-128-758)

6. Anhang

Plate Layout

[illegible]

6.4.7 Worksheet FACS staining PBMCs Niklas Grassl MDSC Panel

DATE _____

OPERATOR _____

PATIENT ID _____

Assayvorlage am FACS Lyric: **MDSC_UD****Preparation before staining**

↓ check after completion

	11. Spin down antibody vials and keep on ice in the dark!	
	12. Prepare Fix/Via Stain 700 (1:1000 in 1x PBS) and keep on ice until further use. (Calculate 200µl/well)	
	13. Prepare Fc Block Reagent (1:20 in FACS buffer) and keep on ice until further use. (Calculate 50µl/well)	
	14. Prepare antibody Mastermixes (extra and intracellular) according to table 1 (see page 3) and keep on ice in the dark until use.	
	15. Prepare 1x Fix/Perm Solution (1:4 dilution TF Fix/Perm Buffer in TF diluent Buffer) and 1x TF Perm/Wash Buffer in H₂O (Stock concentration indicated on bottle). (Calculate 200µl/well) → eBioscience Fix/Perm Kit	
	6. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	7. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	
	8. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	

FACS staining

↓ check after completion

	1. Add 200µl of 1:1000 (1µl in 1000µl PBS) diluted Fix/Via Stain 700 dye into all wells (Panel 1, see plate layout), resuspend and incubate for 10 min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	2. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	3. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	4. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	5. Add 50µl of 1:20 diluted BD Fc Block Reagent into all wells.	
	6. Resuspend all wells and incubate 10min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	7. Add 150µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	8. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	9. Add 50µl of Mastermix 1 into well "stain" (see plate layout).	
	10. Add 50µl of Mastermix 3 into well "FMT Arginase/PDL1" (see plate layout).	
	11. Resuspend all wells and incubate 20 min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	12. Add 150µl of FACS Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	13. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	14. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	15. Add 200µl Fix/Perm Solution into all wells and incubate on ice for 20min in the dark.	Time in:
		Time out:
	16. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	17. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	18. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	19. Add 50µl of Mastermix 2 (intra) into well "stain" (see plate layout). → Add 50µl of Perm buffer into well "FMT Arginase/PDL1".	
	20. Resuspend all wells and incubate for 30' min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	21. Add 150µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	
	22. Add 200µl of 1x Perm/Wash Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant completely.	

	23. Resuspend the cell pellet of each well by adding 300µl FACS Buffer and transfer into labeled FACS tubes. Keep FACS tubes on ice until analyzing on BD FACS Lyric.	
	24. After recording the data save fcs files in following format: “ <i>SampleID_Task Name_Tube Name</i> .” Note: always check order of format under “preferences” → “Work-lists” → “fcs files” and adjust them if necessary.	

Table 1: Mastermixes “MDSC Panel”

		Mastermix 1 full stained antibody per sample [µl]	Mastermix 2 (intra) antibody per sample [µl]	Mastermix 3 FMT Arginase/ PDL-1 antibody per sample [µl]
MDSC Panel				
BV510	CD3/19/56	2,5/2,5/0,5		2,5/2,5/0,5
BV605	CD16	2,5		2,5
BV711	CD33	0,5		0,5
BV786	CD15	0,5		0,5
PE	PDL-1	10		
BB700	CD11b	1		1
PE-Cy7	HLA-DR	2,5		2,5
APC	Arginase*		1	
APC-H7	CD14	2,5		2,5
APC-eFluor700	DCM			
FACS buffer/Perm buffer		25	49	34
total stain volume		50	50	50

*intracellular

6. Anhang

MDSC Panel	Anzahl Samples: -	Mastermix 1 full stained antibody total [μl]	Mastermix 2 (intra) antibody total [μl]	Mastermix 3 FMT Arginase/ PDL-1 antibody total [μl]
BV510	CD3/19/56			
BV605	CD16			
BV711	CD33			
BV786	CD15			
PE	PDL-1			
BB700	CD11b			
PE-Cy7	HLA-DR			
APC	Arginase*			
APC-H7	CD14			
APC-eFluor700	DCM			
FACS buffer/Perm buffer total stain volume				

6.4.8 Worksheet FACS staining PBMCs Niklas Grassl TBNKDC Panel

DATE _____

OPERATOR _____

PATIENT ID _____

Assayvorlage am FACS Lyric: **TBNKDC_UD****Preparation before staining**

↓ check after completion

	16. Spin down antibody vials and keep on ice in the dark!	
	17. Prepare Fix/Via Stain 700 (1:1000 in 1x PBS) and keep on ice until further use. (Calculate 200µl/well)	
	18. Prepare Fc Block Reagent (1:20 in FACS buffer) and keep on ice until further use. (Calculate 50µl/well)	
	19. Prepare Antibody Mastermixes (extra and intracellular) according to table 1 (see page 3) and keep on ice in the dark until use.	
	5. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	6. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	
	7. Add 200µl of 1xPBS into each well, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant.	

FACS staining

↓ check after completion

	1. Add 200µl of 1:1000 (1µl in 1000µl PBS) diluted Fix/Via Stain 700 dye into all wells (Panel 1, see plate layout), resuspend and incubate for 10 min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	2. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	3. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	4. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	5. Add 50µl of 1:20 diluted BD Fc Block Reagent into all wells.	
	6. Resuspend all wells and incubate 10min at RT in the dark.	Time in:
		Time out:
	7. Add 150µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	8. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	9. Add 50µl of Mastermix 1 into well "stain" (see plate layout).	
	10. Resuspend and incubate 20 min on ice in the dark.	Time in:
		Time out:
	11. Add 150µl of FACS Buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	12. Add 200µl of FACS buffer into all wells, spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	13. Spin the plate at 700xg for 4' min and discard supernatant carefully.	
	14. Resuspend the cell pellet of each well by adding 300µl FACS Buffer and transfer into labeled FACS tubes. Keep FACS tubes on ice until analyzing on BD FACS Lyric.	
	15. After recording the data save fcs files in following format: "SampleID_Task Name_Tube Name." Note: always check order of format under "preferences" → "Work-lists" → "fcs files" and adjust them if necessary.	

Table 1: Mastermixes “TBNKDC Panel”

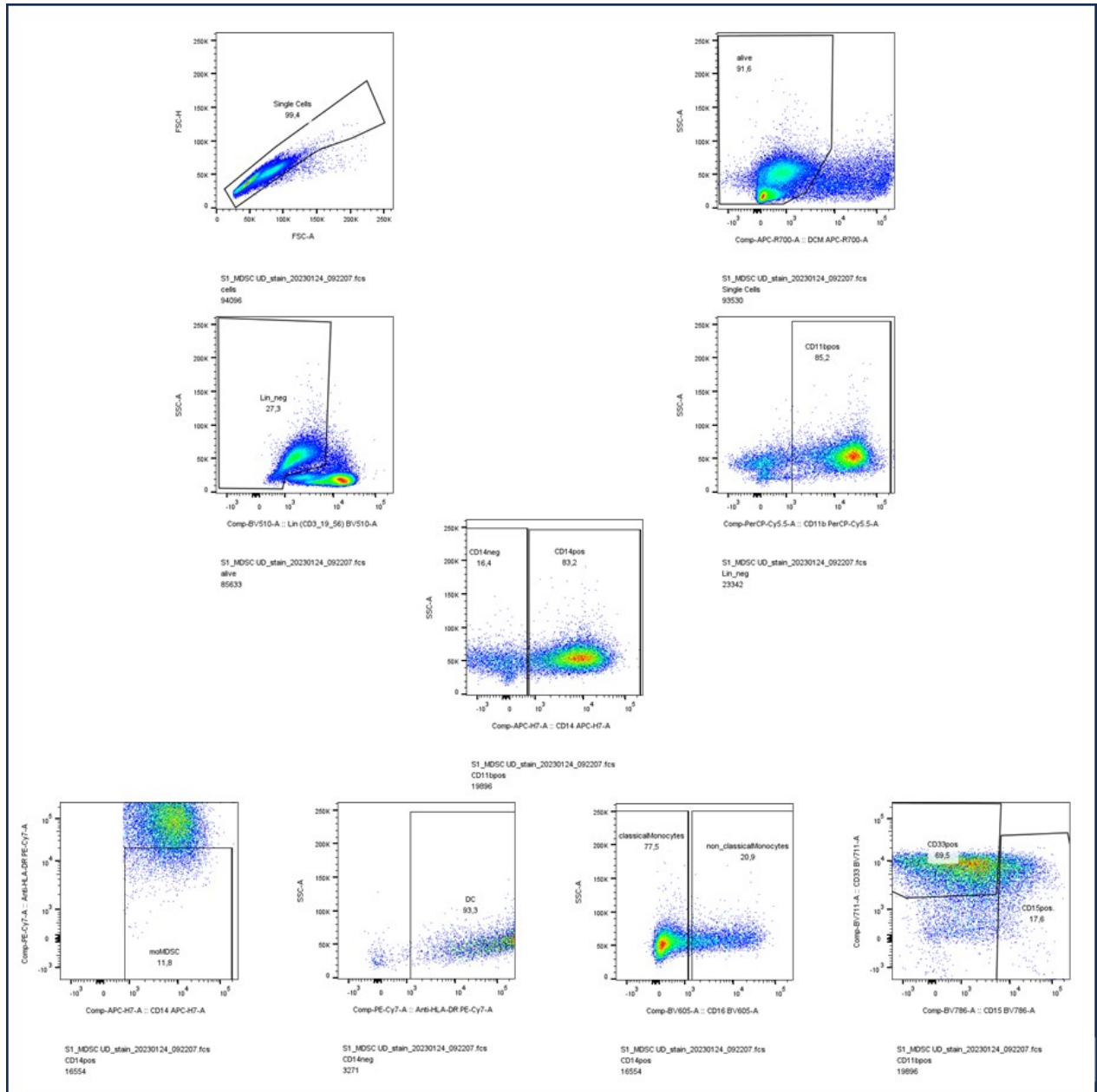
TBNK Panel		Mastermix 1 full stained antibody per sample [μl]
BV421	CD14	0,5
BV510	CD3	2,5
BV605	CD16	2,5
BV711	CD19	1
BV786	CD56	0,5
BB515	CD33	1
PE	CD15	10
BB700	CD11c	0,5
APC-H7	HLA-DR	1
APC-eFluor700	DCM	
FACS buffer		28,5
total stain volume		50

TBNK Panel	Anzahl Samples: _____	Mastermix 1 full stained antibody per sample [μl]
BV421	CD14	
BV510	CD3	
BV605	CD16	
BV711	CD19	
BV786	CD56	
BB515	CD33	
PE	CD15	
PerCP-Cy5.5/BB700	CD11c	
APC-H7	HLA-DR	
APC-eFluor700	DCM	
FACS buffer		
total stain volume		

6. Anhang

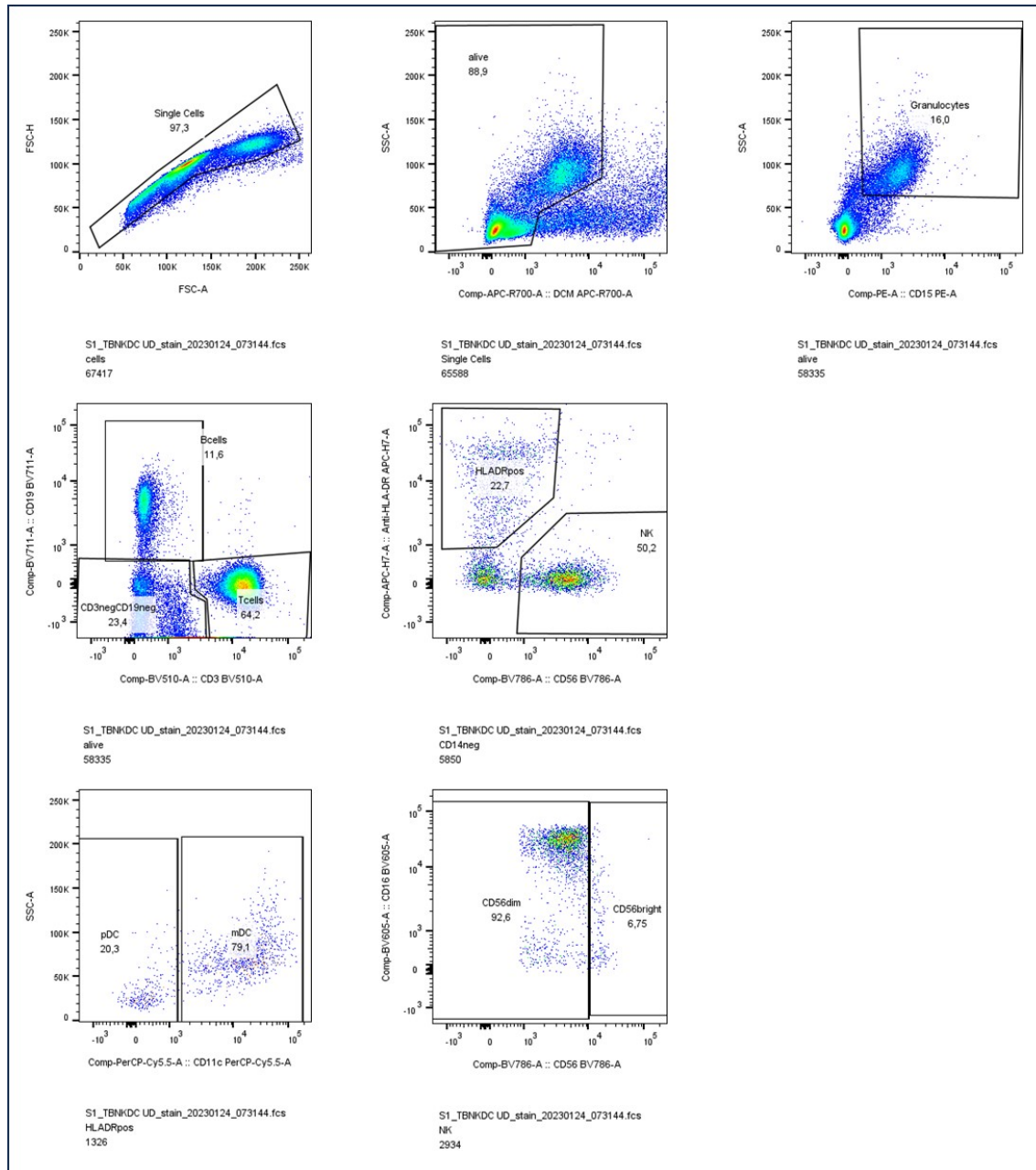
6.5 Gating FACS-Analyse

6.5.7 Gating in Panel „MDSC2“



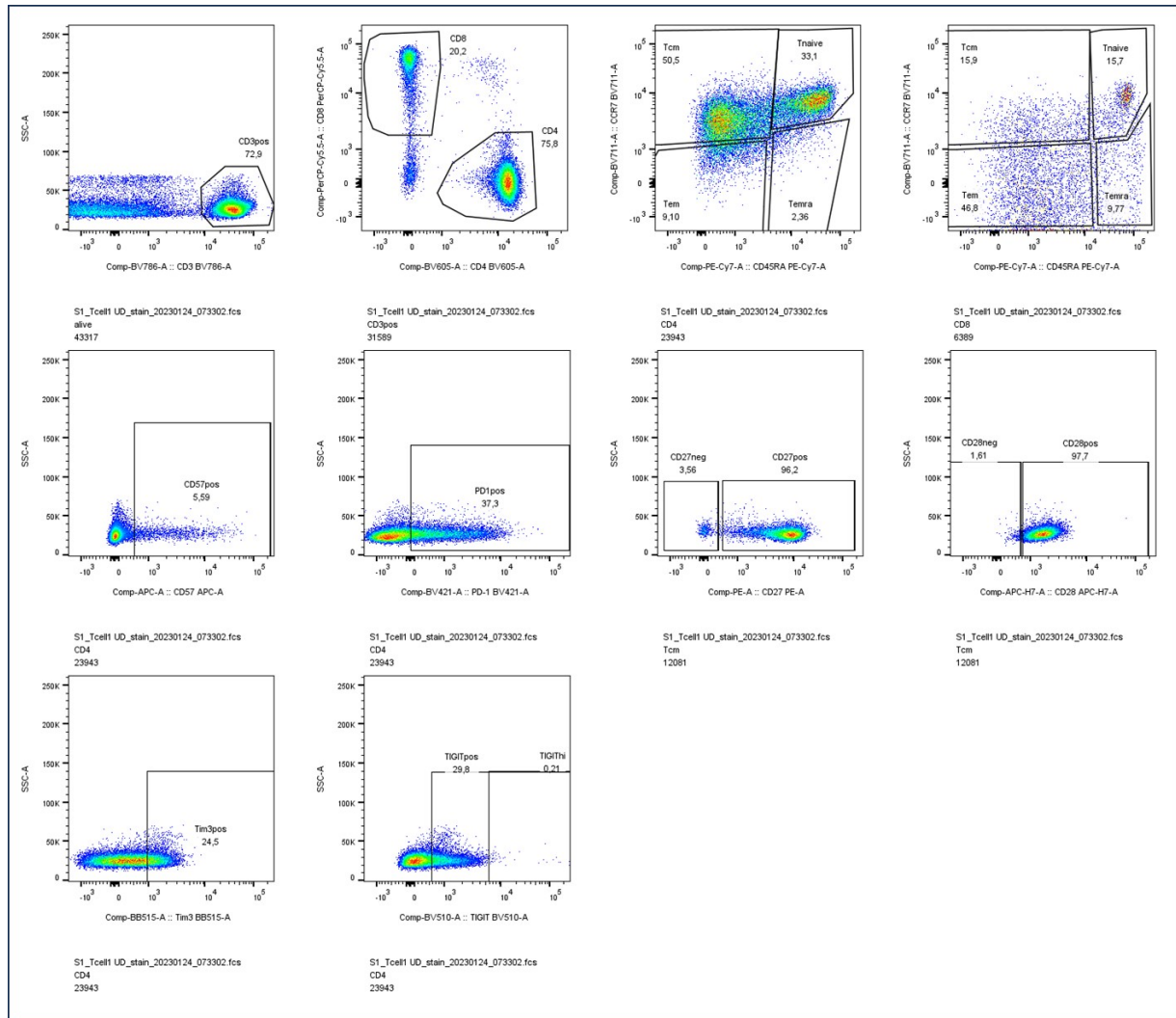
6. Anhang

6.5.8 Gating in Panel „TBNK“



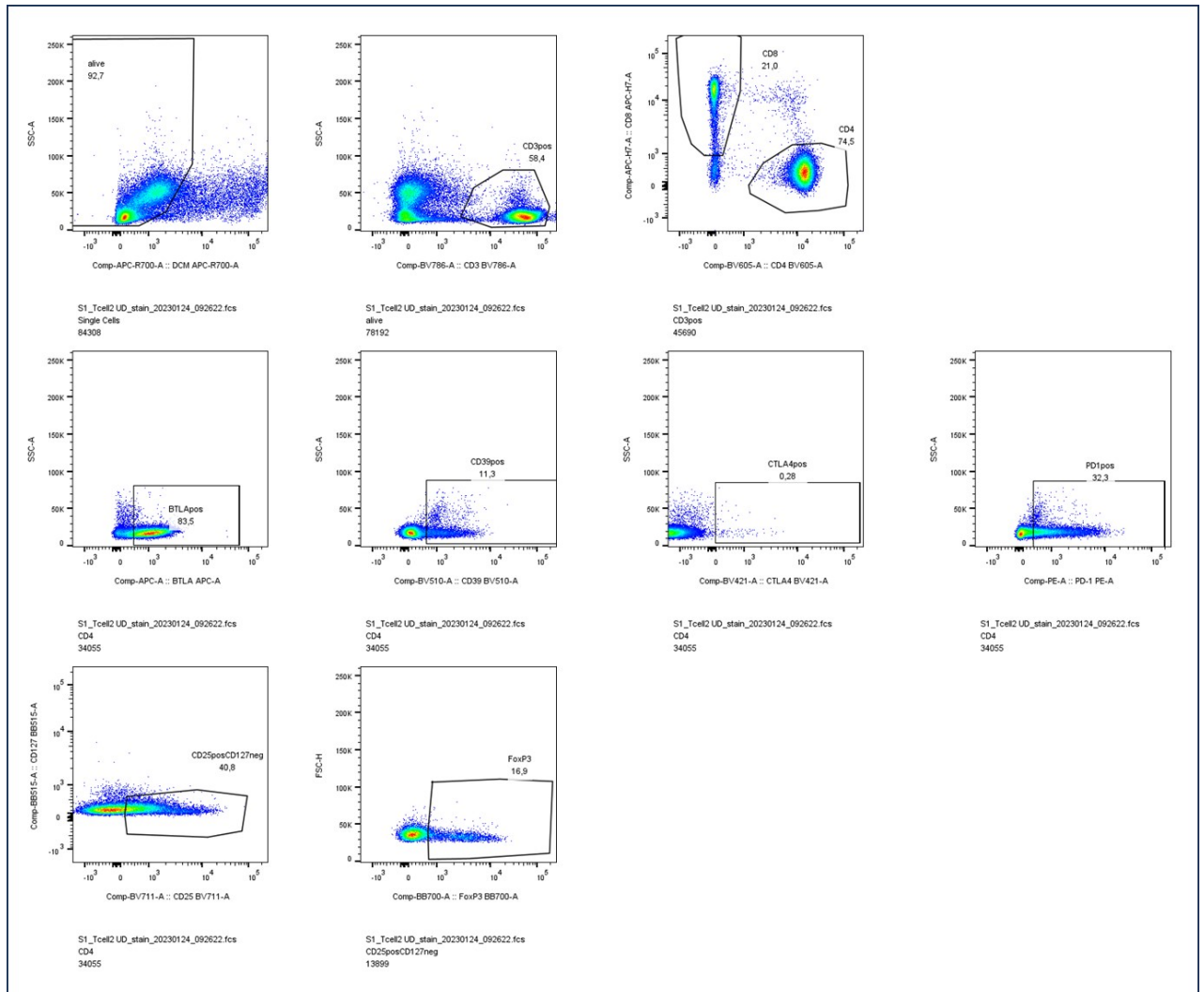
6. Anhang

6.5.1 Gating in Panel „Tcell1“

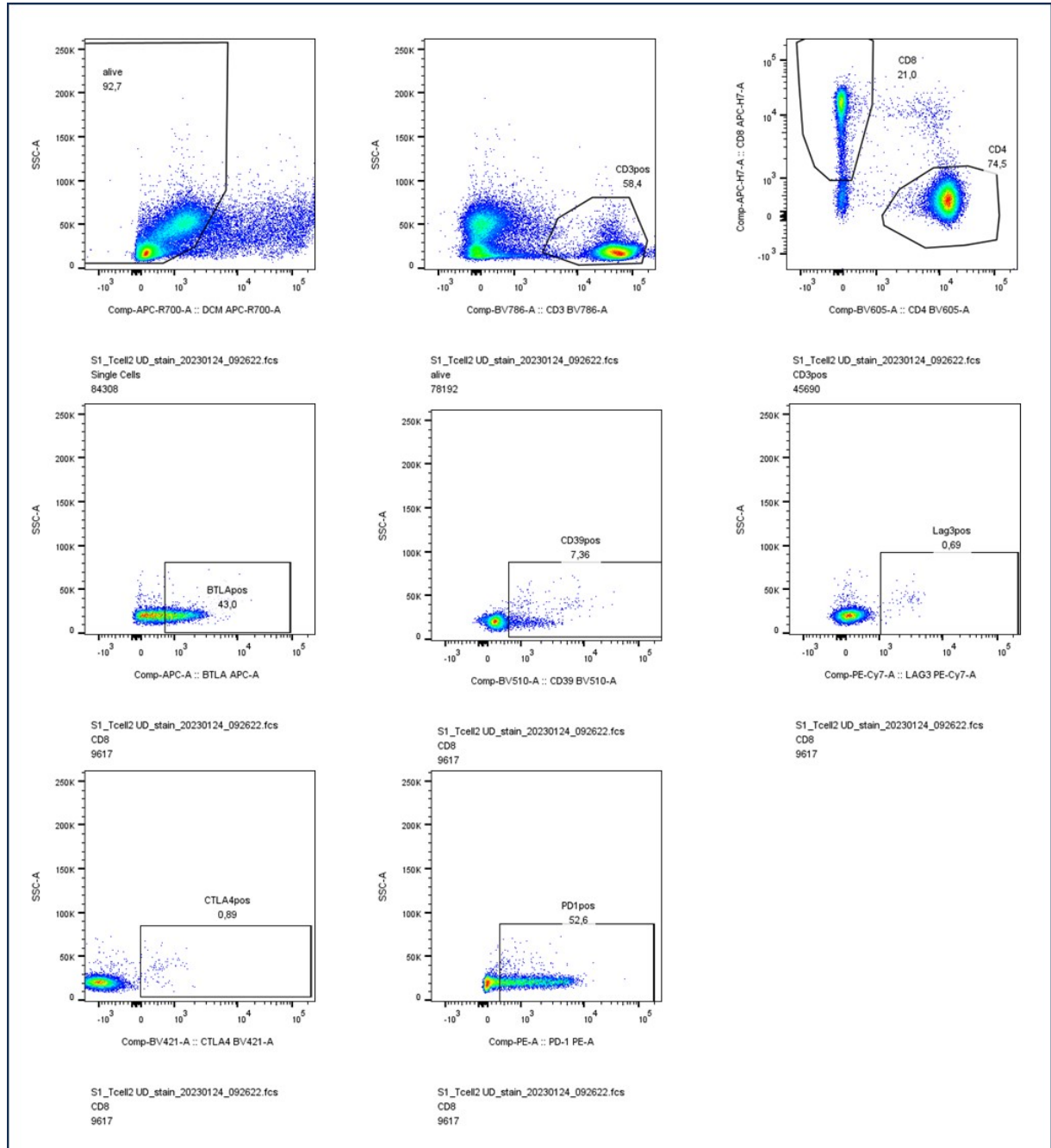


6. Anhang

6.5.2 Gating in Panel „Tcell2“

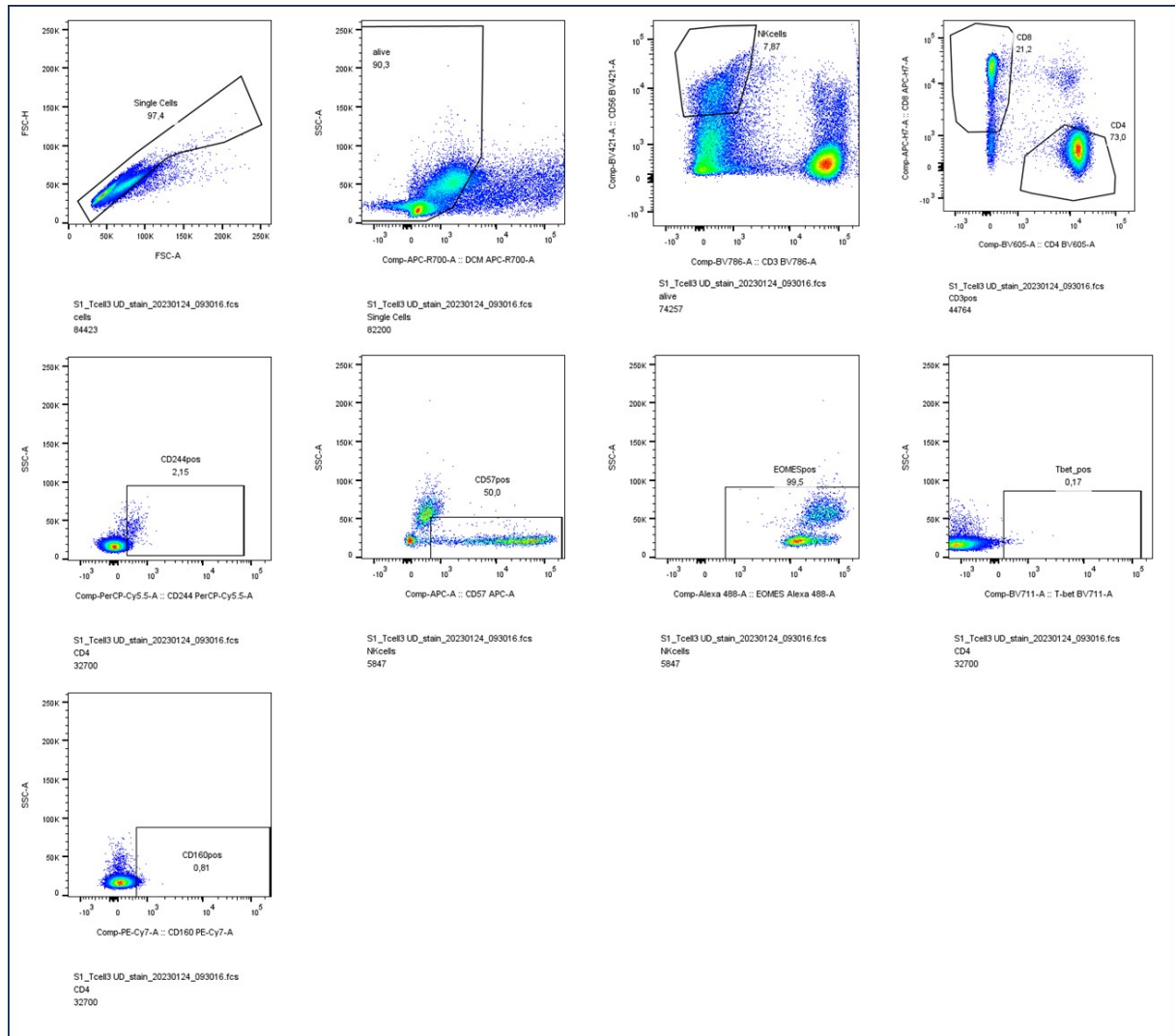


6. Anhang

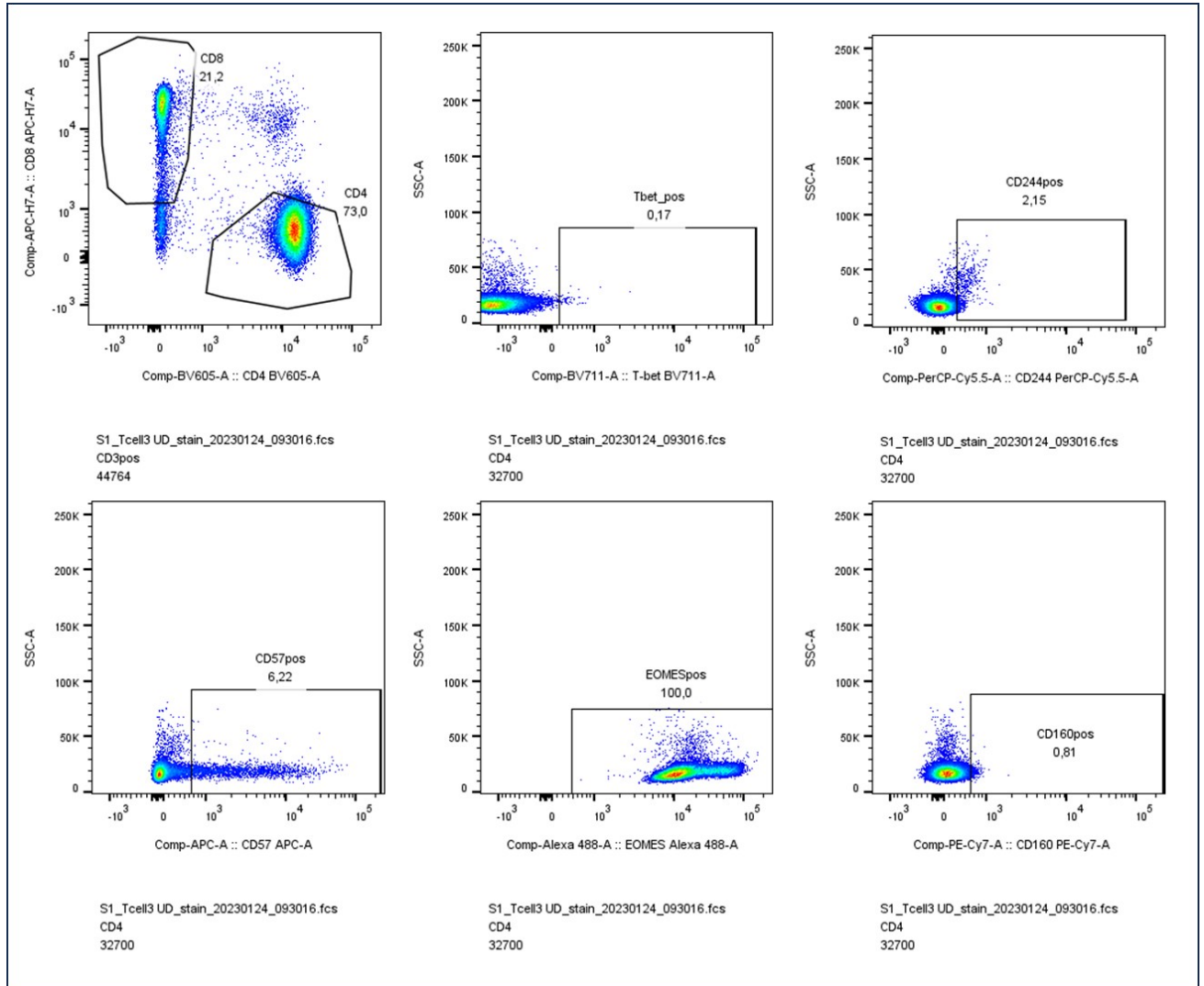


6. Anhang

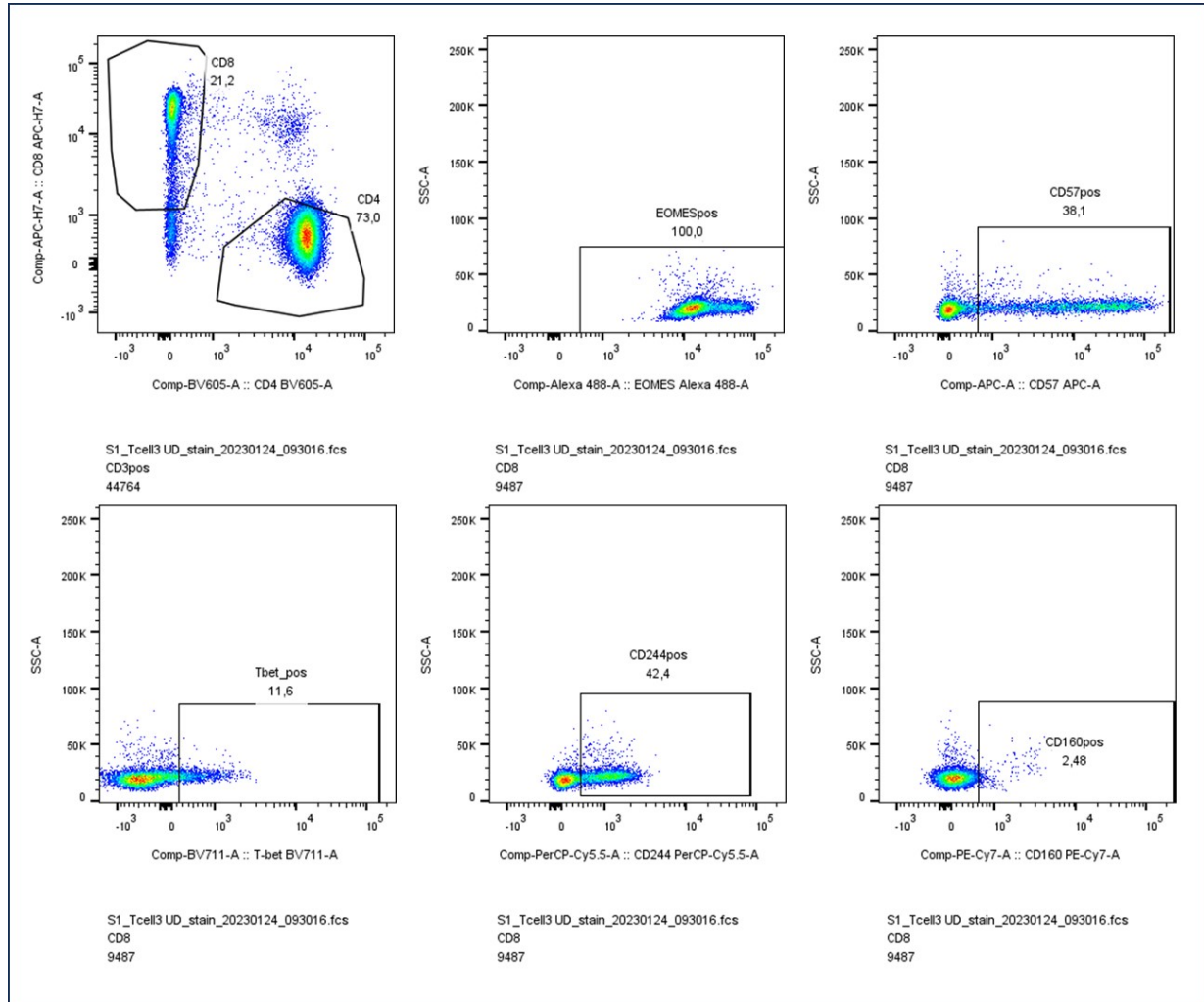
6.5.3 Gating in Panel „Tcell3“



6. Anhang

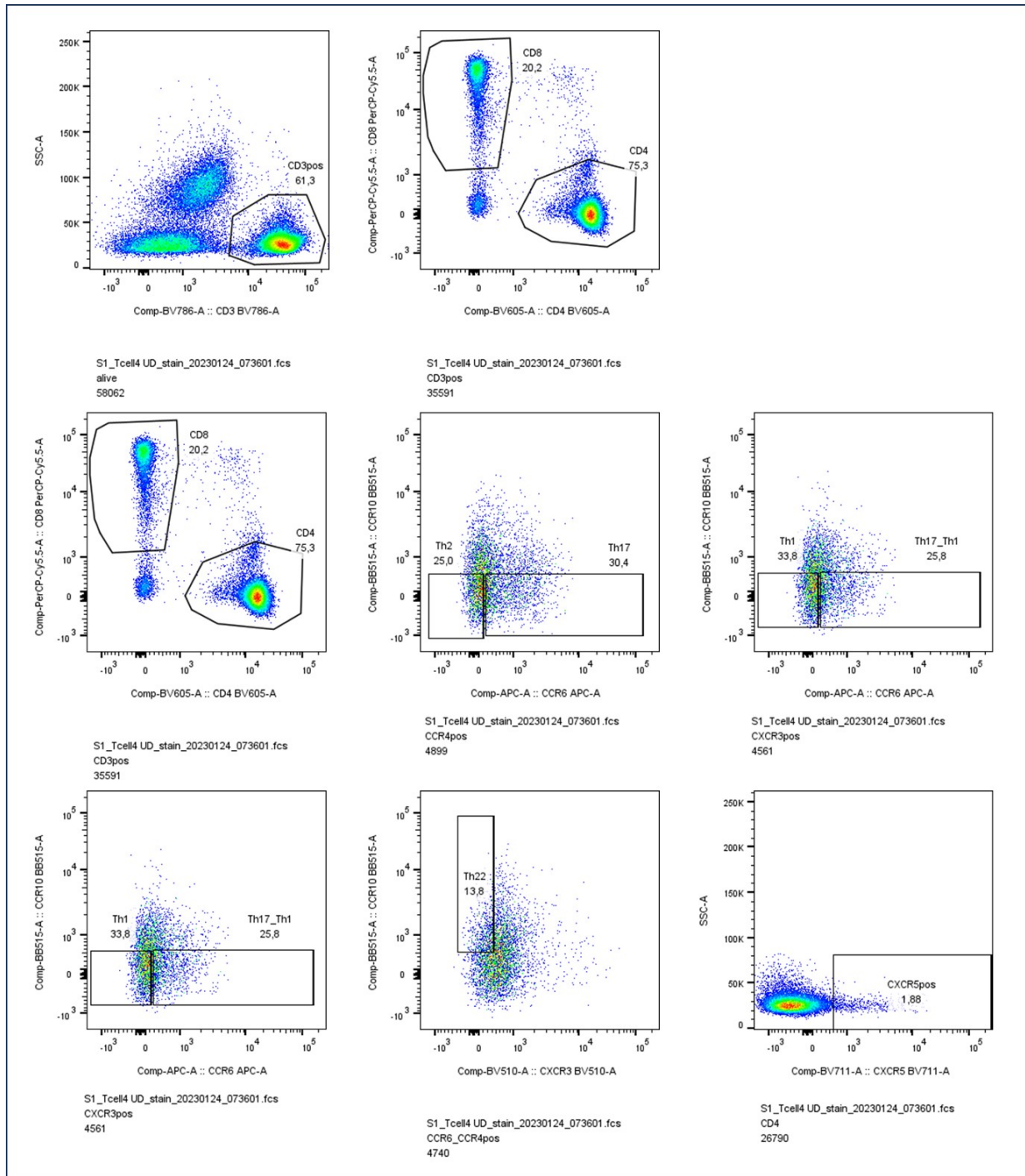


6. Anhang



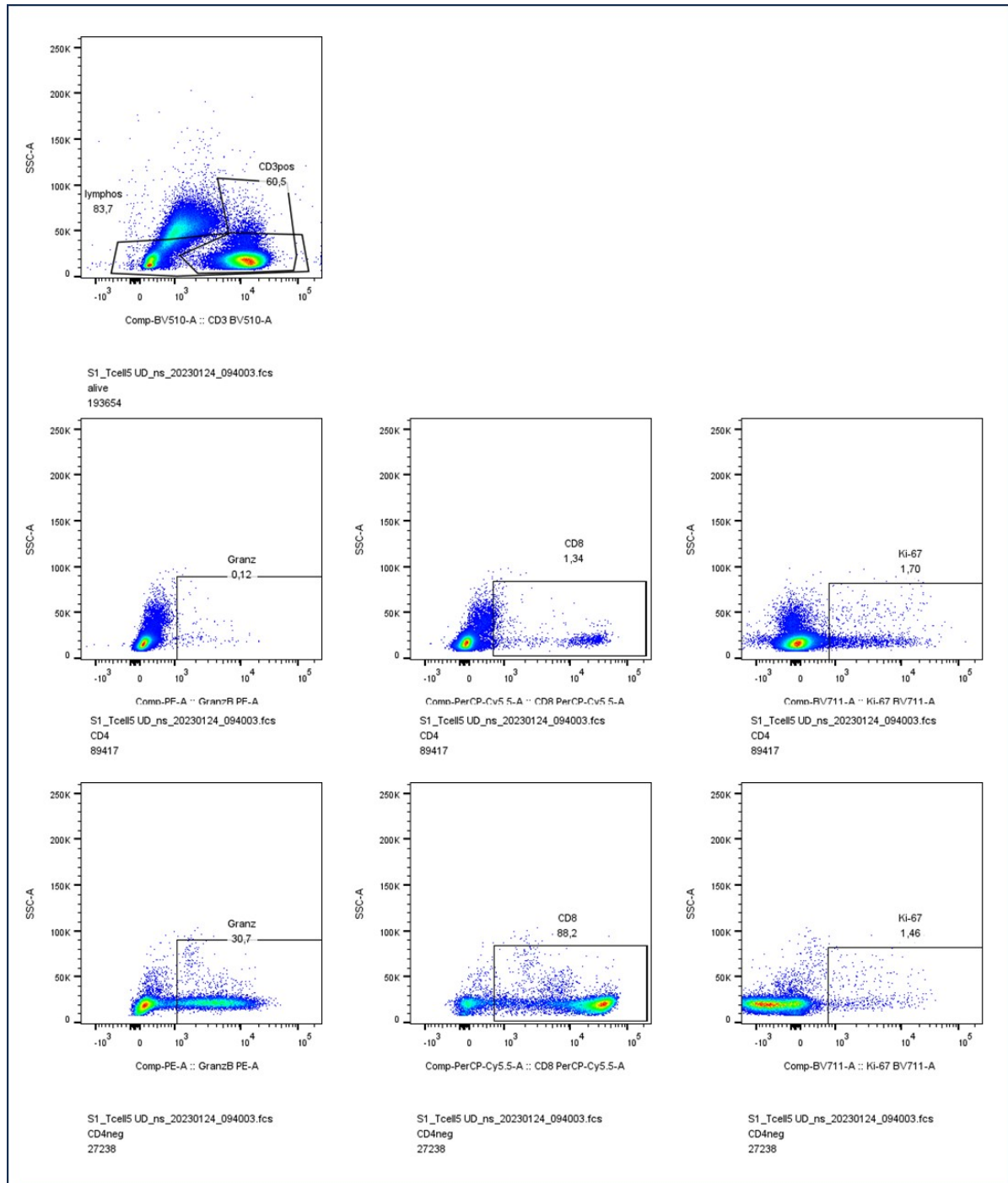
6. Anhang

6.5.4 Gating in Panel „Tcell4“

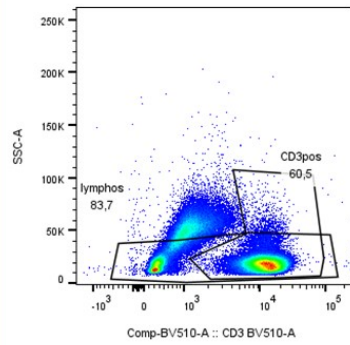


6. Anhang

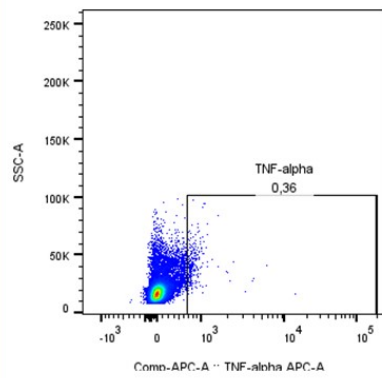
6.5.5 Gating in Panel „Tcell5- unstimuliert“



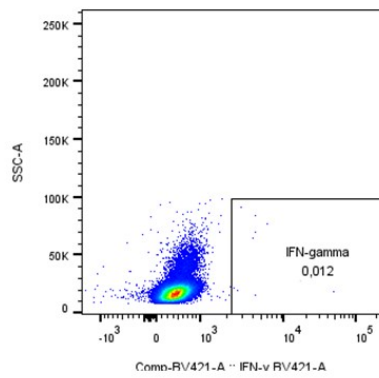
6. Anhang



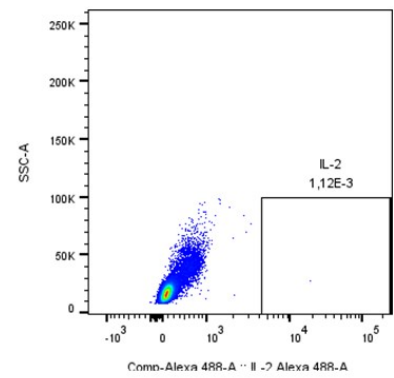
S1_Tcell5 UD_ns_20230124_094003.fcs
alive
193654



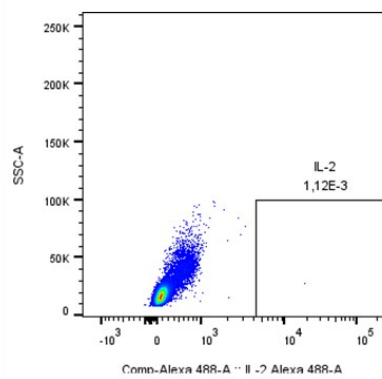
S1_Tcell5 UD_ns_20230124_094003.fcs
CD4
89417



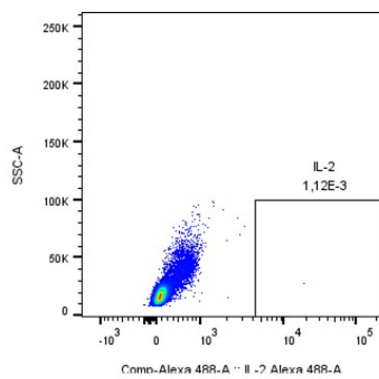
S1_Tcell5 UD_ns_20230124_094003.fcs
CD4
89417



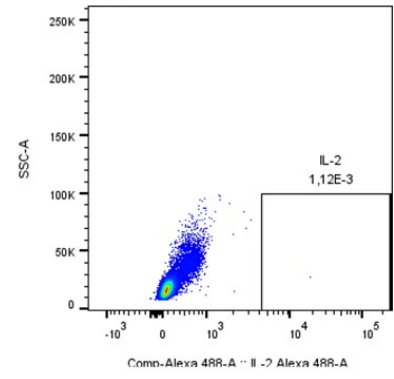
S1_Tcell5 UD_ns_20230124_094003.fcs
CD4
89417



S1_Tcell5 UD_ns_20230124_094003.fcs
CD4
89417



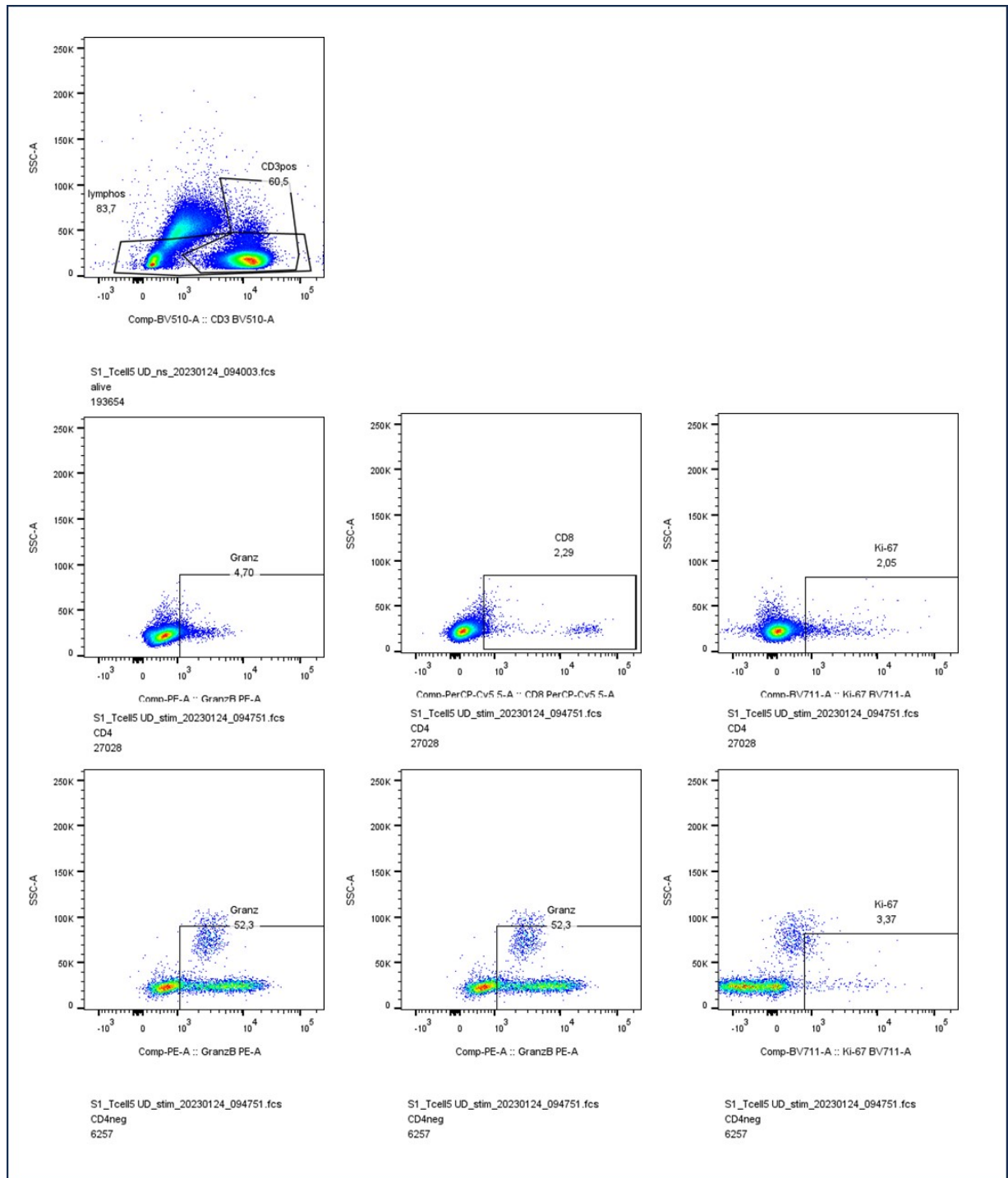
S1_Tcell5 UD_ns_20230124_094003.fcs
CD4
89417



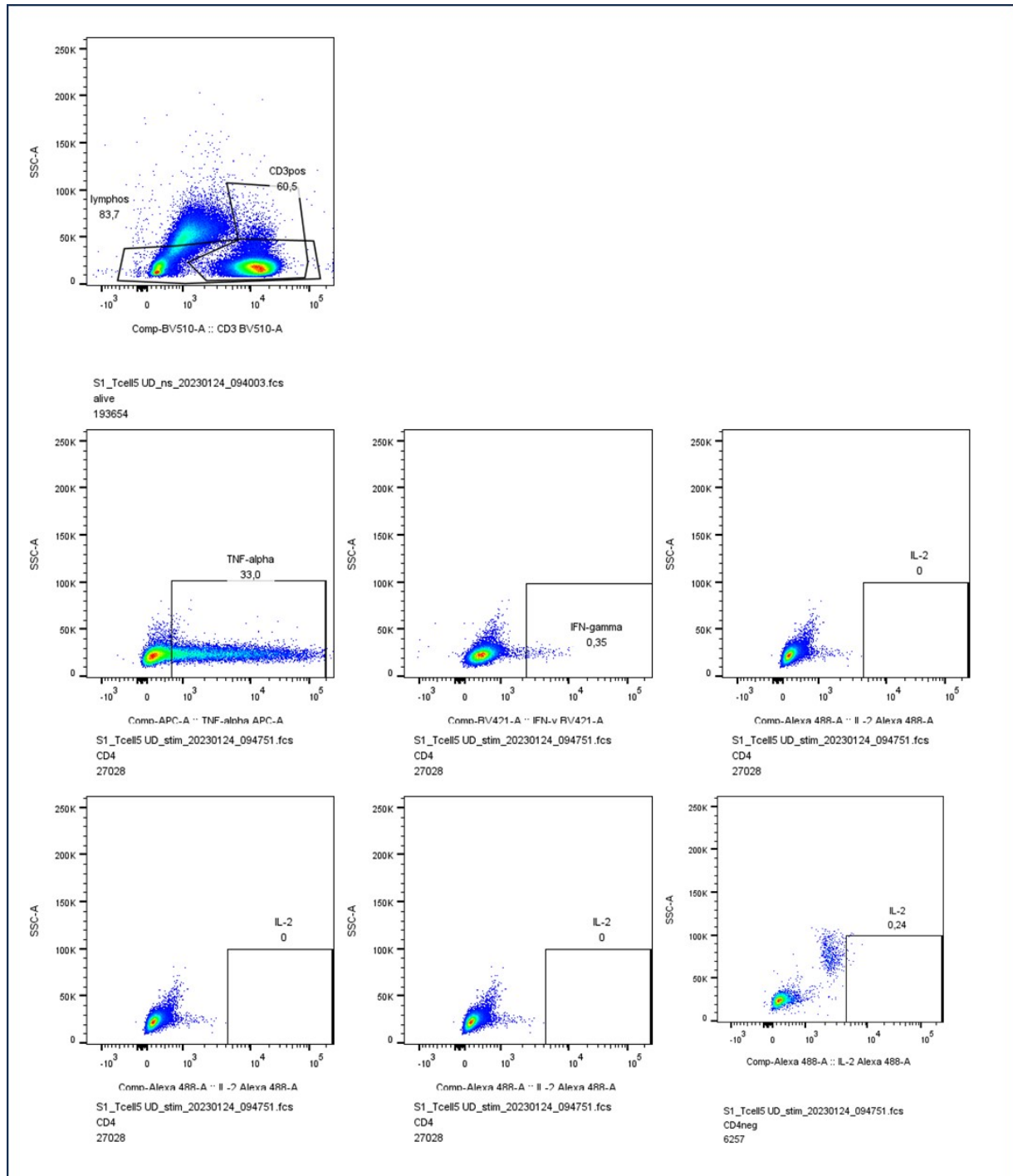
S1_Tcell5 UD_ns_20230124_094003.fcs
CD4
89417

6. Anhang

6.5.6 Gating in Panel „Tcell5- stimuliert“

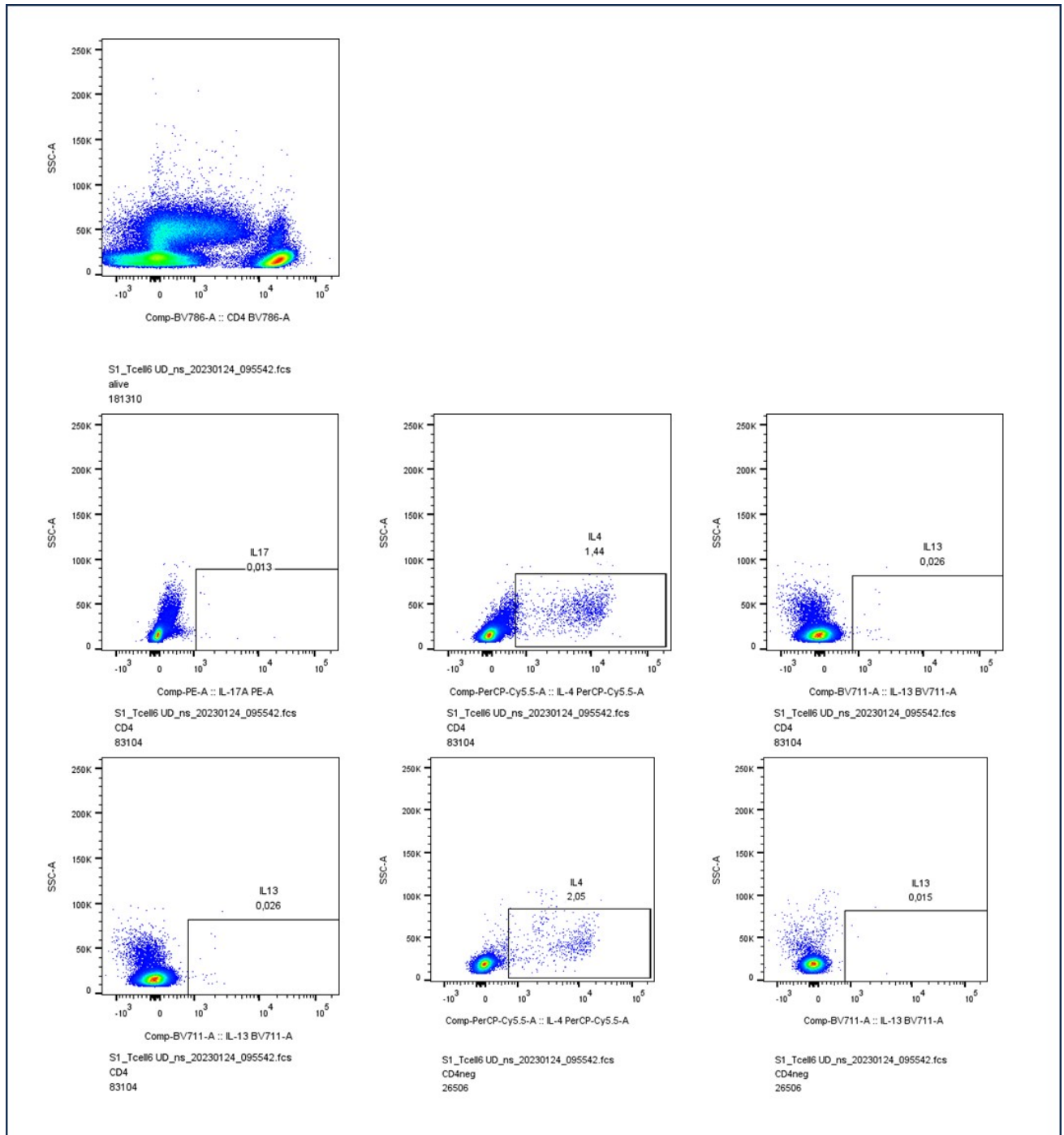


6. Anhang

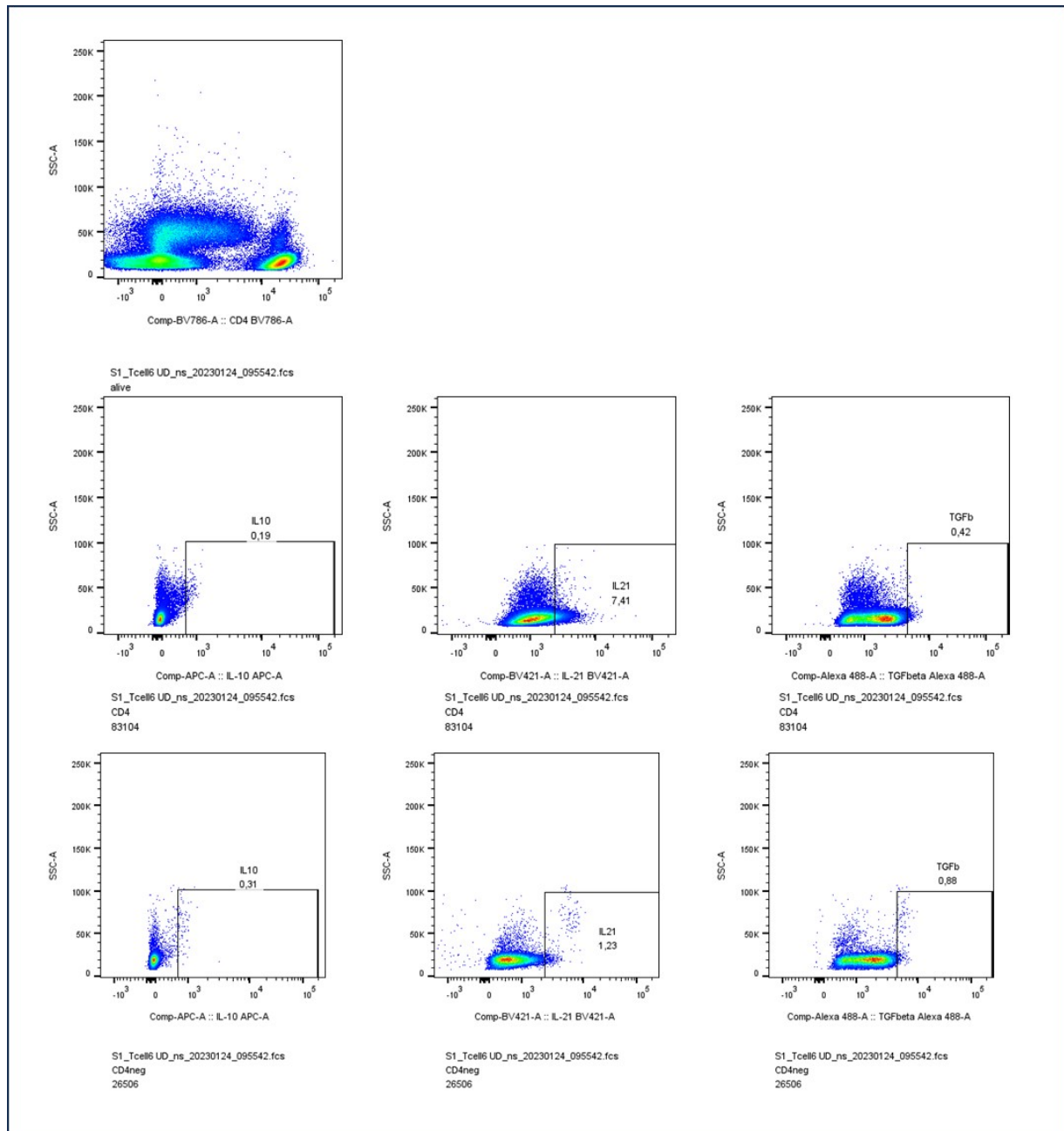


6. Anhang

6.5.7 Gating in Panel „Tcell6-unstimuliert“

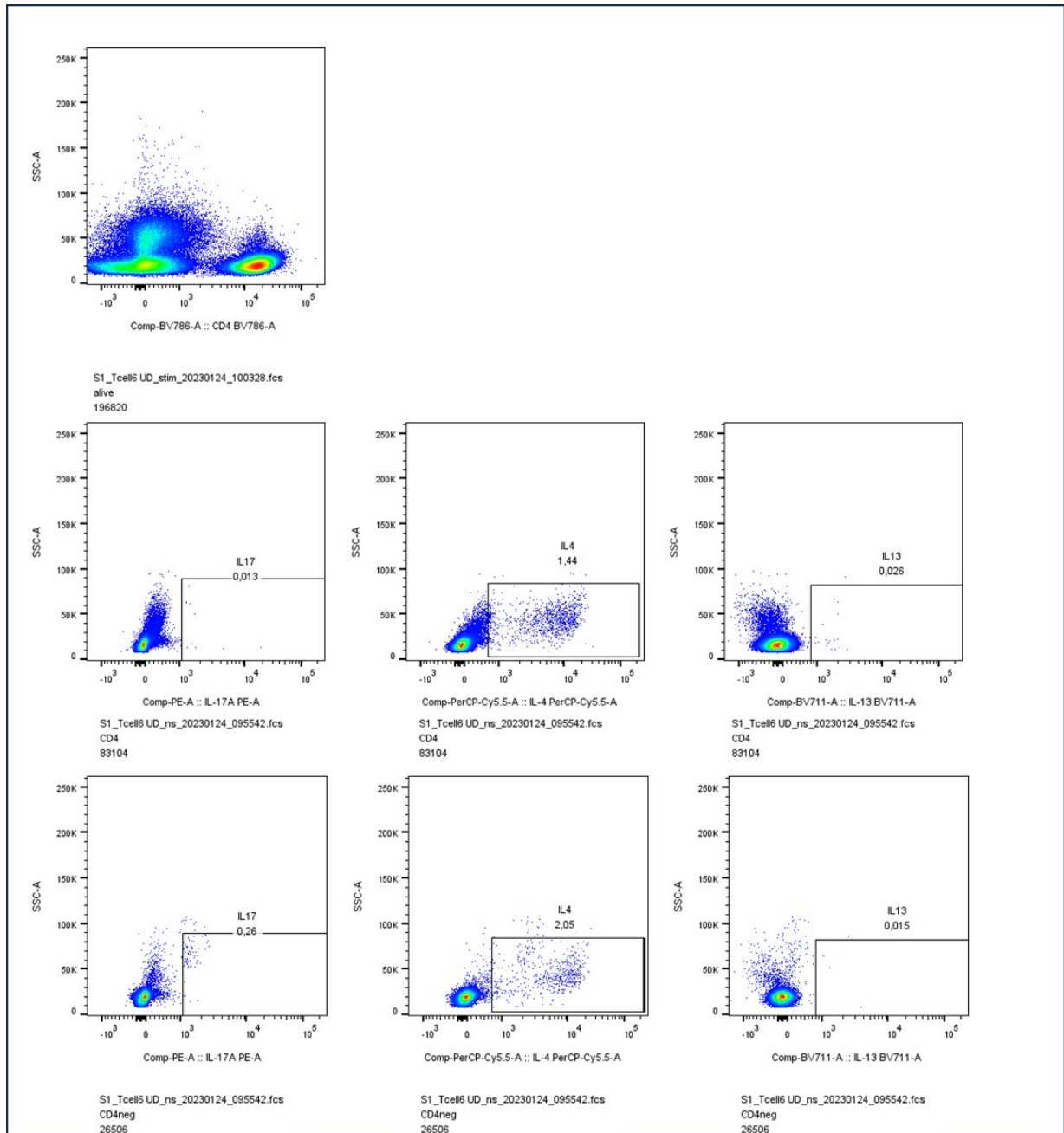


6. Anhang

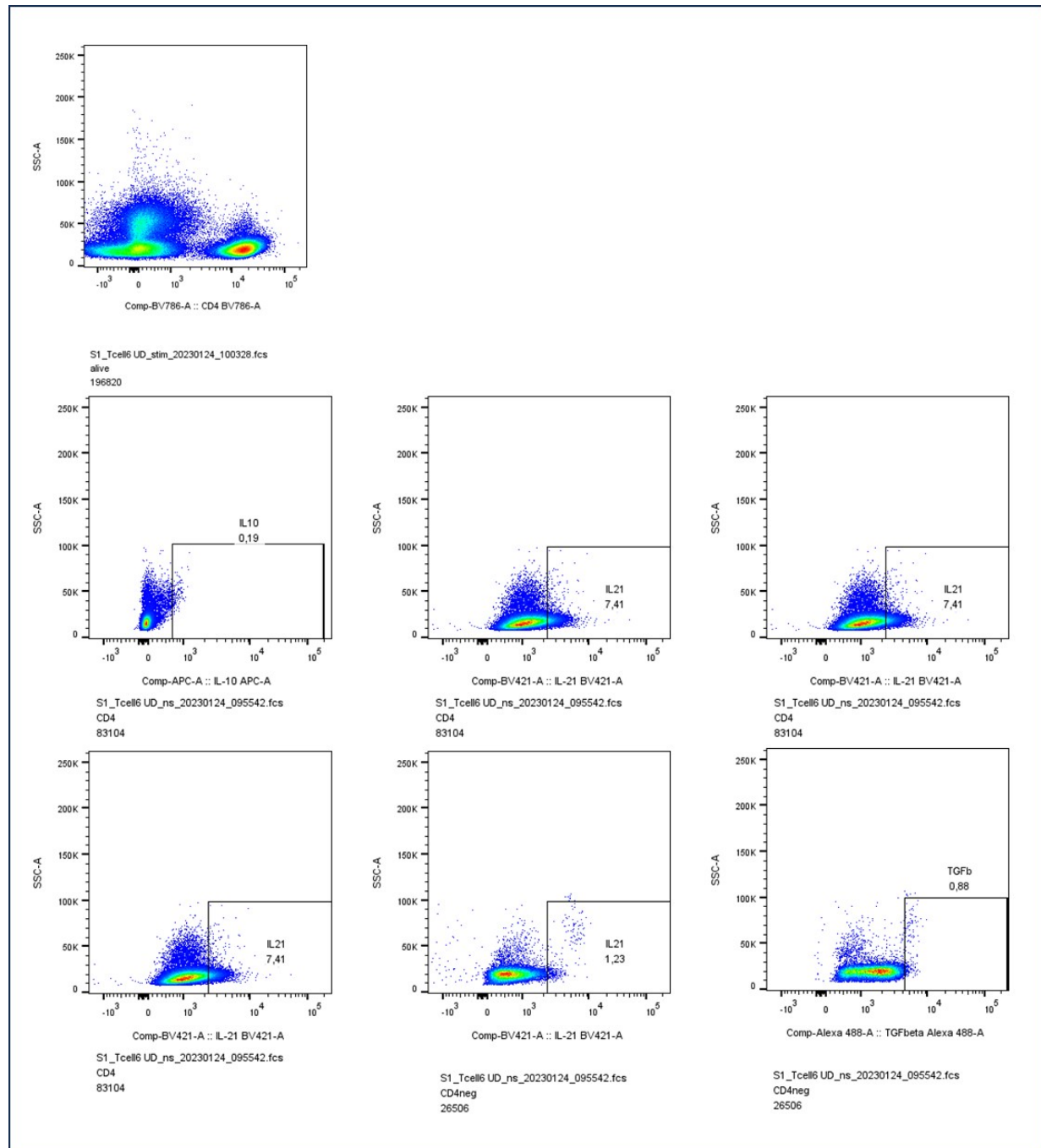


6. Anhang

6.5.8 Gating in Panel „Tcell6-stimuliert“



6. Anhang



6.6 Proteomik Protokoll (EDTA – Plasma)

Benötigte Substanzen

- TrisHCL (0,1M) Urea (8M) Bei RT zu lagern
- NH_4HCO_3 (100mM) Bei RT zu lagern
- CaCl_2 (5mM) Bei RT zu lagern
- Trypsin in 1%/50mM Essigsäure gelöst -> 0,2ug/ul (100ug Trypsin also in 500ul 1% /50mM Essigsäure (AceticAcid) lösen) Bei -20°C mind 1 Jahr haltbar
- DTT ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$) (500mM)
- Iodacetamid (500mM)
- 10ul EDTA Plasma
- Eis
- Thermoblock (Am besten zwei Blocks und einen Schraubenzieher zum austauschen)
- Zentrifuge
- Microcon (30kD) Filter
- Pipette
- Alufolie (Zum abdunkeln der Probe)

Ablauf

- 1) 10ul Probe auf 100ul verdünnen mit TrisHCL-Urea (1:9)
- 2) Davon 10ul erneute auf 100ul verdünnen mit TrisHCL-Urea (Jetzt liegt Probe 1:99 vor)
- 3) Verdünnte Probe bei 90°C – 5min – 500rpm im Thermoblock
- 4) 5 min auf Eis, Block des Thermoblocks eventuell für weniger Wartezeit (muss abkühlen) austauschen.
- 5) 2ul DTT (500mM) in die verdünnte Probe (jetzt 10mM DTT in Probe)
- 6) 30min bei 60°C und 500 rpm in Thermoblock (wieder austauschen oder kurz abkühlen lassen)
- 7) 10ul Iodacetamid (500mM) auf die Probe geben -> 30min, RT (20-30°C), 500rpm
CAVE: Iodacetamid im Dunkeln lagern, die nächsten Inkubationsschritte im dunklen (kleinen Deckel mit Alufolie für Thermoblock basteln)
- 8) 8ul DTT (500mM) auf Probe geben -> 15min, RT, 500rpm
- 9) Kann Parallel zu Schritt 7 und 8 gemacht werden. Microcon Filter (30kD) beschriften und mit 250ul Tris/Urea waschen -> drauf pipettieren, 22°C, 15min, 8000g
- 10) Durchfluß und Retentat (was oben auf Filter geblieben ist) verwerfen
- 11) Probe (jetzt ca. 120ul) auf Filter geben, 100ul TrisUrea dazugeben -> 15min, 8000g, 22°C in Zentrifuge

12) Filtrat verwerfen (nichts mehr vom Filter abpipettieren)

13) 250ul NH_4HCO_3 (100mM) auf Filter geben -> 15min, 8000g, 22°C → Retentat verwerfen

Schritt insgesamt 3 x wiederholen

Merke: Es sollte keine bis kaum Flüssigkeit auf dem Filter mehr sein, b.B nochmal 10min bei 8000g Zentrifugieren

14) 200ul NH_4HCO_3 / CaCl_2 (4:1) (also bspw.: 160ul:40ul für eine Probe. (Endkonz.: CaCl_2 1mM)) auf den Filter geben

+ 7,5ul gelöstes Trypsin

-> 5min, 37°C, 500rpm im Thermoblock (beim Entnehmen, gerade halten!)

15) Tubes mit Parafilm abdichten und über Nacht (ca. 16-18h) bei 37°C inkubieren

16) Darauffolgender Tag: Filter 15min, 22°C, 8000g zentrifugieren

17) 200ul NH_4HCO_3 auf den Filter geben -> 15min, 22°C, 8000g

-> Filtrat in spitz zulaufendes Eppi überführen und einfrieren.

6.7 Protokoll Proteomikanalyse

Sample Preparation

Proteins (10 µg) were digested (trypsin) using an AssayMAP Bravo liquid handling system (Agilent technologies) running the autoSP3 protocol according to Müller et al. (Müller T, Kalxdorf M, Longuespée R, Kazdal DN, Stenzinger A, Krijgsveld J. Automated sample preparation with SP3 for low-input clinical proteomics. *Mol Syst Biol.* 2020 Jan;16(1):e9111. doi: 10.15252/msb.20199111. PMID: 32129943; PMCID: PMC6966100.)

MS method Orbitrap Exploris 480

The LC-MS/MS analysis was carried out using a Vanquish Neo UPLC system (Thermo Fisher Scientific) directly connected to an Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer for a total of 120 min. Peptides were online desalted on a trapping cartridge (Acclaim PepMap300 C18, 5µm, 300Å wide pore; Thermo Fisher Scientific) for 2 min by setting the loading settings to 30 µl/min flow for a total loading volume of 60 µl. The analytical multistep gradient (300 nl/min) was performed using a nanoEase MZ Peptide analytical column (300Å, 1.7 µm, 75 µm x 200 mm, Waters) using solvent A (0.1% formic acid in water) and solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile). For 105 min the concentration of B was linearly ramped from 4% to 27%, followed by a quick ramp to 78%, after two minutes the concentration of B was lowered to 2% and a 10 min equilibration step appended. Eluting peptides were analyzed in the mass spectrometer using data independent acquisition (DIA) mode. A full scan at 120k resolution (380-1400 m/z, 300% AGC target, 45 ms maxIT). Followed by 40 DIA MS2 windows of variable length covering the mass range of 400-1000 m/z. MS2 DIA scans were recorded at 30k resolution (1000% AGC target, 54 ms maxIT, centroid mode, 28% NCE). Each sample was followed by a wash run (40 min) to minimize carry-over between samples. Instrument performance throughout the course of the measurement was monitored by regular (approx. one per 48 hours) injections of a standard sample and an in-house shiny application.

Data analysis

All sample handling (sample preparation and LC-MS/MS analysis) have been performed in a block randomization (Burger, Bram, Marc Vaudel, and Harald Barsnes. "Importance of block randomization when designing proteomics experiments." *Journal of proteome research* 20.1 (2020): 122-128.) order.

a) Lfq DIA

18.6.231227.55695 with 2024-02-21_Lfq_MS

Analysis of DIA RAW files was performed with Spectronaut (Biognosys, version 18.6.231227.55695) in directDIA+ (deep) library-free mode. Default settings were applied with the following adaptations. Within *DIA Analysis* under *Identification* the *Precursor PEP Cutoff* was set to 0.01, the *Protein Qvalue Cutoff (Run)* set to 0.01 and the *Protein PEP Cutoff* set to 0.01. In *Quantification* the *Proteotypicity Filter* was set to *Only Protein Group Specific*, the *Protein Lfq Method* was set to *MaxLfq* and the *Quantification window* was set to *Not Synchronized (SN 17)*. The data was searched against the human proteome from Uniprot (human reference database with one protein sequence per gene, containing 20,597 unique entries from ninth of February 2024) and the contaminants FASTA from MaxQuant (246 unique entries from 22nd of December 2022).

7. Quellenverzeichnis

7.1 Paper

1. Acar G, Tanriover G, Acar F, Demir R. Increased Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in Patients with Temporal Lobe Epilepsy. *Turk Neurosurg.* 2015;25(5):749-56. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.10738-14.0. PMID: 26442541.
2. Alyu F, Dikmen M. Inflammatory aspects of epileptogenesis: contribution of molecular inflammatory mechanisms. *Acta Neuropsychiatr.* 2017 Feb;29(1):1-16. doi: 10.1017/neu.2016.47. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27692004.
3. Aubé B, Lévesque SA, Paré A, Chamma É, Kébir H, Gorina R, Lécuyer MA, Alvarez JI, De Koninck Y, Engelhardt B, Prat A, Côté D, Lacroix S. Neutrophils mediate blood-spinal cord barrier disruption in demyelinating neuroinflammatory diseases. *J Immunol.* 2014 Sep 1;193(5):2438-54. doi: 10.4049/jimmunol.1400401. Epub 2014 Jul 21. PMID: 25049355.
4. Auvin S, Mazarati A, Shin D, Sankar R. Inflammation enhances epileptogenesis in the developing rat brain. *Neurobiol Dis.* 2010 Oct;40(1):303-10. doi: 10.1016/j.nbd.2010.06.004. Epub 2010 Jun 19. PMID: 20600912; PMCID: PMC2926147.
5. Auvin S, Shin D, Mazarati A, Sankar R. Inflammation induced by LPS enhances epileptogenesis in immature rat and may be partially reversed by IL1RA. *Epilepsia.* 2010 Jul;51 Suppl 3(Suppl 3):34-8. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02606.x. PMID: 20618397; PMCID: PMC2910518.
6. Balosso S, Ravizza T, Aronica E, Vezzani A. The dual role of TNF- α and its receptors in seizures. *Exp Neurol.* 2013 Sep;247:267-71. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.05.010. Epub 2013 May 23. PMID: 23707217.
7. Balosso S, Ravizza T, Perego C, Peschon J, Campbell IL, De Simoni MG, Vezzani A. Tumor necrosis factor- α inhibits seizures in mice via p75 receptors. *Ann Neurol.* 2005 Jun;57(6):804-12. doi: 10.1002/ana.20480. PMID: 15852477.
8. Banote RK, Larsson D, Berger E, Kumlien E, Zelano J. Quantitative proteomic analysis to identify differentially expressed proteins in patients with epilepsy. *Epilepsy Res.* 2021 Aug;174:106674. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2021.106674. Epub 2021 May 15. PMID: 34029912.
9. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity.* 2019 Apr 16;50(4):924-940. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.024. PMID: 30995507; PMCID: PMC7507121
10. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia.* 2010 Apr;51(4):676-85. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x. Epub 2010 Feb 26. PMID: 20196795.

11. Birkner K, Wasser B, Ruck T, Thalman C, Luchtman D, Pape K, Schmaul S, Bitar L, Krämer-Albers EM, Stroh A, Meuth SG, Zipp F, Bittner S. β 1-Integrin- and KV1.3 channel-dependent signaling stimulates glutamate release from Th17 cells. *J Clin Invest*. 2020 Feb 3;130(2):715-732. doi: 10.1172/JCI126381. PMID: 31661467; PMCID: PMC6994160.
12. Bittermann HJ, Steinhoff BJ. Die juvenile myoklonische Epilepsie (Janz-Syndrome). Ein gut bekanntes Epilepsiesyndrom? [Juvenile myoclonic epilepsy (Janz syndrome). A well-known epilepsy syndrome?]. *Nervenarzt*. 1998 Feb;69(2):127-30. German. doi: 10.1007/s001150050248. PMID: 9551456.
13. Bosco DB, Tian DS, Wu LJ. Neuroimmune interaction in seizures and epilepsy: focusing on monocyte infiltration. *FEBS J*. 2020 Nov;287(22):4822-4837. doi: 10.1111/febs.15428. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32473609; PMCID: PMC7817085.
14. Bozzi Y, Caleo M. Epilepsy, Seizures, and Inflammation: Role of the C-C Motif Ligand 2 Chemokine. *DNA Cell Biol*. 2016 Jun;35(6):257-60. doi: 10.1089/dna.2016.3345. Epub 2016 May 11. PMID: 27167681.
15. Broadley I, Pera A, Morrow G, Davies KA, Kern F. Expansions of Cytotoxic CD4⁺CD28⁻ T Cells Drive Excess Cardiovascular Mortality in Rheumatoid Arthritis and Other Chronic Inflammatory Conditions and Are Triggered by CMV Infection. *Front Immunol*. 2017 Mar 2;8:195. doi: 10.3389/fimmu.2017.00195. PMID: 28303136; PMCID: PMC5332470.
16. Bronisz E, Kurkowska-Jastrzębska I. Matrix Metalloproteinase 9 in Epilepsy: The Role of Neuroinflammation in Seizure Development. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:7369020. doi: 10.1155/2016/7369020. Epub 2016 Dec 26. PMID: 28104930; PMCID: PMC5220508.
17. Chen CJ, Ou YC, Chang CY, Pan HC, Liao SL, Chen SY, Raung SL, Lai CY. Glutamate released by Japanese encephalitis virus-infected microglia involves TNF- α signaling and contributes to neuronal death. *Glia*. 2012 Mar;60(3):487-501. doi: 10.1002/glia.22282. Epub 2011 Dec 5. PMID: 22144112.
18. Chen W, Ju X-Z, Lu Y, Ding X-W, Miao C-H, Chen J-W. Propofol improved hypoxia-impaired integrity of blood-brain barrier via modulating the expression and phosphorylation of zonula occludens-1. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25:704-713.
19. Daniels BP, Holman DW, Cruz-Orengo L, Jujavarapu H, Durrant DM, Klein RS. Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals. *mBio*. 2014 Aug 26;5(5):e01476-14. doi: 10.1128/mBio.01476-14. PMID: 25161189; PMCID: PMC4173776.
20. de Vries EE, van den Munckhof B, Braun KP, van Royen-Kerkhof A, de Jager W, Jansen FE. Inflammatory mediators in human epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 Apr;63:177-90. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.02.007. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26877106.

21. Dey A, Kang X, Qiu J, Du Y, Jiang J. Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Jun;37(6):463-484. doi: 10.1016/j.tips.2016.03.001. Epub 2016 Apr 6. PMID: 27062228; PMCID: PMC5064857.
22. DÜCHTING A., Prodromi und Auren, Informationszentrum Epilepsie (ize) der Dt. Gesellschaft für Epileptologie e.V., , April 2008
23. Elger C. E. (2012) Anfälle und Bewusstseinsstörung. In: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. (Hrsg.) Diener H.C., (Hrsg) Weimar C. Thieme Verlag, Stuttgart, 1- 23.
24. 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 16.02.2023).
25. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1254-66. doi: 10.7150/ijbs.4679. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23136554; PMCID: PMC3491449.
26. Fabene PF, Bramanti P, Constantin G. The emerging role for chemokines in epilepsy. *J Neuroimmunol.* 2010 Jul 27;224(1-2):22-7. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.016. Epub 2010 Jun 9. PMID: 20542576.
27. Faustino J, Chip S, Derugin N, Jullienne A, Hamer M, Haddad E, Butovsky O, Obenaus A, Vexler ZS. CX3CR1-CCR2-dependent monocyte-microglial signaling modulates neurovascular leakage and acute injury in a mouse model of childhood stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 Oct;39(10):1919-1935. doi: 10.1177/0271678X18817663. Epub 2019 Jan 10. PMID: 30628839; PMCID: PMC6775594.
28. Fisher R. S., Cross J. H., D'Souza C., French J. A., Haut S. R., Higurashi N., Hirsch E., Jansen F. E., Lagae L., Moshe S. L., Peltola J., Roulet Perez E., Scheffer I. E., Schulze-Bonhage A., Somerville E., Sperling M., Yacubian E. M., Zuberi S. M. (2017B) Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia* 58: 531-542.
29. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia.* 2014 Apr;55(4):475-82. doi: 10.1111/epi.12550. Epub 2014 Apr 14. PMID: 24730690.

30. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014 Apr;55(4):475-82. doi: 10.1111/epi.12550. Epub 2014 Apr 14. PMID: 24730690.
31. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Zuberi SM. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. (2017A) Apr;58(4):522-530. doi: 10.1111/epi.13670. Epub 2017 Mar 8. PMID: 28276060.
32. Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J Jr. Epileptic and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005 Apr;46(4):470-2. doi: 10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x. PMID: 15816939.
33. Forsgren L, Beghi E, Oun A, Sillanpää M. The epidemiology of epilepsy in Europe - a systematic review. *Eur J Neurol*. 2005 Apr;12(4):245-53. doi: 10.1111/j.1468-1331.2004.00992.x. PMID: 15804240.
34. French JA, Koepp M, Naegelin Y, Vigeveno F, Auvin S, Rho JM, Rosenberg E, Devinsky O, Olofsson PS, Dichter MA. Clinical studies and anti-inflammatory mechanisms of treatments. *Epilepsia*. 2017 Jul;58 Suppl 3(Suppl 3):69-82. doi: 10.1111/epi.13779. PMID: 28675558; PMCID: PMC5679081.
35. Fu Y, Wu Z, Guo Z, Chen L, Ma Y, Wang Z, Xiao W, Wang Y. Systems-level analysis identifies key regulators driving epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. *Genomics*. 2020 Mar;112(2):1768-1780. doi: 10.1016/j.ygeno.2019.09.020. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31669700.
36. Gao Z, Feng Y, Xu J, Liang J. T-cell exhaustion in immune-mediated inflammatory diseases: New implications for immunotherapy. *Front Immunol*. 2022 Sep 23;13:977394. doi: 10.3389/fimmu.2022.977394. PMID: 36211414; PMCID: PMC9538155.
37. Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, Gressens P. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2015 Apr;11(4):192-208. doi: 10.1038/nrneurol.2015.13. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25686754; PMCID: PMC4664161.
38. Hamer HM, Spottke A, Aletsee C, Knake S, Reis J, Strzelczyk A, Oertel WH, Rosenow F, Dodel R. Direct and indirect costs of refractory epilepsy in a tertiary epilepsy center in Germany. *Epilepsia*. 2006 Dec;47(12):2165-72. doi: 10.1111/j.1528-1167.2006.00889.x. PMID: 17201718.
39. Hendrix S, Nitsch R. The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration. *J Neuroimmunol*. 2007 Mar;184(1-2):100-12. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.11.019. Epub 2007 Jan 2. PMID: 17198734.

40. Huang M, Wan Y, Mao L, He QW, Xia YP, Li M, Li YN, Jin HJ, Hu B. Inhibiting the Migration of M1 Microglia at Hyperacute Period Could Improve Outcome of tMCAO Rats. *CNS Neurosci Ther.* 2017 Mar;23(3):222-232. doi: 10.1111/cns.12665. Epub 2016 Dec 19. PMID: 27991729; PMCID: PMC6492671.
41. Huang X, Hussain B, Chang J. Peripheral inflammation and blood-brain barrier disruption: effects and mechanisms. *CNS Neurosci Ther.* 2021 Jan;27(1):36-47. doi: 10.1111/cns.13569. Epub 2020 Dec 30. PMID: 33381913; PMCID: PMC7804893.
42. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, Bechmann I, Becher B, Luhmann HJ, Waisman A, Kuhlmann CR. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J.* 2010 Apr;24(4):1023-34. doi: 10.1096/fj.09-141978. Epub 2009 Nov 25. PMID: 19940258.
43. Jameson, J. Larry, et al. *Harrisons Innere Medizin / J.L. Jameson, A.S. Fauci, D.L. Kasper [und 3 weiteren] ; deutsche Ausgabe herausgegeben von: N. Sut-torp, M. Möckel, B. Siegmund, M. Dietel. 20. Auflage, Mc Graw Hill Education, 2020, S.3038-S.3062* <https://doi.org/10.1055/b000000107>.
44. Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, func-tion, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS.* 2020 Nov 18;17(1):69. doi: 10.1186/s12987-020-00230-3. PMID: 33208141; PMCID: PMC7672931.
45. Kamaşak T, Dilber B, Yaman SÖ, Durgut BD, Kurt T, Çoban E, Arslan EA, Şahin S, Karahan SC, Cansu A. HMGB-1, TLR4, IL-1R1, TNF- α , and IL-1 β : novel epi-lesy markers? *Epileptic Disord.* 2020 Apr 1;22(2):183-193. doi: 10.1684/epd.2020.1155. PMID: 32301731.
46. Koh HS, Chang CY, Jeon SB, Yoon HJ, Ahn YH, Kim HS, Kim IH, Jeon SH, Johnson RS, Park EJ. The HIF-1/glia1 TIM-3 axis controls inflammation-associ-ated brain damage under hypoxia. *Nat Commun.* 2015 Mar 20;6:6340. doi: 10.1038/ncomms7340. PMID: 25790768; PMCID: PMC4383004.
47. Konopka A, Grajkowska W, Ziemiańska K, Roszkowski M, Daszkiewicz P, Rysz A, Marchel A, Koperski L, Wilczyński GM, Dzwonek J. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human intractable epilepsy caused by focal cortical dysplasia. *Epi-lesy Res.* 2013 Mar;104(1-2):45-58. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2012.09.018. E-pub 2012 Nov 23. PMID: 23182966.
48. Kossmann T, Stahel PF, Lenzlinger PM, Redl H, Dubs RW, Trentz O, Schlag G, Morganti-Kossmann MC. Interleukin-8 released into the cerebrospinal fluid after brain injury is associated with blood-brain barrier dysfunction and nerve growth factor production. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997 Mar;17(3):280-9. doi: 10.1097/00004647-199703000-00005. PMID: 9119901.

49. Krämer TJ, Hack N, Brühl TJ, Menzel L, Hummel R, Griemert EV, Klein M, Thal SC, Bopp T, Schäfer MKE. Depletion of regulatory T cells increases T cell brain infiltration, reactive astrogliosis, and interferon- γ gene expression in acute experimental traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2019 Aug 5;16(1):163. doi: 10.1186/s12974-019-1550-0. Erratum in: *J Neuroinflammation*. 2019 Sep 7;16(1):176. PMID: 31383034; PMCID: PMC6683516.
50. Kubota K, Inoue K, Hashimoto R, Kumamoto N, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H, Iwata N, Ozaki N, Takeda M, Tohyama M. Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 regulates cell adhesion and synaptic morphology via modulation of N-cadherin expression. *J Neurochem*. 2009 Jul;110(2):496-508. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06099.x. Epub 2009 Apr 20. PMID: 19490362.
51. Labus J, Hackel S, Lucka L, Danker K. Interleukin-1 β induces an inflammatory response and the breakdown of the endothelial cell layer in an improved human THBMEC-based in vitro blood-brain barrier model. *J Neurosci Methods*. 2014;228:35-45.
52. Labus J, Woltje K, Stolte KN, et al. IL-1 β promotes transendothelial migration of PBMCs by upregulation of the FN/ α 5 β 1 signalling pathway in immortalised human brain microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res*. 2018;373:99-111.
53. Lang JD, Olmes DG, Proske M, Hagge M, Dogan Onugoren M, Rothhammer V, Schwab S, Hamer HM. Pre- and Postictal Changes in the Innate Immune System: Cause or Effect? *Eur Neurol*. 2021;84(5):380-388. doi: 10.1159/000516556. Epub 2021 Jun 17. PMID: 34139710.
54. Levin SG, Godukhin OV. Modulating Effect of Cytokines on Mechanisms of Synaptic Plasticity in the Brain. *Biochemistry (Mosc)*. 2017 Mar;82(3):264-274. doi: 10.1134/S000629791703004X. PMID: 28320267.
55. Li G, Bauer S, Nowak M, Norwood B, Tackenberg B, Rosenow F, Knake S, Oertel WH, Hamer HM. Cytokines and epilepsy. *Seizure*. 2011 Apr;20(3):249-56. doi: 10.1016/j.seizure.2010.12.005. Epub 2011 Jan 8. PMID: 21216630.
56. Li M, Cui L, Feng X, Wang C, Zhang Y, Wang L, Ding Y, Zhao T. Losmapimod Protected Epileptic Rats From Hippocampal Neuron Damage Through Inhibition of the MAPK Pathway. *Front Pharmacol*. 2019 Jun 7;10:625. doi: 10.3389/fphar.2019.00625. PMID: 31231220; PMCID: PMC6565798.
57. Lopez NE, Krzyzaniak MJ, Blow C, Putnam J, Ortiz-Pomales Y, Hageny AM, Elliceiri B, Coimbra R, Bansal V. Ghrelin prevents disruption of the blood-brain barrier after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2012 Jan 20;29(2):385-93. doi: 10.1089/neu.2011.2053. Epub 2011 Oct 26. PMID: 21939391; PMCID: PMC3279718.

58. Lüders H, Acharya J, Baumgartner C, Benbadis S, Bleasel A, Burgess R, Dinner DS, Ebner A, Foldvary N, Geller E, Hamer H, Holthausen H, Kotagal P, Morris H, Meencke HJ, Noachtar S, Rosenow F, Sakamoto A, Steinhoff BJ, Tuxhorn I, Wyllie E. Semiological seizure classification. *Epilepsia*. 1998 Sep;39(9):1006-13. doi: 10.1111/j.1528-1157.1998.tb01452.x. PMID: 9738682.
59. Müller T, Kalxdorf M, Longuespée R, Kazdal DN, Stenzinger A, Krijgsveld J. Automatisierte Probenvorbereitung mittels SP3 für klinische Proteomik bei geringem Probeninput. *Mol Syst Biol*. 2020 Jan;16(1). doi: 10.15252/msb.20199111. PMID: 32129943; PMCID: PMC6966100
60. McKittrick CM, Lawrence CE, Carswell HV. Mast cells promote blood brain barrier breakdown and neutrophil infiltration in a mouse model of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015 Mar 31;35(4):638-47. doi: 10.1038/jcbfm.2014.239. PMID: 25564235; PMCID: PMC4420882.
61. Melero-Jerez C, Ortega MC, Moliné-Velázquez V, Clemente D. Myeloid derived suppressor cells in inflammatory conditions of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Mar;1862(3):368-80. doi: 10.1016/j.bbdis.2015.10.015. Epub 2015 Oct 23. PMID: 26527182.
62. Melo AM, Taher NA, Doherty DG, Molloy EJ. The role of lymphocytes in neonatal encephalopathy. *Brain Behav Immun Health*. 2021 Oct 20;18:100380. doi: 10.1016/j.bbih.2021.100380. PMID: 34755125; PMCID: PMC8560973.
63. Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*. 2003;161:653-660.
64. Noachtar S, Rosenow F, Arnold S, Baumgartner C, Ebner A, Hamer H, Holthausen H, Meencke HJ, Müller A, Sakamoto AC, Steinhoff BJ, Tuxhorn I, Werhahn KJ, Winkler PA, Lüders HO. Die semiologische Klassifikation epileptischer Anfälle [Semiologic classification of epileptic seizures]. *Nervenarzt*. 1998 Feb;69(2):117-26. German. doi: 10.1007/s001150050247. PMID: 9551455.
65. Ouédraogo O, Rébillard RM, Jamann H, Mamane VH, Clénet ML, Daigneault A, Lahav B, Uphaus T, Steffen F, Bittner S, Zipp F, Bérubé A, Lapalme-Remis S, Cossette P, Nguyen DK, Arbour N, Keezer MR, Larochelle C. Increased frequency of proinflammatory CD4 T cells and pathological levels of serum neurofilament light chain in adult drug-resistant epilepsy. *Epilepsia*. 2021 Jan;62(1):176-189. doi: 10.1111/epi.16742. Epub 2020 Nov 2. PMID: 33140401.
66. Prakash MD, Munoz MA, Jain R, Tong PL, Koskinen A, Regner M, Kleifeld O, Ho B, Olson M, Turner SJ, Mrass P, Weninger W, Bird PI. Granzyme B promotes cytotoxic lymphocyte transmigration via basement membrane remodeling. *Immunity*. 2014 Dec 18;41(6):960-72. doi: 10.1016/j.immuni.2014.11.012. Epub 2014 Nov 28. PMID: 25526309.
67. Presta I, Vismara M, Novellino F, Donato A, Zaffino P, Scali E, Pirrone KC, Spadea MF, Malara N, Donato G. Innate Immunity Cells and the Neurovascular Unit. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 3;19(12):3856. doi: 10.3390/ijms19123856. PMID: 30513991; PMCID: PMC6321635.

68. Prodjinotho UF, Gres V, Henkel F, Lacorcchia M, Dandl R, Haslbeck M, Schmidt V, Winkler AS, Sikasunge C, Jakobsson PJ, Henneke P, Esser-von Bieren J, Prazeres da Costa C. Helminthic dehydrogenase drives PGE₂ and IL-10 production in monocytes to potentiate Treg induction. *EMBO Rep.* 2022 May 4;23(5):e54096. doi: 10.15252/embr.202154096. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35357743; PMCID: PMC9066053.
69. Prodjinotho UF, Gres V, Henkel F, Lacorcchia M, Dandl R, Haslbeck M, Schmidt V, Winkler AS, Sikasunge C, Jakobsson PJ, Henneke P, Esser-von Bieren J, Prazeres da Costa C. Helminthic dehydrogenase drives PGE₂ and IL-10 production in monocytes to potentiate Treg induction.
70. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia.* 1989 Jul-Aug;30(4):389-99. doi: 10.1111/j.1528-1157.1989.tb05316.x. PMID: 2502382.
71. Qiu YM, Zhang CL, Chen AQ, Wang HL, Zhou YF, Li YN, Hu B. Immune Cells in the BBB Disruption After Acute Ischemic Stroke: Targets for Immune Therapy? *Front Immunol.* 2021 Jun 23;12:678744. doi: 10.3389/fimmu.2021.678744. PMID: 34248961; PMCID: PMC8260997.
72. Rana A, Musto AE. The role of inflammation in the development of epilepsy. *J Neuroinflammation.* 2018 May 15;15(1):144. doi: 10.1186/s12974-018-1192-7. PMID: 29764485; PMCID: PMC5952578.
73. Ravizza T, Boer K, Redeker S, Spliet WG, van Rijen PC, Troost D, Vezzani A, Aronica E. The IL-1 β system in epilepsy-associated malformations of cortical development. *Neurobiol Dis.* 2006 Oct;24(1):128-43. doi: 10.1016/j.nbd.2006.06.003. Epub 2006 Jul 24. PMID: 16860990.
74. Ravizza T, Gagliardi B, Noé F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2008 Jan;29(1):142-60. doi: 10.1016/j.nbd.2007.08.012. Epub 2007 Aug 31. PMID: 17931873.
75. Ravizza T, Moneta D, Bottazzi B, Peri G, Garlanda C, Hirsch E, Richards GJ, Mantovani A, Vezzani A. Dynamic induction of the long pentraxin PTX3 in the CNS after limbic seizures: evidence for a protective role in seizure-induced neurodegeneration. *Neuroscience.* 2001;105(1):43-53. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00177-4. PMID: 11483299.
76. Ronaldson PT, Davis TP. Regulation of blood-brain barrier integrity by microglia in health and disease: A therapeutic opportunity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2020 Dec;40(1_suppl):S6-S24. doi: 10.1177/0271678X20951995. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32928017; PMCID: PMC7687032.

77. Saand AR, Yu F, Chen J, Chou SH. Systemic inflammation in hemorrhagic strokes - A novel neurological sign and therapeutic target? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 Jun;39(6):959-988. doi: 10.1177/0271678X19841443. Epub 2019 Apr 8. PMID: 30961425; PMCID: PMC6547186.
78. Salimi H, Klein RS. Disruption of the Blood-Brain Barrier During Neuroinflammatory and Neuroinfectious Diseases. *Neuroimmune Diseases.* 2019 Apr 25:195–234. doi: 10.1007/978-3-030-19515-1_7. PMCID: PMC7121618.
79. Sanli E, Akbayir E, Kuçukali CI, Baykan B, Sirin NG, Bebek N, Yilmaz V, Tuzun E. Adaptive immunity cells are differentially distributed in the peripheral blood of glycine receptor antibody-positive patients with focal epilepsy of unknown cause. *Epilepsy Res.* 2021 Feb;170:106542. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2020.106542. Epub 2020 Dec 25. PMID: 33387801.
80. Santello M, Bezzi P, Volterra A. TNF α controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron.* 2011 Mar 10;69(5):988-1001. doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.003. PMID: 21382557.
81. Sarvari S, Moakedi F, Hone E, Simpkins JW, Ren X. Mechanisms in blood-brain barrier opening and metabolism-challenged cerebrovascular ischemia with emphasis on ischemic stroke. *Metab Brain Dis.* 2020 Aug;35(6):851-868. doi: 10.1007/s11011-020-00573-8. Epub 2020 Apr 15. PMID: 32297170; PMCID: PMC7988906.
82. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshé SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang YH, Zuberi SM. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017 Apr;58(4):512-521. doi: 10.1111/epi.13709. Epub 2017 Mar 8. PMID: 28276062; PMCID: PMC5386840.
83. Schneider-Hohendorf T, Stenner MP, Weidenfeller C, Zozulya AL, Simon OJ, Schwab N, Wiendl H. Regulatory T cells exhibit enhanced migratory characteristics, a feature impaired in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2010 Dec;40(12):3581-90. doi: 10.1002/eji.201040558. PMID: 21108477.
84. Serna-Rodríguez MF, Bernal-Vega S, de la Barquera JAO, Camacho-Morales A, Pérez-Maya AA. The role of damage associated molecular pattern molecules (DAMPs) and permeability of the blood-brain barrier in depression and neuroinflammation. *J Neuroimmunol.* 2022 Oct 15;371:577951. doi: 10.1016/j.jneuroim.2022.577951. Epub 2022 Aug 17. PMID: 35994946.
85. Serna-Rodríguez MF, Bernal-Vega S, de la Barquera JAO, Camacho-Morales A, Pérez-Maya AA. The role of damage associated molecular pattern molecules (DAMPs) and permeability of the blood-brain barrier in depression and neuroinflammation. *J Neuroimmunol.* 2022 Oct 15;371:577951. doi: 10.1016/j.jneuroim.2022.577951. Epub 2022 Aug 17. PMID: 35994946.

86. Siffrin V, Radbruch H, Glumm R, Niesner R, Paterka M, Herz J, Leuenberger T, Lehmann SM, Luenstedt S, Rinnenthal JL, Laube G, Luche H, Lehnardt S, Fehling HJ, Griesbeck O, Zipp F. In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):424-36. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.018. PMID: 20870176.
87. Sonar SA, Lal G. Differentiation and Transmigration of CD4 T Cells in Neuroinflammation and Autoimmunity. *Front Immunol*. 2017 Nov 29;8:1695. doi: 10.3389/fimmu.2017.01695. PMID: 29238350; PMCID: PMC5712560.
88. Souza PS, Gonçalves ED, Pedroso GS, Farias HR, Junqueira SC, Marcon R, Tuon T, Cola M, Silveira PCL, Santos AR, Calixto JB, Souza CT, de Pinho RA, Dutra RC. Physical Exercise Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Peripheral Immune Response and Blood-Brain Barrier Disruption. *Mol Neurobiol*. 2017 Aug;54(6):4723-4737. doi: 10.1007/s12035-016-0014-0. Epub 2016 Jul 22. PMID: 27447807.
89. Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci*. 2005 Mar 23;25(12):3219-28. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005. Erratum in: *J Neurosci*. 2005 Jun 1;25(22):1 p following 5454. PMID: 15788779; PMCID: PMC6725093.
90. Stellwagen D, Beattie EC, Seo JY, Malenka RC. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci*. 2005 Mar 23;25(12):3219-28. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005. Erratum in: *J Neurosci*. 2005 Jun 1;25(22):1 p following 5454. PMID: 15788779; PMCID: PMC6725093.
91. Stellwagen D, Malenka RC. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha. *Nature*. 2006 Apr 20;440(7087):1054-9. doi: 10.1038/nature04671. Epub 2006 Mar 19. PMID: 16547515.
92. Suidan GL, Brill A, De Meyer SF, Voorhees JR, Cifuni SM, Cabral JE, Wagner DD. Endothelial Von Willebrand factor promotes blood-brain barrier flexibility and provides protection from hypoxia and seizures in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Sep;33(9):2112-20. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301362. Epub 2013 Jul 3. PMID: 23825365; PMCID: PMC3854012.
93. Sumi N, Nishioku T, Takata F, Matsumoto J, Watanabe T, Shuto H, Yamauchi A, Dohgu S, Kataoka Y. Lipopolysaccharide-activated microglia induce dysfunction of the blood-brain barrier in rat microvascular endothelial cells co-cultured with microglia. *Cell Mol Neurobiol*. 2010 Mar;30(2):247-53. doi: 10.1007/s10571-009-9446-7. Epub 2009 Aug 29. PMID: 19728078.
94. Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A. Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem*. 2006 Jul 28;281(30):21362-21368. doi: 10.1074/jbc.M600504200. Epub 2006 May 23. PMID: 16720574.

95. Tan S, Shan Y, Lin Y, et al. Neutralization of interleukin-9 ameliorates experimental stroke by repairing the blood-brain barrier via down-regulation of astrocyte-derived vascular endothelial growth factor-A. *FASEB J.* 2019;33:4376-4387.
96. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet.* 2019 Feb 16;393(10172):689-701. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32596-0. Epub 2019 Jan 24. PMID: 30686584.
97. van Aalderen MC, Remmerswaal EB, Verstegen NJ, Hombrink P, ten Brinke A, Pircher H, Kootstra NA, ten Berge IJ, van Lier RA. Infection history determines the differentiation state of human CD8⁺ T cells. *J Virol.* 2015 May;89(9):5110-23. doi: 10.1128/JVI.03478-14. Epub 2015 Feb 25. PMID: 25717102; PMCID: PMC4403462.
98. van Vliet EA, da Costa Araújo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain.* 2007 Feb;130(Pt 2):521-34. doi: 10.1093/brain/awl318. Epub 2006 Nov 22. PMID: 17124188.
99. Vezzani A, Aronica E, Mazarati A, Pittman QJ. Epilepsy and brain inflammation. *Exp Neurol.* 2013 Jun;244:11-21. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.09.033. Epub 2011 Oct 1. PMID: 21985866.
100. Vezzani A, Friedman A, Dingledine RJ. The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology.* 2013 Jun;69:16-24. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.04.004. Epub 2012 Apr 13. PMID: 22521336; PMCID: PMC3447120.
101. Vogelaar CF, Mandal S, Lerch S, Birkner K, Birkenstock J, Bühler U, Schnatz A, Raine CS, Bittner S, Vogt J, Kipnis J, Nitsch R, Zipp F. Fast direct neuronal signaling via the IL-4 receptor as therapeutic target in neuroinflammation. *Sci Transl Med.* 2018 Feb 28;10(430):eaao2304. doi: 10.1126/scitranslmed.aao2304. PMID: 29491183.
102. Weinberg MS, Blake BL, McCown TJ. Opposing actions of hippocampus TNF α receptors on limbic seizure susceptibility. *Exp Neurol.* 2013 Sep;247:429-37. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.01.011. Epub 2013 Jan 16. PMID: 23333565; PMCID: PMC3636186.
103. Wilcox KS, Vezzani A. Does brain inflammation mediate pathological outcomes in epilepsy? *Adv Exp Med Biol.* 2014;813:169-83. doi: 10.1007/978-94-017-8914-1_14. PMID: 25012376; PMCID: PMC4867105.
104. Yu CC, Chen HL, Chen MH, Lu CH, Tsai NW, Huang CC, Chang YY, Li SH, Chen YS, Chiang PL, Lin WC. Vascular Inflammation Is a Risk Factor Associated with Brain Atrophy and Disease Severity in Parkinson's Disease: A Case-Control Study. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Jul 14;2020:2591248. doi: 10.1155/2020/2591248. PMID: 32733633; PMCID: PMC7376437.

105. Zattoni M, Mura ML, Deprez F, Schwendener RA, Engelhardt B, Frei K, Fritschy JM. Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2011 Mar 16;31(11):4037-50. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6210-10.2011. PMID: 21411646; PMCID: PMC6623535.
106. Zhang J, Sadowska GB, Chen X, Park SY, Kim JE, Bodge CA, Cummings E, Lim YP, Makeyev O, Besio WG, Gaitanis J, Banks WA, Stonestreet BS. Anti-IL-6 neutralizing antibody modulates blood-brain barrier function in the ovine fetus. *FASEB J*. 2015 May;29(5):1739-53. doi: 10.1096/fj.14-258822. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25609424; PMCID: PMC4771067.
107. Zhang ZT, Zhang DY, Xie K, Wang CJ, Xu F. Luteolin activates Tregs to promote IL-10 expression and alleviating caspase-11-dependent pyroptosis in sepsis-induced lung injury. *Int Immunopharmacol*. 2021 Oct;99:107914. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107914. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34246059.

7.2 Webseiten

1. https://www.epilepsie-vereinigung.de/wp-content/uploads/2019/02/Faltblatt_Genetik-0119-Bundesverband.pdf
(aufgerufen am 17.02.2023)
2. Vertex Pharmaceuticals Incorporated (10. März 2011) Vertex Announces Completion of Phase 2 Study of VX-765 in People with Epilepsy who did not Respond to Previous Treatment
3. <https://investors.vrtx.com/static-files/99195d36-42be-4e2a-a2b3-b0d632ba31c7>
(Aufgerufen am 14.02.2023)

7.3 Bücherquellen

1. Chaplin D. D. (2010) *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol 125: S3-23.
2. Ferencík M., Rovensky J., Mat'ha V., Herold M. (2006) *Kompendium der Immunologie - Grundlagen und Klinik*. 1. Aufl. Springer-Verlag, Wien.
3. Bröker B, Schütt C, Fleischer B (2019) *Grundwissen Immunologie*, 4. Aufl. Springer Spektrum, Berlin Seiten: 3-105

8. Lebenslauf

PERSONALIEN

Name und Vorname: Woog, Maximilian
Geburtsdatum: 13.02.1999
Geburtsort: Heidelberg

SCHULISCHER WERDEGANG

2009-2017 Gymnasium des BSBZ, Biberach an der Riss
05/2017 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2018/19 Beginn des Studiums der Humanmedizin
An der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
10.09.2020 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2020 - 04/2024 Hauptstudium
11.04.2024 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2024 – 05/2025 Praktisches Jahr
Vsl. 06/2025 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

9. Danksagung

Die Fertigstellung dieser Dissertation wäre ohne die Unterstützung vieler Menschen nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank gilt Professor Michael Platten, der mich mit seiner Expertise und seinem Vertrauen durch alle Phasen dieser Arbeit geleitet hat. Ebenso bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. Niklas Graßl, dessen fachlicher Rat und freundschaftliche Unterstützung für mich von unschätzbarem Wert waren.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des Labors der UMM sowie der Core Facility, die diese Forschung durch ihre fachliche Förderung ermöglicht haben.

Ein ebenfalls großer Dank gilt den Mitarbeiter*innen des NCT-Labors in Heidelberg insbesondere Frau Dr. Isabel Poschke, welche bei Erstellung und Auswertung der FACS-Analyse stets eine große Hilfe war.

Meiner Familie danke ich von Herzen, die mir während der gesamten Promotionszeit Rückhalt gegeben hat.

Allen Genannten und Ungenannten, die mich auf diesem Weg begleitet haben, gilt mein tiefster Dank.