

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Institut für Anatomie II (Experimentelle Neurobiologie)  
Komm. Direktor: Prof. Dr. Thomas Deller

**Untersuchung der Expression von Wachstumsfaktoren in  
reseziertem Hirngewebe von Epilepsiepatienten**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Alexander Sanchez-Maroto Vogel

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2023

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Jörg H. Stehle
Korreferent/in:	Prof. Dr. Felix Rosenow
Tag der mündlichen Prüfung:	10.04.2024

## Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis .....	5
2	Einleitung .....	8
2.1	Epilepsie .....	8
2.1.1	Klassifikation .....	10
2.1.2	Epileptogenese und Ätiologie .....	11
2.1.3	Diagnostik und prächirurgische Evaluation.....	14
2.1.4	Therapie und Prognose .....	16
2.2	Hippocampus.....	18
2.3	Hippocampussklerose .....	21
2.4	Wachstumsfaktoren und Epilepsie .....	22
2.4.1	BDNF.....	23
2.4.2	FGF2 .....	24
2.4.3	GDNF .....	24
2.4.4	GMFB .....	25
2.4.5	PDGF-B.....	25
2.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	26
3	Material und Methoden .....	27
3.1	Histologisches Material.....	27
3.2	Antikörper .....	27
3.3	Immunhistochemie .....	28
3.3.1	Prinzip der Immunhistochemie .....	28
3.3.2	Erarbeitung des Färbeprotokolls.....	29
3.3.3	Färbeprotokoll.....	30
3.4	Western Blot.....	37
3.4.1	Prinzip des Western Blots .....	37
3.4.2	Protokoll des Western Blots .....	37
3.4.3	Validierung der Antikörper mittels Western Blot .....	38

3.5	Histologische Auswertung .....	40
3.5.1	Algorithmus zur histologischen Auswertung .....	42
3.6	Statistik und Abbildungen .....	45
4	Ergebnisse .....	46
4.1	Charakterisierung und deskriptive Statistik des Patientenkollektivs	46
4.2	Vergleich der Expression der Wachstumsfaktoren in histologisch unauffälligem und sklerotischem Gewebe.....	49
4.3	Multivariate Analyse .....	51
4.4	Korrelation von Wachstumsfaktorenexpression und Outcome .....	52
4.5	Korrelation von Wachstumsfaktorenexpression und Epilepsiedauer	56
4.6	Korrelation von Wachstumsfaktorenexpression und Anfallsfrequenz	59
4.7	Korrelation von Wachstumsfaktorenexpression untereinander .....	61
4.8	Geschlechtsabhängige Expression der Wachstumsfaktoren.....	63
4.9	Wachstumsfaktorenexpression und neuropsychologische Testung	63
5	Diskussion.....	68
5.1	Einordnung der Ergebnisse .....	68
5.1.1	Vorkommen von Wachstumsfaktoren in histologisch unauffälligem und in sklerotischem Gewebe (vgl. 4.2).....	68
5.1.2	GMFB und das postoperative Outcome (vgl. 4.4).....	69
5.1.3	Epilepsiedauer (vgl. 4.5).....	70
5.1.4	Anfallsfrequenz (vgl. 4.6).....	71
5.1.5	Korrelation der Wachstumsfaktorenexpression untereinander (vgl. 4.7) .....	73
5.1.6	Geschlechtsabhängige Expression der Wachstumsfaktoren (vgl. 4.8) .....	74
5.1.7	Wachstumsfaktorenexpression und neuropsychologische Testung (vgl. 4.9) .....	74

5.2	Limitationen .....	76
5.3	Ausblick und klinische Anwendungen.....	77
6	Zusammenfassung .....	79
6.1	Deutsch .....	79
6.2	Englisch.....	81
7	Liste der verwendeten Materialien .....	83
8	Literatur.....	86
9	Abbildungsverzeichnis .....	97
10	Tabellenverzeichnis .....	98
11	Anhang.....	100
	<b>Schriftliche Erklärung</b> .....	102
12	Danksagung.....	103

## 1 Abkürzungsverzeichnis

## **A**

ABC-Methode..... *Avidin-Biotin-Complex-Methode*

## **C**

CA ..... *Cornu ammonis/Ammonshorn*

## **D**

DAB ..... *3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid*

DG ..... *Dentate Gyrus/Gyrus dentatus*

DTT ..... *Dithiothreitol*

## **E**

EEG ..... *Elektroenzephalographie*

## **F**

FCD ..... *Fokale Kortikale Dysplasie*

FDG-PET ..... *[<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose-Positronenemissionstomographie*

FFPE ..... *Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet*

FGF2 ..... *Fibroblast Growth Factor-2*

fMRT ..... *funktionelle Magnetresonanztomographie*

fTCD ..... *funktionelle transkranielle Dopplersonographie*

## **G**

GABA ..... *Gamma-Aminobutyric Acid*

GDNF ..... *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor*

GMF ..... *Glia Maturation Factor*

GMFB ..... *Glia Maturation Factor-β*

GMFG ..... *Glia Maturation Factor-Gamma*

## **H**

HRP ..... *Horse-Radish-Peroxidase/Meerrettichperoxidase*

**I**

IHC ..... *Immunhistochemie*

ILAE ..... *International League Against Epilepsy*

**M**

MEG ..... *Magnetenzephalographie*

mRNA ..... *messenger Ribonucleic Acid*

MRT ..... *Magnetresonanztomographie*

**N**

NGS ..... *Normal Goat Serum*

NMDA-Rezeptoren ..... *N-Methyl-D-Aspartate Receptors*

**P**

PBS ..... *Phosphate-Buffered Saline*

PDGF ..... *Platelet-Derived Growth Factor*

PDGF-B ..... *Platelet-Derived Growth Factor-B*

**S**

SUDEP ..... *Sudden Unexpected Death in Epilepsy*

**T**

TLE ..... *Temporallappenepilepsie*

**U**

UCT ..... *University Cancer Center Frankfurt*

## 2 Einleitung

### 2.1 Epilepsie

In einem gesunden menschlichen Gehirn befinden sich die exzitatorischen und inhibitorischen Einflüsse auf das neuronale Netzwerk in einem fein regulierten Gleichgewicht. Die Neurone halten Amplitude und Frequenz ihrer Entladungsrate in einem engen physiologischen Rahmen.<sup>1,2</sup> Neuroplastischen Veränderungen, die zu einem Mehr an Input führen, werden auf anderen Ebenen entgegengewirkt, um dies zu gewährleisten.<sup>1,2</sup> Eine Verschiebung des homöostatischen Gleichgewichts kann zu epileptischen Anfällen führen.

Ein *epileptischer Anfall* ist ein zeitlich begrenztes Ereignis mit Zeichen oder Symptomen einer abnormal gesteigerten oder synchronisierten elektrischen Aktivität des Gehirns.<sup>3</sup> In Abgrenzung dazu handelt es sich bei der *Epilepsie* um eine Erkrankung des Gehirns, die durch eine Prädisposition für das Auftreten derartiger nicht provozierte epileptischer Anfälle gekennzeichnet ist.<sup>3</sup> Ein epileptischer Anfall kann folglich auch ohne eine Epilepsie vorliegen, eine Epilepsie kann allerdings nicht ohne das Auftreten mindestens eines epileptischen Anfalls diagnostiziert werden.<sup>3</sup> Beispielsweise liegt ein akut-symptomatischer Anfall vor, wenn der epileptische Anfall in einem engen zeitlichen Zusammenhang mit einer akuten Schädigung des Gehirns, wie einem Schädel-Hirn-Trauma, einer Infektion oder einem Schlaganfall einhergeht. Im klinischen Alltag wird die Epilepsie gemäß den Kriterien der International League Against Epilepsy (ILAE) über zwei nicht provozierte Anfälle, über einen epileptischen Anfall mit einer hohen Wahrscheinlichkeit (60%) für einen weiteren epileptischen Anfall oder über den Nachweis eines Epilepsiesyndroms definiert.<sup>3</sup> Zudem kann die Diagnose nach einer zehnjährigen Anfallsfreiheit, davon in den letzten fünf Jahren ohne antikonvulsive Therapie, zurückgenommen werden.<sup>3</sup>

Die Epilepsie gehört mit einer weltweiten Lebenszeitprävalenz von 7,6 (4-10 laut WHO) pro 1000 Personen zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen.<sup>4,5</sup> Weltweit leiden über 50 Millionen Menschen an Epilepsie.<sup>5</sup> Neben den unmittelbaren Folgen und Einschränkungen der Erkrankung sind Stigmatisierung<sup>6</sup>, psychiatrische Komorbidität<sup>7</sup>, sowie die sozioökonomischen Kosten<sup>8,9</sup> der Epilepsie relevante Faktoren für die verminderte Lebensqualität der

Patienten. Zusätzlich zu Einschränkungen der Lebensqualität, besteht ein erhöhtes Risiko für Verletzungen und „Sudden Unexpected Death in Epilepsy“ (SUDEP), woraus eine verringerte Lebenserwartung resultiert.<sup>10</sup>

Das Erscheinungsbild einer Epilepsie, beziehungsweise eines epileptischen Anfalls, wird als Anfallssemiologie bezeichnet. Iktal, also während des Anfalls, sowie periiktal auftretende Positiv- und Negativsymptome können bereits Hinweise auf den Ursprung und die Ausbreitung der abnormalen elektrischen Aktivität geben. Zudem finden sich iktal sowie interiktal elektroencephalographisch messbare elektrophysiologische Korrelate.

Als große Untergruppen können hierbei die fokalen und generalisierten Epilepsien voneinander unterschieden werden. Bei fokalen Anfällen beschränkt sich die pathologische elektrische Aktivität auf ein bestimmtes Areal, was sich für gewöhnlich auch in der Anfallssemiologie widerspiegelt. Im Gegensatz dazu tritt die pathologische elektrische Aktivität bei den generalisierten Epilepsien im gesamten Gehirn auf.

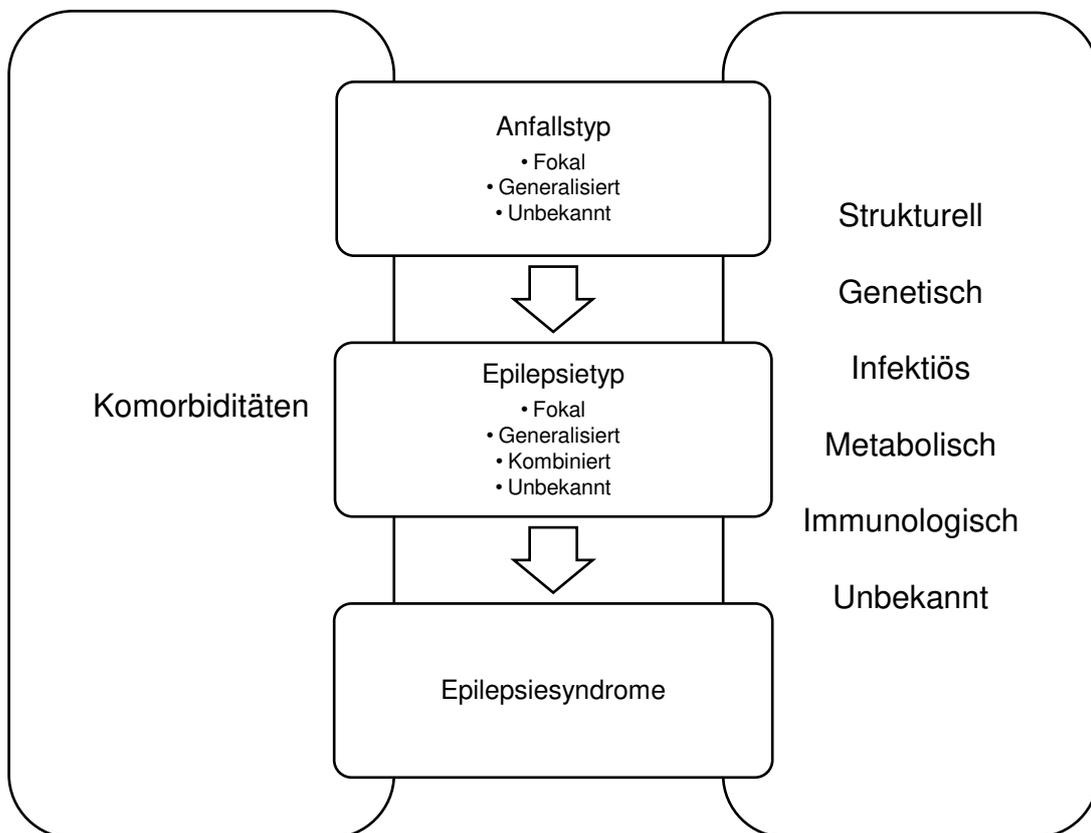
Trotz der großen Bandbreite unterschiedlicher anfallssuppressiver Substanzen und Fortschritte in der medikamentösen Therapie, erreichen 20-40% der Patienten keine Anfallsfreiheit.<sup>11,12</sup> Diese pharmakorefraktären Epilepsien, bei denen trotz der Anwendung von mindestens zwei adäquat ausgewählter anfallssuppressiver Substanzen keine Anfallsfreiheit erreicht wurde<sup>13</sup>, stellen eine besondere Herausforderung dar. Diese Patienten sollten an einem Epilepsiezentrum behandelt und dort epilepsiechirurgische Therapieoptionen evaluiert werden (siehe Kapitel 2.1.3 und 2.1.4). In chirurgischen Fallserien und postmortalen Untersuchungen stellte die Hippocampusklerose die häufigste Ursache der pharmakorefraktären Temporallappenepilepsie (TLE) dar.<sup>14-16</sup>

Die Pharmakorefraktärität, also das Versagen der medikamentösen Therapie, kann zahlreiche Ursachen haben. Genetische Komponenten, krankheitsbedingte Adaptationen, sowie medikamentös getriggerte Anpassungen kommen dabei in Frage.<sup>17</sup> Im Verlauf kann es beispielsweise zu morphologischen Veränderungen des neuronalen Netzwerks, einer Überexpression von Efflux-Transportproteinen oder Veränderungen der pharmakologischen Zielstrukturen kommen.<sup>17,18</sup> Auch

eine fehlende Beeinflussung der pathophysiologisch relevanten Strukturen durch die anfallssuppressiven Substanzen ist möglich.<sup>18</sup>

### 2.1.1 Klassifikation

Die Klassifikation der Epilepsien erfolgt anhand eines Stufenschemas und umfasst jeweils die Einordnung des epileptischen Anfalls, eine Zuordnung der Epilepsie und im letzten Schritt, falls möglich, eines Epilepsiesyndroms (siehe Abbildung 1). Auf jeder Stufe des Schemas sollen Überlegungen zur Ätiologie und zu vorhandenen Komorbiditäten einfließen. Voraussetzung ist die Diagnose einer Epilepsie.



**Abbildung 1: Klassifikation der Epilepsien**

Schematische Darstellung des Handlungsablaufs zur Klassifikation der Epilepsien. Nach der Einordnung des Anfallstyps und des Epilepsietyps kann gegebenenfalls ein Epilepsiesyndrom diagnostiziert werden. Auf jeder Stufe des Schemas sollten Komorbiditäten und mögliche Ursachen berücksichtigt werden.

Quelle: <sup>15</sup>

Im ersten Schritt wird der epileptische Anfall klassifiziert. Zur Einteilung können verschiedene diagnostische Mittel, wie etwa die Anfallssemiologie oder ein Elektroenzephalogramm (EEG), genutzt werden. Für die Klassifikation ist der Beginn des epileptischen Anfalls relevant. Dieser kann fokal, generalisiert oder unbekannt sein. Die epileptischen Anfälle können anhand weiterer Merkmale nochmals unterteilt und spezifiziert werden.<sup>19</sup>

Sollte entsprechend der ILAE Definition<sup>3</sup> eine Epilepsie diagnostiziert werden, wird diese entsprechend ihrer Ausprägung einer Kategorie zugeordnet. Die Kategorien umfassen fokale, generalisierte, kombiniert fokal und generalisierte oder unbekannt Formen der Epilepsie. Zuletzt wird, falls möglich, anhand der erhobenen Befunde ein Epilepsiesyndrom diagnostiziert.<sup>20</sup>

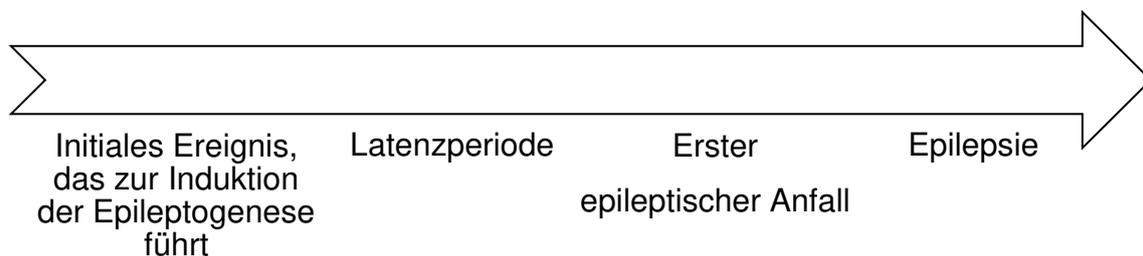
Bei der in dieser Arbeit untersuchten mesialen Temporallappenepilepsien mit Hippocampusklerose handelt es sich um eine fokale Epilepsie mit struktureller Ursache.

### 2.1.2 Epileptogenese und Ätiologie

So variabel, wie die Anfallssemiologie der Epilepsien, sind auch die zugrunde liegenden Ursachen. Jede Veränderung, die einen Einfluss auf die Balance zwischen Exzitation und Inhibition des neuronalen Netzwerks und somit eine Senkung der intrinsischen Anfallsschwelle zur Folge hat, kann Ursache einer Epilepsie sein.<sup>21,22</sup> Der Prozess, der zur übermäßigen Erregbarkeit eines initial gesunden neuronalen Netzwerks und damit zur Entstehung der Epilepsie, sowie zu deren Progression führt, wird als Epileptogenese bezeichnet.<sup>23</sup> Die Epileptogenese endet also nicht nach Diagnose der Epilepsie.

Auch wenn in vielen Fällen die Ursache der Epilepsie beziehungsweise der Auslöser der Epileptogenese nicht bekannt ist, können die Umbauprozesse, beziehungsweise Mechanismen, die der Epileptogenese zugrunde liegen, auf verschiedenen Ebenen betrachtet werden. Die Epileptogenese scheint häufig durch ein initiales schädigendes Ereignis in Gang gesetzt zu werden, das nach einer klinisch stummen Phase (der Epileptogenese), in der es zu Umbauprozessen, beziehungsweise zu Adaptationen kommt, im Auftreten der Epilepsie gipfelt. Dafür spricht, dass eine vorangegangene Schädigung des

Gehirns mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Epilepsie einhergeht.<sup>23,24</sup> Zu den Umbauprozessen, beziehungsweise Adaptationen, zählen Veränderungen der Ionenkonzentrationen, der Zellmembranen oder der Ionenkanäle. Alle diese Umbauprozesse können zu einer erhöhten Erregbarkeit führen.<sup>22,24</sup> Auch Veränderungen an vorhandenen Synapsen, sowie neue synaptische Verbindungen können die Krampfschwelle senken.<sup>22,24</sup> Gliazellen, welche selten Ziel antikonvulsiver Substanzen sind, spielen womöglich eine größere Rolle als bislang angenommen,<sup>22,25</sup> weshalb zukünftig der Einsatz neuer antikonvulsiver Substanzen, die auf Strukturen der Gliazellen abzielen, vielversprechend sein kann.



**Abbildung 2: Zeitstrahl Epileptogenese**

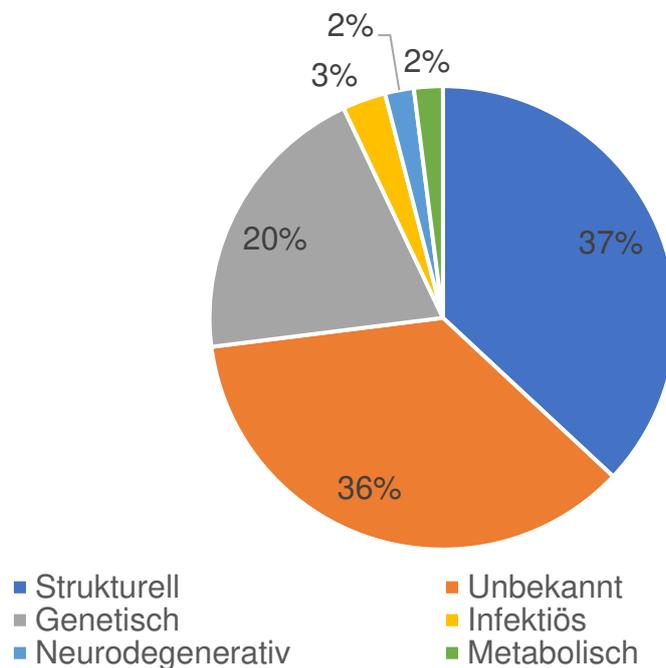
*Ein initiales Ereignis induziert die Epileptogenese. Nach der klinisch stummen Latenzperiode, die Monate bis Jahre andauern kann, kommt es zum Auftreten des ersten epileptischen Anfalls und der Epilepsie.*

Bei der Epileptogenese handelt es sich nicht um einen rein destruktiven Prozess, da es zur Ausbildung von abnormalen synaptischen Verbindungen und somit zum Entstehen von pathologischen neuronalen Netzwerken kommt.<sup>23,26</sup>

Sowohl strukturelle, genetische, infektiöse, metabolische als auch immunologische Pathologien können die Epileptogenese in Gang setzen (siehe Abbildung 3). Auch kindliche komplexe Fieberkrämpfe, Schädel-Hirn-Traumata, Schlaganfälle oder entzündliche Geschehen können ursächlich für die Epileptogenese sein und somit im Verlauf zur Entstehung einer Epilepsie führen.<sup>24</sup> Des Weiteren werden neurodegenerative Veränderungen als mögliche Ursache diskutiert.<sup>27-29</sup> Da die Datenlage hierzu nicht eindeutig ist, haben diese allerdings noch nicht den Weg in die aktuelle Klassifikation der ILAE von 2017 gefunden. Der große Teil von Epilepsien unbekannter Ursache, zeigt, dass die Pathomechanismen bislang nicht vollständig verstanden sind.

Strukturelle Veränderungen stellen die häufigste Ursache der Epilepsien dar.<sup>21</sup> Bereits die radiologische Bildgebung mittels kranialer Magnetresonanztomographie (MRT) kann erste Hinweise auf strukturelle Veränderungen liefern, allerdings ist eine abschließende Diagnose erst nach histologischer Untersuchung des chirurgischen Resektats oder des postmortalen Gewebes möglich.<sup>21</sup> Innerhalb der strukturellen Ursachen stellt die Hippocampussklerose wiederum den größten Teil (36.3%) dar.<sup>21</sup> Andere häufige strukturelle Läsionen sind etwa Hirntumore, kortikale Malformationen, vaskuläre Malformationen, inflammatorische Prozesse und posttraumatische beziehungsweise posthämorrhagische und postischämische Veränderungen.<sup>21,24</sup>

Die Häufigkeit der Ursachen ist abhängig vom Alter bei Auftreten der Epilepsie. So finden sich bei Kindern vor allem genetisch generalisierte Epilepsien, während strukturelle Epilepsien im Alter zunehmen.<sup>30</sup>



**Abbildung 3: Verteilung der Ätiologien aller Epilepsien**

*Fast ebenso häufig, wie die strukturellen Veränderungen, lässt sich der Epilepsie keine Ursache zuordnen. Dieser Anteil ist im Laufe der Zeit durch das bessere Verständnis der Erkrankung sowie die verbesserten diagnostischen Methoden zwar gesunken, ist allerdings weiterhin hoch. Quellen:<sup>21,30</sup>*

### 2.1.3 Diagnostik und prächirurgische Evaluation

Die Durchführung einer epilepsiechirurgischen Therapie wird ausschließlich bei pharmakorefraktären Patienten in Erwägung gezogen. Da sich nicht alle Patienten für diese Therapieform eignen, wird vorher eine umfassende prächirurgische Evaluation durchgeführt.<sup>31</sup> Das Ziel eines epilepsiechirurgischen Eingriffs ist die Resektion der sogenannten *epileptogenen Zone*.<sup>32</sup>

Die *epileptogene Zone* ist der Teil des Gehirns, der für das Entstehen eines epileptischen Anfalls ursächlich ist.<sup>33</sup> Aus diesem Grund geht eine Resektion der *epileptogenen Zone* in der Regel mit einer Anfallsreduktion beziehungsweise Anfallsfreiheit einher. Zur Identifikation der *epileptogenen Zone* dient die Analyse der Anfallssemiologie, die Elektroenzephalographie (EEG) mit Videomonitoring, die MRT, die Magnetenzephalographie (MEG), eine neuropsychologische Testung sowie die [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose-Positronenemissionstomographie (FDG-PET).<sup>31,34</sup> Die Sprachlateralisierung sollte neben der neuropsychologischen Testung mittels funktioneller transkranieller Dopplersonographie (fTCD), funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRT) oder Wada-Test gesichert werden.<sup>31,34</sup>

Mit Hilfe dieser Verfahren werden verschiedene kortikale Zonen definiert, denen spezifische Eigenschaften im Rahmen der Epilepsie zugeschrieben werden.<sup>33</sup> Aus diesen direkt bestimmbaren Zonen, der *symptomatischen*, der *irritativen*, der *Anfallsursprungszone* und der *Zone des funktionellen Defizits*, wird die *epileptogene Zone*, die ursächlich für die Epilepsie ist, indirekt abgeleitet.<sup>33</sup>

Die *symptomatische Zone* ist das Areal, welches während des epileptischen Anfalls ursächlich für die klinische Symptomatik ist.<sup>33</sup> Die *symptomatische Zone* kann also anhand der Anfallssemiologie, anamnestisch oder im iktalen Videomonitoring, definiert werden. Bemerkenswerterweise liegt die *epileptogene Zone* nicht zwingend innerhalb der *symptomatischen Zone*. Bei direkter elektrischer Stimulation des Cortex lässt sich dies zeigen, da viele Areale trotz einer solchen Stimulation asymptotisch bleiben. Entspringt eine elektrische Aktivität in einem solchen asymptotischen Areal, wird diese erst bei Erreichen eines eloquenten Areals symptomatisch.<sup>33</sup> Die Definition der eloquenten Areale ist nicht einheitlich und wird in vielen Publikationen nicht angegeben. In der hier

vorliegenden Arbeit wird sie als Hirnareal definiert, dem reproduzierbar eine Funktion zugeordnet werden kann.<sup>33</sup> Alle Hirnareale mit weniger klar definierten Funktionen sind dementsprechend nicht eloquent.

Die *irritative Zone* generiert interiktal, also in asymptomatischen Phasen, epilepsietypische Potentiale, also elektroenzephalographische Aktivität, die pathologische Eigenschaften aufweist.<sup>33</sup> Diese interiktale Aktivität wird als Zeichen der Prädisposition beziehungsweise als asymptomatische epileptische Aktivität verstanden. Die *irritative Zone* kann mittels EEG, MEG oder fMRT bestimmt werden.<sup>33</sup>

Die *Anfallsursprungszone* ist der Teil der *irritativen Zone*, welcher einen epileptischen Anfall auslöst.<sup>33</sup> Diese elektrische Aktivität kann auch erst in einem Areal des Cortex symptomatisch werden, der außerhalb der *Anfallsursprungszone* liegt.<sup>33</sup>

Radiologisch lässt sich in einigen Fällen die sogenannte epileptogene Läsion in der MRT definieren.<sup>33</sup> Nicht alle Epilepsiepatienten zeigen in der MRT epileptogene Läsionen. Zudem sind nicht alle radiologisch identifizierbaren Läsionen tatsächlich epileptogen.<sup>33</sup> In einigen Fällen sind multiple, miteinander konkurrierende, epileptogene Läsionen sichtbar. Deshalb sollte die Relevanz des radiologischen Befundes mittels Korrelation mit dem Video-EEF-Monitoring evaluiert werden.<sup>33</sup>

Die *Zone des funktionellen Defizits* ist definiert als jenes Cortexareal, welches sich interiktal funktionell abnormal zeigt.<sup>33</sup> Dieses Defizit kann symptomatisch oder auch klinisch stumm sein. Es kann in der klinischen Untersuchung, neuropsychologischen Testung, dem EEG sowie einem FDG-PET bestimmt werden.<sup>33</sup>

Wie oben bereits erwähnt, ist die *epileptogene Zone* für das Entstehen eines epileptischen Anfalls ursächlich. Grundsätzlich liegt die *epileptogene Zone* innerhalb der *Anfallsursprungszone* beziehungsweise kann sie dieser vollständig entsprechen. Nichtsdestotrotz gibt es Fälle, in denen sich die *epileptogene Zone* über die Grenzen der *Seizure Onset Zone* hinweg erstreckt. Wenn der Patient postoperativ anfallsfrei bleibt, kann davon ausgegangen werden, dass die *epileptogene Zone* vollständig reseziert wurde. Da momentan kein

diagnostisches Mittel existiert, um die *epileptogene Zone* anatomisch genau einzugrenzen, handelt es sich lediglich um ein theoretisches Konzept. Im klinischen Alltag wird die *epileptogene Zone* anhand der anderen diagnostisch ermittelbaren Zonen bestimmt beziehungsweise eingegrenzt. Dies gelingt nicht in allen Fällen, sodass weitere, meist invasive Verfahren, wie die Implantation von Tiefenelektroden zur Verbesserung der räumlichen Auflösung, eingesetzt werden müssen, um die *epileptogene Zone* einzugrenzen.

#### 2.1.4 Therapie und Prognose

Für die medikamentöse Therapie der Epilepsie sind im Laufe der Jahre zahlreiche anfallssuppressive Substanzen zugelassen worden. Das Ziel aller Substanzen ist, die exzitatorischen Einflüsse zu mindern beziehungsweise die inhibitorischen Einflüsse zu stärken, um die Anfallsfrequenz zu reduzieren. Dies geschieht über die Beeinflussung verschiedener Zielstrukturen, wie beispielsweise des GABAergen, des glutamatergen Systems oder von verschiedenen Ionenkanäle.<sup>35,36</sup> Ob neben den symptomatischen Effekten, auch eine verlaufsmodifizierende Wirkung besteht, ist nicht abschließend geklärt.<sup>23,37,38</sup>

Für die pharmakorefraktären Epilepsien bietet sich die Epilepsiechirurgie als weitere Therapieoption an. Entscheidend bei der Evaluation einer chirurgischen Therapie sind, neben der Ätiologie, der Leidensdruck des Patienten sowie Komorbiditäten. Der ideale Zeitpunkt für eine epilepsiechirurgische Therapie wird auch heute noch kontrovers diskutiert. Insbesondere die Frage, ob eine frühe chirurgische Therapie vorteilhaft ist, bleibt ungeklärt. Allerdings wird eine möglichst frühe Evaluation der therapieresistenten Patienten in Hinblick auf eine chirurgische Therapie empfohlen.<sup>12</sup> Bislang wurde diese Evaluation im Durchschnitt erst 22 Jahre nach Diagnosestellung und zehn Jahre nach Versagen des zweiten Antikonvulsivums und damit zehn Jahre nach Auftreten der Therapierefraktärität durchgeführt.<sup>39,40</sup>

Erstmalig im Jahr 1886 durchgeführt<sup>32</sup>, ist die Epilepsiechirurgie insbesondere in den letzten zwei Jahrzehnten zu einem elementaren Bestandteil der Behandlung der pharmakorefraktären Epilepsien geworden. Das Ziel eines

epilepsiechirurgischen Eingriffs ist die Diskonnektion oder Resektion der epileptogenen Zone, also dem Ursprung der Epilepsie.<sup>32</sup>

Der postoperative Erfolg wird anhand der ILAE-Klassifikation für „Surgical Outcome“ eingeteilt, wobei ILAE 1 eine Anfallsfreiheit und ILAE 6 eine höhere Anfallsfrequenz als vor der Operation repräsentiert (Tabelle 1). Das Outcome soll jährlich reevaluiert werden, weshalb es zu Veränderungen der Klassifikation eines Patienten im Laufe der Zeit kommen kann. Insgesamt lässt sich bei den pharmakorefraktären Epilepsien in etwa der Hälfte der Fälle mittels Epilepsiechirurgie eine Anfallsfreiheit erreichen.<sup>11,16</sup>

Klassifikation	Definition
1	Anfallsfreiheit, keine Auren
2	Nur Auren, keine sonstigen Anfälle
3	Ein bis drei Anfallstage pro Jahr, ± Auren
4	Vier Anfallstage pro Jahr bis 50% Reduktion der Anfallstage des Ausgangswertes, ± Auren
5	Weniger als 50% Reduktion bis 100% Anstieg der Anfallstage des Ausgangswertes, ± Auren
6	Mehr als 100% Anstieg der Anfallstage, ± Auren

**Tabelle 1: Klassifikation des postoperativen Outcomes der ILAE**

Die abgebildete Klassifikation dient der Einteilung des Erfolgs eines epilepsiechirurgischen Eingriffs. Grad 1 bis 4 entsprechen einer Verbesserung und 6 einer Verschlechterung. Zu beachten ist, dass Grad 5 den Bereich einer geringen Verbesserung sowie einer Verschlechterung abdeckt. Quelle:<sup>41</sup>

Als unabhängige Prädiktoren für ein gutes Outcome wurden bislang das Vorhandensein einer mesialen temporalen Sklerose, eines Tumors, die Konkordanz von präoperativem MRT und EEG, Fieberkrämpfe in der Vorgeschichte, unilaterale interiktale Spikes im EEG sowie die vollständige chirurgische Resektion identifiziert.<sup>42</sup> Im Gegensatz dazu wurden ein normales präoperatives MRT, die Notwendigkeit zur Nutzung invasiver diagnostischer Tests, das Vorhandensein einer fokalen kortikalen Dysplasie (FCD) oder Malformation der kortikalen Entwicklung sowie eine linksseitige Resektion als Prädiktoren für ein schlechtes Outcome identifiziert.<sup>42</sup>

Für therapieresistente Fälle sollte eine chirurgische Intervention erwogen werden. Die Epilepsiechirurgie ist der medikamentösen Therapie bei

therapierefraktären Fällen in Bezug auf die Anfallsfrequenz, Lebensqualität und Mortalität überlegen.<sup>12,31,39,42–45</sup>

Der Hippocampus ist häufig Ausgangspunkt von epileptischen Anfällen und zeigt dabei in vielen Fällen pathologische Veränderungen, wie die Hippocampussklerose. Was genau den Hippocampus als Ursprung vieler Epilepsien prädisponiert, ist nicht bekannt, allerdings wird vermutet, dass die ausgeprägte Eigenschaft des Hippocampus zur Neurogenese dabei eine Rolle spielt.<sup>46</sup> Diese Plastizität begünstigt womöglich die Umbauprozesse im Rahmen der Epileptogenese.

## 2.2 Hippocampus

Der Hippocampus des Menschen ist eine bogenförmige Struktur, die sich im mesialen Temporallappen, angrenzend an den Boden des Cornu temporale des Seitenventrikels befindet und Teil des limbischen Systems ist. Namensgebend war die Form des Hippocampus, die an ein Seepferdchen erinnert (lat. Hippocampus).<sup>47</sup> Der Hippocampus kann in den Gyrus dentatus (DG = Dentate gyrus), das Ammonshorn (CA = Cornu ammonis) und das Subiculum untergliedert werden.

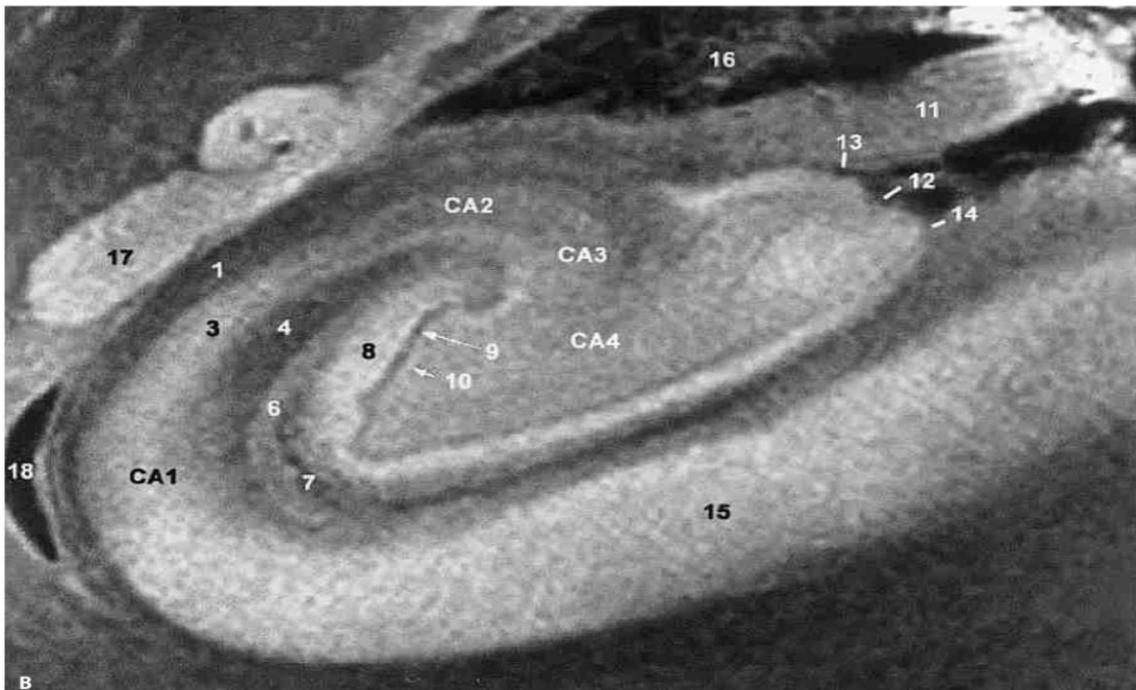
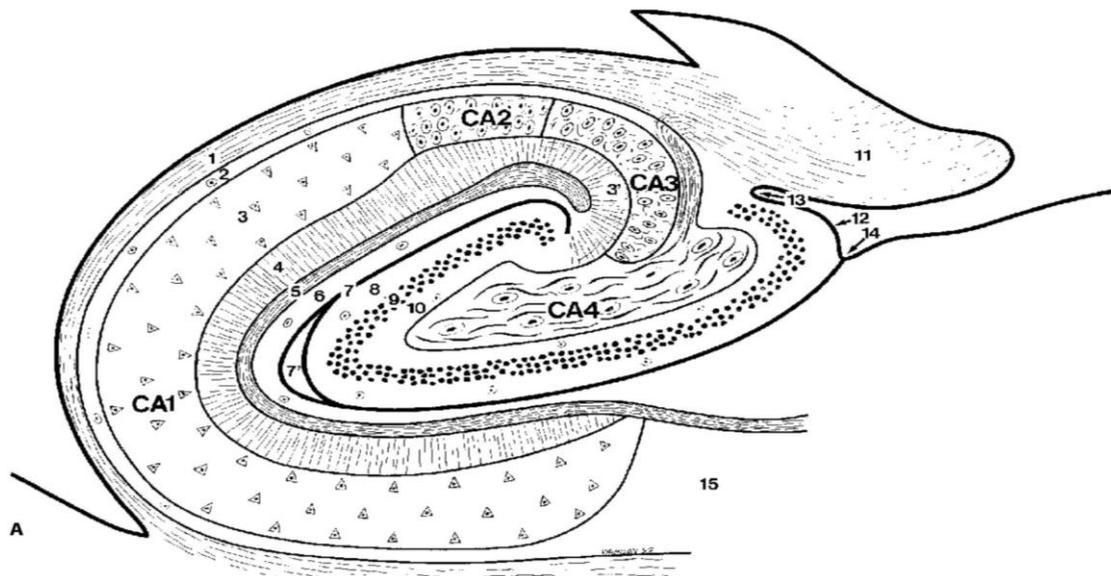
Funktionell ist im gesunden Gehirn insbesondere die Beteiligung an der Gedächtnisbildung hervorzuheben. Das prominente Beispiel des Patienten „H.M.“, der nach bilateraler Hippocampektomie nicht mehr in der Lage war, neue Inhalte zu erlernen, illustriert die Funktion des Hippocampus anschaulich.<sup>48</sup>

Anhand histologischer Merkmale kann das Ammonshorn in vier Regionen, CA1 bis CA4, untergliedert werden. Die Region CA1 beginnt am Subiculum und setzt sich von dort in Richtung DG fort. Die Pyramidenzellen haben kleine, dreieckige Somata und liegen verstreut in CA1.<sup>49</sup> Die Region CA2 beginnt distal von CA1. Ihre großen, ovalen Pyramidenzellen liegen in Abgrenzung zu CA1 dicht beieinander.<sup>49</sup> Da das histologische Bild von CA3 dem von CA2 ähnelt, ist die Differenzierung nicht immer eindeutig möglich. CA3 zeigt eine etwas geringere Zelldichte bei gleicher Zellmorphologie wie CA2. Eine Besonderheit sind die Moosfasern, die vom DG zu CA3 ziehen.<sup>47</sup> Die zu CA4 gehörigen Pyramidenzellen liegen innerhalb des Areals, das durch den DG begrenzt wird

und werden gelegentlich auch als Hilus des DG bezeichnet. Eine Übersicht der histologischen Unterteilung bietet Abbildung 4.

Der DG kann in die Körnerzellschicht, die Molekularzellschicht und den Hilus unterteilt werden. Die Körnerzellschicht beinhaltet eine wenige Zellkörper dicke Schicht aus Körnerzellen. Die Molekularschicht ist größtenteils frei von Zellkörpern und führt die Nervenfasern, über die die Körnerzellen Afferenzen erhalten. Der Hilus wird auch als CA4 bezeichnet und enthält Interneurone, wie auch die Efferenzen der Körnerzellen, die als Moosfasern bezeichnet werden.

Der Hippocampus erhält seine afferenten Fasern größtenteils aus dem entorhinalen Cortex. Die Afferenzen gelangen zum DG (1. Verschaltung)<sup>47</sup> und von dort zur CA3-Region (2. Verschaltung) des Hippocampus.<sup>47</sup> Die CA3-Region wiederum projiziert auf die CA1-Region (3. Verschaltung).<sup>47</sup> Die Schleife wird durch die Projektion der CA1-Region zum entorhinalen Cortex geschlossen.<sup>47</sup> Die Region CA2 erhält Afferenzen aus dieser Schleife und direkt aus dem entorhinalen Cortex und sorgt so für deren Abgleich.<sup>47</sup>



**Abbildung 4: Abbildungen der Areale des menschlichen Hippocampus**

**A, B** Schema und 9,4T-MRT-Ansicht der Struktur des Hippocampus (koronarer Schnitt), **CA1-CA4** Felder des Cornu Ammonis, Cornu Ammonis: **1** Alveus; **2** Stratum oriens, **3** Stratum pyramidale, **3'** Stratum lucidum, **4** Stratum radiatum, **5** Stratum lacunosum, **6** Stratum moleculare, **7** vestigialer Sulcus hippocampus (**7'** Resthöhle), Gyrus dentatus: **8** Stratum moleculare, **9** Stratum granulosum, **10** polymorphe Schicht, **11** Fimbrien, **12** Margo denticulatus, **13** Sulcus fimbriodentatus, **14** Sulcus superficialis hippocampus, **15** Subiculum, **16** Plexus choroideus, **17** Schwanz des Nucleus caudatus, **18** Cornu temporalis (inferior) des Ventriculus lateralis, Quelle: Adaptiert nach Duvernoy 2005 - The Human Hippocampus.jpg<sup>49</sup>

## 2.3 Hippocampussklerose

Bouchet und Cazauvieilh vermuteten bereits 1825 eine Beteiligung des Hippocampus an der Entstehung der Epilepsie.<sup>50</sup> Sommer beschrieb 1880 die zugehörige Histopathologie und führte den Begriff der Ammonshornsklerose, heute als Hippocampussklerose bezeichnet, beziehungsweise der mesialen temporalen Sklerose, ein.<sup>51</sup> Die von ihm beschriebenen Veränderungen im Sinne eines Pyramidenzellverlustes und einer Astroglieose definieren auch heute noch die Hippocampussklerose. Aus diesem Grund kann die exakte Diagnose erst nach neuropathologischer Untersuchung des resezierten Gewebes gestellt werden. Neben dem Pyramidenzellverlust und der Astroglieose kommt es typischerweise auch zu einem Aussprossen von Axonen, einer Reorganisation der synaptischen Verbindungen sowie Veränderungen der Gliazellen und der Blut-Hirn-Schranke.<sup>14,52</sup>

Die genauen Ursachen der Hippocampussklerose sind nicht bekannt. Schädigende Ereignisse, wie komplizierte Fieberkrämpfe in der Kindheit, Status epilepticus, Entzündungen und Traumata, begünstigen offensichtlich die Entstehung einer Hippocampussklerose. Allerdings führen weder Fieberkrämpfe, noch der Status epilepticus in jedem Fall zu einer Hippocampussklerose. Am ehesten scheint es sich um eine multifaktorielle Genese mit einer gewissen genetischen Prädisposition zu handeln.

Interessant ist die Tatsache, dass es trotz des großen Zellverlusts zu der Prädisposition für epileptische Anfälle kommt. Man könnte annehmen, dass es durch den Zellverlust und damit den Verlust synaptischer Verbindungen und exzitatorischer Impulse sowie dem rarefizierten, neuronalen Netzwerk zu einer verminderten Anfallsneigung kommt. Dies ist allerdings nicht der Fall, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen nicht abschließend geklärt sind.

Unter den therapierefraktären Temporallappenepilepsien stellt die Hippocampussklerose den häufigsten neuropathologischen Befund dar.<sup>53</sup> Auch in einer multizentrischen Untersuchung der European Epilepsy Brain Bank (EEBB) trat bei 36,4% der 9523 untersuchten Gewebeproben eine Hippocampussklerose auf, womit sie die häufigste histopathologische Diagnose nach epilepsiechirurgischen Eingriffen darstellte.<sup>54</sup>

Anhand der segmentalen Verteilung dieser histopathologischen Merkmale wird die Hippocampussklerose entsprechend der Klassifikation der ILAE in drei beziehungsweise vier Subtypen unterteilt (siehe Tabelle 2).<sup>53</sup> Bei den TLE mit Hippocampussklerose findet sich mit Abstand am häufigsten Typ 1 (60-80%). Typ 2 (5-10%), Typ 3 (4-7,4%) und Typ 4 (20%) sind deutlich seltener. Zu beachten ist, dass es sich bei Typ 4 nicht um eine Hippocampussklerose handelt, da lediglich eine Gliose vorliegt.

Klassifikation	Zellverlust je Areal
Typ 1	CA1: > 80% CA2: 30-50% CA3: 30-90% CA4: 40-90% DG: 50-60%
Typ 2	CA1: > 80% CA2-4: wenig DG: wenig
Typ 3	CA1: < 20% CA2: < 25% CA3: 30% CA4: 50% DG: 35%
Typ 4	Nur Gliose, keine hippocampale Sklerose

**Tabelle 2: Klassifikation der Hippocampussklerosen**

Anhand der abgebildeten Kriterien werden die Hippocampussklerosen diagnostiziert und gemäß des Zellverlusts der jeweiligen Areale kategorisiert. Quelle:<sup>53</sup>

## 2.4 Wachstumsfaktoren und Epilepsie

Da die Epileptogenese kein rein destruktiver Prozess ist, sondern die oben beschriebenen Wachstumsvorgänge stattfinden<sup>23</sup>, ist anzunehmen, dass Wachstumsfaktoren eine Rolle bei der Entstehung der Epilepsie spielen. Neben der Ausbildung neuer synaptischer Verbindungen, ist der Verlust inhibitorischer Einflüsse, ein weiterer Mechanismus, der zur Epileptogenese beiträgt.<sup>23</sup>

Wachstumsfaktoren kommen in der embryonalen Entwicklung, der neuronalen Plastizität und Neurogenese im erwachsenen Gehirn eine herausragende Bedeutung zu. Sie induzieren und modulieren sowohl die embryonale

Entwicklung, als auch die neuronale Plastizität und Neurogenese im erwachsenen Gehirn.<sup>46</sup>

Basierend auf der vorhandenen Literatur wurden fünf Wachstumsfaktoren ausgewählt, die im Hinblick auf eine Beteiligung an der Epileptogenese sowie für die hier durchgeführten Untersuchungen vielversprechend erschienen. Ein großer Teil der bisherigen Arbeiten wurde im Tiermodell durchgeführt. Daten zu humanem Gewebe sind vergleichsweise rar. Umso wichtiger erschien deshalb die Durchführung von Untersuchungen an humanem Gewebe, um die vorhandenen Daten aus den Tiermodellen validieren zu können.

### 2.4.1 BDNF

Der Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) wurde erstmalig 1982 isoliert und war der zweite zur Gruppe der „neurotrophic factors“ gehörende Wachstumsfaktor.<sup>55</sup> Von BDNF existieren Isoformen mit einem Molekulargewicht von 30 kDa in seiner Precursor Form und 14 kDa in seiner reifen Form.<sup>56</sup>

BDNF wird im gesamten zentralen Nervensystem exprimiert, wobei die Expression im Hippocampus am ausgeprägtesten ist. Neben Neuronen wird BDNF auch von Gliazellen und Mikroglia, die beide eine Rolle bei der Epileptogenese spielen, exprimiert.<sup>57</sup>

Die Funktionen von BDNF sind bereits im physiologischen Zustand sehr vielfältig. Die Isoformen von BDNF wirken jeweils über unterschiedliche Rezeptoren, weshalb zahlreiche Signalwege beeinflusst werden. Eine umfassende Übersicht bietet die Übersichtsarbeit von Kowiański et al. aus dem Jahr 2018.<sup>58</sup> Wichtige Funktionen übernimmt BDNF bei Entwicklungsprozessen des Gehirns, Neurogenese, Gliogenese und Synaptogenese, Neuroprotektion sowie synaptischer Plastizität.<sup>58</sup> Des Weiteren zeigt sich postiktal eine erhöhte Expression von BDNF.<sup>59</sup> Die Epileptogenese scheint durch BDNF begünstigt zu werden, da es bei Lern- als auch bei neuronalen Wachstumsprozessen erhöht ist und seine Überexpression zum Anstieg der Anfallsfrequenz führt.<sup>56</sup>

## 2.4.2 FGF2

Fibroblast Growth Factor-2 (FGF2), auch basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), ist ein Wachstumsfaktor, der in zwei Isoformen vorliegt. Es existieren eine Low Molecular Weight Isoform (18 kDa, LMW) und eine High Molecular Weight Isoform (20-24 kDa, HWM).<sup>60</sup> FGF2 bindet an die Rezeptoren FGFR1-4, wobei FGFR1 der wichtigste Rezeptor ist. FGF2 spielt eine essenzielle Rolle bei der Neurogenese und synaptischen Plastizität im zentralen Nervensystem.<sup>61</sup> Im Tiermodell zeigte sich zudem eine positive Wirkung auf die Neurogenese bei neurodegenerativen Erkrankungen.<sup>61</sup>

Aus diesem Grund ist auch die Untersuchung seiner Expression bei Epilepsiepatienten von Interesse. Im Mausmodell fanden sich sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* Hinweise dafür, dass FGF2 die hippocampale Neurogenese fördert, sowie das „axonale branching“ und die synaptische Exzitation, und damit das Entstehen von epileptischen Anfällen, unterstützt.<sup>60</sup> Ein möglicher Einfluss von FGF2 bei pathologischen Prozessen des zentralen Nervensystems, wie der Epileptogenese, kann beim Menschen vermutet werden.

## 2.4.3 GDNF

Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) ist ein glykosyliertes Disulfidgebundenes Homodimer, das 1993 aus der Gliazelllinie B49 extrahiert wurde. Die Darstellung des Molekulargewichts von GDNF variiert je nach Zustand der Glykosylierung und Verwendung eines reduzierenden (18 bis 22 kDa) oder eines nicht-reduzierenden (32 bis 42 kDa) SDS-Gels.<sup>62</sup> Im reduzierenden Gel werden sowohl Glykosylierungen, als auch Disulfidbrücken gelöst, was zu der Detektion eines niedrigeren Molekulargewichts führt.<sup>62</sup>

Zumindest bei der Ratte zeigten die Pyramidenzellen in den Regionen CA1-3 des Hippocampus sowie die Körnerzellen des DG eine hohe Expression von GDNF.<sup>63</sup> Zudem konnte bei der Ratte nachgewiesen werden, dass die Spiegel von GDNF und der GDNF mRNA nach einem künstlich evozierten epileptischen Anfall erhöht sind.<sup>64</sup> Eine Überexpression beziehungsweise die externe Zufuhr von GDNF führte sowohl im Tiermodell, als auch in humanen Hippocampi zu einer Reduktion der Anfallsfrequenz und einer Hemmung der Epileptogenese.<sup>65-67</sup> Bei

der postiktalen Hochregulation von GDNF scheint es sich also um eine neuroprotektive Gegenregulation zu handeln.

#### 2.4.4 GMFB

Glia Maturation Factor (GMF) ist ein Wachstumsfaktor, der erstmals 1972 aus bovinem Gehirn isoliert wurde. GMF besteht aus zwei Komponenten, dem Glia Maturation Factor- $\beta$  (GMFB) und dem Glia Maturation Factor-Gamma (GMFG). Im zentralen Nervensystem wird hauptsächlich die Isoform GMFB exprimiert.<sup>68</sup>

GMFB hat ein Molekulargewicht von etwa 17 kDa und findet sich größtenteils im Zytoplasma von Neuronen und Astrozyten.<sup>69</sup> Interessanterweise scheinen die GMFB-Spiegel im Laufe des Lebens, sowohl bei Ratten als auch bei Menschen, relativ konstant zu bleiben, während GMFB bei pathologischen Prozesse des zentralen Nervensystems hochreguliert wird.<sup>68,70</sup>

Zu der Bedeutung von GMFB bei der Epilepsie gibt es bisher wenig Literatur, allerdings erscheint es durchaus möglich, dass GMFB hier, wie bei vielen anderen Krankheitsprozessen, einen neuroprotektiven Effekt hat.<sup>70-72</sup>

#### 2.4.5 PDGF-B

Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) gehört zu einer Gruppe von Wachstumsfaktoren, die sich aus Homo- beziehungsweise Heterodimeren der Ketten PDGF-A, -B, -C und -D zusammensetzt.<sup>71</sup> Bislang ist lediglich ein Heterodimer und zwar PDGF-AB bekannt.<sup>71</sup>

Die Homodimere PDGF-BB und -CC haben einen neuroprotektiven Effekt, was in Tiermodellen bei verschiedenen Arten von Zellschäden nachgewiesen werden konnte.<sup>71,72</sup> Zwei relevante Pathomechanismen zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen, sind oxidativer Stress sowie NMDA-Rezeptoren-vermittelte Exzitotoxizität.<sup>71</sup> Hier setzt PDGF-BB an, indem es NMDA-Rezeptoren inhibiert und die Neurone vor Exzitotoxizität schützt.<sup>71-73</sup> Zwischen der Expression von PDGF-B und der NMDA-vermittelten Exzitotoxizität besteht also eine negative Korrelation.<sup>71</sup> Zudem hat PDGF-BB durch seine Wirkung auf die NMDA-Rezeptoren einen inhibierenden Einfluss auf die neuronale Plastizität und fördert

somit die „long-time depression“ (LTD), also die aktivitätsabhängige Verringerung der Leitfähigkeit neuronaler Synapsen.<sup>72</sup> Neben der neuroprotektiven Wirkung über den NMDA-Rezeptor wirkt PDGF-B auch über die Hochregulation von Enzymen antioxidativ und damit ebenfalls neuroprotektiv.<sup>71,73</sup>

Da PDGF die Entwicklung fehlerhafter GABAergen neuronaler Netzwerke im Rahmen psychiatrischer Erkrankungen begünstigt<sup>71</sup>, lässt sich ein ähnlicher Effekt auch bei der Epilepsie vermuten.

## 2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Da die Epileptogenese, wie oben beschrieben, kein rein destruktiver Prozess ist, sondern teilweise auch mit Proliferation einhergeht, ist das Ziel dieser Arbeit die vergleichende Untersuchung von Resektaten menschlicher Hippocampi auf die Expression von Wachstumsfaktoren, um semiquantitativ Daten zu deren Verteilung bei Epilepsiepatienten zu erhalten. Neben dem Vergleich der Gewebe verschiedener Patienten untereinander, ist die Korrelation mit den klinischen Daten der Patienten von besonderem Interesse, da so Hinweise auf mögliche Zusammenhänge zwischen dem klinischen Erscheinungsbild und der Expression der Wachstumsfaktoren gewonnen werden können. Diese Daten sind insbesondere vor dem Hintergrund möglicher klinischer Anwendungen zu betrachten. Dabei bieten Wachstumsfaktoren sowohl im Rahmen der prächirurgischen Diagnostik wie auch als Ziel neuer medikamentöser Therapien Potenzial.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Histologisches Material

Bei den verwendeten Präparaten handelt es sich um Resektate menschlicher Hippocampi, die in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) wurden. Da für die Durchführung der Western Blots, die der Untermauerung der Spezifität der Antikörper dienten, kein gefrorener humaner Hippocampus zur Verfügung stand, wurde humaner telencephaler Cortex verwendet, der aus dem Zugangsgebiet neurochirurgischer Eingriffe stammte. Das Gewebe wurde nach operativer Entnahme im Edinger-Institut für Neuropathologie der Goethe-Universität Frankfurt fixiert und fachärztlich neuropathologisch befundet. Anschließend wurden am Vibratom für diese Arbeit 4µm dicke Schnitte angefertigt.

Des Weiteren wurde für die ersten Schritte der Etablierung des immunhistochemischen Färbeprotokolls Gewebe der Maus verwendet, da dieses in größerer Menge zur Verfügung stand.

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben und Patientendaten wurden vom University Cancer Center Frankfurt (UCT) zur Verfügung gestellt. Von allen Patienten wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt, und die Studie wurde von den institutionellen Prüfungsausschüssen des UCT und der Ethikkommission des Universitätsklinikums Frankfurt genehmigt (Projektnummer: UCT-13-2020).

### 3.2 Antikörper

Bei der Auswahl der Primäantikörper wurde im ersten Schritt die vorhandene Literatur auf Antikörper für die ausgewählten Wachstumsfaktoren durchsucht. Dabei wurden die Ergebnisse der Arbeiten, die mit den jeweiligen Primäantikörpern erzielt wurden, evaluiert und die vielversprechendsten Primäantikörper getestet. Zu diesem Zweck wurden alle Antikörper mittels Western Blot und immunhistochemischer Färbungen untersucht und validiert. In der Immunhistochemie wurden die topographische Verteilung und Anfärbung, sowie die Kompatibilität mit dem Färbeprotokoll bewertet. Die Spezifität wurde im Western Blot, im Sinne eines korrekten Molekulargewichts, nachgewiesen. Allerdings standen keine Kontrollgewebe zur Verfügung, die den jeweiligen

Wachstumsfaktor nicht exprimierten, weshalb die Spezifität nicht zusätzlich durch Tests an diesen untermauert werden konnte. Zahlreiche Antikörper zeigten eine geringe Spezifität im Western Blot beziehungsweise eine geringe oder unspezifische Anfärbung in der Immunhistochemie. Um die passende Konzentration der Antikörper zu finden, wurden Verdünnungsreihen durchgeführt. Alle Antikörper zeigten in der Verdünnungsreihe die besten Ergebnisse bei einer Konzentration von 1:200. Eine Übersicht der verwendeten Antikörper findet sich in Tabelle 3.

Als Sekundärantikörper der Immunhistochemie wurde SantaCruz Biotech, sc-2357 verwendet. Für die weiteren verwendeten Materialien und Geräte, siehe Tabelle 21.

<b>Antigen</b>	<b>Hersteller, Bezeichnung</b>	<b>Konzentration</b>
BDNF	Abcam, ab108319	1:200
FGF2	Abcam, ab92337	1:200
GDNF	Bioss Inc, bs-1024R	1:200
GMFB	Merck, HPA002954	1:200
PDGF-B	Abcam, ab23914	1:200

*Tabelle 3: Primärantikörper Immunhistochemie*

### 3.3 Immunhistochemie

#### 3.3.1 Prinzip der Immunhistochemie

Erstmals im Jahr 1941 beschrieben,<sup>74</sup> hat sich die Immunhistochemie (IHC) zu einer Standardmethode zum Nachweis von Proteinen in histologischen Präparaten entwickelt.

Der Name deutet bereits auf die drei Prinzipien der Immunhistochemie hin. Man macht sich immunologische, histologische und chemische Aspekte zu Nutze, um Proteine in histologischen Präparaten nachzuweisen. Der Nachweis des Proteins beruht auf der immunologischen Affinität der Antikörper. Mittels Antigen-Antikörper-Bindung kann das Antigen, also das Protein, innerhalb des Gewebes nachgewiesen und im weiteren Verlauf chemisch sichtbar gemacht werden.<sup>75</sup>

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode) verwendet, um die Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar zu machen.

Bei dieser Methode binden mit Biotin konjugierte Sekundärantikörper an den fc-Teil der Primärantikörper. Das Biotin zeigt eine starke Affinität zu Avidin, welches an die biotinylierten Sekundärantikörper bindet. Zudem fungiert es als Coenzym für Enzyme, die Carboxylgruppen transferieren, wie etwa die Meerrettich-Peroxidase (HRP). An das Avidin selbst wiederum bindet die Meerrettich-Peroxidase (HRP). HRP oxidiert das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), wodurch das Areal braun eingefärbt und lichtmikroskopisch sichtbar gemacht wurde.

### 3.3.2 Erarbeitung des Färbeprotokolls

Das verwendete immunhistochemische Färbeprotokoll wurde für die vorliegende Arbeit entwickelt und etabliert. Die Verwendung von humanem paraffiniertem Gewebe stellt eine besondere Herausforderung dar. Zur Zeit der hier durchgeführten Untersuchungen lag kein funktionierendes Protokoll für humanes paraffiniertes Gewebe vor. Deshalb wurden zunächst verschiedene Protokolle, die aus der Literatur bekannt waren oder innerhalb der Arbeitsgruppe für tierisches Material verwendet wurden, an humanem und tierischem Gewebe getestet. Dabei fiel auf, dass die Ergebnisse an tierischem Gewebe nicht problemlos auf humanes Gewebe übertragbar waren. Die verschiedenen Protokolle wurden zusammengeführt und an das vorliegende Material angepasst. Dabei wurden neben den Inkubationszeiten und der Anzahl an Inkubations- und Waschzyklen auch verschiedene Reagenzien getestet. So wurden verschiedene ABC-Kits getestet und letztlich das mit den besten Ergebnissen ausgewählt. Zudem führte dies dazu, dass im Verlauf von einem fluoreszierenden auf DAB als absorbierendes Detektionsverfahren umgestellt wurde, da so ebenfalls bessere Ergebnisse erzielt werden konnten. Letztlich führten meine Vorarbeiten zu dem hier vorgestellten und verwendeten Protokoll (siehe Tabelle 4).

### 3.3.3 Färbeprotokoll

Das Färbeprotokoll soll im Folgenden in seinen Grundzügen erläutert werden.

Im ersten Schritt wurden die Präparate mittels Wärmeanwendung und Xylol entparaffiniert und absteigender Alkoholreihe rehydriert. Darauf folgten Waschschrte mit destilliertem Wasser und Phosphate-Buffered-Saline (PBS, 0,01M) sowie die Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität mittels Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Darüber hinaus wurde eine hitzeinduzierte Epitopfreilegung bei  $100^\circ C$  in Citratpuffer durchgeführt. Zur Reduktion unspezifischer Signale wurde eine Inkubation in Normal Goat Serum (NGS)/PBS durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurde der jeweilige Primärantikörper (1:200 in NGS/PBS) über Nacht inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Bindung wurde mittels Sekundärantikörper, Avidin Biotin Komplex (ABC) und über das DAB sichtbar gemacht. Daraufhin wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert.

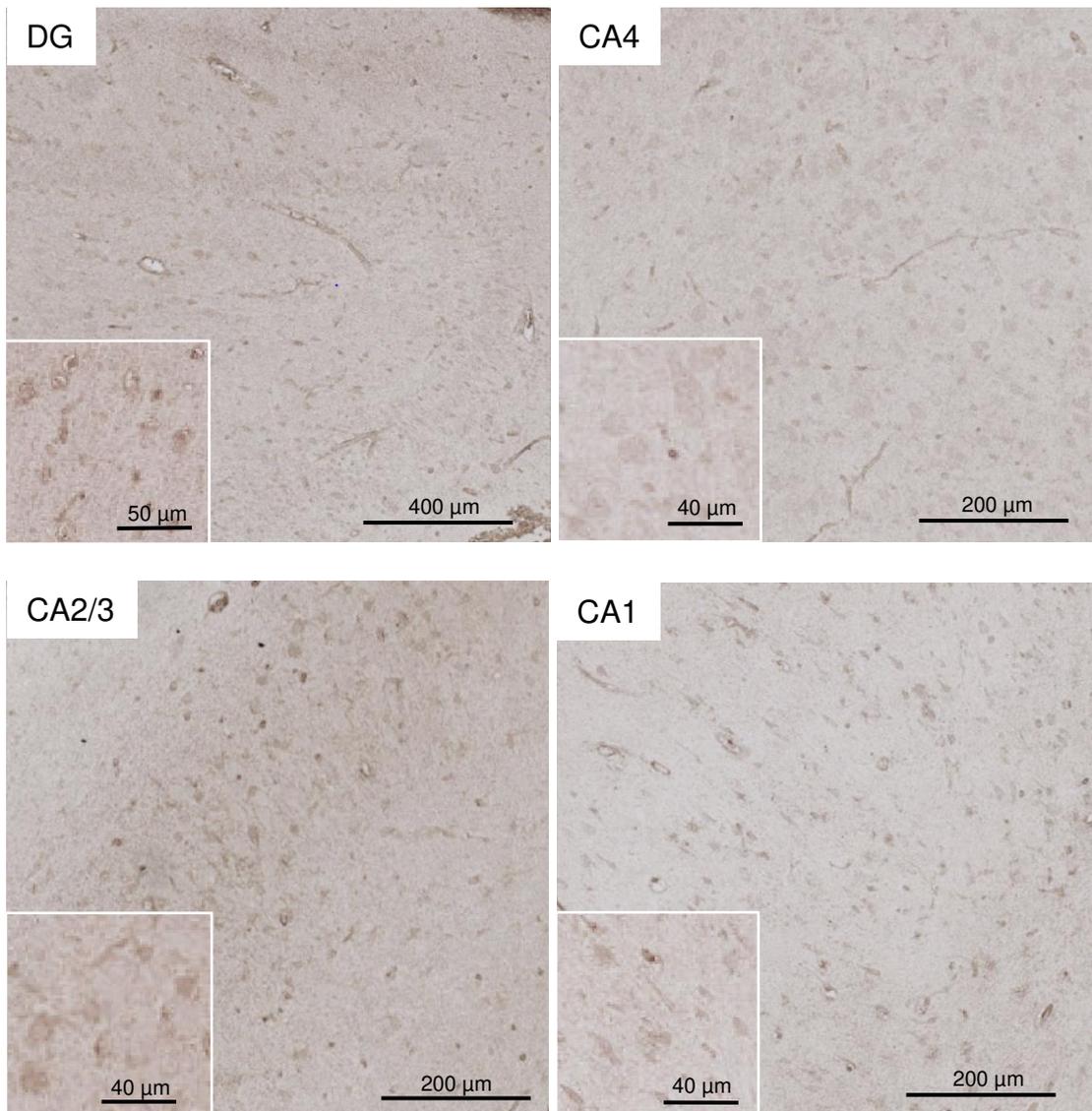
Die gefärbten Schnitte konnten im Anschluss mit Deckgläsern (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, Deutschland) und Eindeckmittel (Entellan, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt werden.

Bei jeder Färbung wurde ein Schnitt als Negativkontrolle verwendet, der bis auf die Inkubation mit dem Primärantikörper dasselbe Protokoll durchlief. In tabellarischer Form ist das Protokoll Tabelle 4 zu entnehmen. Die Abbildungen 5 bis 9 zeigen je Wachstumsfaktor und Areal exemplarisch eine Färbung.

1.	10 Minuten bei 80°C im Wärmeschrank inkubieren
2.	2 x 5 Minuten in Xylol entparaffinieren
3.	2 x 3 Minuten jeweils in 100%, 90%, 80% Ethanol bewässern
4.	5 Minuten in Aqua dest. inkubieren
5.	30 Minuten in 2% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Methanol inkubieren
6.	5 Minuten in PBS (0,01M) waschen
7.	10 Minuten in dem Citrat-Puffer bei 100°C kochen
8.	5 Minuten in PBS (0,01M) waschen
9.	60 Minuten mit NGS/PBS inkubieren
10.	über Nacht mit dem Primärantikörper (1:200 in NGS/PBS) inkubieren
11.	3 x 5 Minuten in PBS waschen
12.	60 Minuten mit dem Sekundärantikörper inkubieren
13.	2 x 5 Minuten in PBS (0,01M) waschen
14.	30 Minuten mit ABC inkubieren
15.	2 x 5 Minuten in PBS (0,01M) waschen
16.	20 Minuten mit DAB inkubieren
17.	5 Minuten in Aqua dest. waschen
18.	2 x 3 Minuten jeweils in 80%, 90%, 100% Ethanol entwässern
19.	2 x 5 Minuten in Xylol inkubieren
20.	Eindecken mit Entellan

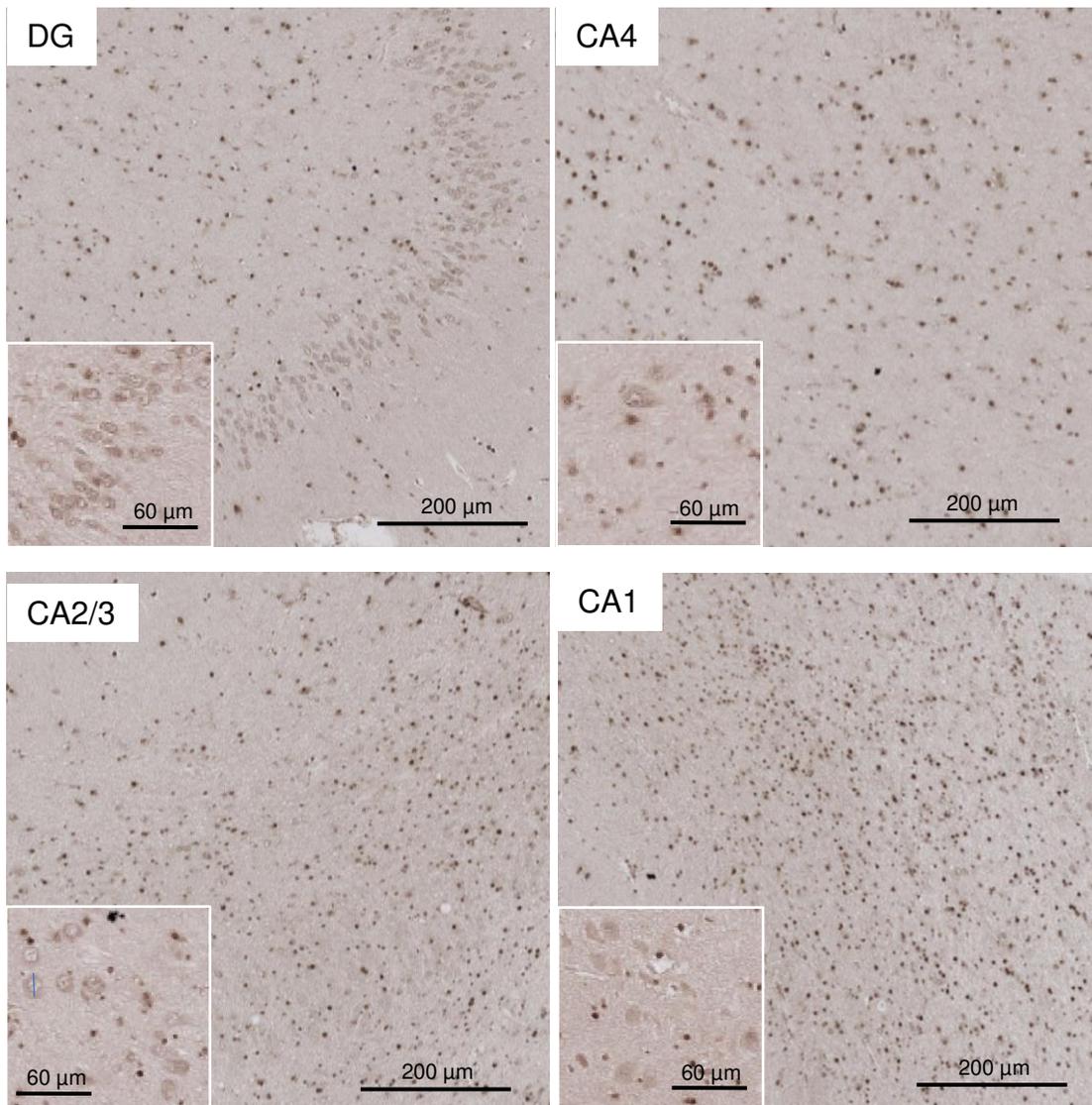
**Tabelle 4: Protokoll Immunhistochemie**

*Tabellarische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Protokolls der Immunhistochemie.*

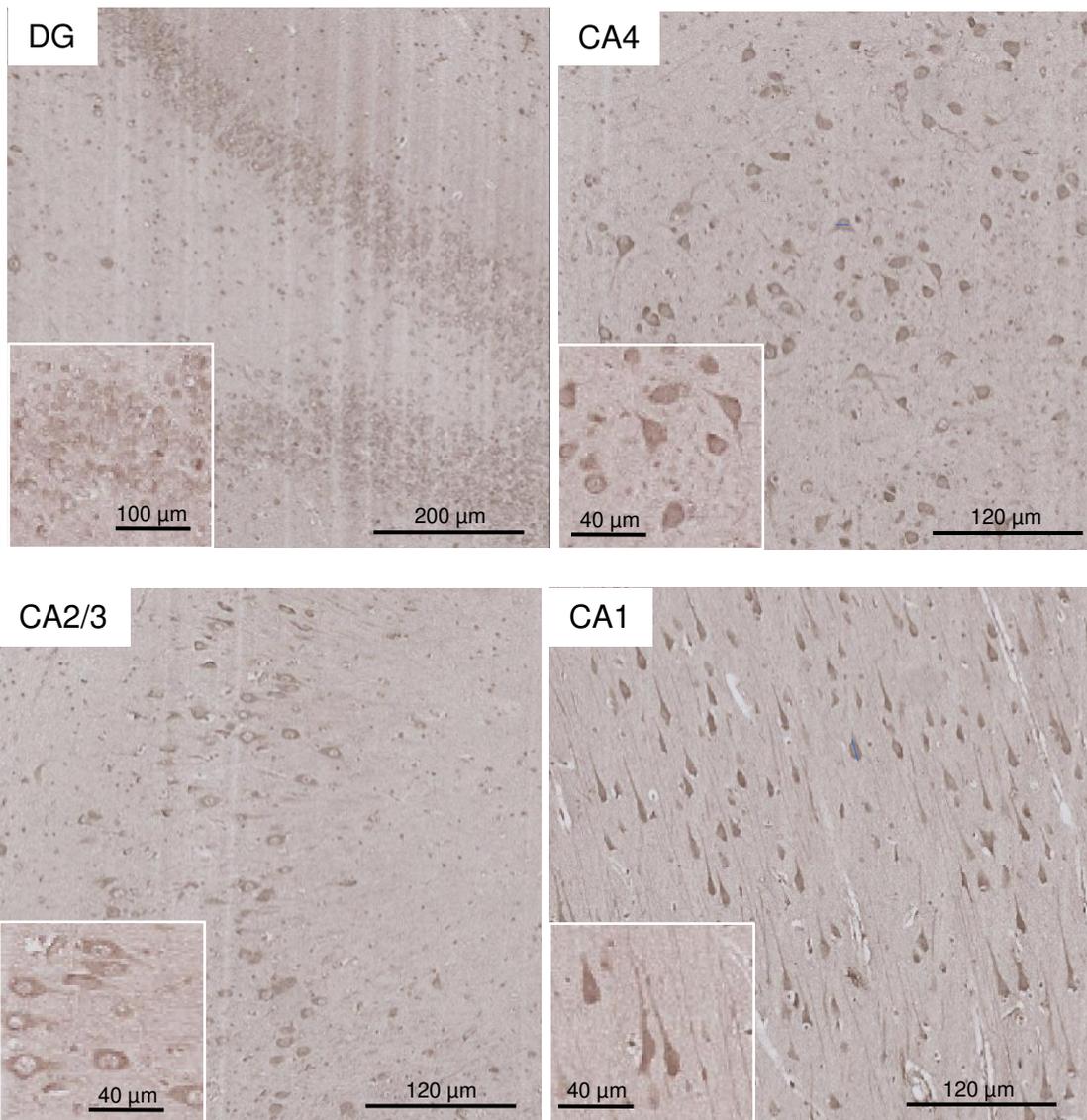


**Abbildung 5: BDNF-Färbung des Resektats eines humanen Hippocampus, exemplarische Abbildung der Areale DG, CA1-CA4**

Abgebildet sind Ausschnitte der Areale DG, CA1-CA4 eines menschlichen Hippocampus nach Anfärbung von BDNF. Da DAB als Chromogen verwendet wurde, ist eine Braunfärbung als positives Signal zu werten. Exemplarisch jeweils in der linken unteren Bildecke eine Nahaufnahme des Areals.

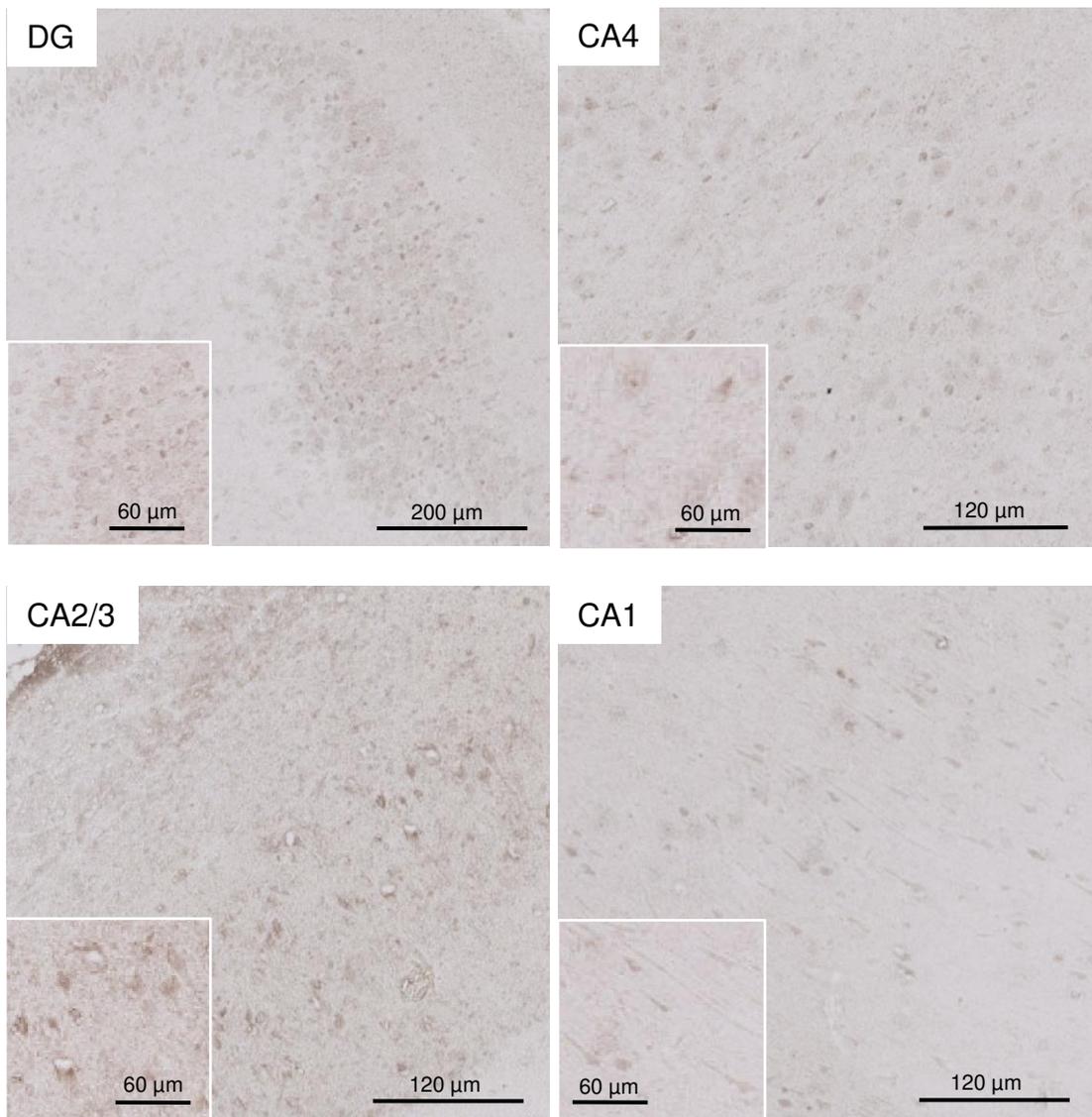


**Abbildung 6: FGF2-Färbung des Resektats eines humanen Hippocampus, exemplarische Abbildung der Areale DG, CA1-CA4**  
 Abgebildet sind Ausschnitte der Areale DG, CA1-CA4 eines menschlichen Hippocampus nach Anfärbung von FGF2. Da DAB als Chromogen verwendet wurde, ist eine Braunfärbung als positives Signal zu werten. Exemplarisch jeweils in der linken unteren Bildecke eine Nahaufnahme des Areals. In dem Ausschnitt des DG lässt sich gut das Körnerzellband erkennen.



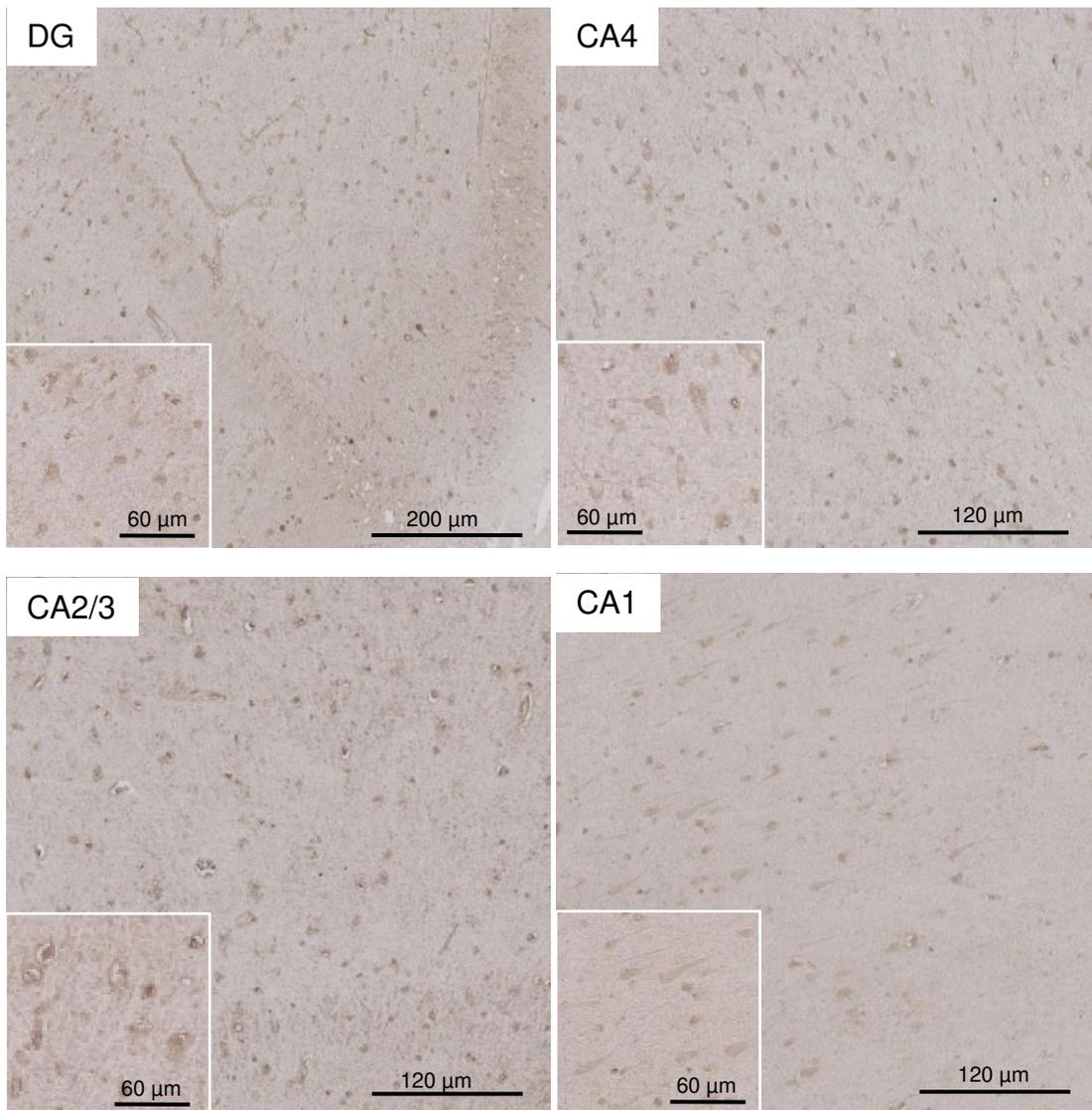
**Abbildung 7: GDNF-Färbung des Resektats eines humanen Hippocampus, exemplarische Abbildung der Areale DG, CA1-CA4**

Abgebildet sind Ausschnitte der Areale DG, CA1-CA4 eines menschlichen Hippocampus nach Anfärbung von GDNF. Da DAB als Chromogen verwendet wurde, ist eine Braunfärbung als positives Signal zu werten. Exemplarisch jeweils in der linken unteren Bildecke eine Nahaufnahme des Areals. In dem Ausschnitt des DG lässt sich gut das Körnerzellband erkennen. In den Ausschnitten des Ammonshorns (CA1-CA4) lassen sich die Zellkörper sowie zum Teil die Axonhügel und zellulären Ausläufer gut abgrenzen.



**Abbildung 8: GMFB-Färbung des Resektats eines humanen Hippocampus, exemplarische Abbildung der Areale DG, CA1-CA4**

Abgebildet sind Ausschnitte der Areale DG, CA1-CA4 eines menschlichen Hippocampus nach Anfärbung von GMFB. Da DAB als Chromogen verwendet wurde, ist eine Braunfärbung als positives Signal zu werten. Exemplarisch jeweils in der linken unteren Bildecke eine Nahaufnahme des Areals. In dem Ausschnitt des DG lässt sich gut das Körnerzellband erkennen. In dem Ausschnitt von CA1 lassen sich zum Teil die Axonhügel und zellulären Ausläufer gut abgrenzen.



**Abbildung 9: PDGF-B-Färbung des Resektats eines humanen Hippocampus, exemplarische Abbildung der Areale DG, CA1-CA4**

Abgebildet sind Ausschnitte der Areale DG, CA1-CA4 eines menschlichen Hippocampus nach Anfärbung von PDGF-B. Da DAB als Chromogen verwendet wurde, ist eine Braunfärbung als positives Signal zu werten. In dem Ausschnitt des DG lässt sich gut das Körnerzellband erkennen. Exemplarisch jeweils in der linken unteren Bildecke eine Nahaufnahme des Areals. In den Ausschnitten des Ammonshorns (CA1-CA4) lassen sich ebenfalls gut die Zellkörper abgrenzen. Insbesondere in CA1 lassen sich zudem die Axonhügel und zellulären Ausläufer erkennen.

## 3.4 Western Blot

### 3.4.1 Prinzip des Western Blots

Erstmals im Jahr 1979 beschrieben<sup>76</sup>, handelt es sich bei dem Western Blot um ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Ein Western Blot besteht prinzipiell aus drei Schritten – Auftrennung, Transfer und Nachweis der Proteine. Die Proteine des zu untersuchenden Gewebelysats werden zunächst mittels der Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert. Unter Verwendung eines Antikörpers kann das untersuchte Protein auf der Membran detektiert und das Signal der Fluoreszenz gemessen werden, sodass eine Quantifizierung möglich ist.

### 3.4.2 Protokoll des Western Blots

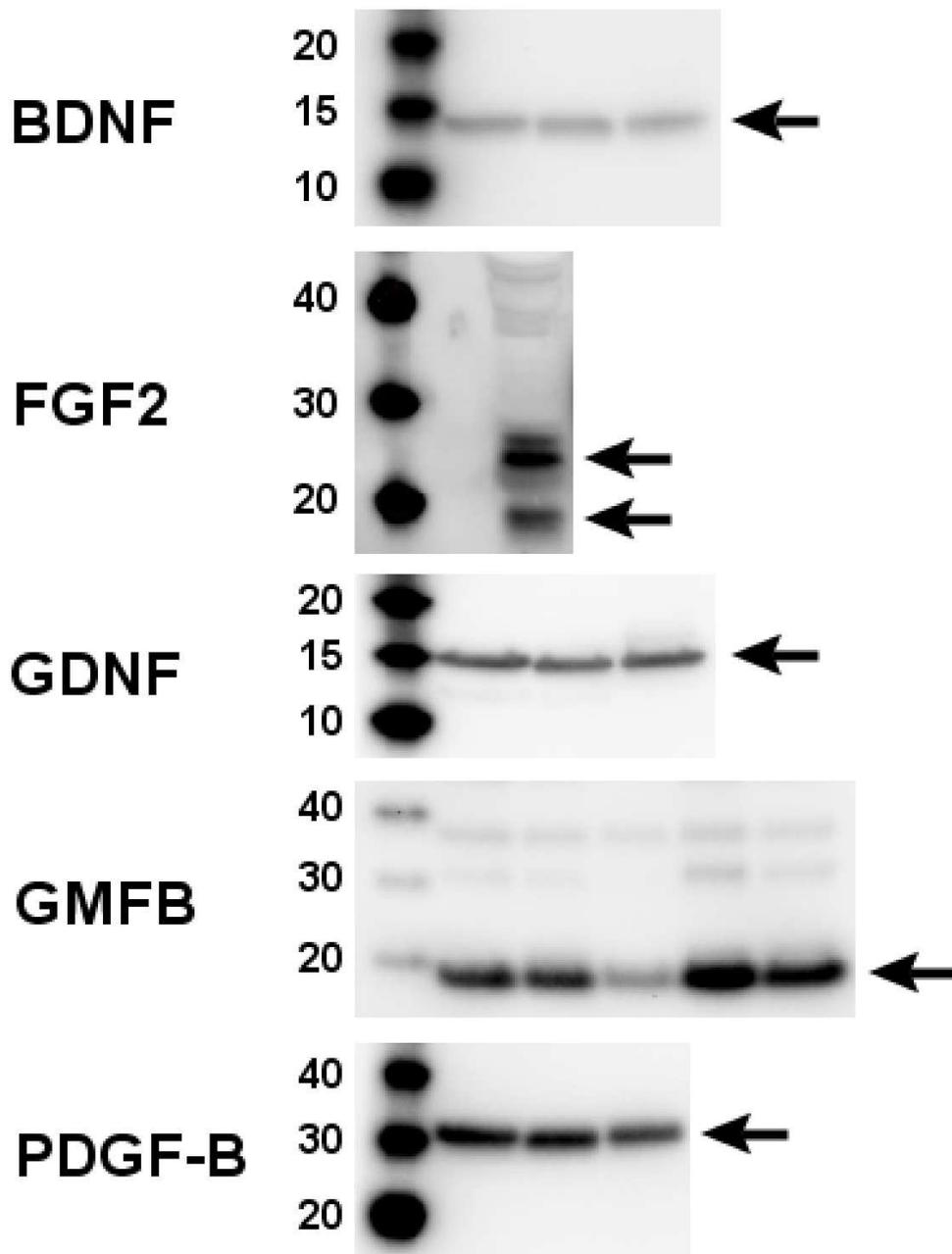
Folgend ein kurzer Überblick über das für diese Arbeit verwendete Protokoll. Zunächst wurden das Gewebe sonifiziert und mit Dithiothreitol (DTT) bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend folgte die elektrophoretische Auftrennung in einem Polyacrylamidgel, sowie der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran. Dieser wurde bei 200V für 60 Minuten durchgeführt. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen erfolgte die Inkubation der Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde in Blockierungsreagenz (Roti Block 10x Konzentrat, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Im Anschluss wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Primärantikörper (Tabelle 5) in Blockierungsreagenz inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBST erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (SantaCruz Biotech, sc-2357) in Blockierungsreagenz (1:30.000) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen der Membran in PBST wurden die Proteinbanden mittels Chemilumineszenz detektiert. Eine quantitative Auswertung wurde nicht durchgeführt, da es lediglich um den Nachweis der Spezifität der verwendeten Antikörper ging.

<b>Antigen</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Konzentration</b>
BDNF	Abcam, ab108319	1:1000
FGF2	Abcam, ab92337	1:1000
GDNF	Bioss Inc, bs-1024R	1:1000
GMFB	Merck, HPA002954	1:1000
PDGF-B	Abcam, ab23914	1:1000

*Tabelle 5: Primärantikörper Western Blot*

### 3.4.3 Validierung der Antikörper mittels Western Blot

Zur Validierung der verwendeten Antikörper wurden diese mittels Western Blot getestet, um das Molekulargewicht der angefärbten Proteine mit den jeweiligen Wachstumsfaktoren vergleichen zu können. Die Abbildung 10 zeigt die Western Blots für die verwendeten Wachstumsfaktoren.



**Abbildung 10: Western Blot zur Validierung der Antikörper**

Dargestellt ist je ein Western Blot, die zur Validierung der verwendeten Antikörper dienen. Bei allen abgebildeten Proben handelt es sich um humanen telencephalen Cortex. Die unterschiedliche Anzahl verwendeter Proben ist bedingt durch die Verfügbarkeit der Proben zum Zeitpunkt der jeweiligen Durchführung. Links befindet sich jeweils der Marker. Folgend die gemäß Literatur korrekten Molekulargewichte der Wachstumsfaktoren: **BDNF**: 14 kDa; **FGF2**: 18 und 20-24 kDa passend zu den beiden Isotypen des Proteins; **GDNF**: 18-22 und 32-42 kDa; **GMFB**: 18 kDa; **PDGF-B**: 32 kDa. Gewisse Abweichungen bei den Molekulargewichten können durch Bildung von Multimeren, posttranslationale Modifikation, alternatives Splicing oder enzymatische Spaltung des Zielproteins bedingt sein.

### 3.5 Histologische Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden mittels des Scanners NanoZoomer S360 (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Harsching am Ammersee, Deutschland) gescannt, sodass die Präparate im weiteren Verlauf vollständig digital mikroskopiert und ausgewertet werden konnten.

Zur weiteren Auswertung der digitalisierten Präparate dienten die Programme QuPath (Version 0.3.0)<sup>77</sup> und „Fiji is just ImageJ“ (Version 2.9.0., Fiji).<sup>78</sup> Fiji stellt eine Version von ImageJ dar und weicht von diesem lediglich durch vorinstallierte Plugins ab, die für die Verwendung im Bereich Life Sciences vorgesehen sind.

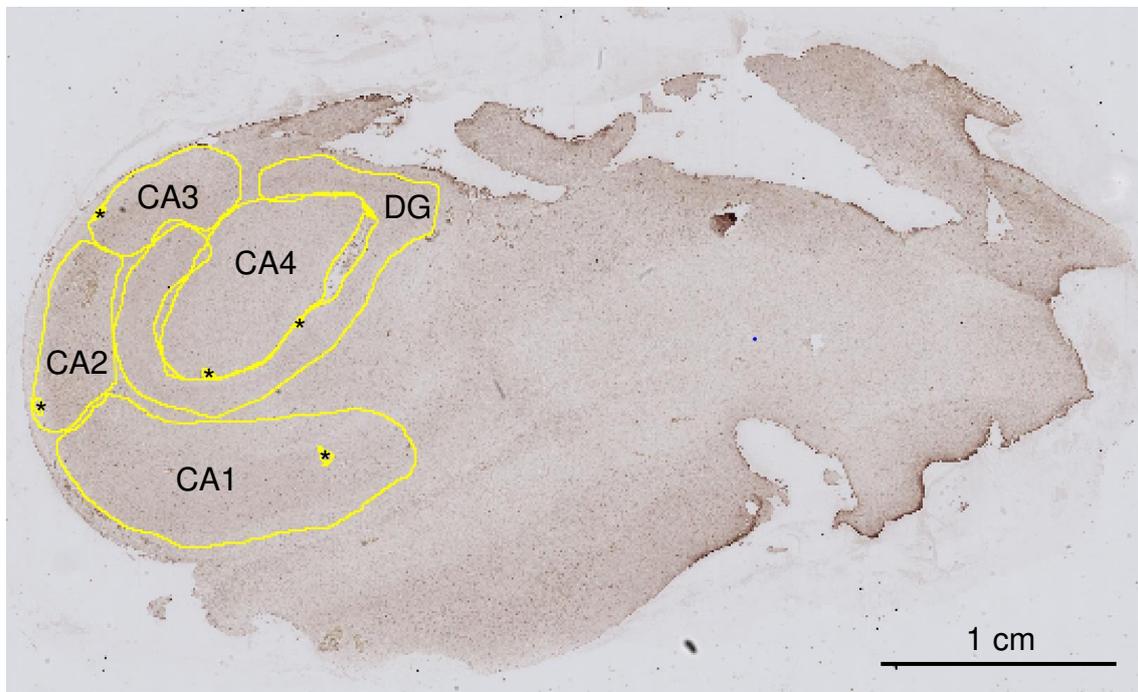
Das Programm QuPath wurde verwendet, um die Kompatibilität der Scans sowohl in Format, als auch in Speichergröße, für Fiji sicherzustellen. Die Hamamatsu NanoZoomer Digital Pathology Image-Dateien (NDPI) wurden dafür in Tagged Image File Format-Dateien (TIF oder TIFF) umgewandelt und mit dem jeweils kleinstmöglichen Faktor komprimiert, um den Datenverlust zu minimieren.

Für die quantitative Auswertung wurde die Intensität des Farbniederschlags, und somit die relative Expression der Wachstumsfaktoren, evaluiert. Es wurde lediglich jener Farbniederschlag berücksichtigt, welcher intrazellulär beziehungsweise intramembranös zu finden war. Dies liegt zum einen daran, dass die Wachstumsfaktoren hauptsächlich dort zu finden sind und zudem so das Standardisieren des Hintergrunds erleichtert und präzisiert wurde (siehe unten). Zur Auswertung wurden Grauwerte verwendet, weshalb alle Scans in 8 Bit Abbildungen umgewandelt wurden.

Bei der Auswertung von histologischen Abbildungen unter Verwendung von Programmen wie Fiji stößt man auf eine Reihe von Problemen, die Einschränkungen der Objektivität und Reliabilität nach sich ziehen können. Um eine möglichst objektive und reliable Bildbearbeitung und Auswertung zu erreichen, wurde eine größtmögliche Automatisierung angestrebt. Zu diesem Zweck wurde ein Algorithmus geschrieben, der die Bildbearbeitung und Auswertung übernimmt (siehe 3.5.1).

Einige Schritte, wie das Einzeichnen der zu untersuchenden Areale im Gewebe, die in Fiji „Region of Interest“ (ROI) genannt werden, ließen sich nicht automatisieren. Daher wurden die Areale händisch, aber verblindet für den

histologischen Befund, sowie den angefärbten Wachstumsfaktor eingezeichnet. Die Einteilung der Areale wurde gemäß der Klassifikation von Duvernoy von 2005 durchgeführt, auf der auch die Leitlinie zu Hippocampussklerosen der ILAE basiert.<sup>49,53</sup> Dabei wurden die Areale CA2 und CA3 zusammengefasst, da diese ohne Gegenfärbung nicht eindeutig zu differenzieren sind. Zur Qualitätskontrolle wurden die eingezeichneten Areale stichprobenartig von einem erfahrenen Neuroanatomen kontrolliert. Für jedes dieser anatomischen Areale eines jeden Schnittes wurde zudem eine zellfreie Region als Hintergrund festgelegt, um die Farbeintensität individuell korrigieren zu können. Abbildung 11 zeigt eine exemplarische Darstellung der eingezeichneten Areale beziehungsweise ROIs.



**Abbildung 11: Eingezeichnete Areale, Schnitt eines resezierten humanen Hippocampus, BDNF-Färbung**

*Exemplarische Darstellung der eingezeichneten Areale (DG, CA1-CA4) anhand eines resezierten humanen Hippocampus. Zudem wurde jeweils ein zellfreies Areal eingezeichnet, das als Hintergrund verwendet wurde (mit \* markiert, am besten sichtbar in CA1).*

### 3.5.1 Algorithmus zur histologischen Auswertung

Im Anschluss an die bereits beschriebenen, händisch durchgeführten Schritte, konnten alle weiteren Schritte automatisiert durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde für die Arbeit eigens ein Algorithmus für die Verwendung in dem Programm Fiji ausgearbeitet. Das Erkennen der Zellen, sowie deren Auswertung im Sinne der Berechnung vor allem des Grauwertes, war dabei das Ziel. Durch Verwendung desselben Algorithmus konnte eine reproduzierbare und miteinander vergleichbare Auswertung aller Areale erfolgen.

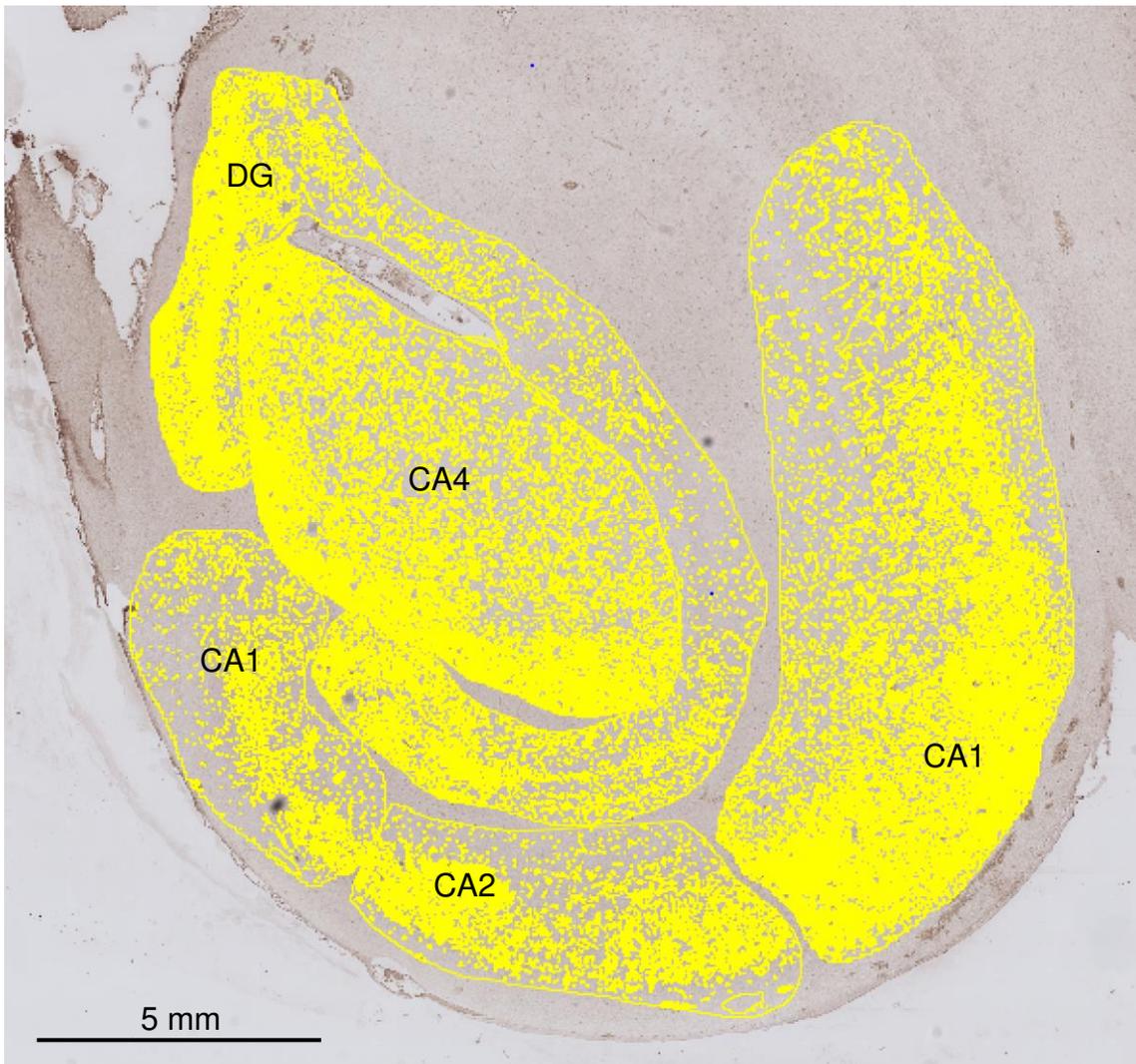
Der erste Schritt ist dabei das Erkennen der Zellen. Dafür wurde ein Schwellenwert definiert, also ein Grauwert, ab dem ein Pixel als positiv gewertet wird. Da allerdings nicht alle positiven Pixel Zellen repräsentieren, wurden neben den Grauwerten noch weitere Kriterien herangezogen. Basierend auf Angaben in der Literatur, wurde eine Gruppe von Pixeln als Zelle gewertet, wenn die Fläche zwischen  $30\text{-}700\mu\text{m}^2$  lag.<sup>79</sup> Zudem wurde auch die Zirkularität dabei mit einbezogen, was allerdings nicht in einer besseren Erkennung von Zellen resultierte, weshalb im finalen Algorithmus davon abgesehen wurde. Von den Grauwerten der Zellen wurde jeweils der zuvor manuell definierte Hintergrund des zugehörigen Areals abgezogen, um die tatsächliche Färbeintensität zu erhalten.

Eine Schwierigkeit bei der Erarbeitung des Algorithmus stellte die Bestimmung der Schwelle, also des Grauwertes, ab dem Pixel als positiv gewertet werden, dar. Bei einem niedrigen Wert der Schwelle werden mehr Pixel als positiv gewertet, womit die Sensitivität steigt, allerdings sinkt im gleichen Zug die Spezifität. Ist der Wert der Schwelle hingegen höher gewählt, sinkt die Sensitivität und die Spezifität der positiven Pixel steigt. In der Literatur ist die manuelle Bestimmung des Schwellenwerts gängig. Problematisch ist dabei die Darstellung von 256 Grauwerten, aus denen gewählt werden muss. Vor dem Hintergrund, dass das visuelle System des Menschen nur begrenzt Grauwerte unterscheiden kann, ist eine reliable manuelle Auswahl der Schwelle unmöglich.

Eine Möglichkeit, die Reliabilität zu verbessern, ist die Verwendung eines von 16, in Fiji vorinstallierten, und in der Literatur beschriebenen Algorithmen zur Festlegung der Schwelle. Diese definieren entsprechend des jeweiligen

Algorithmus für jedes Bild eine Schwelle. Alle Bilder, deren Schwelle durch denselben Algorithmus bestimmt wurden, sind nun miteinander vergleichbar. Die subjektive Auswahl eines dieser 16 Algorithmen bietet einen deutlichen Fortschritt im Vergleich zu der Auswahl eines der 256 Grauwerte. Um auch die Auswahl des Algorithmus zu objektivieren, wurde die Funktion „Threshold Test“ des Fiji Plugins BioVoxel verwendet.<sup>80</sup> Der „Threshold Test“ vergleicht die 16 Algorithmen anhand eines Bildes miteinander und soll eine objektive Entscheidungsfindung erleichtern. Es werden Sensitivität, Spezifität, relative Qualität, Genauigkeit sowie eine Empfehlung des am besten geeigneten Algorithmus angegeben. Für die vorliegende Arbeit wurde der „Threshold Test“ an einer Bildserie durchgeführt, was zu dem Ergebnis führte, dass der Algorithmus „Moments“ am geeignetsten war.<sup>87</sup>

Abbildung 12 zeigt exemplarisch die durch den Algorithmus markierten Zellen innerhalb der zuvor eingezeichneten Areale.



**Abbildung 12: Durch Algorithmus markierte Zellen, Schnitt eines resezierten humanen Hippocampus, BDNF-Färbung**

*Exemplarische Darstellung der durch den Algorithmus automatisiert markierten Zellen eines resezierten humanen Hippocampus.*

Die Algorithmus-basierte Auswertung löst zwar viele der oben beschriebenen Probleme, allerdings ist auch sie nicht frei von einem Bias. Für die Auswertung wurden die um den jeweiligen Hintergrund korrigierten Grauwerte herangezogen. Parameter, wie die Zellzahl, niedrigste und höchste Grauwerte, Fläche des Areal sind aufgrund der unterschiedlichen Qualität des Gewebes einer großen Variabilität, weshalb diese für die weitere Auswertung nicht herangezogen wurden.

### 3.6 Statistik und Abbildungen

Die statistische Auswertung der histologischen und klinischen Daten erfolgte mittels dem Programm JMP 17 (Version 17, SAS Institute, Cary, North Carolina, Vereinigte Staaten von Amerika). Auch die Abbildungen wurden mit dem JMP 17 Programm erstellt. Die gesamte Auswertung erfolgte verblindet. Statistische Unterschiede wurden sowohl mittels einer quantitativen Multivariat Analyse, als auch mittels des nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Tests analysiert.<sup>81</sup> Es wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

Die histologischen Daten wurden im Anschluss mit klinischen Daten korreliert, um mögliche Zusammenhänge zu finden.

Erster Schritt der Datenanalyse war eine deskriptive Analyse. Diese diente unter anderem der Einschätzung, inwiefern eine Normalverteilung vorliegt. Zunächst wurden die Unterschiede zwischen der Expression in den Hippocampussklerosen und den histologisch normalen Hippocampi dargestellt. Zudem wurde eine Multivariat Analyse durchgeführt, um einen Überblick über Korrelationen zwischen den Variablen zu erhalten.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung und deskriptive Statistik des Patientenkollektivs

Die folgende Charakterisierung des Patientenkollektivs bezieht sich auf Patienten, deren Hippocampi nach partieller oder vollständiger Resektion untersucht wurden.

Bei allen Patienten wurde im Epilepsiezentrum Frankfurt Rhein-Main des Universitätsklinikums der Goethe-Universität eine Temporallappenepilepsie diagnostiziert. Der klinische Handlungsablauf ist in den Kapiteln „Diagnostik und prächirurgische Evaluation“ (2.1.3) sowie „Therapie und Prognose“ (2.1.4) beschrieben und wurde gemäß der aktuellen Leitlinie der „Deutschen Gesellschaft für Neurologie“ durchgeführt.<sup>31</sup> Die epilepsiechirurgischen Resektionen waren bei allen Patienten zur Anfallskontrolle indiziert und wurden zwischen 2015 und 2019 in der Klinik für Neurochirurgie der Goethe-Universität Frankfurt durchgeführt. Das Ausmaß der Resektion wurde basierend auf den vorliegenden Befunden sowie der intraoperativen Situation gewählt. Eine Übersicht der Patientencharakteristika bietet Tabelle 6.

Hervorzuheben sind das junge Alter sowie die im Verhältnis dazu lange Epilepsiedauer. Die Verteilung der Typen der Hippocampusklerosen entspricht den Daten aus der Literatur.<sup>14</sup> Der Großteil des Patientenkollektivs hatte keine Begleiterkrankungen oder Fieberkrämpfe. Bei der Anfallsfrequenz ist zu beachten, dass hier jegliche Art von Anfällen, inklusive Auren, erfasst wurden. Das postoperative Outcome des Patientenkollektivs ist als sehr gut zu erachten und liegt ebenfalls im zu erwartenden Rahmen der Literaturdaten.<sup>16</sup> Hervorzuheben ist, dass alle Patienten von der Operation profitiert haben (Outcome ILAE  $\leq 4$ ).

<b>Geschlecht</b>		
männlich	N	7
	% von Gesamt	33,33%
weiblich	N	14
	% von Gesamt	66,67%
<b>Alter bei OP</b>		
	Mittelwert	33,47619047619
	Min.	6
	Max.	60
<b>Epilepsiedauer in Jahren</b>		
	Mittelwert	16,317428571429
	Min.	0,666
	Max.	42
<b>Histologie</b>		
Gangliogliom	N	1
	% von Gesamt	4,76%
HS NOS	N	1
	% von Gesamt	4,76%
HS Typ 1	N	7
	% von Gesamt	33,33%
HS Typ 2	N	2
	% von Gesamt	9,52%
Hypoxie	N	1
	% von Gesamt	4,76%
normal	N	9
	% von Gesamt	42,86%
<b>Begleiterkrankungen</b>		
Arachnoidalzyste rechts temporopolar	N	1
	% von Gesamt	4,76%
Epidermoidzyste links temporal (Z.n. Resektion)	N	1
	% von Gesamt	4,76%
keine	N	16
	% von Gesamt	76,19%
Meningitis	N	2
	% von Gesamt	9,52%
perinatal hypoxischer Hirnschaden	N	1
	% von Gesamt	4,76%
<b>Anfallsfrequenz pro Monat</b>		
	Mittelwert	20,178061904762
	Min.	0,1666
	Max.	107
<b>Outcome ILAE</b>		
ILAE 1	N	14
	% von Gesamt	66,666666666667%
ILAE 2	N	2
	% von Gesamt	9,52380952380952%
ILAE 3	N	3
	% von Gesamt	14,28571428571429%
ILAE 4	N	2
	% von Gesamt	9,52380952380952%

**Tabelle 6: Charakteristika des Patientenkollektivs**

Abgebildet sind die wichtigsten Charakteristika des Patientenkollektivs.

\* gemäß neuropathologischem Befund war eine Klassifizierung nicht möglich

Das mediane Lebensalter der Patienten zum Zeitpunkt der Resektion lag bei 35 Jahren. 33,33% der Patienten waren männlich. Bei 13 Patienten (61,90%) fand sich eine postoperativ diagnostizierte Hippocampusklerose. Bei den verbleibenden 8 Patientenproben wurden verschiedene andere Pathologien beziehungsweise histologisch unauffällige Befunde erhoben.

Die klinischen Daten der Patienten wurden im Rahmen der stationären beziehungsweise ambulanten Versorgung im Epilepsiezentrum erhoben. Dabei wurden anamnestisch Daten erhoben sowie diagnostische Befunde herangezogen. Postoperativ wurde im Rahmen der ambulanten Nachsorge insbesondere das postoperative Outcome der Patienten erfasst. Eine Übersicht über alle erhobenen klinischen Daten bietet Tabelle 7.

<b>Präoperative klinische Daten</b>
Probennummer Geschlecht Alter bei OP Epilepsiedauer in Jahren Begleiterkrankungen Fieberkrampf Ätiologie MRT Seite der epileptogenen Zone Dominante Hemisphäre Anfallsfrequenz pro Monat Eingenommene AEDs Aufmerksamkeit Kurzzeitgedächtnis Verbalgedächtnis Figuralgedächtnis Visuospatiale Funktionen Exekutivfunktionen Depressivität Funktionelles Defizit gemäß Neuropsychologie Funktionelles Defizit gemäß EEG Funktionelles Defizit gemäß PET
<b>Postoperative klinische Daten</b>
Outcome ILAE Nachbeobachtung Dauer in Monaten

**Tabelle 7: Erhobene klinische Daten der Patienten**

Da keine humanen Hippocampi von Patienten zur Verfügung standen, die nicht an Epilepsie erkrankt waren, wurden die von der Neuropathologie als histologisch normal befundeten Hippocampi als Vergleichsmaterial verwendet. Zu beachten ist dabei, dass auch diese Patienten, trotz eines histologisch unauffälligen

Hippocampus, an einer Temporallappenepilepsie litten. Follow-up-Daten lagen für alle 21 Patienten vor. Die mediane Follow-up-Zeit betrug 36 Monate.

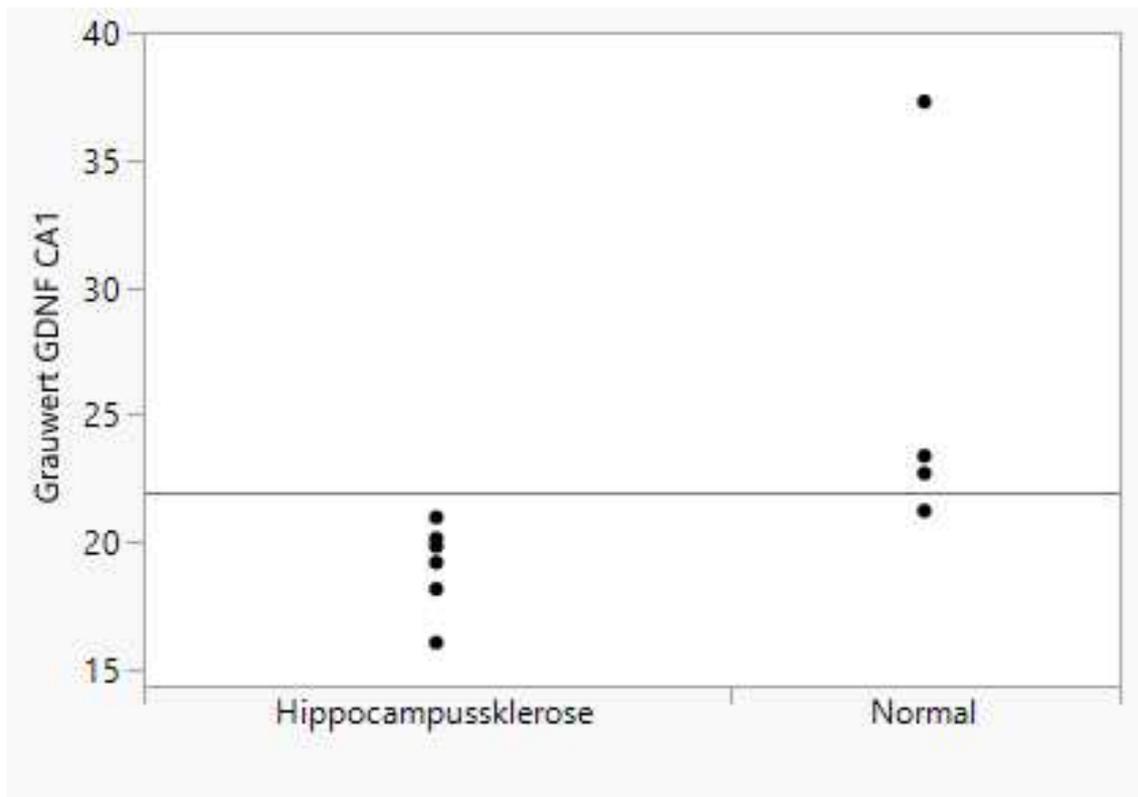
Alle Patienten haben der Verwendung des entnommenen Gewebes sowie ihrer Daten zugestimmt. Die Durchführung dieser Arbeit wurde durch die Ethik-Kommission der Goethe-Universität Frankfurt am 12. März 2020 genehmigt (Projektnummer: UCT-13-2020).

Je Patient wurden 5 Wachstumsfaktoren und 4 Areale (DG, CA1, CA2/3 und CA4) untersucht, sodass bei 21 Patienten insgesamt 420 Datensets vorliegen sollten. Da nicht auf allen Gewebeschnitten sämtliche Areale zu identifizieren waren, liegen stattdessen lediglich 186 Datensets vor.

#### 4.2 Vergleich der Expression der Wachstumsfaktoren in histologisch unauffälligem und sklerotischem Gewebe

Für GDNF zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Expression in histologisch unauffälligem und sklerotischem Hippocampus im Bereich von CA1 (siehe Abbildung 13, Tabellen 8 und 9). Die Hippocampussklerosen zeigten dabei eine geringere Expression von GDNF in CA1 als die histologisch unauffälligen Hippocampi. Abbildung 14 zeigt exemplarisch jeweils zwei sklerotische und zwei histologisch normale Ausschnitte aus der Regionen CA1. Für die anderen Areale des Hippocampus wurde kein Unterschied in der Expression von GDNF festgestellt. Auch für die Expression der Wachstumsfaktoren BDNF, GMFB, FGF2 und PDGF-B konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Hippocampussklerose und unauffälligem Gewebe gefunden werden (Tabelle 24 im Anhang).

Da die Fallzahl der anderen neuropathologischen Befunde zu gering war, wurde auf eine gesonderte statistische Auswertung verzichtet.



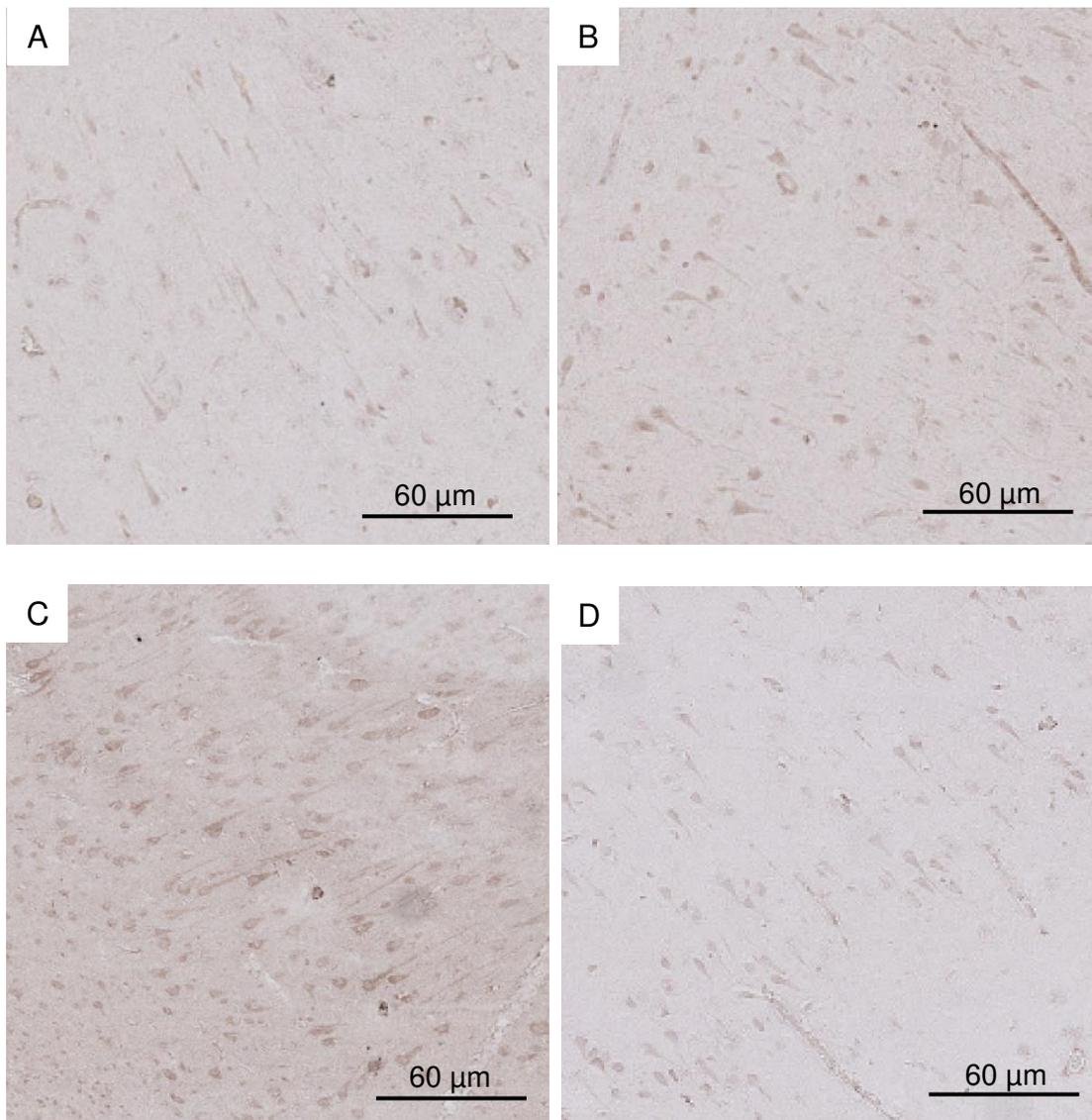
**Abbildung 13: Vergleich der Expression von GDNF in CA1 in normalem Gewebe und Hippocampussklerose**  
 Die horizontale Linie entspricht dem Mittelwert aller Datenpunkte und dient lediglich als Referenz.

Stufe	N	Mittelwert	Std.-Abw.	95% KI unten	95% KI oben
Hippocampussklerose	6	19,051523	1,7497207	17,215304	20,887742
Normal	4	26,140769	7,4799737	14,238461	38,043076

**Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichung der Grauwerte von GDNF in CA1 in normalem Gewebe und Hippocampussklerosen**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	p-Wert
6,5455	1	0,0105

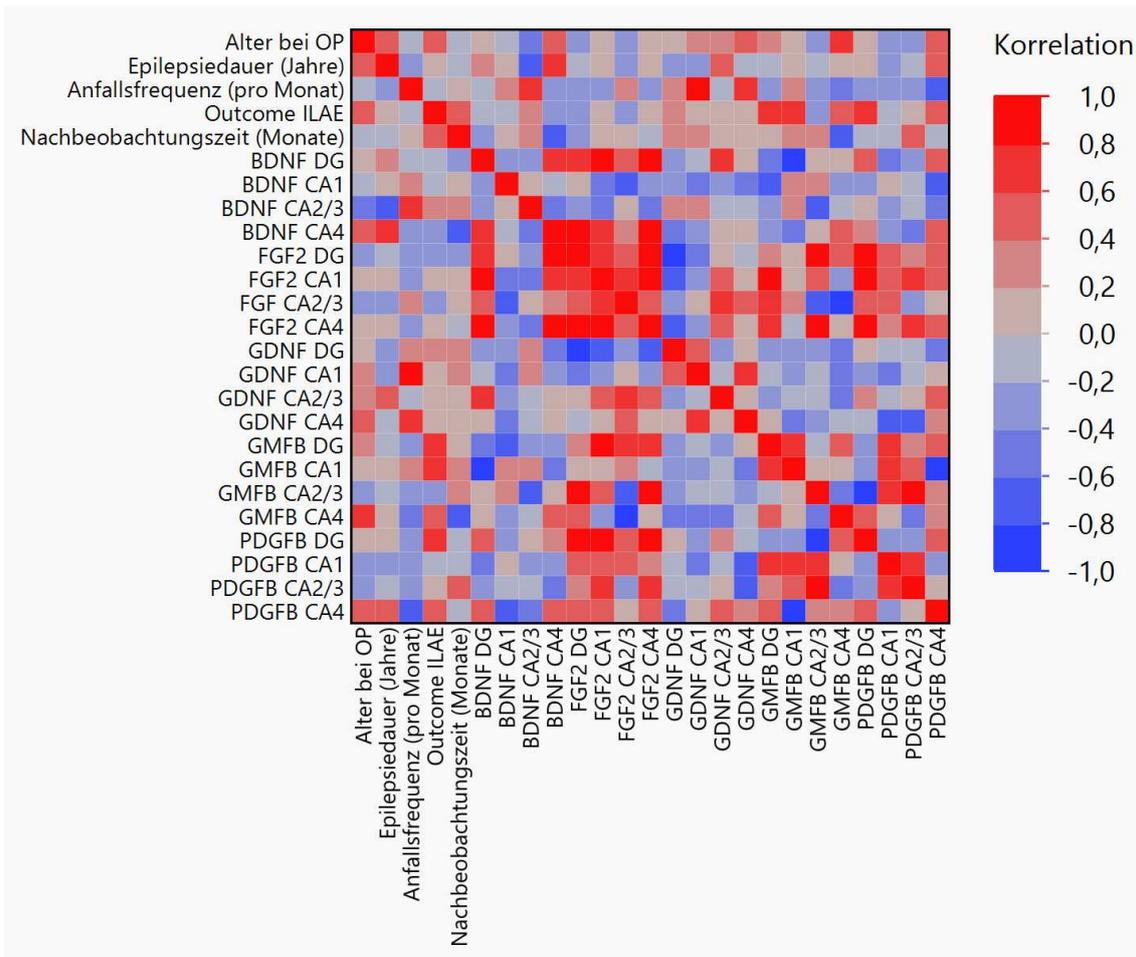
**Tabelle 9: Kruskal-Wallis-Test der Expression von GDNF in CA1 in normalem Gewebe und Hippocampussklerosen**



**Abbildung 14: GDNF-Färbung, exemplarische Gegenüberstellung von sklerotischem und nicht sklerotischem Gewebe des Areals CA1**  
**A und B:** Ausschnitte des Areals CA1 von Patienten ohne Hippocampussklerose;  
**C und D:** Ausschnitt des Areals CA1 von Patienten mit Hippocampussklerose

### 4.3 Multivariate Analyse

Mittels der multivariate Analyse wurden die quantitativen Variablen auf Korrelationen untersucht. Dafür wurden alle quantitativen klinischen und experimentellen Variablen miteinander korreliert. Die Korrelationen sind in Abbildung 15 als Heatmap visualisiert. Die relevanten Korrelationen sind in Tabelle 25 im Anhang dargestellt und im Folgenden näher beschrieben.



**Abbildung 15: Heatmap der Korrelationen**

Hierbei handelt es sich um eine farbkodierte Darstellung der Korrelationen, wobei dunkelblau  $-1,0$  (niedrige Korrelation) entspricht, während dunkelrot  $+1,0$  (hohe Korrelation) entspricht. Die dunkelroten Felder, die sich in einer Linie von der oberen linken Ecke zur unteren rechten Ecke ziehen, entsprechen der Korrelation der jeweiligen Variable mit sich selbst und entsprechen somit der Korrelation  $+1,0$ . Dementsprechend ist die Darstellung an dieser Linie gespiegelt.

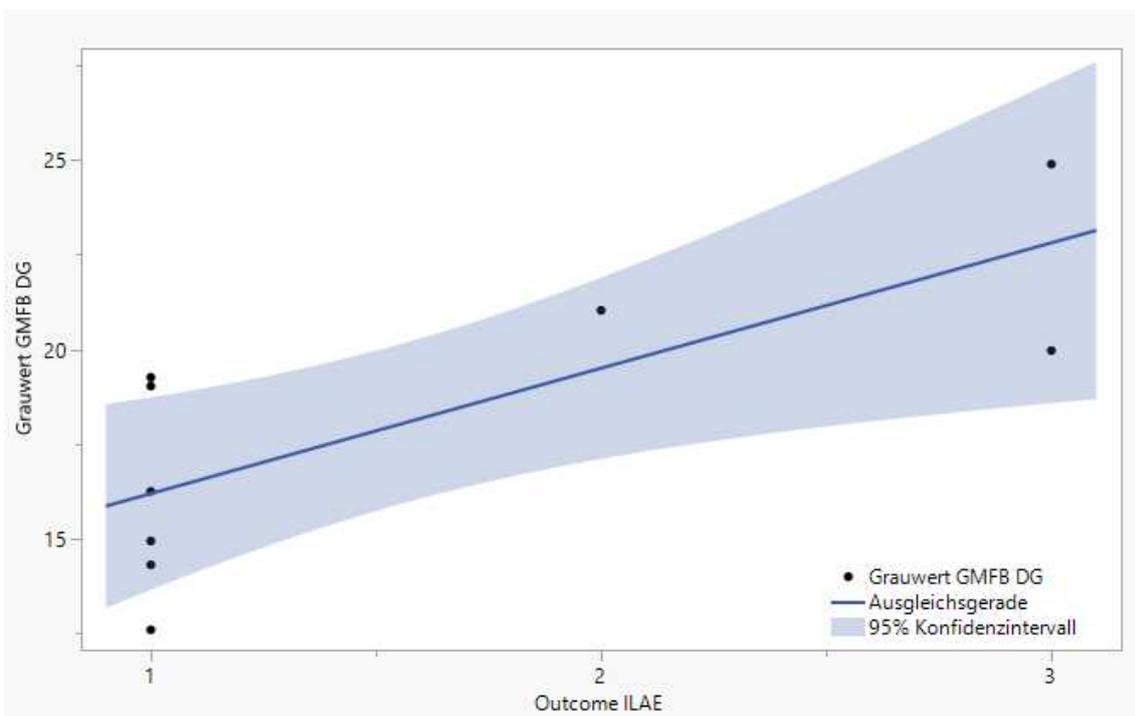
#### 4.4 Korrelation von Wachstumsfaktorenexpression und Outcome

Eine Übersicht über das postoperative Outcome des Patientenkollektivs liefert Tabelle 10. Eine signifikante Korrelation mit dem Outcome fand sich für GMFB. Je höher die Expression von GFMB in den Arealen DG und CA1, desto schlechter war das Outcome der Patienten gemäß ILAE-Einteilung. Die Ergebnisse sind den Abbildungen 16 und 17 sowie der Tabelle 11 zu entnehmen. Interessant sind dabei auch die absoluten Grauwerte der beiden Areale im Vergleich. Im DG liegen diese insgesamt deutlich höher als in CA1. Abbildung 18 zeigt Ausschnitte

der Areale DG und CA1 von Patienten mit gutem Outcome (1) und einem Patienten mit schlechterem Outcome (3) zur exemplarischen Gegenüberstellung.

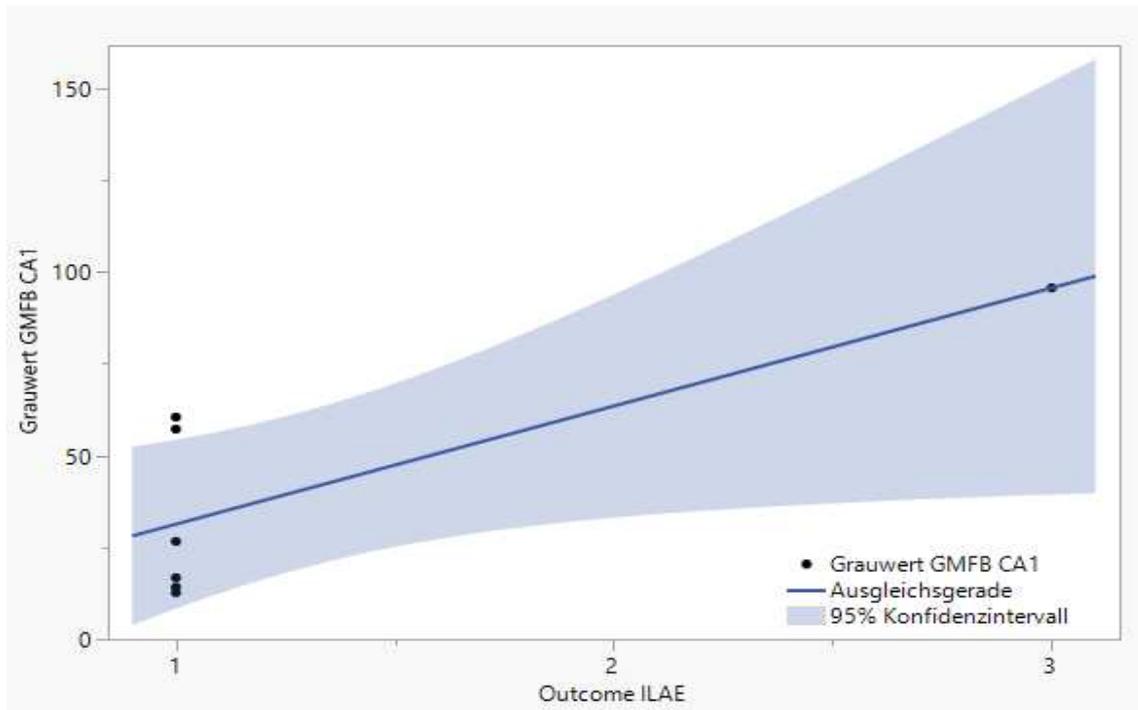
Klassifikation des postoperatives Outcomes der ILAE (siehe Tabelle 1, Seite X)	Zahl der Patienten (%)
1	14 (66,67%)
2	2 (9,52%)
3	3 (14,29%)
4	2 (9,52%)
5	0 (0,00%)
6	0 (0,00%)

**Tabelle 10: Postoperatives Outcome der Patienten nach ILAE**



**Abbildung 16: Darstellung der Korrelation der Expression von GMFB im DG und dem postoperativen Outcome**

X-Achse: postoperatives Outcome nach ILAE, Y-Achse: Grauwert (8-bit) der Anfärbung von GMFB, ein höherer Grauwert entspricht einer größeren Menge GMFB, dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte und die zugehörige Ausgleichsgerade. Zu beachten ist, dass nur wenige Datenpunkte ILAE Outcome >1 für den DG vorhanden sind.

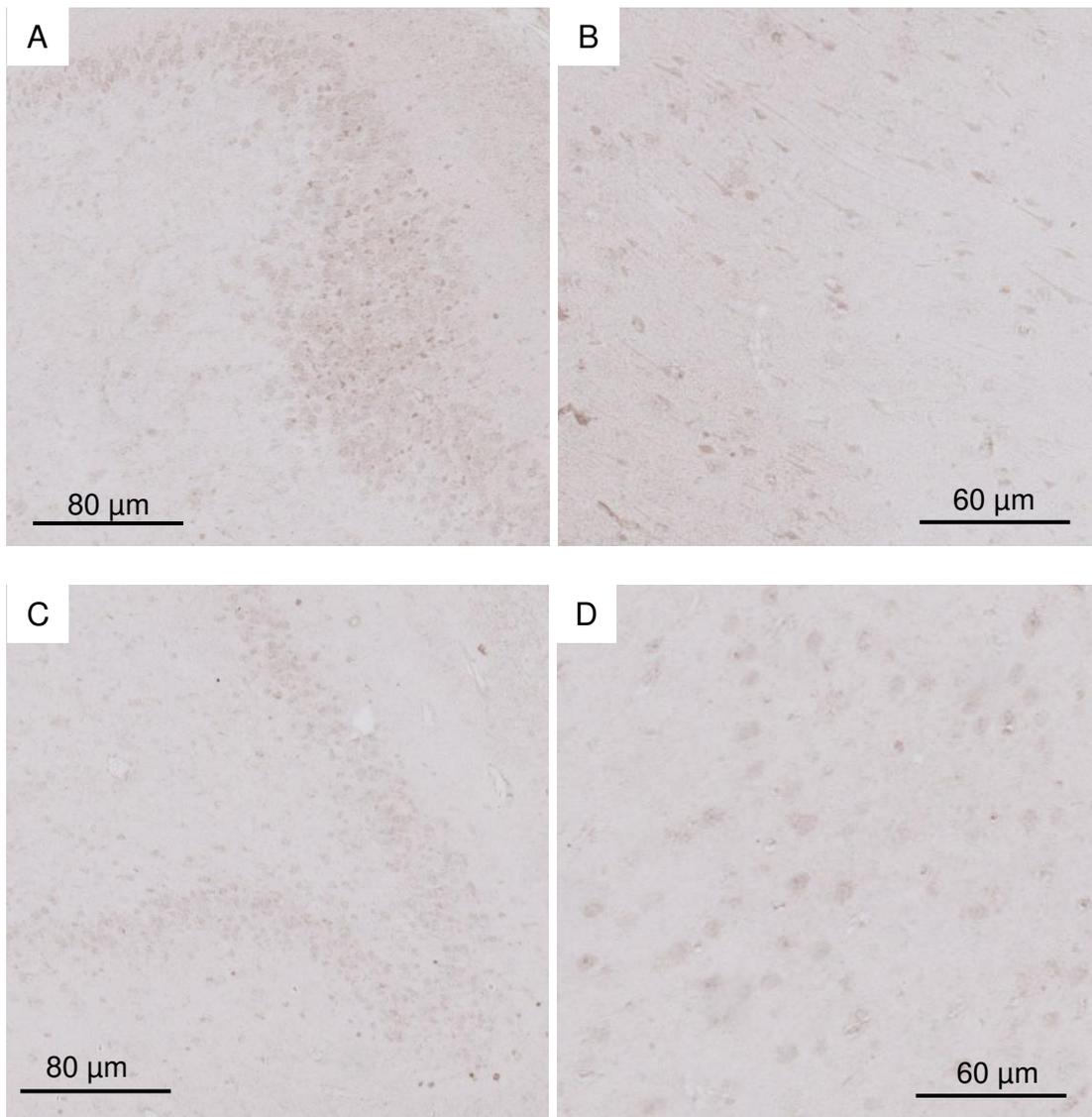


**Abbildung 17: Darstellung der Korrelation der Expression von GMFB in CA1 und dem postoperativen Outcome**

X-Achse: postoperatives Outcome nach ILAE, Y-Achse: Grauwert (8-bit) der Anfärbung von GMFB, ein höherer Grauwert entspricht einer größeren Menge GMFB, dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte und die zugehörige Ausgleichsgerade. Zu beachten ist, dass nur ein Datenpunkt ILAE Outcome >1 für CA1 vorhanden ist.

Variable	mit Variable	Korrelation	n	p-Wert
GMFB DG	Outcome ILAE	0,7587	9	<b>0,0178</b>
GMFB CA1	Outcome ILAE	0,7726	7	<b>0,0417</b>

**Tabelle 11: Korrelationsanalyse Wachstumsfaktoren und Outcome**



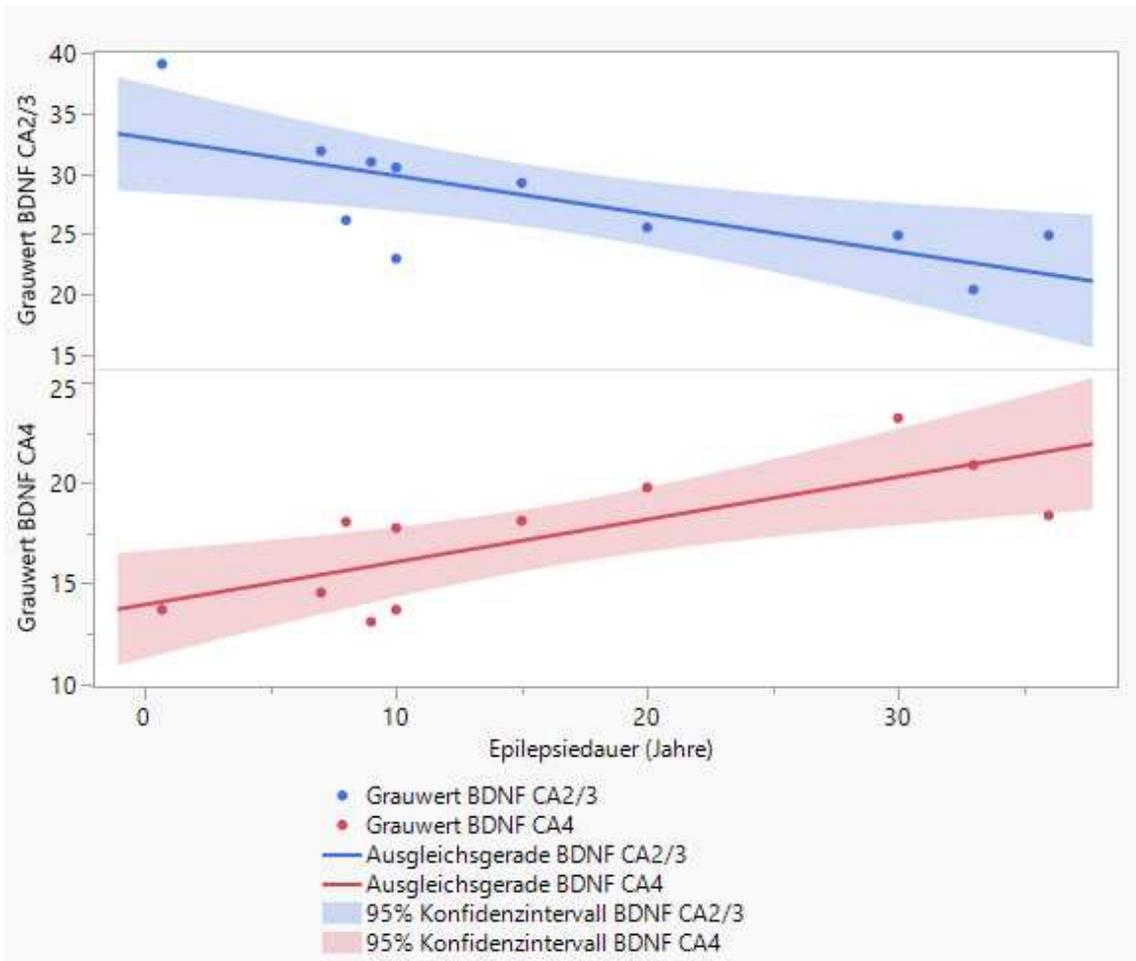
**Abbildung 18: GMFB-Färbung, exemplarische Gegenüberstellung von Gewebe der Areale DG und CA1**

Ausschnitte zur exemplarischen Gegenüberstellung der Areale DG und CA1 basierend auf dem Outcome. Die obere Reihe zeigt zwei Ausschnitte mit dem Outcome 1, die untere mit dem Outcome 3. Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen Outcome und Expression von GMFB. In den Abbildungen C und D ist im Vergleich zu A und B eine geringere Graufärbung zu sehen. **A:** DG, Outcome ILAE 1; **B:** CA1, Outcome ILAE 1; **C:** DG, Outcome 3; **D:** CA1, Outcome 3

#### 4.5 Korrelation von Wachstumsfaktorenexpression und Epilepsiedauer

In dieser Arbeit zeigte sich eine sinkende BDNF-Expression in den Regionen CA2 und CA3 im Laufe der Epilepsie. In CA4 war eine signifikante positive Korrelation zwischen der Epilepsiedauer und der Expression von BDNF zu finden. Diese Ergebnisse sind Abbildung 19 sowie Tabelle 12 zu entnehmen. Abbildung 20 zeigt Ausschnitte der Areale CA4 und CA2/3 von Patienten mit kurzer Epilepsiedauer (<1 Jahr) und einem Patienten mit langer Epilepsiedauer zur exemplarischen Gegenüberstellung.

Für alle weiteren Wachstumsfaktoren und Areale fanden sich keine signifikanten Korrelationen.

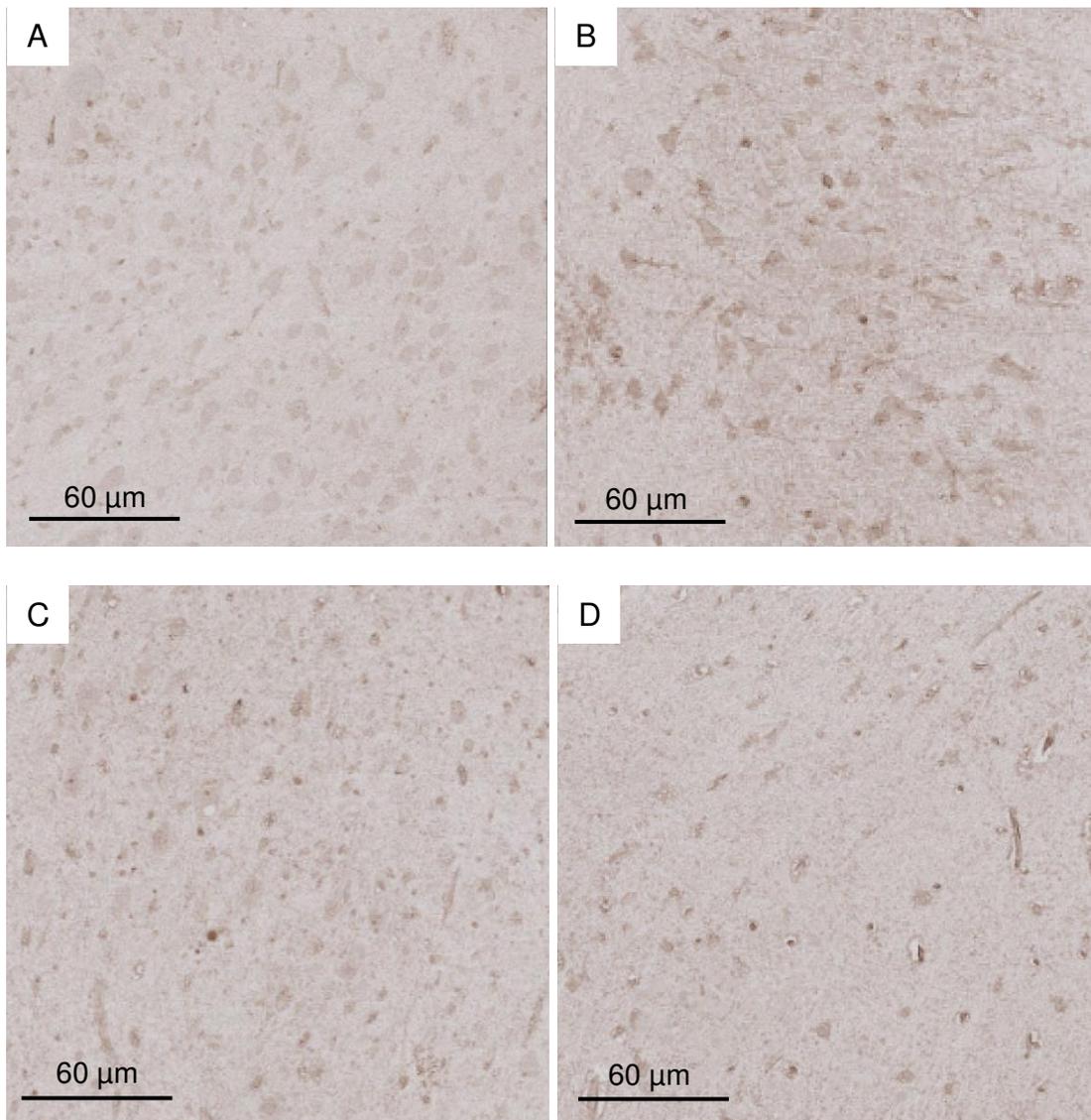


**Abbildung 19: Darstellung der Korrelation der Expression von BDNF in CA2/3 und CA4 und der Epilepsiedauer**

X-Achse: Epilepsiedauer in Jahren, Y-Achse: Grauwert (8-bit) der Anfärbung von BDNF in CA2/3 und CA4, ein höherer Grauwert entspricht einer größeren Menge BDNF, dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte und die zugehörigen Ausgleichsgeraden.

Variable	mit Variable	Korrelation	n	p-Wert
BDNF CA2/3	Epilepsiedauer (Jahre)	-0,7220	11	<b>0,0121</b>
BDNF CA4	Epilepsiedauer (Jahre)	0,7630	11	<b>0,0063</b>

**Tabelle 12: Korrelationsanalyse Wachstumsfaktoren und Epilepsiedauer**



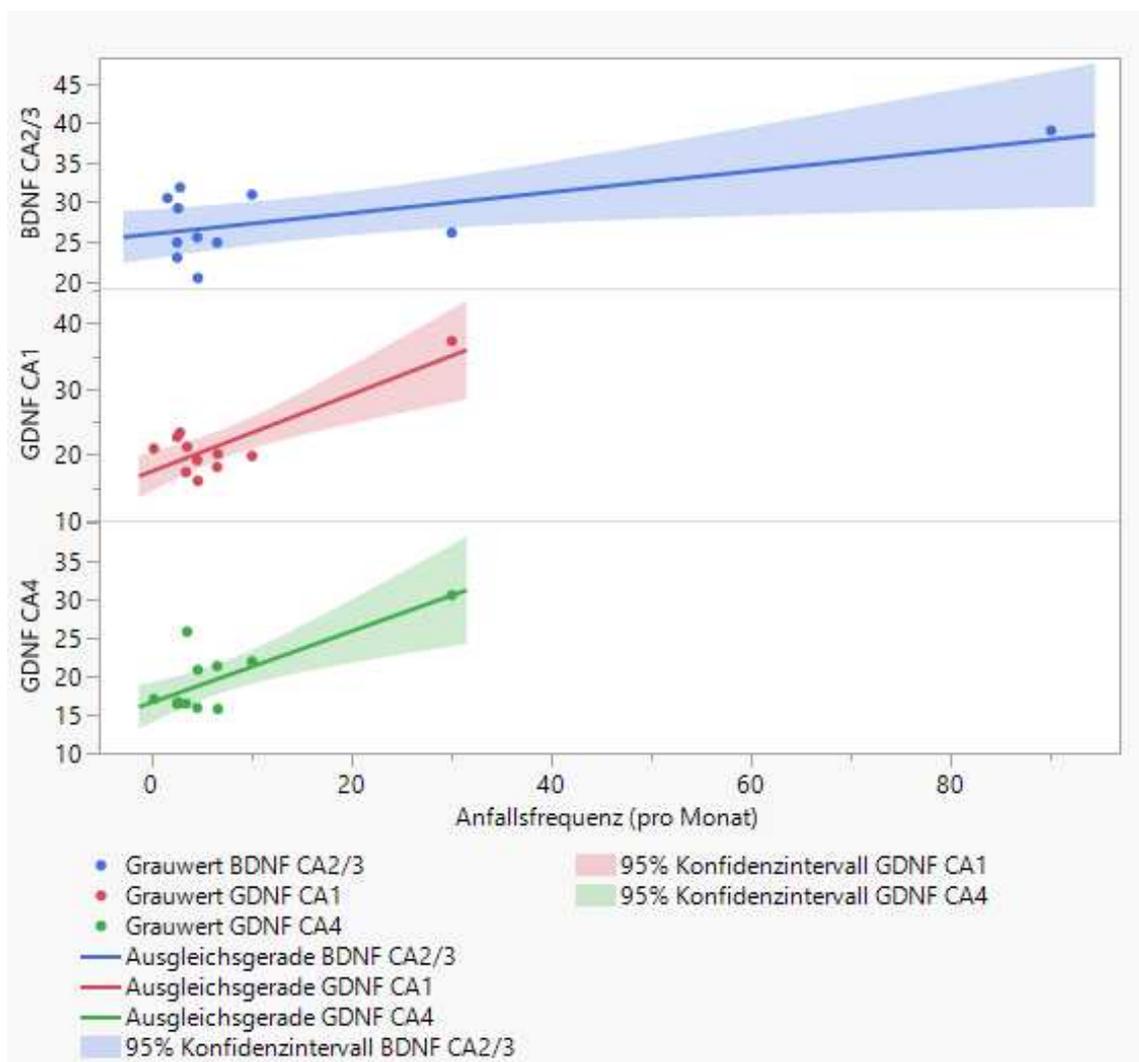
**Abbildung 20: BDNF-Färbung, exemplarische Gegenüberstellung von Gewebe der Areale CA2/3 und CA4**

Ausschnitte zur exemplarischen Gegenüberstellung der Areale CA4 und CA2/3 mit unterschiedlicher Epilepsiedauer. **A:** Ausschnitt von CA4 eines Patienten mit <1 Jahr Epilepsiedauer; In den Abbildungen A und C zeigt sich die oben beschriebene stärkere Graufärbung der Region CA4 bei längerer Epilepsiedauer. Die Abbildungen B und D hingegen zeigen die ebenfalls oben beschriebene abnehmende Graufärbung der Regionen CA2/3 bei längerer Epilepsiedauer. **B:** Ausschnitt von CA2/3 eines Patienten mit <1 Jahr Epilepsiedauer; **C:** Ausschnitt von CA4 eines Patienten mit 36 Jahren Epilepsiedauer; **D:** Ausschnitt von CA2/3 eines Patienten mit 36 Jahren Epilepsiedauer.

## 4.6 Korrelation von Wachstumsfaktorenexpression und Anfallsfrequenz

Die BDNF-Expression der Regionen CA2/3 korreliert positiv mit der präoperativen Anfallsfrequenz der Patienten. Auch für GDNF zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen der Expression in CA1 und CA4 mit der präoperativen Anfallsfrequenz. Eine Übersicht bieten Abbildung 21 sowie Tabelle 13.

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen histologische Ausschnitte von Patienten mit niedriger und hoher Anfallsfrequenz zur exemplarischen Gegenüberstellung.

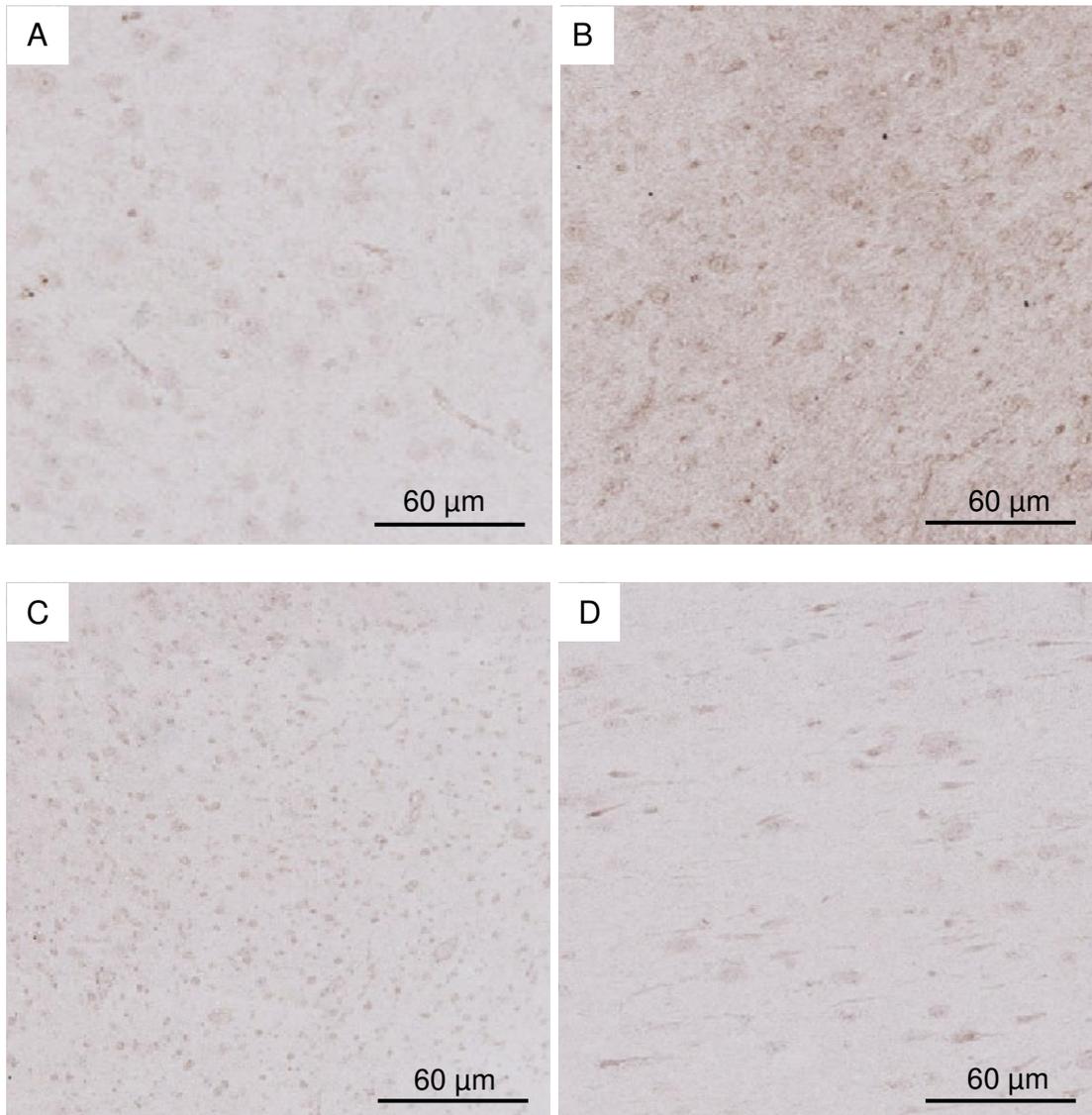


**Abbildung 21: Darstellung der Korrelation der Expression von BDNF in CA2/3, GDNF in CA1 und CA4 und der Anfallsfrequenz**

X-Achse: Anfallsfrequenz pro Monat, Y-Achse: Grauwert (8-bit) der Anfärbung von BDNF beziehungsweise GDNF, ein höherer Grauwert entspricht einer größeren Menge des jeweiligen Wachstumsfaktors, dargestellt sind die einzelnen Datenpunkte und die zugehörigen Ausgleichsgeraden.

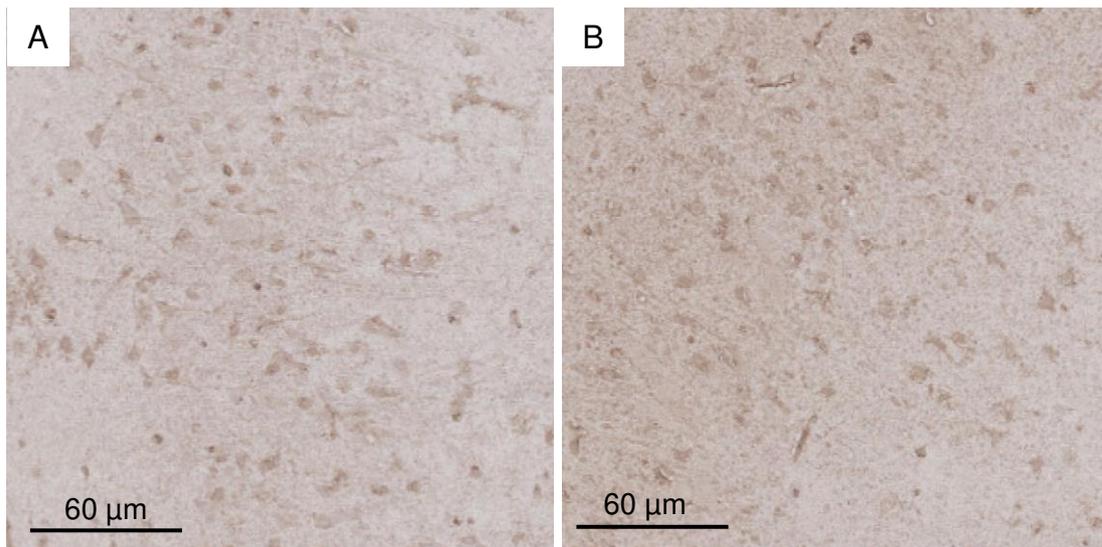
Variable	mit Variable	Korrelation	n	p-Wert
BDNF CA2/3	Anfallsfrequenz (pro Monat)	0,6790	11	<b>0,0216</b>
GDNF CA1	Anfallsfrequenz (pro Monat)	0,8354	11	<b>0,0014</b>
GDNF CA4	Anfallsfrequenz (pro Monat)	0,7748	12	<b>0,0031</b>

**Tabelle 13: Signifikanzanalyse von Wachstumsfaktoren und Anfallsfrequenz**



**Abbildung 22: GDNF-Färbung, exemplarische Gegenüberstellung von Gewebe der Areale CA4 und CA1**

Ausschnitte zur exemplarischen Gegenüberstellung der Areale CA4 und CA1 mit unterschiedlicher Anfallsfrequenz. **A:** Areal CA4 eines Patienten mit 0,16667 Anfällen/Monat; **B:** Areal CA4 eines Patienten mit 10 Anfällen/Monat; **C:** Areal CA1 eines Patienten mit 0,16667 Anfällen/Monat; **D:** Areal CA1 eines Patienten mit 10 Anfällen/Monat



**Abbildung 23: BDNF-Färbung, exemplarische Gegenüberstellung von Gewebe der Areale CA2/3**

*Ausschnitte zur exemplarischen Gegenüberstellung der Areale CA2/3 mit unterschiedlicher Anfallsfrequenz. **A:** Patienten mit 3,5 Anfällen/Monat; **B:** Areal CA4 eines Patienten mit 30 Anfällen/Monat*

#### 4.7 Korrelation von Wachstumsfaktorenexpression untereinander

Auch zwischen den verschiedenen Wachstumsfaktoren zeigten sich signifikante Korrelationen. Diese fanden sich etwa zwischen der Expression von PDGF-B im DG und der Expression von FGF2 in CA1 sowie CA4.

Des Weiteren korrelierte die Expression von PDGF-B in CA1 negativ mit der Expression von GMFB in den Arealen CA2 und CA3, während zwischen PDGF-B in CA2 und CA3 und GMFB in CA2 und CA3 eine positive Korrelation existiert.

Zudem fand sich eine negative Korrelation zwischen PDGF-B in CA4 und BDNF in CA1. Eine Übersicht aller signifikanter Korrelationen zwischen den Wachstumsfaktoren in den jeweiligen Arealen bietet Tabelle 14.

<b>Variable</b>	<b>mit Variable</b>	<b>Korrelation</b>	<b>n</b>	<b>p-Wert</b>
BDNF CA4	BDNF DG	0,6433	10	<b>0,0448</b>
FGF2 CA1	BDNF DG	0,9918	5	<b>0,0009</b>
FGF2 CA4	BDNF DG	0,9812	5	<b>0,0031</b>
FGF2 CA4	FGF2 DG	0,8248	6	<b>0,0433</b>
FGF2 CA4	FGF2 CA1	0,9880	6	<b>0,0002</b>
GDNF CA4	GDNF CA1	0,6333	11	<b>0,0365</b>
GMFB CA1	BDNF DG	-0,8976	6	<b>0,0152</b>
GMFB CA2/3	FGF2 DG	0,9551	4	<b>0,0449</b>
PDGFB DG	FGF2 CA1	0,9826	4	<b>0,0174</b>
PDGFB DG	FGF2 CA4	0,9720	4	<b>0,0280</b>
PDGFB DG	GMFB CA2/3	-0,9781	4	<b>0,0219</b>
PDGFB CA2/3	GMFB CA2/3	0,9728	4	<b>0,0272</b>
PDGFB CA4	BDNF CA1	-0,7733	7	<b>0,0414</b>

**Tabelle 14: Signifikanzanalyse der Wachstumsfaktoren miteinander**  
 Signifikanzanalyse der Wachstumsfaktoren in den jeweiligen Arealen miteinander. Die in der Spalte „Variable“ abgebildeten Wachstumsfaktoren des Areals wurden mit denen der Spalte „mit Variable“ korreliert. Alle hier abgebildeten Korrelationen waren signifikant.

#### 4.8 Geschlechtsabhängige Expression der Wachstumsfaktoren

Es zeigte sich kein signifikanter geschlechtsabhängiger Unterschied in der Expression eines der Wachstumsfaktoren (Tabelle 15).

Wachstumsfaktor und Areal	p-Wert
BDNF DG	0,9353
BDNF CA1	0,8551
BDNF CA2/3	0,2012
BDNF CA4	0,7150
FGF2 DG	0,1266
FGF2 CA1	0,8273
FGF2 CA2/3	0,8273
FGF2 CA4	0,5127
GDNF DG	0,8651
GDNF CA1	0,8501
GDNF CA2/3	1,0000
GDNF CA4	0,8651
GMFB DG	0,8065
GMFB CA1	0,0771
GMFB CA2/3	1,0000
GMFB CA4	0,6242
PDGF-B DG	0,4624
PDGF-B CA1	0,8065
PDGF-B CA2/3	0,4624
PDGF-B CA4	0,8065

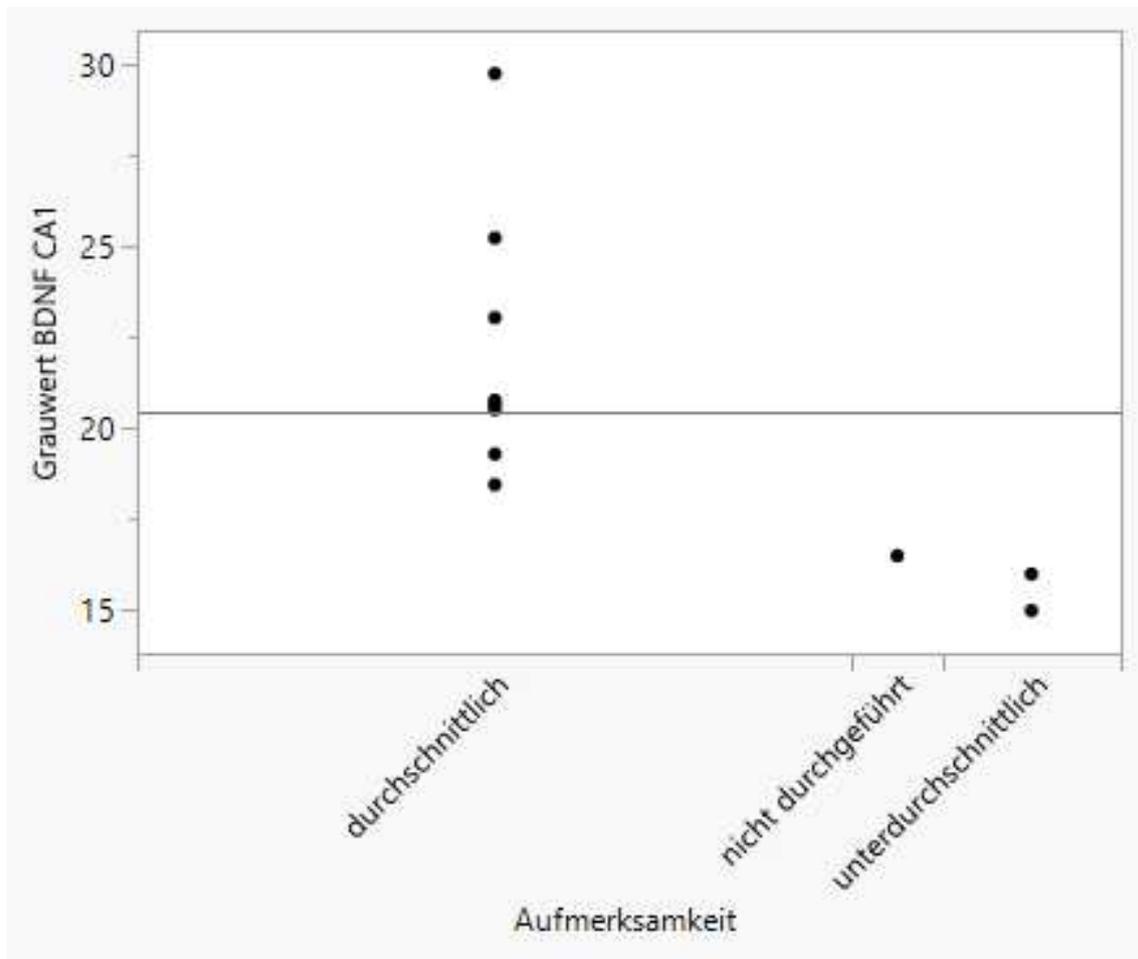
**Tabelle 15: Signifikanzanalyse der geschlechterabhängigen Expression der Wachstumsfaktoren**

*In der linken Spalte ist die Expression der Wachstumsfaktoren im jeweiligen Areal abgebildet. In der rechten Spalte die p-Werte. Keine der geschlechterabhängigen Korrelationen war signifikant.*

#### 4.9 Wachstumsfaktorenexpression und neuropsychologische Testung

Im Bereich der Ergebnisse der Testung der Aufmerksamkeit fand sich eine positive Korrelation mit der Expression von BDNF in CA1 (Abbildung 24, Tabellen 16 und 17).

Des Weiteren korrelierte die Expression von BDNF in CA1 mit den Ergebnissen der Testung des Verbalgedächtnisses positiv (Abbildung 25, Tabellen 18 und 19), während die Expression von PDGFB in CA4 negativ korrelierte (Abbildung 26, Tabellen 20 und 21).



**Abbildung 24: Scatter Plot der Expression von BDNF in CA1 und den Testergebnissen der Aufmerksamkeit**

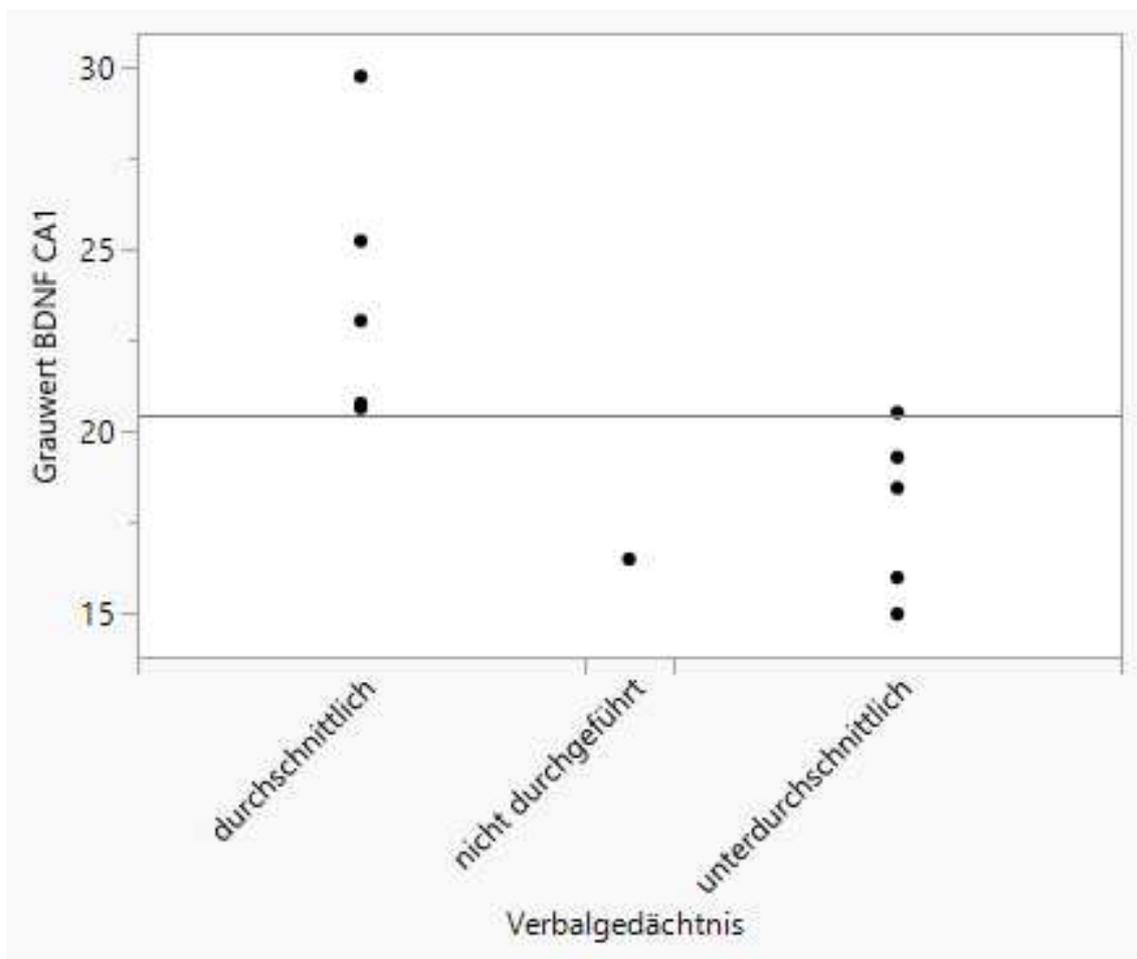
X-Achse: Ergebnisse der neuropsychologischen Testung des Verbalgedächtnisses, Y-Achse: Grauwert (8-bit) der Anfärbung von BDNF, ein höherer Grauwert entspricht einer größeren Menge BDNF. Bei einer Person des Patientenkollektivs wurde die Testung der Aufmerksamkeit aufgrund einer Sprachbarriere nicht durchgeführt.

Kategorie	n	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert
durchschnittlich	8	60,000	48,000	7,50000
nicht durchgeführt	1	3,000	6,000	3,00000
unterdurchschnittlich	2	3,000	12,000	1,50000

**Tabelle 16: Daten der Expression von BDNF in CA1 und den Testergebnissen der Aufmerksamkeit**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	p-Wert
6,1364	2	0,0465

**Tabelle 17: Signifikanzanalyse der Expression von PDGF-B in CA4 und den Testergebnissen der Aufmerksamkeit**



**Abbildung 25: Scatter Plot der Expression von BDNF in CA1 und den Testergebnissen des Verbalgedächtnisses**

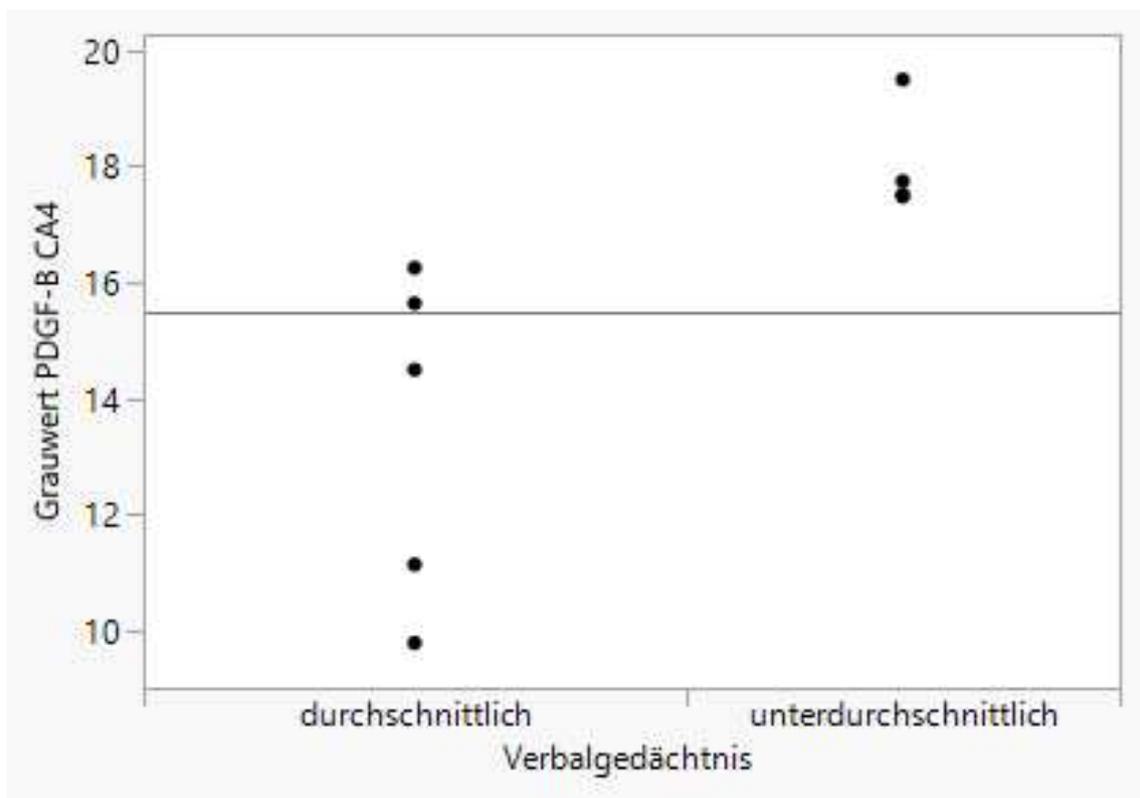
X-Achse: Ergebnisse der neuropsychologischen Testung des Verbalgedächtnisses, Y-Achse: Grauwert (8-bit) der Anfärbung von BDNF, ein höherer Grauwert entspricht einer größeren Menge BDNF.

Kategorie	N	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert
durchschnittlich	5	45,000	30,000	9,00000
nicht durchgeführt	1	3,000	6,000	3,00000
unterdurchschnittlich	5	18,000	30,000	3,60000

**Tabelle 18: Daten der Expression von BDNF in CA1 und den Testergebnissen des Verbalgedächtnisses**

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	p-Wert
7,5273	2	0,0232

**Tabelle 19: Signifikanzanalyse der Expression von PDGF-B in CA4 und den Testergebnissen des Verbalgedächtnisses**



**Abbildung 26: Scatter Plot der Expression von PDGF-B in CA4 und den Testergebnissen des Verbalgedächtnisses**

X-Achse: Ergebnisse der neuropsychologischen Testung des Verbalgedächtnisses, Y-Achse: Grauwert (8-bit) der Anfärbung von PDGF-B, ein höherer Grauwert entspricht einer größeren Menge PDGF-B.

Kategorie	N	Score-Summe	Erwarteter Score	Score-Mittelwert
durchschnittlich	5	15,000	25,000	3,00000
unterdurchschnittlich	4	30,000	20,000	7,50000

*Tabelle 20: Daten der Expression von PDGF-B in CA4 und den Testergebnissen des Verbalgedächtnisses*

Chi <sup>2</sup>	Freiheitsgrade	p-Wert
6,0000	1	0,0143

*Tabelle 21: Signifikanzanalyse der Expression von PDGF-B in CA4 und den Testergebnissen des Verbalgedächtnisses*

## 5 Diskussion

### 5.1 Einordnung der Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die vergleichende Untersuchung der Expression von Wachstumsfaktoren in Resektaten menschlicher Hippocampi, um semiquantitativ Daten zu deren Verteilung bei Epilepsiepatienten zu erhalten. Des Weiteren sollten diese Daten mit den klinischen Daten der Patienten korreliert werden, um Hinweise auf mögliche Zusammenhänge zwischen dem klinischen Erscheinungsbild der Epilepsie und der Expression der Wachstumsfaktoren zu gewinnen. Die vorliegenden Ergebnisse liefern Antworten beziehungsweise Hinweise auf diese Fragen.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse unter Zuhilfenahme vorhandener Originalarbeiten diskutiert und eingeordnet werden. Dabei soll insbesondere auf Korrelationen zwischen der Wachstumsfaktorenexpression und klinischen Daten bei TLE eingegangen werden sowie ein Ausblick für mögliche klinische Anwendungen gegeben werden. Die Verwendung von Wachstumsfaktoren für diagnostische und therapeutische Zwecke ist dabei von besonderem Interesse.

#### 5.1.1 Vorkommen von Wachstumsfaktoren in histologisch unauffälligem und in sklerotischem Gewebe (vgl. 4.2)

Die geringen Unterschiede zwischen der Expression der Wachstumsfaktoren in Hippocampussklerosen und in normalem Gewebe erscheinen auf den ersten Blick überraschend. Die geringere Expression von GDNF in CA1 in den Hippocampussklerosen war der einzige signifikante Unterschied zu histologisch normalem Gewebe. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression der Wachstumsfaktoren bei TLE nicht von dem jeweiligen histopathologischen Befund, sondern von der Erkrankung selbst abhängt. Da auch das histologisch unauffällige Gewebe von Patienten mit Temporallappenepilepsie stammen, unterscheiden sich die Gewebeproben letztlich nur in dem histopathologischen Befund.

Die Literatur liefert uneinheitliche Antworten auf die Fragen der Expression von Wachstumsfaktoren in histologisch unauffälligem Gewebe im Vergleich zu

sklerotischem Gewebe. In einer Arbeit, die ebenfalls an hippocampalen Resektaten von Patienten mit therapierefraktärer TLE durchgeführt wurde, zeigte sich kein Unterschied in der Expression von BDNF zwischen TLE mit HS und TLE ohne HS.<sup>82</sup> Interessanterweise ist diese Arbeit eine der wenigen, die zudem einen Vergleich mit gesundem Gewebe, also von Patienten ohne Epilepsie, als Kontrolle verwendete. Es zeigte sich eine erhöhte Expression von BDNF bei TLE, unabhängig von dem histopathologischen Befund, verglichen mit dem gesunden Gewebe.<sup>82</sup> In einer weiteren Arbeit, die ebenfalls Gewebe von Patienten mit TLE im Vergleich zu postmortal gewonnenem Gewebe von Patienten ohne Epilepsie untersuchte, fand sich ebenfalls eine erhöhte Expression von BDNF bei TLE.<sup>83</sup>

Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Arbeit, die an chirurgischen Resektaten von Patienten mit TLE durchgeführt wurde, zumindest eine Erhöhung der mRNA von BDNF bei TLE und Hippocampusklerose im Vergleich zu TLE ohne Hippocampusklerose gezeigt werden.<sup>84</sup> In dieser Arbeit wurde allerdings nicht das Protein BDNF selbst, sondern ausschließlich dessen mRNA bestimmt.

Weitere vergleichende Untersuchungen an Gewebe von Patienten mit und ohne Epilepsie wären zur abschließenden Klärung der Fragestellung interessant. Solches Gewebe stand allerdings für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

### 5.1.2 GMFB und das postoperative Outcome (vgl. 4.4)

Zunächst ist anzumerken, dass das Outcome der hier untersuchten Patienten dem Outcome aus Untersuchungen großer Kohorten ähnelt, in denen etwa Zweidrittel der Patienten von der Operation profitieren, was einer ILAE Klassifikation von 1 bis 4 entspricht.<sup>11,42</sup> In anderen Arbeiten waren 36%-61,4% der Patienten nach der Operation sogar anfallsfrei.<sup>43,45</sup> Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten (n=21) haben von der epilepsiechirurgischen Therapie im Sinne einer Anfallsreduktion profitiert und 14 Patienten (66,67%) sogar eine Anfallsfreiheit erreicht (siehe Tabelle 10).

Die für GMFB gefundene Korrelation mit dem Outcome der Patienten ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Generell ist die Bedeutung von GMFB bei der Epilepsie bislang nicht umfassend untersucht worden.

Der Wachstumsfaktor GMFB scheint über den MAP-Kinase-Signalweg, die Transkriptionsfaktoren CREB und NF- $\kappa$ B zu aktivieren und die Sekretion anderer Wachstumsfaktoren zu stimulieren.<sup>85</sup> Zudem wird GMFB bei zahlreichen Krankheitsprozessen, wie Alzheimer, Morbus Parkinson, Neuroinflammation, aber auch kryogenen Läsionen hochreguliert.<sup>68,70</sup> Welche Funktion GMFB dabei übernimmt, ist allerdings unklar. Um diese Frage abschließend zu klären, müssten die zugrundeliegenden Mechanismen, über die GMFB Einfluss auf den Verlauf der Epilepsie nimmt, besser verstanden werden. Die hier vorliegenden Ergebnisse können dazu ebenfalls keinen Erklärungsansatz liefern, weshalb über die Bedeutung nur spekuliert werden kann. Die hohe Expression von GMFB könnte mit einem schlechten Outcome insofern assoziiert sein, dass es sich um eine neuroprotektive Gegenregulation bei von vornherein schwerem Verlauf handelt. Auf der anderen Seite könnte die starke Expression von GMFB ursächlich für Veränderungen sein, die ein schlechtes Outcome befördern. Bei anderen Krankheitsprozessen des zentralen Nervensystems übt GMFB einen neuroprotektiven Effekt aus.<sup>70,85-88</sup>

### 5.1.3 Epilepsiedauer (vgl. 4.5)

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von BDNF mit der Dauer der Epilepsie signifikant abnimmt. Dies lässt sich in der Literatur auch auf Ebene der mRNA sowie im Serum bestätigen.<sup>84,85,89</sup> Zu der in CA4 gefundenen, positiven Korrelation der Expression von BDNF mit der Epilepsiedauer gibt es keine Literaturdaten. Die verringerte Expression könnte durch den progressiven Zellverlust bei langer Krankheitsdauer bedingt sein. Dagegen spricht allerdings, dass in diesem Fall auch eine reduzierte Expression der anderen Wachstumsfaktoren zu erwarten wäre. Da sich dies in den Untersuchungen dieser Arbeit nicht zeigte, erscheint diese These deshalb weniger wahrscheinlich.

Auch eine medikamentöse, anfallssuppressive Vorbehandlung kann die Expression von Wachstumsfaktoren modulieren. Beispielsweise wurde im Tiermodell sowohl *in vitro* also auch *in vivo* eine reduzierte Expression von BDNF bei Applikation des Anfallssuppressivums Valproat nachgewiesen.<sup>90,91</sup> *In vitro* konnte dieser Effekt auch beim Menschen gezeigt werden.<sup>82</sup> Da alle Patienten

dieser Arbeit präoperativ eine anfallssuppressive, medikamentöse Therapie erhalten haben, ist eine derartige Beeinflussung denkbar.

Von einer Altersabhängigkeit der Expression als weiterem Faktor kann, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, nicht ausgegangen werden, da sich keine signifikante Korrelation findet. Auch in den Literaturdaten findet sich keine Altersabhängigkeit der Expression von BDNF.<sup>89</sup>

Zusammenfassend ist eine abschließende Beurteilung dieser Ergebnisse schwierig. Insbesondere eine Einordnung der Epilepsiedauer ist bei den deutlichen kürzeren Beobachtungsintervallen in Tiermodellen, aus denen die meisten Daten stammen, nicht mit denen des Menschen vergleichbar. Im Tiermodell wird insbesondere das periiktale Zeitintervall untersucht, in dem sich ein Anstieg von BDNF sowie ein Rückgang auf den Ausgangswert innerhalb von Stunden bis Tagen zeigt.<sup>92</sup> Zudem ist die Funktion von BDNF im Rahmen der Epilepsie nicht abschließend geklärt, was eine Einordnung zusätzlich erschwert.

#### 5.1.4 Anfallsfrequenz (vgl. 4.6)

Eine hohe Anfallsfrequenz eines Patienten ist mit dem häufigeren Auftreten von Komorbiditäten, einem erhöhten Risiko für SUDEP sowie einer insgesamt reduzierten Lebenserwartung assoziiert.<sup>52</sup> Auch die Lebensqualität hängt maßgeblich von der Anfallsfrequenz ab, weshalb das Erreichen von Anfallsfreiheit unbedingt angestrebt werden sollte.<sup>93</sup> In Folge eines epileptischen Anfalls kommt es zu metabolischen und homöostatischen Veränderungen.<sup>94</sup> So kommt es beispielsweise zu Elektrolytverschiebungen, einem Anstieg von Sauerstoffradikalen und Konzentrationsänderungen intra- und extrazellulärer Botenstoffe.<sup>90</sup>

In den Daten dieser Arbeit zeigte sich bei Patienten mit hoher präoperativer Anfallsfrequenz eine signifikante Korrelation mit der Expression von BDNF. Dies ist womöglich darauf zurückzuführen, dass die Expression von BDNF sowie BDNF mRNA nach epileptischen Anfällen hochreguliert wird.<sup>56,57</sup>

Da bei hoher Anfallsfrequenz der letzte epileptische Anfall statistisch näher am Operationsdatum lag, ist die Wahrscheinlichkeit für eine postiktale

Hochregulation der BDNF-Expression womöglich entsprechend höher. Auch in menschlichen Hippocampi konnte eine erhöhte Expression von BDNF bei Epilepsie gezeigt werden.<sup>56,57,83,84,95</sup> Interessanterweise ist in der Literatur eine negative Korrelation zwischen der Anfallsfrequenz und BDNF im Serum beschrieben.<sup>89</sup> Dies gilt insbesondere für den Zeitraum wenige Stunden bis Tage nach einem epileptischen Anfall, während sich BDNF im Serum anschließend wieder seinem Ausgangswert annähert.<sup>96</sup> Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Verschiebung von BDNF aus dem Serum über die Blut-Hirn-Schranke.<sup>96</sup> Des Weiteren könnte der BDNF-Abfall durch eine Dysfunktion der Endothelzellen verursacht werden, da die reife BDNF-Form von den Endothelzellen in das Blut freigesetzt und wahrscheinlich schnell von Blutplättchen aufgenommen wird.<sup>97,98</sup> In einem solchen Fall könnten endotheliale Dysfunktion und Leckage der Blut-Hirn-Schranke, die durch Anfälle verursacht werden, die Ursache für die sinkenden BDNF-Spiegel sein.<sup>96</sup>

Im Rahmen der Epilepsie werden BDNF gegensätzliche Effekte zugeschrieben. Die Hochregulierung von BDNF scheint insgesamt einen pro-epileptogenen Effekt zu haben. Die signifikante Korrelation zwischen der Anfallsfrequenz und der Expression von BDNF im Hippocampus, die sich in dieser Arbeit zeigt, kann dementsprechend interpretiert werden. Die erhöhte Expression von BDNF kann also ursächlich für die höhere Krankheitslast, hier repräsentiert durch die Anfallsfrequenz, sein.

Bei der Maus führt die Infusion von Substanzen, die BDNF neutralisieren, wie auch ein Knockout von BDNF, zu einer Hemmung der Epileptogenese.<sup>56</sup> Passend dazu führt die Applikation von BDNF zu einer gesteigerten Exzitabilität.<sup>56</sup> Allerdings wurde auch eine neuroprotektive Wirkung von BDNF beschrieben, vermittelt durch Inhibition von NMDA-Rezeptoren.<sup>58</sup> Des Weiteren scheint eine länger andauernde exogene Zufuhr von BDNF antikonvulsive Effekte zu haben.<sup>57</sup> Dies scheint auf eine Hochregulierung von Neuropeptid Y und eine Herunterregulierung von TrkB zurückzuführen zu sein.<sup>57</sup> Des Weiteren zeigte sich eine negative Korrelation mit der Schwere der Erkrankung.<sup>57</sup>

Für GDNF wurden ähnliche Zusammenhänge gezeigt. Auch GDNF sowie GDNF mRNA werden nach einem epileptischen Anfall hochreguliert.<sup>64</sup> Dies passt

ebenfalls zu dem oben beschriebenen Zusammenhang der postiktalen Hochregulation und der erhöhten Anfallsfrequenz.

An hippocampalen Gewebeschnitten der Maus und des Menschen konnte ein Anstieg von inhibitorischen postsynaptischen Potenzialen nach Applikation von GDNF beobachtet werden.<sup>65</sup> Eine anfallsreduzierende Wirkung dieser Beobachtung ist naheliegend.

Des Weiteren konnte im *in vivo* Tiermodell durch externe Zufuhr von GDNF mittels der Injektion eines viralen GDNF-Vektors in den Hippocampus eine Anfallsreduktion sowie eine Hemmung der Epileptogenese erreicht werden.<sup>66,67</sup> Bei der postiktalen Hochregulation von GDNF scheint es sich also um eine neuroprotektive Gegenregulation zu handeln. Auch in den Daten dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Anfallsfrequenz und der Expression von GDNF.

#### 5.1.5 Korrelation der Wachstumsfaktorenexpression untereinander (vgl. 4.7)

Zusammenhänge in der Expression verschiedener Wachstumsfaktoren zu finden, überrascht nicht, da eine gemeinsame Beteiligung an Prozessen im Rahmen der Epilepsie wahrscheinlich ist (siehe Tabelle 15). Nichtsdestotrotz ist die Interpretation schwierig. Auch eine Einordnung mit Hilfe der Literatur ist nicht möglich, da zu den beschriebenen Korrelationen keine Vorarbeiten vorlagen. Allerdings lässt sich anhand des Beispiels von BDNF und FGF2 die synergistische Wirkung der Wachstumsfaktoren vermuten. Sowohl BDNF als auch FGF2 haben einen neuroprotektiven beziehungsweise neuroproliferativen Effekt.<sup>99,100</sup> Es zeigte sich eine deutlich verstärkte Wirkung auf das neuronale Überleben bei gleichzeitiger Applikation von BDNF und FGF2.<sup>99,101</sup> Derartige Effekte sind demzufolge auch im Rahmen der Epilepsie denkbar und würden die signifikanten Korrelationen erklären.

Des Weiteren könnte über einen Feedback-Mechanismus eine gegenseitige Stimulierung der Wachstumsfaktoren stattfinden. Hierzu liefert die Literatur allerdings keine Daten.

### 5.1.6 Geschlechtsabhängige Expression der Wachstumsfaktoren (vgl. 4.8)

Die Bedeutung der Geschlechtsabhängigkeit bei Epilepsien ist in weiten Teilen unklar. Es existieren Hinweise für geschlechtsabhängige Inzidenzen, Anfallsneigung und bei der Verteilung der Ursachen der Epilepsien.<sup>102</sup> Auch finden sich idiopathische generalisierte Epilepsien häufiger bei Frauen, während sich bei Männern häufiger fokale kortikale Dysplasien finden.<sup>102</sup>

Es gibt eine Reihe von Arbeiten zu dem Einfluss von Sexualhormonen auf die Epilepsie. So sind bei den Wachstumsfaktoren zyklusabhängige Veränderungen der GABAergen und glutamatergen Signalwege sowie der Expression von BDNF bekannt.<sup>92</sup> Allerdings finden sich wenige Vorarbeiten, bei denen die Expression von Wachstumsfaktoren bei TLE mit Hippocampussklerose und TLE ohne Hippocampussklerose verglichen wurden. Eine Arbeit, in der Patienten mit TLE und Hippocampussklerose und TLE ohne Hippocampussklerose in Bezug auf Geschlechtsabhängigkeit untersucht wurden, zeigte keinen Unterschied in der Expression von BDNF.<sup>103</sup>

Es zeigten sich keine signifikanten geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Expression der Wachstumsfaktoren (Tabelle 25 im Anhang). Dieses Ergebnis ist eventuell auch damit zu erklären, dass antikonvulsive Medikamente einen Einfluss auf die Expression der Sexualhormone haben.<sup>104</sup> Zudem resultiert die Hippocampussklerose meist aus einem initialen Ereignis, wie Fieberkrämpfen, Schädel-Hirn-Trauma, Entzündungen oder Schlaganfällen, die allesamt unabhängig vom Geschlecht sind.

### 5.1.7 Wachstumsfaktorenexpression und neuropsychologische Testung (vgl. 4.9)

Die neuropsychologischen Einschränkungen sind, neben den unmittelbaren Folgen der epileptischen Anfälle, der wichtigste Faktor für die Krankheitslast von Epilepsiepatienten.<sup>105</sup> Häufig werden die neuropsychologischen Komorbiditäten nicht adäquat therapiert, da der Fokus hauptsächlich auf der anfallssuppressiven Therapie liegt.<sup>105</sup>

Das Feld der neuropsychologischen Komorbiditäten der Epilepsie hat lange Zeit wenig Beachtung gefunden. Insbesondere zu dem Einfluss und der möglichen diagnostischen Rolle von Wachstumsfaktoren auf die neuropsychologischen Folgen der Epilepsie gibt es kaum Vorarbeiten. Die vorliegenden Daten aus den routinemäßig durchgeführten präoperativen neuropsychologischen Testungen wurden mit den experimentellen Daten korreliert, wobei sich signifikante Korrelationen zwischen BDNF und der Testung der Aufmerksamkeit sowie BDNF und der Testung des Verbalgedächtnisses zeigten. Des Weiteren fand sich eine negative Korrelation zwischen PDGFB und der Testung des Verbalgedächtnisses.

Lediglich eine positive Korrelation zwischen BDNF und der Verbesserung der Symptomlast bei depressiven Patienten ist vorbeschrieben.<sup>106</sup> Da eine reduzierte Aufmerksamkeit zu den Symptomen der Depression gehört, liefert dies zumindest einen Anhalt in der Literatur.

Es ist bekannt, dass BDNF die neuronale Plastizität begünstigt und somit auch für Lernprozesse und damit wahrscheinlich auch für neuropsychologische Komorbiditäten von Bedeutung ist.<sup>56,107,108</sup> Bei depressiven Patienten finden sich, unabhängig von der Epilepsie, niedrigere BDNF-Spiegel als bei Gesunden.<sup>106,109</sup> Zu beachten ist hierbei, dass BDNF auch mit der Anfallsfrequenz korreliert, sodass es sich dabei um einen Confounder handeln könnte. Allerdings fand sich zwischen der Anfallsfrequenz und den Ergebnissen der neuropsychologischen Testungen in dieser Arbeit keine signifikante Korrelation.

In der Literatur finden sich einige Daten dazu, dass die Ausbildung pathologischer Netzwerke nicht nur Teil der Epileptogenese ist, sondern auch einen negativen Einfluss auf die Kognition der Patienten hat.<sup>110-112</sup> Aus diesem Grund ist auch anzunehmen, dass Wachstumsfaktoren eine Rolle bei der Ausprägung neuropsychologischer Komorbiditäten spielen. Hinweise dazu gibt es für GDNF, für das eine positive Korrelation zwischen der Expression und der Kognition gezeigt wurde.<sup>103,104</sup>

## 5.2 Limitationen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit müssen vor dem Hintergrund einiger Limitationen betrachtet werden. Zunächst ist das kleine Patientenkollektiv (n=21) zu beachten, insbesondere da nicht in allen Proben alle Areale zu finden waren, was die Menge der auswertbaren Daten zusätzlich reduzierte. Dies ist insbesondere auf die operationsbedingte unterschiedliche Größe, Orientierung und Vollständigkeit der Resektate zurückzuführen. So waren in vielen Fällen lediglich Anteile des Hippocampus zu identifizieren.

Auch das unterschiedliche Präfixierungsintervall, die verwendeten Reagenzien, die Durchführung der Fixation und die Lagerbedingungen der Gewebeproben könnten einen Einfluss auf den Nachweis der Wachstumsfaktoren haben.<sup>113,114</sup> Da die in dieser Arbeit verwendeten Gewebe alle unmittelbar nach Resektion fixiert wurden, ist der Einfluss des Präfixierungsintervall allerdings eher als gering zu bewerten. Unterschiede, die durch verschiedene Lagerungsbedingungen hervorgerufen werden können<sup>114</sup>, sind ebenfalls unwahrscheinlich, da alle Gewebeproben bei gleichen Bedingungen gelagert wurden. Für das Postfixierungsintervall konnte hingegen kein Einfluss auf den immunhistochemischen Nachweis der Proteine gezeigt werden.<sup>113</sup>

Des Weiteren ist zu beachten, dass die Patienten sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befanden (Median 11 Krankheitsjahre. Mean 16,32 Krankheitsjahre), was einen Einfluss auf die Expression der Wachstumsfaktoren hat. Im Tiermodell fanden sich in frühen Stadien der Epileptogenese andere Expressionsmuster der Wachstumsfaktoren als in einem chronischen Stadium.<sup>23,24,115</sup> Die wenigen Studien, bei denen eine sequenzielle Untersuchung, wenn auch an Tiermodellen, während der Latenzperiode, also der frühen Phase, der Epileptogenese durchgeführt wurde, zeigten eine zeitabhängige, dynamische Genexpression.<sup>23,24,115</sup>

Epilepsiechirurgisch behandelte Patienten befinden sich in den meisten Fällen in einem fortgeschrittenen Stadium, wodurch Rückschlüsse auf die Expressionsmuster von Wachstumsfaktoren in frühen Stadien nicht möglich sind. Diese Einschränkung ist allerdings bei beinahe allen Untersuchungen, die an menschlichem Gewebe durchgeführt wurden, zu beachten.<sup>115</sup> Da die in dieser

Arbeit verwendeten Gewebeproben denen entsprechen, die auch im klinischen Alltag zur Verfügung stehen, können die Ergebnisse für die klinische Anwendung von diagnostischem und prädiktivem Nutzen sein.

Auch zu bedenken ist, dass die hier verwendeten Proben aus unterschiedlichen Regionen des Hippocampus stammen. Es wurden nicht alle Hippocampi vollständig beziehungsweise in unterschiedlicher Orientierung aufgeblockt. Es gibt Hinweise auf einen kraniokaudalen Gradienten bei der Expression von Proteinen, wie etwa Glia Fibrillary Acidic Protein (GFAP) oder Myelin Basic Protein (MBP).<sup>116</sup> Deshalb ist ein kraniokaudaler Gradient auch bei Wachstumsfaktoren vorstellbar. Ein Schnitt aus unterschiedlichen Regionen des Hippocampus könnte somit auch einen Einfluss auf den Nachweis der Wachstumsfaktoren haben.

Bei der Quantifizierung der Immunhistochemie ist zu bedenken, dass die Signalintensität von DAB nicht linear mit der Konzentration des angefärbten Proteins steigt, sondern eine Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration existiert.<sup>117-119</sup> Dieses Phänomen erschwert die quantitative Vergleichbarkeit verschiedener Proben untereinander. In dieser Arbeit wurden die verwendeten Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten über alle Versuchsreihen konstant gehalten, wodurch dieser Effekt minimiert wurde.

Neben dem Detektionssystem und der Antikörperkonzentration<sup>118</sup> haben auch die Affinität des Antikörpers, die Dauer der Fixierung und die Antigenfreilegung einen Einfluss auf die Ergebnisse der Immunhistochemie.<sup>120</sup> Da kein Gewebe für eine quantitative Analyse, wie den Western Blot, zur Verfügung stand, wurden die semiquantitativen Daten aus der Immunhistochemie für die Analyse verwendet.

### 5.3 Ausblick und klinische Anwendungen

Die hier dargestellten Ergebnisse sind auch vor dem Hintergrund möglicher klinischer Anwendung zu betrachten. Zum aktuellen Zeitpunkt ist kein Biomarker bekannt, der bereits in der klinisch stummen Phase der Epileptogenese Hinweise auf die Entstehung der Epilepsie liefert und somit die Epilepsie oder einen epileptischen Anfall voraussagt.<sup>121</sup> Zu diesem Zweck müssten sequenziell

Proben von Menschen gewonnen werden, die zu Beginn noch nicht an einer Epilepsie leiden, im Verlauf aber eine entwickeln.<sup>122</sup> Dies wäre nur möglich, wenn die Gewinnung der Proben auf einem wenig invasiven Weg, wie etwa aus Körperflüssigkeiten, erfolgen würde.

Zumindest aus Tiermodellen existieren Daten, die eine Korrelation zwischen den BDNF-Werten im Blut und denen im Hippocampus nachweisen konnten.<sup>123</sup> Beim Menschen wurden derartige vergleichende Untersuchungen bislang nicht durchgeführt. Zu beachten wäre dabei allerdings die geringe Spezifität von BDNF, da es auch bei anderen Krankheitsbildern, wie etwa zahlreichen psychiatrischen Erkrankungen zu einer veränderten Expression kommt.<sup>124</sup> BDNF ist somit weniger ein Biomarker für ein spezifisches Krankheitsbild als für den Grad der neuronalen Plastizität.<sup>124</sup>

Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche neue antikonvulsive Substanzen zugelassen wurden, konnte die Zahl der therapierefraktären Epilepsien kaum gesenkt werden.<sup>125,126</sup> Deshalb ist davon auszugehen, dass die Epilepsiechirurgie auch zukünftig einen großen Stellenwert bei den therapierefraktären Epilepsien haben wird. Vor diesem Hintergrund ist eine weitere Optimierung der prächirurgischen Evaluation erstrebenswert. Neben den etablierten klinischen Prädiktoren wäre zu diesem Zweck die Einführung eines Biomarkers wünschenswert, der das postoperative Outcome vorhersagt. Ein solcher Biomarker könnte somit der Entscheidungsfindung für oder gegen eine chirurgische Therapie dienen. Dadurch könnten die perioperativen Risiken minimiert und Therapieerfolge maximiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise darauf, dass GMFB als Biomarker für das postoperative Outcome in Frage kommt. Da die Messung der Expression von GMFB in reseziertem Gewebe erfolgte, ist im Verlauf eine vergleichende Untersuchung im Blut, Liquor, Speichel oder Urin im Sinne einer Liquid Biopsy, notwendig. Derartige Untersuchungen existieren bereits für andere Marker, sind allerdings bislang rein experimentell.<sup>127</sup> Sollten sich die Ergebnisse in der Liquid Biopsy bestätigen, könnte GMFB als weniger invasiver und vor allem präoperativer Biomarker herangezogen werden, um Therapieentscheidungen weiter zu objektivieren.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Deutsch

**Hintergrund:** Die Epilepsie gehört zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen beim Menschen. Bei Patienten mit mesialer TLE und Hippocampussklerose besteht die höchste Wahrscheinlichkeit, eine medikamentöse Therapierefraktärität zu entwickeln. Die Ursache der Hippocampussklerose sowie die ursächlichen Mechanismen sind nicht bekannt. Allerdings kann eine initiale Schädigung, wie etwa komplizierte Fieberkrämpfe im Kindesalter, Schädel-Hirn-Traumata, Schlaganfälle, entzündliche Prozesse oder Ähnliches, für die Entwicklung einer Hippocampussklerose prädisponieren. Diese kann anschließend nach einer klinisch stummen Latenzperiode zur Entwicklung spontaner epileptischer Anfälle und der Diagnose einer Epilepsie führen. Im Rahmen der Epileptogenese, also der Entstehung und Progression der Epilepsie kommt es zu Wachstumsprozessen, weshalb eine Beteiligung von neurotrophen Wachstumsfaktoren naheliegend war. Das Ziel dieser Arbeit war die vergleichende Untersuchung resezierter Hippocampi auf Wachstumsfaktoren, um semiquantitative Daten zu deren Verteilung bei Epilepsiepatienten zu erhalten. Des Weiteren war die Korrelation mit den klinischen Daten der Patienten von besonderem Interesse, da so Hinweise auf mögliche Zusammenhänge zwischen dem klinischen Erscheinungsbild und der Expression der Wachstumsfaktoren gewonnen werden konnten.

**Methoden:** Bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gewebe handelt es sich um Hippocampi von 21 Patienten mit TLE, die epilepsiechirurgisch therapiert wurden. Die Schnitte der paraffinierten Hippocampi wurden mittels Immunhistochemie auf die Wachstumsfaktoren BDNF, FGF2, GDNF, GMFB und PDGF-B untersucht. Im Anschluss wurden die Schnitte gescannt und die Zellen mittels eines Algorithmus identifiziert und ausgewertet. Diese experimentellen Daten wurden anschließend mit den klinischen Daten der Patienten korreliert.

**Ergebnisse:** Es fand sich eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von GMFB und dem postoperativen Outcome der Patienten. Des Weiteren fanden sich auch Korrelationen zwischen der präoperativen Anfallsfrequenz und der Expression von BDNF sowie GDNF. Auch die Epilepsiedauer korrelierte mit

der Expression von BDNF. Zudem fanden sich Korrelationen zwischen den Ergebnissen der neuropsychologischen Testungen und der Expression von BDNF, sowie PDGF-B.

**Diskussion:** Die vorliegende Arbeit liefert einige Daten, die Hinweise für nachfolgende Untersuchungen geben können. Sowohl für die Anfallsfrequenz, als auch für die Epilepsiedauer fanden sich signifikante Korrelationen mit BDNF. Beides ist passend zu den vermuteten und zum Teil in der Literatur beschriebenen Mechanismen im Rahmen der Epilepsie, also einer postiktalen Hochregulation von Wachstumsfaktoren beziehungsweise des Zugrundegehens von Zellen im Verlauf der Erkrankung und damit zu einer reduzierten Expression von Wachstumsfaktoren. Geschlechterabhängige Unterschiede in der Expression der Wachstumsfaktoren fanden sich, passend zu der vorhandenen Literatur, nicht. Interessant ist, dass sowohl Geschlechtshormone als auch anfallssuppressive Medikamente einen Einfluss auf die Expression der Wachstumsfaktoren haben können.

Bis heute ist kein Biomarker bekannt, der eine Vorhersage über den Erfolg einer operativen Therapie bei therapierefraktären TLE treffen kann. Da meine Daten eine Korrelation von GMFB und dem postoperativen Outcome zeigen, bietet es sich für weitere Untersuchungen an, GMFB als präoperativen Biomarker zu nutzen. zu können, wäre eine einfachere Probengewinnung beispielsweise aus Blut, Liquor, Urin oder Speichel notwendig. Im Sinne einer „Liquid Biopsy“ könnte so der Erfolg einer chirurgischen Therapie weiter objektiviert werden, was die Entscheidungsfindung einfacher und risikoärmer gestalten würde.

## 6.2 Englisch

**Background:** Epilepsy is one of the most common chronic neurological disorders. Patients with mesial TLE and hippocampal sclerosis are most likely to develop refractory to medication. The cause of hippocampal sclerosis, as well as the causative mechanisms, are unknown. However, initial damage, such as complicated febrile seizures in childhood, traumatic brain injury, stroke, inflammatory processes, or others, may be a predisposition to the development of hippocampal sclerosis. This may subsequently lead to the development of spontaneous epileptic seizures and the diagnosis of epilepsy after a clinically silent latency period. In the course of epileptogenesis, that is, the development and progression of epilepsy, growth processes occur, and therefore, the involvement of neurotrophic growth factors was suggested. The aim of this work was the comparative examination of resected hippocampi for the expression of growth factors to obtain semiquantitative data on their distribution in epilepsy patients. Furthermore, correlation with the clinical data of the patients was of particular interest, as this would provide evidence for possible correlations between the clinical presentation and the expression of growth factors.

**Methods:** The tissues studied in the present work were hippocampi from 21 patients with TLE who underwent epilepsy surgery. Sections of paraffin-embedded hippocampi were analyzed by immunohistochemistry for the growth factors BDNF, FGF2, GDNF, GMFB, and PDGF-B. Subsequently, the sections were scanned and the cells were identified and analyzed using an algorithm. These experimental data were then correlated with the clinical data of the patients.

**Results:** A significant correlation was found between the expression of GMFB and the postoperative outcome of the patients. Furthermore, correlations were also found between preoperative seizure frequency and the expression of BDNF, as well as GDNF. Epilepsy duration also correlated with the expression of BDNF. In addition, correlations were found between the results of neuropsychological testing and the expression of BDNF, as well as PDGF-B.

**Discussion:** The present work provides some data that may give clues for subsequent studies. Significant correlations with BDNF were found for both

seizure frequency and epilepsy duration. Both are consistent with the presumed mechanisms in epilepsy described in part in the literature, that is, a postictal upregulation of growth factors and the death of cells in the course of the disease, respectively, leading to a reduced expression of growth factors. Gender-dependent differences in growth factor expression were not found, consistent with the existing literature. Interestingly, both sex hormones and seizure-suppressing drugs may have an impact on growth factor expression.

To date, no biomarker is known to predict the success of surgical therapy in refractory TLE. Since my data show a correlation of GMFB and postoperative outcome, it lends itself to further investigation. To use GMFB as a preoperative biomarker, a simpler sample collection, for example, from blood, CSF, urine, or saliva, would be necessary. In the sense of a "liquid biopsy", the success of a surgical therapy could thus be further objectified, which would make decision-making easier and less risky.

## 7 Liste der verwendeten Materialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Citronensäure-Monohydrat	CAS-Nr.: 5949-29-1	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DAB Substrate (metal enhanced, precipitating)	DAB	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat (wasserfrei)	CAS-Nr.: 7558-79-4	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol	CAS-Nr.: 3483-12-3	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Entellan		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Reference 1000	Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research 2,5; 10; 100; 1000; 5000	Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Ethanol	CAS-Nr.: 64-17-5	Fisher Scientific UK Ltd, Leicestershire, UK
Feuchtekammer		N/A
iBlot Gel Transfer Stacks PVDF, Regular	Transferkit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
inoLab pH Level 1	pH-Meter	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	CAS-Nr.: 7778-77-0	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte		N/A
Major Science Orbital Shaker	Orbitalschüttler	Major Science, Saratoga, CA, USA
Methanol	CAS-Nr.: 67-56-1	Fisher Scientific UK Ltd, Leicestershire, UK
NanoZoomer S360	Scanner	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH
Natriumchlorid	CAS-Nr.: 7647-14-5	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sartorius BP221S	Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Sartorius Portable PT2100	Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
SEVERIN Microwave 800	Mikrowelle	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	CAS-Nr.: 6132-04-3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20, viscous liquid	CAS Nr.: 9005-64-5	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Vectastain ABC Kit, Peroxidase (Standard)	ABC	Vector Laboratories, Inc., Newark, USA
Wasserstoffperoxid	CAS Nr.: 7722-84-1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylene	CAS Nr.: 1330-20-7	Fisher Scientific UK Ltd, Leicestershire, UK

**Tabelle 22: Materialien Immunhistochemie**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
ChemiDoc MP Imaging System		Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
peqPower 250	Elektrophoresegerät	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
iBlot Dry Blotting System	Geltransfergerät	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Roti-Block 10x Konzentrat	Blockierungsreagenz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NuPage 4-12% Bis-Tris Gel 1,5mm X 15 well	Gel	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
NuPage MES SDS Running Buffer (20X)	Running Buffer	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Eppendorf Research 2,5; 10; 100; 1000; 5000	Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Reference 1000	Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
iBlot Gel Transfer Stacks PVDF, Regular	Transfer-Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Immobilon Forte Western HRP Substrate		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MagicMark XP Western-Proteinstandard	Magic Marker	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Major Science Orbital Shaker	Orbitalschüttler	Major Science, Saratoga, CA, USA
XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System	Kammer Elektrophorese	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Precision Plus Protein All Blue Standards	Magic Marker	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Spectra Multicolor High Range Protein Ladder	Color Marker	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Thermomixer compact	Thermoschüttler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Heraeus Biofuge Pico	Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

**Tabelle 23: Materialien Western Blot**

## 8 Literatur

1. Misonou H. Homeostatic regulation of neuronal excitability by K(+) channels in normal and diseased brains. *Neuroscientist*. 2010;16(1):51-64. doi:10.1177/1073858409341085
2. Schulz DJ, Baines RA, Hempel CM, Li L, Liss B, Misonou H. Cellular excitability and the regulation of functional neuronal identity: from gene expression to neuromodulation. *J Neurosci*. 2006;26(41):10362-10367. doi:10.1523/JNEUROSCI.3194-06.2006
3. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475-482. doi:10.1111/epi.12550
4. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*. 2017;88(3):296-303. doi:10.1212/WNL.0000000000003509
5. World Health Organisation. Epilepsy fact sheet. Accessed June 11, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
6. Fiest KM, Birbeck GL, Jacoby A, Jette N. Stigma in epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2014;14(5):444. doi:10.1007/s11910-014-0444-x
7. Tellez-Zenteno JF, Patten SB, Jetté N, Williams J, Wiebe S. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. *Epilepsia*. 2007;48(12):2336-2344. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01222.x
8. Hamer HM, Spottke A, Aletsee C, et al. Direct and indirect costs of refractory epilepsy in a tertiary epilepsy center in Germany. *Epilepsia*. 2006;47(12):2165-2172. doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00889.x
9. Begley CE, Beghi E. The economic cost of epilepsy: a review of the literature. *Epilepsia*. 2002;43 Suppl 4:3-9. doi:10.1046/j.1528-1157.43.s.4.2.x
10. Tomson T, Walczak T, Sillanpaa M, Sander JWAS. Sudden unexpected death in epilepsy: a review of incidence and risk factors. *Epilepsia*. 2005;46(s11):54-61. doi:10.1111/j.1528-1167.2005.00411.x
11. West S, Nevitt SJ, Cotton J, et al. Surgery for epilepsy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;6(6):CD010541. doi:10.1002/14651858.CD010541.pub3
12. Engel J. The current place of epilepsy surgery. *Curr Opin Neurol*. 2018;31(2):192-197. doi:10.1097/WCO.0000000000000528
13. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, et al. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 2010;51(6):1069-1077. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x

14. Thom M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review: Hippocampal sclerosis in epilepsy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(5):520-543. doi:10.1111/nan.12150
15. Blümcke I, Coras R, Miyata H, Özkara C. Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: neuropathological findings in mTLE-HS. *Brain Pathol.* 2012;22(3):402-411. doi:10.1111/j.1750-3639.2012.00583.x
16. De Tisi J, Bell GS, Peacock JL, et al. The long-term outcome of adult epilepsy surgery, patterns of seizure remission, and relapse: a cohort study. *Lancet.* 2011;378(9800):1388-1395. doi:10.1016/S0140-6736(11)60890-8
17. Löscher W, Potschka H, Sisodiya SM, Vezzani A. Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. Barker EL, ed. *Pharmacol Rev.* 2020;72(3):606-638. doi:10.1124/pr.120.019539
18. Kwan P, Schachter SC, Brodie MJ. Drug-Resistant Epilepsy. *New Engl J Med.* 2011;365(10):919-926. doi:10.1056/NEJMra1004418
19. Fisher RS, Cross JH, French JA, et al. Operational classification of seizure types by the international league against epilepsy: position paper of the ILAE commission for classification and terminology. *Epilepsia.* 2017;58(4):522-530. doi:10.1111/epi.13670
20. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017;58(4):512-521. doi:10.1111/epi.13709
21. Balestrini S, Arzimanoglou A, Blümcke I, et al. The aetiologies of epilepsy. *Epileptic Disord.* 2021;23(1):1-16. doi:10.1684/epd.2021.1255
22. Scharfman HE. The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2007;7(4):348-354. doi:10.1007/s11910-007-0053-z
23. Pitkänen A, Lukasiuk K, Dudek FE, Staley KJ. Epileptogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(10):a022822. doi:10.1101/cshperspect.a022822
24. Pitkänen A, Lukasiuk K. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol.* 2011;10(2):173-186. doi:10.1016/S1474-4422(10)70310-0
25. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci.* 2013;36(3):174-184. doi:10.1016/j.tins.2012.11.008
26. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J*

- Neurosci.* 2000;20(16):6144-6158. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-16-06144.2000
27. Hesdorffer DC, Hauser WA, Annegers JF, Kokmen E, Rocca WA. Dementia and adult-onset unprovoked seizures. *Neurology*. 1996;46(3):727-730. doi:10.1212/WNL.46.3.727
  28. Friedman D, Honig LS, Scarmeas N. Seizures and epilepsy in Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther*. 2012;18(4):285-294. doi:10.1111/j.1755-5949.2011.00251.x
  29. Subota A, Pham T, Jetté N, Sauro K, Lorenzetti D, Holroyd-Leduc J. The association between dementia and epilepsy: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia*. 2017;58(6):962-972. doi:10.1111/epi.13744
  30. Syvertsen M, Nakken KO, Edland A, Hansen G, Hellum MK, Koht J. Prevalence and etiology of epilepsy in a Norwegian county-A population based study. *Epilepsia*. 2015;56(5):699-706. doi:10.1111/epi.12972
  31. Rosenow F, Bast T, Czech T, et al. Revised version of quality guidelines for presurgical epilepsy evaluation and surgical epilepsy therapy issued by the Austrian, German, and Swiss working group on presurgical epilepsy diagnosis and operative epilepsy treatment. *Epilepsia*. 2016;57(8):1215-1220. doi:10.1111/epi.13449
  32. Feindel W, Leblanc R, De Almeida AN. Epilepsy Surgery: Historical Highlights 1909-2009. *Epilepsia*. 2009;50:131-151. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02043.x
  33. Rosenow F. Presurgical evaluation of epilepsy. *Brain*. 2001;124(9):1683-1700. doi:10.1093/brain/124.9.1683
  34. Ryvlin P, Cross JH, Rheims S. Epilepsy surgery in children and adults. *Lancet Neurol*. 2014;13(11):1114-1126. doi:10.1016/S1474-4422(14)70156-5
  35. Davies JA. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Seizure*. 1995;4(4):267-271. doi:10.1016/S1059-1311(95)80003-4
  36. Kobayashi K, Endoh F, Ohmori I, Akiyama T. Action of antiepileptic drugs on neurons. *Brain Dev*. 2020;42(1):2-5. doi:10.1016/j.braindev.2019.07.006
  37. Gu J, Lynch BA, Anderson D, et al. The antiepileptic drug levetiracetam selectively modifies kindling-induced alterations in gene expression in the temporal lobe of rats: Levetiracetam and kindling-induced changes in gene expression. *Eur J Neurosci*. 2004;19(2):334-345. doi:10.1111/j.0953-816X.2003.03106.x
  38. Christensen KV, Leffers H, Watson WP, Sánchez C, Kallunki P, Egebjerg J. Levetiracetam attenuates hippocampal expression of synaptic plasticity-related immediate early and late response genes in amygdala-kindled rats. *BMC Neurosci*. 2010;11(1):9. doi:10.1186/1471-2202-11-9

39. Engel J. Early Surgical Therapy for Drug-Resistant Temporal Lobe Epilepsy: A Randomized Trial. *JAMA*. 2012;307(9):922. doi:10.1001/jama.2012.220
40. Berg AT, Langfitt J, Shinnar S, et al. How long does it take for partial epilepsy to become intractable? *Neurology*. 2003;60(2):186-190. doi:10.1212/01.WNL.0000031792.89992.EC
41. Wieser HG, Blume WT, Fish D, et al. ILAE Commission Report. Proposal for a new classification of outcome with respect to epileptic seizures following epilepsy surgery. *Epilepsia*. 2001;42(2):282-286.
42. West S, Nolan SJ, Newton R. Surgery for epilepsy: a systematic review of current evidence. *Epileptic Disord*. 2016;18(2):113-121. doi:10.1684/epd.2016.0825
43. Blumcke I, Spreafico R, Haaker G, et al. Histopathological Findings in Brain Tissue Obtained during Epilepsy Surgery. *New Engl J Med*. 2017;377(17):1648-1656. doi:10.1056/NEJMoa1703784
44. Jobst BC, Cascino GD. Resective Epilepsy Surgery for Drug-Resistant Focal Epilepsy: A Review. *JAMA*. 2015;313(3):285. doi:10.1001/jama.2014.17426
45. Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M. A Randomized, Controlled Trial of Surgery for Temporal-Lobe Epilepsy. *New Engl J Med*. 2001;345(5):311-318. doi:10.1056/NEJM200108023450501
46. Binder DK, Scharfman HE, Anderson B, eds. *Growth Factors and Epilepsy*. Nova Science Publishers; 2005, pp. 1-237.
47. Knierim JJ. The Hippocampus. *Curr Biol*. 2015;25(23):R1116-R1121. doi:10.1016/j.cub.2015.10.049
48. Milner B. Visually-guided maze learning in man: Effects of bilateral hippocampal, bilateral frontal, and unilateral cerebral lesions. *Neuropsychologia*. 1965;3(4):317-338. doi:10.1016/0028-3932(65)90005-9
49. Duvernoy HM, Cattin F, Risold PY, Vannson JL, Gaudron M. *The Human Hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI*. Fourth edition. Springer; 2013, pp. 1-232.
50. Bouchet C, Cazauvieilh JB. *De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale.: Recherches sur la nature et le siège de ces deux maladies; mémoire qui a remporté le prix au concours établi par M. Esquirol (2 septembre 1825)*,. Imprimerie de Migneret, rue du Dragon, no. 20.; 1825.
51. Sommer W. Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie. *Arch Psychiatr Nervenkr (1970)*. 1880;10(3):631-675. doi:10.1007/BF02224538

52. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet*. 2019;393(10172):689-701. doi:10.1016/S0140-6736(18)32596-0
53. Blümcke I, Thom M, Aronica E, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*. 2013;54(7):1315-1329. doi:10.1111/epi.12220
54. Blümcke I, Aronica E, Miyata H, et al. International recommendation for a comprehensive neuropathologic workup of epilepsy surgery brain tissue: A consensus Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*. 2016;57(3):348-358. doi:10.1111/epi.13319
55. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1(5):549-553.
56. Binder DK, Scharman HE. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*. 2004;22(3):123-131. doi:10.1080/08977190410001723308
57. Iughetti L, Lucaccioni L, Fugetto F, Predieri B, Berardi A, Ferrari F. Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy: a systematic review. *Neuropeptides*. 2018;72:23-29. doi:10.1016/j.npep.2018.09.005
58. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*. 2018;38(3):579-593. doi:10.1007/s10571-017-0510-4
59. Isackson PJ, Huntsman MM, Murray KD, Gall CM. BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron*. 1991;6(6):937-948. doi:10.1016/0896-6273(91)90234-q
60. Zucchini S, Buzzi A, Barbieri M, et al. FGF-2 Overexpression increases excitability and seizure susceptibility but decreases seizure-induced cell loss. *J Neurosci*. 2008;28(49):13112-13124. doi:10.1523/JNEUROSCI.1472-08.2008
61. Woodbury ME, Ikezu T. Fibroblast Growth Factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2014;9(2):92-101. doi:10.1007/s11481-013-9501-5
62. Lin LFH, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. 1993;260(5111):1130-1132. doi:10.1126/science.8493557
63. Pochon NAM, Menoud A, Tseng JL, Zurn AD, Aebischer P. Neuronal GDNF expression in the adult rat nervous system identified by In situ hybridization. *Eur J Neurosci*. 1997;9(3):463-471. doi:10.1111/j.1460-9568.1997.tb01623.x

64. Chiavellini P, Canatelli-Mallat M, Lehmann M, Goya R, Morel G. Therapeutic potential of glial cell line-derived neurotrophic factor and cell reprogramming for hippocampal-related neurological disorders. *Neural Regen Res.* 2022;17(3):469. doi:10.4103/1673-5374.320966
65. Mikroulis A, Waloschková E, Bengzon J, et al. GDNF increases inhibitory synaptic drive on principal neurons in the hippocampus via activation of the ret pathway. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21):13190. doi:10.3390/ijms232113190
66. Kanter-Schlifke I, Georgievska B, Kirik D, Kokaia M. Seizure suppression by GDNF gene therapy in animal models of epilepsy. *Mol Ther.* 2007;15(6):1106-1113. doi:10.1038/sj.mt.6300148
67. Yoo YM, Lee CJ, Lee U, Kim YJ. Neuroprotection of adenoviral-vector-mediated GDNF expression against kainic-acid-induced excitotoxicity in the rat hippocampus. *Exp Neurol.* 2006;200(2):407-417. doi:10.1016/j.expneurol.2006.02.132
68. Fan J, Fong T, Chen X, Chen C, Luo P, Xie H. Glia maturation factor- $\beta$ : a potential therapeutic target in neurodegeneration and neuroinflammation. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2018;Volume 14:495-504. doi:10.2147/NDT.S157099
69. Wang BR, Zaheer A, Lim R. Polyclonal antibody localizes glia maturation factor  $\beta$ -like immunoreactivity in neurons and glia. *Brain Res.* 1992;591(1):1-7. doi:10.1016/0006-8993(92)90971-B
70. Hotta N, Aoyama M, Inagaki M, et al. Expression of glia maturation factor beta after cryogenic brain injury. *Mol Brain Res.* 2005;133(1):71-77. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.09.027
71. Funa K, Sasahara M. The Roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous System. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2014;9(2):168-181. doi:10.1007/s11481-013-9479-z
72. Beazely MA, Lim A, Li H, et al. Platelet-derived growth factor selectively inhibits NR2B-containing N-Methyl-D-aspartate receptors in CA1 hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 2009;284(12):8054-8063. doi:10.1074/jbc.M805384200
73. Cheng B, Mattson M. PDGFs protect hippocampal neurons against energy deprivation and oxidative injury: evidence for induction of antioxidant pathways. *J Neurosci.* 1995;15(11):7095-7104. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-11-07095.1995
74. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Exp Biol Med.* 1941;47(2):200-202. doi:10.3181/00379727-47-13084P
75. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2005;42(4):405-426. doi:10.1354/vp.42-4-405

76. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76(9):4350-4354. doi:10.1073/pnas.76.9.4350
77. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):16878. doi:10.1038/s41598-017-17204-5
78. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
79. Padurariu M, Ciobica A, Mavroudis I, Fotiou D, Baloyannis S. Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub.* 2012;24(2):152-158.
80. Brocher J. biovoxxel/BioVoxxel-Toolbox: BioVoxxel Toolbox. Published online February 6, 2022. doi:10.5281/ZENODO.5986130
81. Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc.* 1952;47(260):583-621. doi:10.1080/01621459.1952.10483441
82. Zhang L, Hou X, Wang X. Conditional downregulation of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B blocks epileptogenesis in the human temporal lobe epilepsy hippocampus. *Neurol India.* 2010;58(1):29. doi:10.4103/0028-3886.60392
83. Takahashi M, Hayashi S, Kakita A, et al. Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y. *Brain Res.* 1999;818(2):579-582. doi:10.1016/S0006-8993(98)01355-9
84. Wang F, Li C, Hou X, Wang R, Zhang L. Selective upregulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts and BDNF direct induction of activity independent N-Methyl-D-Aspartate currents in temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis. *J Int Med Res.* 2011;39(4):1358-1368. doi:10.1177/147323001103900422
85. Zaheer A, Yorek MA, Lim R. Effects of glia maturation factor overexpression in primary astrocytes on MAP kinase activation, transcription factor activation, and neurotrophin secretion. *Neurochem Res.* 2001;26(12):1293-1299. doi:10.1023/a:1014241300179
86. Lim R, Zaheer A, Yorek MA, Darby CJ, Oberley LW. Activation of nuclear factor-κB in C6 rat glioma cells after transfection with glia maturation factor. *J Neurochem.* 2001;74(2):596-602. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.740596.x
87. Yuan Z, Yu Z, Zhang Y, Yang H. Analysis of the clinical diagnostic value of GMFB in cerebral infarction. *Curr Pharm Biotechnol.* 2020;21(10):955-963. doi:10.2174/1389201021666200210102425

88. Yin G, Du M, Li R, et al. Glia maturation factor beta is required for reactive gliosis after traumatic brain injury in zebrafish. *Exp Neurol*. 2018;305:129-138. doi:10.1016/j.expneurol.2018.04.008
89. Hong Z, Li W, Qu B, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in epilepsy. *Eur J Neurol*. 2014;21(1):57-64. doi:10.1111/ene.12232
90. Bath KG, Pimentel T. Effect of early postnatal exposure to valproate on neurobehavioral development and regional BDNF expression in two strains of mice. *Epilepsy Behav EB*. 2017;70(Pt A):110-117. doi:10.1016/j.yebeh.2017.02.026
91. Shi XY, Wang JW, Cui H, Li BM, Lei GF, Sun RP. Effects of antiepileptic drugs on mRNA levels of BDNF and NT-3 and cell neogenesis in the developing rat brain. *Brain Dev*. 2010;32(3):229-235. doi:10.1016/j.braindev.2009.03.012
92. Nawa H, Carnahan J, Gall C. BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci*. 1995;7(7):1527-1535. doi:10.1111/j.1460-9568.1995.tb01148.x
93. Birbeck GL, Hays RD, Cui X, Vickrey BG. Seizure reduction and quality of life improvements in people with epilepsy. *Epilepsia*. 2002;43(5):535-538. doi:10.1046/j.1528-1157.2002.32201.x
94. Kovac S, Dinkova Kostova A, Herrmann A, Melzer N, Meuth S, Gorji A. Metabolic and homeostatic changes in seizures and acquired epilepsy—mitochondria, calcium dynamics and reactive oxygen species. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1935. doi:10.3390/ijms18091935
95. Mathern GW, Babb TL, Micevych PE, Blanco CE, Pretorius JK. Granule cell mRNA levels for BDNF, NGF, and NT-3 correlate with neuron losses or supragranular mossy fiber sprouting in the chronically damaged and epileptic human hippocampus. *Mol Chem Neuropathol*. 1997;30(1-2):53-76. doi:10.1007/BF02815150
96. Poniatowski ŁA, Cudna A, Kurczyk K, Bronisz E, Kurkowska-Jastrzębska I. Kinetics of serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) concentration levels in epileptic patients after generalized tonic-clonic seizures. *Epilepsy Res*. 2021;173:106612. doi:10.1016/j.epilepsyres.2021.106612
97. Fujimura H, Altar CA, Chen R, et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost*. 2002;87(4):728-734.
98. Poduslo JF, Curran GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996;36(2):280-286. doi:10.1016/0169-328x(95)00250-v

99. Johnson-Farley NN, Patel K, Kim D, Cowen DS. Interaction of FGF-2 with IGF-1 and BDNF in stimulating Akt, ERK, and neuronal survival in hippocampal cultures. *Brain Res.* 2007;1154:40-49. doi:10.1016/j.brainres.2007.04.026
100. Chen K, Henry RA, Hughes SM, Connor B. Creating a neurogenic environment: The role of BDNF and FGF2. *Mol Cell Neurosci.* 2007;36(1):108-120. doi:10.1016/j.mcn.2007.06.004
101. Singh M, Kakkar A, Sharma R, et al. Synergistic effect of BDNF and FGF2 in efficient generation of functional dopaminergic neurons from human mesenchymal stem cells. *Sci Rep.* 2017;7:10378. doi:10.1038/s41598-017-11028-z
102. Scharfman HE, MacLusky NJ. Sex differences in the neurobiology of epilepsy: A preclinical perspective. *Neurobiol Dis.* 2014;72:180-192. doi:10.1016/j.nbd.2014.07.004
103. Wang F, Lin Y, Kang D, Chen F, Lin K, Su X. Distribution and expression of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophic factor-3 in refractory epilepsy-associated focal cortical dysplasia. *Clin Neuropathol.* 2017;36(09):233-239. doi:10.5414/NP301026
104. Stoffel-Wagner B, Bauer J, Flugel D, Brennemann W, Klingmuller D, Elger CE. Serum sex hormones are altered in patients with chronic temporal lobe epilepsy receiving anticonvulsant medication. *Epilepsia.* 1998;39(11):1164-1173. doi:10.1111/j.1528-1157.1998.tb01307.x
105. Helmstaedter C, Witt JA. How neuropsychology can improve the care of individual patients with epilepsy. Looking back and into the future. *Seizure.* 2017;44:113-120. doi:10.1016/j.seizure.2016.09.010
106. Brunoni AR, Lopes M, Fregni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008;11(8):1169-1180. doi:10.1017/S1461145708009309
107. Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 2014;76:639-656. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.005
108. Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction. In: Lewin GR, Carter BD, eds. *Neurotrophic Factors*. Vol 220. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer Berlin Heidelberg; 2014:223-250. doi:10.1007/978-3-642-45106-5\_9. pp. 223-250.
109. Bus B a. A, Molendijk ML, Tendolkar I, et al. Chronic depression is associated with a pronounced decrease in serum brain-derived neurotrophic factor over time. *Mol Psychiatry.* 2015;20(5):602-608. doi:10.1038/mp.2014.83
110. Bear JJ, Chapman KE, Tregellas JR. The epileptic network and cognition: What functional connectivity is teaching us about the childhood epilepsies. *Epilepsia.* 2019;60(8):1491-1507. doi:10.1111/epi.16098

111. Helmstaedter C, Witt JA. Epilepsy and cognition – A bidirectional relationship? *Seizure*. 2017;49:83-89. doi:10.1016/j.seizure.2017.02.017
112. Cho KO, Lybrand ZR, Ito N, et al. Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nat Commun*. 2015;6(1):6606. doi:10.1038/ncomms7606
113. Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(5):537-543. doi:10.5858/2010-0702-RAIR.1
114. Xie R, Chung JY, Ylaya K, et al. Factors Influencing the Degradation of Archival Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Sections. *J Histochem Cytochem*. 2011;59(4):356-365. doi:10.1369/0022155411398488
115. Lukasiuk K, Dabrowski M, Adach A, Pitkänen A. Epileptogenesis-related genes revisited. *Prog Brain Res*. 2006;158:223-241. doi:10.1016/S0079-6123(06)58011-2
116. Sjölin K, Kultima K, Larsson A, et al. Distribution of five clinically important neuroglial proteins in the human brain. *Mol Brain*. 2022;15(1):52. doi:10.1186/s13041-022-00935-6
117. Rimm DL. What brown cannot do for you. *Nat Biotechnol*. 2006;24(8):914-916. doi:10.1038/nbt0806-914
118. McCORMICK D, Yu C, Hobbs C, Hall PA. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology*. 1993;22(6):543-547. doi:10.1111/j.1365-2559.1993.tb00174.x
119. Wicht H, Maronde E, Olcese J, Korf HW. A semiquantitative image-analytical method for the recording of dose-response curves in immunocytochemical preparations. *J Histochem Cytochem*. 1999;47(3):411-419. doi:10.1177/002215549904700315
120. Hall PA, Lane DP. p53 In tumour pathology: Can we trust immunohistochemistry?—revisited! *J Pathol*. 1994;172(1):1-4. doi:10.1002/path.1711720103
121. Kuhlmann L, Lehnertz K, Richardson MP, Schelter B, Zaveri HP. Seizure prediction — ready for a new era. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(10):618-630. doi:10.1038/s41582-018-0055-2
122. Sueri C, Gasparini S, Balestrini S, et al. Diagnostic biomarkers of epilepsy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(6):440-450. doi:10.2174/1389201019666180713095251
123. Klein AB, Williamson R, Santini MA, et al. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011;14(03):347-353. doi:10.1017/S1461145710000738

124. Cattaneo A, Cattane N, Begni V, Pariante CM, Riva MA. The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. *Transl Psychiatry*. 2016;6(11):e958-e958. doi:10.1038/tp.2016.214
125. Löscher W, Schmidt D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. *Epilepsia*. 2011;52(4):657-678. doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03024.x
126. Brodie MJ, Barry SJE, Bamagous GA, Norrie JD, Kwan P. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. *Neurology*. 2012;78(20):1548-1554. doi:10.1212/WNL.0b013e3182563b19
127. Whitlock JH, Soelter TM, Williams AS, Hardigan AA, Lasseigne BN. Liquid biopsies in epilepsy: biomarkers for etiology, diagnosis, prognosis, and therapeutics. *Hum Cell*. 2022;35(1):15-22. doi:10.1007/s13577-021-00624-x

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <b>Klassifikation der Epilepsien</b> .....	10
Abbildung 2: <b>Zeitstrahl Epileptogenese</b> .....	12
Abbildung 3: <b>Verteilung der Ätiologien aller Epilepsien</b> .....	13
Abbildung 4: <b>Abbildungen der Areale des menschlichen Hippocampus</b> ...	20
Abbildung 5: <b>BDNF-Färbung des Resektats eines humanen Hippocampus, exemplarische Abbildung der Areale DG, CA1-CA4</b> .....	32
Abbildung 6: <b>FGF2-Färbung des Resektats eines humanen Hippocampus, exemplarische Abbildung der Areale DG, CA1-CA4</b> .....	33
Abbildung 7: <b>GDNF-Färbung des Resektats eines humanen Hippocampus, exemplarische Abbildung der Areale DG, CA1-CA4</b> .....	34
Abbildung 8: <b>GMFB-Färbung des Resektats eines humanen Hippocampus, exemplarische Abbildung der Areale DG, CA1-CA4</b> .....	35
Abbildung 9: <b>PDGF-B-Färbung des Resektats eines humanen Hippocampus, exemplarische Abbildung der Areale DG, CA1-CA4</b> .....	36
Abbildung 10: <b>Western Blot zur Validierung der Antikörper</b> .....	39
Abbildung 11: <b>Eingezeichnete Areale, Schnitt eines resezierten humanen Hippocampus, BDNF-Färbung</b> .....	41
Abbildung 12: <b>Durch Algorithmus markierte Zellen, Schnitt eines resezierten humanen Hippocampus, BDNF-Färbung</b> .....	44
Abbildung 13: <b>Vergleich der Expression von GDNF in CA1 in normalem Gewebe und Hippocampussklerose</b> .....	50
Abbildung 14: <b>GDNF-Färbung, exemplarische Gegenüberstellung von sklerotischem und nicht sklerotischem Gewebe des Areals CA1</b> .....	51
Abbildung 15: <b>Heatmap der Korrelationen</b> .....	52
Abbildung 16: <b>Darstellung der Korrelation der Expression von GMFB im DG und dem postoperativen Outcome</b> .....	53
Abbildung 17: <b>Darstellung der Korrelation der Expression von GMFB in CA1 und dem postoperativen Outcome</b> .....	54
Abbildung 18: <b>GMFB-Färbung, exemplarische Gegenüberstellung von Gewebe der Areale DG und CA1</b> .....	55
Abbildung 19: <b>Darstellung der Korrelation der Expression von BDNF in CA2/3 und CA4 und der Epilepsiedauer</b> .....	57
Abbildung 20: <b>BDNF-Färbung, exemplarische Gegenüberstellung von Gewebe der Areale CA2/3 und CA4</b> .....	58

Abbildung 21: <b>Darstellung der Korrelation der Expression von BDNF in CA2/3, GDNF in CA1 und CA4 und der Anfallsfrequenz</b> .....	59
Abbildung 22: <b>GDNF-Färbung, exemplarische Gegenüberstellung von Gewebe der Areale CA4 und CA1</b> .....	60
Abbildung 23: <b>BDNF-Färbung, exemplarische Gegenüberstellung von Gewebe der Areale CA2/3</b> .....	61
Abbildung 24: <b>Scatter Plot der Expression von BDNF in CA1 und den Testergebnissen der Aufmerksamkeit</b> .....	64
Abbildung 25: <b>Scatter Plot der Expression von BDNF in CA1 und den Testergebnissen des Verbalgedächtnisses</b> .....	65
Abbildung 26: <b>Scatter Plot der Expression von PDGF-B in CA4 und den Testergebnissen des Verbalgedächtnisses</b> .....	66

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <b>Klassifikation des postoperativen Outcomes der ILAE</b> .....	17
Tabelle 2: <b>Klassifikation der Hippocampussklerosen</b> .....	22
Tabelle 3: <b>Primärantikörper Immunhistochemie</b> .....	28
Tabelle 4: <b>Protokoll Immunhistochemie</b> .....	31
Tabelle 5: <b>Primärantikörper Western Blot</b> .....	38
Tabelle 6: <b>Charakteristika des Patientenkollektivs</b> .....	47
Tabelle 7: <b>Erhobene klinische Daten der Patienten</b> .....	48
Tabelle 8: <b>Mittelwerte und Standardabweichung der Grauwerte von GDNF in CA1 in normalem Gewebe und Hippocampussklerosen</b> .....	50
Tabelle 9: <b>Kruskal-Wallis-Test der Expression von GDNF in CA1 in normalem Gewebe und Hippocampussklerosen</b> .....	50
Tabelle 10: <b>Postoperatives Outcome der Patienten nach ILAE</b> .....	53
Tabelle 11: <b>Korrelationsanalyse Wachstumsfaktoren und Outcome</b> .....	54
Tabelle 12: <b>Korrelationsanalyse Wachstumsfaktoren und Epilepsiedauer</b> .....	57
Tabelle 13: <b>Signifikanzanalyse von Wachstumsfaktoren und Anfallsfrequenz</b> .....	60
Tabelle 14: <b>Signifikanzanalyse der Wachstumsfaktoren miteinander</b> .....	62
Tabelle 15: <b>Signifikanzanalyse der geschlechterabhängigen Expression der Wachstumsfaktoren</b> .....	63
Tabelle 16: <b>Daten der Expression von BDNF in CA1 und den Testergebnissen der Aufmerksamkeit</b> .....	65

Tabelle 16: <b>Signifikanzanalyse der Expression von PDGF-B in CA4 und den Testergebnissen der Aufmerksamkeit.....</b>	65
Tabelle 18: <b>Daten der Expression von BDNF in CA1 und den Testergebnissen des Verbalgedächtnisses .....</b>	66
Tabelle 19: <b>Signifikanzanalyse der Expression von PDGF-B in CA4 und den Testergebnissen des Verbalgedächtnisses .....</b>	66
Tabelle 20: <b>Daten der Expression von PDGF-B in CA4 und den Testergebnissen des Verbalgedächtnisses .....</b>	67
Tabelle 21: <b>Signifikanzanalyse der Expression von PDGF-B in CA4 und den Testergebnissen des Verbalgedächtnisses .....</b>	67
Tabelle 22: <b>Materialien Immunhistochemie .....</b>	84
Tabelle 23: <b>Materialien Western Blot.....</b>	85
Tabelle 24: <b>Signifikanzanalyse der Expression von Wachstumsfaktoren bei Hippocampussklerosen und in normalem Gewebe.....</b>	100
Tabelle 25: <b>Signifikante Ergebnisse der Multivariat Analyse .....</b>	101

## 11 Anhang

Wachstumsfaktor und Areal	p-Wert
BDNF DG	0,6310
BDNF CA1	0,2568
BDNF CA2/3	0,2568
BDNF CA4	0,1859
FGF2 DG	0,5127
FGF2 CA1	0,8273
FGF2 CA2/3	0,8273
FGF2 CA4	0,8373
GDNF DG	0,1975
GDNF CA1	<b>0,0244</b>
GDNF CA2/3	0,5681
GDNF CA4	0,6559
GMFB DG	0,6242
GMFB CA1	0,7237
GMFB CA2/3	0,8065
GMFB CA4	0,6242
PDGF-B DG	0,1967
PDGF-B CA1	0,4386
PDGF-B CA2/3	0,7963
PDGF-B CA4	0,6056

**Tabelle 24: Signifikanzanalyse der Expression von Wachstumsfaktoren bei Hippocampussklerosen und in normalem Gewebe**

Die Tabelle zeigt die Signifikanzanalyse für den jeweiligen Wachstumsfaktor in dem benannten Areal in sklerotischem und normalem Gewebe. Hierbei fand sich lediglich für GDNF in CA1 eine signifikant niedrigere Expression in sklerotischem Gewebe verglichen mit normalem Gewebe.

<b>Variable</b>	<b>mit Variable</b>	<b>Korrelation</b>	<b>n</b>	<b>p-Wert</b>
Epilepsiedauer (Jahre)	Alter bei OP	0,5694	21	<b>0,0071</b>
Outcome ILAE	Alter bei OP	0,4919	21	<b>0,0235</b>
Nachbeobachtungzeit (Monate)	Outcome ILAE	0,4920	21	<b>0,0235</b>
BDNF CA2/3	Epilepsiedauer (Jahre)	-0,7220	11	<b>0,0121</b>
BDNF CA2/3	Anfallsfrequenz (pro Monat)	0,6790	11	<b>0,0216</b>
BDNF CA4	Epilepsiedauer (Jahre)	0,7630	11	<b>0,0063</b>
BDNF CA4	Nachbeobachtungzeit (Monate)	-0,7989	11	<b>0,0032</b>
BDNF CA4	BDNF DG	0,6433	10	<b>0,0448</b>
FGF2 CA1	BDNF DG	0,9918	5	<b>0,0009</b>
FGF2 CA4	BDNF DG	0,9812	5	<b>0,0031</b>
FGF2 CA4	FGF2 DG	0,8248	6	<b>0,0433</b>
FGF2 CA4	FGF2 CA1	0,9880	6	<b>0,0002</b>
GDNF CA1	Anfallsfrequenz (pro Monat)	0,8354	11	<b>0,0014</b>
GDNF CA4	Anfallsfrequenz (pro Monat)	0,7748	12	<b>0,0031</b>
GDNF CA4	GDNF CA1	0,6333	11	<b>0,0365</b>
GMFB DG	Outcome ILAE	0,7587	9	<b>0,0178</b>
GMFB CA1	Outcome ILAE	0,7726	7	<b>0,0417</b>
GMFB CA1	BDNF DG	-0,8976	6	<b>0,0152</b>
GMFB CA2/3	FGF2 DG	0,9551	4	<b>0,0449</b>
PDGFB DG	FGF2 CA1	0,9826	4	<b>0,0174</b>
PDGFB DG	FGF2 CA4	0,9720	4	<b>0,0280</b>
PDGFB DG	GMFB CA2/3	-0,9781	4	<b>0,0219</b>
PDGFB CA2/3	GMFB CA2/3	0,9728	4	<b>0,0272</b>
PDGFB CA4	BDNF CA1	-0,7733	7	<b>0,0414</b>

*Tabelle 25: Signifikante Ergebnisse der Multivariat Analyse*

## **Schriftliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Untersuchung der Expression von Wachstumsfaktoren in reseziertem Hirngewebe von Epilepsiepatienten

in dem Institut für Anatomie II (Experimentelle Neurobiologie) unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Jörg H. Stehle mit Unterstützung durch Dr. Kai Siebenbrodt ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)

## 12 Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jörg H. Stehle, für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danken. Auch darüber hinaus hat er meinen Weg geprägt und mich in vielfacher Hinsicht gefördert und gefordert – mit Wirkung weit über das Ende meines Studiums hinaus.

Zudem möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe des ehemaligen Instituts für Anatomie III danken. Insbesondere vielen Dank an Alena Konoplew für das Einlernen in die Labormethoden und die gute Gesellschaft in der einen oder anderen frustrierenden Stunde im Labor. Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Dr. Abdelhaq Rami und Herrn Prof. Dr. Erik Maronde für zahlreiche hilfreiche Anmerkungen und Tipps.

Herrn Dr. Sebastian Bauer und Herrn Dr. Kai Siebenbrodt möchte ich für ihre Unterstützung, insbesondere in Bezug auf die klinischen Aspekte, sowie die gründliche Durchsicht meiner Arbeit danken.

Meinen Eltern danke ich, für die Möglichkeit das Studium und diese Arbeit überhaupt durchführen zu können. Zuletzt danke ich meiner Schwester und meiner Großmutter, die mir stets viel Rückhalt gegeben haben.