

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Differentielle Proteomanalyse in einem Modell der
Epileptogenese:
Regulation inflammations-assozierter Proteine**

von Andreas Gerhard Walker

aus Reutlingen

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Frau Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Mitbetreuung durch Frau Dr. Vera Russmann

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferenten: Priv.-Doz. Dr. Marlon Schneider
Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller
Priv.-Doz. Dr. Johann Maierl
Univ.-Prof. Dr. Cordula Poulsen Nautrup

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	2
1.	Epilepsie.....	2
1.1.	Definition und Bedeutung	2
1.2.	Klassifizierung.....	3
1.3.	Temporallappenepilepsie.....	4
1.4.	Epileptogenese.....	5
1.5.	Biomarker der Epileptogenese	6
1.6.	Tiermodelle	7
2.	Inflammation im Kontext der Epilepsieerkrankung.....	10
2.1.	Neuroinflammation	10
2.2.	Inflammations-assoziierte Mechanismen im Kontext der Epileptogenese	11
3.	Proteomik	15
3.1.	Definition und Einführung	15
3.2.	Neuroproteomik.....	16
3.3.	Massenspektrometrie-basierte Proteomik	16
3.4.	Bioinformatische Datenanalyse.....	18
III.	ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG	22
IV.	MATERIAL UND METHODEN.....	24
1.	Versuchstiere.....	24
2.	Post-Status-Epilepticus-Modell	24
2.1.	Elektrodenimplantation	24
2.2.	SE-BLA-Modell	26
3.	Überwachung spontaner Anfälle.....	28
3.1.	EEG-Aufzeichnung	29
3.2.	Video-Aufzeichnung	29
4.	Durchführung und Auswertung der differentiellen Proteomanalyse.....	30
4.1.	Gewebeaufbereitung für die massenspektrometrischen Analysen	30
4.2.	Massenspektrometrische Analyse	32
4.3.	Markierungsfreie Peptid-Quantifizierung	32

4.4.	Datenbanksuche und Proteinidentifikation	33
4.5.	Ergänzende Datenbanksuche von RGD-Symbolen und humanen Orthologen	34
4.6.	Statistische Datenanalyse	34
4.6.1.	Principal Component-Analyse	34
4.6.2.	Volcano Plots	35
4.6.3.	Venn-Diagramme.....	36
4.6.4.	Proteinexpressionsanalyse mittels Heatmaps	36
4.7.	Funktionelle Datenanalyse	37
4.7.1.	Klassifizierung der differentiell exprimierten Proteine	37
4.7.2.	Pathway-Enrichment-Analyse	37
5.	Immunhistochemische Validierung der Proteomanalyse	38
5.1.	Gewebeaufbereitung perfundierter Proben.....	38
5.2.	Gewebeaufbereitung von paraffinfixierten Proben	39
5.3.	Immunhistochemie	40
6.	Versuchsdesign	43
V.	ERGEBNISSE.....	47
1.	SE-BLA-Modell	47
2.	Quantitative Proteomik.....	48
2.1.	Statistische Auswertung	48
2.1.1.	Darstellung der Proteinprofile von SE- und Kontrolltieren	48
2.1.2.	Vergleichende Darstellung der identifizierten Proteine von HC und PHC	51
2.2.	Funktionelle Auswertung	57
2.2.1.	Regulierte biologische Prozesse und molekulare Funktionen	58
2.2.2.	Ergebnisse der Pathway-Enrichment-Analyse.....	61
2.2.3.	Hypothesen-gestützte Analyse TLR-assozierter Proteine	75
2.2.4.	Aktivierung der inflammatorischen Antwort durch Purinozeptoren	77
2.2.5.	Hypothesen-gestützte Analyse der transendothelialen Leukozytenmigration	79
2.3.	Immunhistochemische Validierung.....	82
VI.	DISKUSSION	88

VII.	ZUSAMMENFASSUNG.....	103
VIII.	SUMMARY	105
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	107
X.	ANHANG	129
1.	Lösungen und Substanzen	129
2.	Geräte	133
3.	R-Skripten	135
XI.	DANKSAGUNG	138

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Actn1	Actinin alpha 1
Alb	Albumin
AMPAR	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
Anxa 1/-2/-3	Annexin A1, -A2 und -A3
Aqua dest.	Aqua destillata
Arc1b	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B
BLA	Basolaterale amygdala
CA	Cornu ammonis (Ammonshorn)
Capg	Capping protein (actin filament), gelsolin-like
Cd38	CD38 molecule
Cd44	CD44 antigen
Cdc42	Cell division cycle protein 42
Clic1	Chloride intracellular channel protein 1
Clu	Clusterin
CRAN	Comprehensive R Archive Network
Ctnna1/-2	Cadherin-associated proteins alpha 1 und -2
Da	Dalton
DAB	3,3'Diaminobenzidin
DNase	Desoxyribonuklease
Dnm 1/-2/-3	Dynamin 1, -2 und -3
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm

Ezr	Ezrin
Fa.	Firma
Fam65b	Family with sequence similarity 65, member B
FASP	filter aided sample preparation
Fbln1	Fibulin-1
Fermt3	Fermitin family homolog 3
Gfap	Glial fibrillary acidic protein
Glipr2	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HC	Hippocampus
HCl	Chlorwasserstoff
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
Hmgb1	High mobility group box protein 1
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
Hsp70/Hspa1a	Heat shock 70 kDa protein
Hsp90b1	Endoplasmic
Hspb1	Heat shock protein beta-1
Hspd1	Heat shock protein 60 kDa
Htra1	Serine protease HTRA1
HUGO	Human Genome Organisation
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
Itgam	Integrin alpha M

Itgb1/-2	Integrin beta 1 und 2
Jam3	Junctional adhesion molecule 3
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC	Flüssigkeitschromatographie
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharide
Ltd.	Limited (beschränkt, haftungsbeschränkt)
M	molare Masse
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEZ	Mittteleuropäische Zeit
Mfge8	Lactadherin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mod.	modifiziert
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
Msn	Moesin
n	Tierzahl, Gruppengröße
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCitrat	Natrium-Citrat
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)

Abkürzungsverzeichnis

NaOH	Natronlauge
NLR	Nod-like-Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
p	Signifikanzniveau
P2x7/P2rx7	P2X purinoceptor 7
P2y12/P2ry12	P2Y purinoceptor 12
PANTHER	Protein Annotation Through Evolutionary Relationship
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pH	potentia hydrogenii (Wasserstoffionenkonzentration)
PHC	Parahippocampaler Cortex
Pltp	Phospholipid transfer protein
Podxl	Podocalyxin
ppm	parts per million (Teile von einer Million)
PRR	Pattern recognition Rezeptor
Ptpn6	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6
RAID	Redundant Array of Independent Discs (Redundante Anordnung unabhängiger Festplatten)
RGD	Rat Genome Database
Rpl23a	Ribosomal protein L23a
Rps27a	Ribosomal protein 27 a
s.c.	subkutan
SE	Status epilepticus
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
TGF beta	Transformierender Wachstumsfaktor-β

Abkürzungsverzeichnis

TLE	Temporallappenepilepsie
TLR	Toll-like-Rezeptor
Tmed7	Transmembrane emp24 domain-containing protein 7
Tnc	Tenascin C
Tollip	Toll-interacting protein
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
UK	United Kingdom
USA	United States of America
Usp7	Ubiquitin specific peptidase 7
Vcl	Vinculin
Wdr34	WD40 domain repeat protein 34
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Epilepsien stellen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, denen eine abnormal gesteigerte Prädisposition Anfälle zu entwickeln zugrunde liegt (FISHER et al. 2005; BLAIR 2012). Bei Hunden und Katzen gehören Epilepsien zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen (CHANDLER 2006; SMITH BAILEY u. DEWEY 2009). Im Hinblick auf die Humanmedizin wird geschätzt, dass weltweit über 70 Millionen Menschen an der Epilepsieerkrankung leiden (DUNCAN et al. 2006). Die Behandlung epileptischer Patienten beschränkt sich dabei im Wesentlichen auf zwei Therapiemöglichkeiten: (1) Chirurgische Resektion der betroffenen Hirnregion (nur Patienten mit fokaler Epilepsie und identifizierbarem Lokus) (CASCINO 2004); oder (2) eine lebenslange Pharmakotherapie (symptomatisch). Bei 25-33 % der Patienten ist die Erkrankung jedoch pharmakoresistent und kann demnach nicht adäquat behandelt werden (DUNCAN et al. 2006). Hinsichtlich nicht-invasiver Therapiemöglichkeiten, haben sich bis heute alle pharmakologischen Strategien zur Beeinflussung und/oder Verhinderung der Epilepsieentstehung (Epileptogenese) als klinisch unwirksam erwiesen (HOLTKAMP u. MEIERKORD 2007; LÖSCHER 2010). Die Entwicklung neuer präventiver, diagnostischer und therapeutischer Ansätze sowie die Identifikation zuverlässiger Biomarker setzt demnach ein besseres Verständnis der Mechanismen der Epileptogenese voraus. Molekularen Studien zufolge umfassen solche Mechanismen genetische Mutationen und Dysfunktionen von Signalwegen, die zu der Bildung eines hyperexzitablen Netzwerkes führen können (GOLDBERG u. COULTER 2013). In diesem Kontext stellen insbesondere inflammatorische Prozesse, welche infolge einer initialen Schädigung des Gehirns auftreten, Schlüsselkomponenten der Epilepsieentstehung dar (VEZZANI et al. 2013b). Die bisherige Erforschung dieser molekularen Veränderungen und im Besonderen der inflammatorischen Mechanismen, beruhte größtenteils auf der Analyse ausgewählter Proteine und Signalwege. Darüber hinaus haben Genom- und Transkriptom-Studien zu unserem heutigen Verständnis über Epileptogenese-assoziierte Pathomechanismen beigetragen (CACHEAUX et al. 2009; OKAMOTO et al. 2010; WANG et al. 2014). Der Transfer dieser Studienergebnisse in zelluläre Proteinexpressionsmuster ist allerdings mit großen Einschränkungen verbunden. Demzufolge ist unser Wissen über molekulare und inflammations-assoziierte Mechanismen der Epileptogenese lückenhaft und unvollständig. Differentielle Proteomanalysen könnten dazu beitragen diese Lücken zu schließen. Im Rahmen des Dissertationsvorhabens wurde daher eine differentielle Proteomanalyse in einem Tiermodell der Epileptogenese durchgeführt.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Epilepsie

1.1. Definition und Bedeutung

Der Terminus „Epilepsie“ stammt aus dem Altgriechischen und bedeutet „Anfall“, bzw. „Übergriff“. Geschichtlich zählt Epilepsie zu den ältesten bekannten Erkrankungen (SCHNEBLE 2003). Bereits in babylonischen Keilschriften und ägyptischen Hieroglyphen finden sich Aufzeichnungen darüber (SCHNEBLE 2003). Die Epilepsieerkrankung beschreibt jedoch kein einzelnes oder einheitliches Krankheitsbild, sondern stellt vielmehr einen Überbegriff unterschiedlichster Funktionsstörungen des Gehirns dar (FISHER et al. 2005). Diese Störungen charakterisieren sich hauptsächlich durch das wiederholte und spontane Auftreten von epileptischen Anfällen (FISHER et al. 2005). Die Internationale Liga gegen Epilepsie definierte im Jahr 2005 epileptische Anfälle als das vorübergehende Auftreten von Anzeichen und/oder Symptomen exzessiver oder synchroner neuronaler Gehirnaktivität (FISHER et al. 2005). Die Epilepsieerkrankung wurde definiert als anhaltende Prädisposition Anfälle zu entwickeln, einhergehend mit den kognitiven, psychischen und sozialen Konsequenzen, die diese Erkrankung mit sich bringt. Voraussetzung war dabei das Auftreten von mindestens einem nicht provozierten Anfall (FISHER et al. 2005). Diese konzeptionelle Definition wurde 2013 von der Task Force der Internationalen Liga gegen Epilepsie um die nachfolgenden Bedingungen erweitert: (1) das Auftreten von mindestens zwei nicht provozierten Anfällen im Abstand von über 24 Stunden; (2) ein nicht provoziertes Anfall, einhergehend mit der Wahrscheinlichkeit weitere Anfälle zu entwickeln oder (3) die Diagnose eines Epilepsie-Syndroms (FISHER et al. 2014). Demnach ist die Diagnose „Epilepsie“ abhängig von dem Auftreten von mindestens einem der genannten Zustände (FISHER et al. 2014).

Beim Menschen zählen Epilepsien zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen. Die Prävalenz wird weltweit auf 0.4-1% geschätzt. (SANDER u. SHORVON 1996; COWAN 2002). Im Hinblick auf die Veterinärmedizin wird vermutet, dass Epilepsien die häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen bei Hunden darstellen (CHANDLER 2006) und mit einer Prävalenz von 1-2 % auftreten („epidemiologische Studie an einer Referenzpopulation“ (SCHWARTZ-PORSCHE 1986)). Das Risiko an Epilepsie zu erkranken geht dabei mit großen rassespezifischen Unterschieden einher (POTSCHEKA et al. 2013). In diesem Zusammenhang zeigen bestimmte Hunderassen Prävalenzraten von 9-18 % (CASAL et

al. 2006; BERENDT et al. 2009; HULSMAYER et al. 2010; GULLOV et al. 2011; WEISSL et al. 2012; POTSCHEKA et al. 2013). Die Prävalenz in der weltweiten Hundepopulation ist allerdings nicht bekannt. Diesbezüglich besteht ein Mangel epidemiologischer Studien, die zur Einschätzung der Prävalenz sowie der Risikofaktoren an Epilepsie zu erkranken, herangezogen werden können (KEARSLEY-FLEET et al. 2013). Bei der Katze zählen Epilepsien ebenfalls zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen, allerdings treten sie seltener auf als beim Hund (SMITH BAILEY u. DEWEY 2009).

1.2. Klassifizierung

Eine Klassifizierung der Epilepsien nach definierten Kriterien bildet die Grundlage für die Entwicklung therapeutischer Strategien und die damit einhergehende Prognosestellung. Die geschichtliche Entwicklung der Klassifizierung von Epilepsien beruhte größtenteils auf Beobachtungen und Expertenmeinungen (BERG et al. 2010). Demgegenüber basiert das aktuelle Klassifizierungsschema der Internationalen Liga gegen Epilepsie hauptsächlich auf modernen neurologischen Bildgebungsverfahren, Technologien der Genomforschung und Konzepten der Molekularbiologie (BERG et al. 2010). Diese Klassifizierung entspricht einer multidimensionalen Einteilung der Epilepsien (BERG et al. 2010). Vereinfacht dargestellt kann solch eine Einteilung erfolgen nach dem Anfallstyp/-Syndrom und der zugrundeliegenden Ursache (SHORVON 2011). Entscheidend für die Einteilung epileptischer Anfälle ist die Unterteilung in generalisierte und fokale Anfälle (BERG et al. 2010). Eine Übersicht dieser Klassifizierung ist in Tabelle 1 zu finden. Fokale Anfälle entstammen einem Netzwerk, das auf eine Hemisphäre begrenzt ist (BERG et al. 2010). Dieses kann entweder umschrieben oder weiträumig verteilt sein. Charakteristisch ist der für jeden Anfallstyp konstante Anfallsbeginn (BERG et al. 2010). Aufgrund des Fehlens einer natürlichen Klassifikation der fokalen Anfälle empfiehlt sich eine Beschreibung nach deren Manifestation (BERG et al. 2010). In einzelnen Fällen können fokale Anfälle sekundär generalisieren. Generalisierte epileptische Anfälle haben ihren Ursprung in einem Netzwerk, das beide Großhirnhemisphären betrifft (BERG et al. 2010). Es können sowohl kortikale als auch subkortikale Strukturen betroffen sein. Die Lokalisation des Anfallsbeginns ist dabei nicht konstant, zudem können die Anfälle asymmetrisch auftreten (BERG et al. 2010). Anhand ihrer motorischen Manifestation lassen sich generalisierte Anfälle in tonische, klonische, tonisch-klonische, atonische und myoklonische Anfälle unterteilen (ENGEL 2006).

Tab. 1 Klassifizierung der Anfallstypen*	
a.	Generalisierte Anfälle
	Tonisch-Klonisch (in jeder Kombination)
	Absencen
	Typisch
	Atypisch
	Absencen mit speziellen Eigenschaften
	Myoklonische Absencen
	Augenliedmyoklonien
	Myoklonisch
	Myoklonisch
	Myoklonisch-Atonisch
	Myoklonisch-Tonisch
	Klonisch
	Tonisch
	Atonisch
b.	Fokale Anfälle
c.	Unbekannt
	Epileptische Spasmen

* Anfälle, die nicht eindeutig einer der angegebenen Kategorien zuzuordnen sind, sollten als "nicht klassifizierbar" eingestuft werden bis weitere Informationen vorliegen.

(mod. nach BERG et al. 2010)

Hinsichtlich der ätiologischen Klassifizierung von Epilepsien werden drei Kategorien unterschieden : (1) Genetische Epilepsien (hierbei stellen Gendefekte die primäre Ursache der Epilepsie dar) (2) Strukturell/metabolische Epilepsien (eindeutige strukturelle oder metabolische Ursache, welche mit einem erheblich erhöhten Risiko Epilepsie zu entwickeln assoziiert ist) und (3) Epilepsien unbekannter Ursache (BERG et al. 2010).

1.3. Temporallappenepilepsie

Die Temporallappenepilepsie (TLE) zählt zu den lokalisations-bezogenen symptomatischen Epilepsien (ILAE 1989). Sie beschreibt eine Vielzahl von Störungen, deren Gemeinsamkeit ein Anfallsbeginn im Temporallappen darstellt (BERTRAM 2009). Beim Menschen entspricht die TLE der häufigsten fokalen Epilepsieform (TÉLLEZ-ZENTENO u. HERNÁNDEZ-RONQUILLO 2011). Etwa 60-70 % aller fokalen epileptischen Anfälle sind auf den Temporallappen zurückzuführen (RUGG-GUNN et al. 2011). Zu den pathologisch betroffenen Gehirnstrukturen des Temporallappens zählen vor allem *Hippocampus* (HC), *Amygdala* und der *parahippocampale Cortex* (PHC) (CHANG u. LOWENSTEIN 2003). In diesem Zusammenhang wird die Temporallappenepilepsie häufig von dem pathologischen Phänomen der HC-Sklerose begleitet, deren genaue Ursache unbekannt ist (LIU et al. 1995; MATHERN et al. 1997; BLÜMCKE et al. 1999). Bei Patienten mit TLE tritt die HC-Sklerose mit einer

Wahrscheinlichkeit von über 80 % auf (WILLIAMSON et al. 1993). Die HC-Sklerose entspricht dabei einer Kombination aus neuronalem Verlust, Atrophie und Gliose. Dieses Muster tritt insbesondere im Hilus und der *Cornu ammonis* (CA1)-Region auf (BERTRAM 2009). Im Gegensatz zu anderen Epilepsieformen beschränkt sich die TLE auf Störungen, die bei den Betroffenen ein ähnliches Erscheinungsbild zeigen (MARGERISON u. CORSELLIS 1966). Beim Menschen können die Symptome der TLE unter anderem olfaktorische und gustatorische Halluzinationen sowie epigastrisches Empfinden oder psychische Phänomene wie „*déjà vu*“ umfassen. Automatismen können infolge von generalisierten Anfällen auftreten (FRENCH et al. 1993; CHANG u. LOWENSTEIN 2003). Mit individueller Varianz entwickelt sich die TLE durchschnittlich siebeneinhalb Jahre nach ursächlicher Gehirnverletzung (initialem Insult) (FRENCH et al. 1993). Schweregrad, Lokalisation, räumliche Dimension der Verletzung sowie genetische Faktoren beeinflussen dabei das Risiko eine Epilepsie zu entwickeln (WALKER et al. 2002).

1.4. Epileptogenese

Bereits im Jahr 1881 entdeckte GOWERS, dass zwischen einer Gehirnverletzung und dem Auftreten symptomatischer Epilepsie ein anfallsfreies Intervall von Monaten bis Jahren liegen kann (GOWERS 1881). Dieses Intervall (Latenzperiode) deutet darauf hin, dass ein zeitaufwendiger Prozess zu Veränderungen führt, die letztendlich eine Epilepsie verursachen (LÖSCHER u. BRANDT 2010). Latenzperiode und Epileptogenese werden häufig synonym verwendet und verweisen als operationale Begriffe auf den Zeitraum zwischen initialem Insult und dem Auftreten erster spontaner Anfälle (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011a). Da Anfälle Ereignisse auf Netzwerkebene darstellen, erfordern sie die wiederholte Aktivierung von Neuronenpopulationen innerhalb der Gehirnschaltkreise; demnach ist Epilepsie als Phänomen auf Netzwerkebene zu verstehen (GOLDBERG u. COULTER 2013). Molekulare Studien lieferten Hinweise auf Mechanismen während der Latenzperiode, die zur Bildung eines Anfalls hervorrufenden (iktogenen) Netzwerkes führen können (GOLDBERG u. COULTER 2013). Genetische Mutationen oder Dysfunktionen molekularer Signalwege sind Beispiele solcher Mechanismen, die nur dann Epilepsie verursachen können, wenn dadurch die Funktion von Schaltkreisen verändert wird (GOLDBERG u. COULTER 2013). Demzufolge kann Epileptogenese als dynamischer Prozess verstanden werden, der mit progressiv veränderter neuronaler Erregbarkeit und der Ausbildung epileptogener Quervernetzungen zwischen den Neuronen einhergeht (ENGEL u. PEDLEY 2007). Möglicherweise bedarf es zusätzlicher

komplizierter struktureller Veränderungen bevor die ersten spontanen Anfälle auftreten (ENGEL u. PEDLEY 2007). Beispiele für solche Veränderungen sind: Neurodegeneration, Neurogenese, Gliose, Beschädigung oder Wachstum von Axonen, dendritische Plastizität, Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, Rekrutierung inflammatorischer Zellen in das Gehirngewebe, Reorganisation extrazellulärer Matrix und der molekularen Architektur individueller neuronaler Zellen (LUKASIUK u. PITKÄNEN 2009). Da das Gehirn sich nach Verletzung wieder regeneriert, ist es entscheidend die Reparations- und Funktionswiederherstellungsmechanismen von den zellulären und molekularen Mechanismen, die direkt zur Epilepsieentstehung beitragen, abzugrenzen (DICHTER 2009; JACOBS et al. 2009). In der Regel wird Epileptogenese assoziiert mit der Entwicklung von symptomatischer (erworben) Epilepsie nach vorangegangener struktureller Verletzung des Gehirns (ENGEL 2001). Epileptogenese kann allerdings auch bei genetischen Epilepsien auftreten, beispielsweise durch die Entwicklung eines veränderten Netzwerks bedingt durch eine genetische Mutation (ZARA u. BIANCHI 2009). Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass molekulare und zelluläre epileptogene Veränderungen nach dem Auftreten des ersten Anfalls fortschreiten (PITKÄNEN u. SUTULA 2002; PITKÄNEN u. LUKASIUK 2009). Dies könnte bedeuten, dass die Epileptogenese nicht mit dem Auftreten des ersten Anfalls abgeschlossen ist, sondern progressiv verläuft (PITKÄNEN 2010).

1.5. Biomarker der Epileptogenese

Biomarker werden definiert als „messbare Parameter“ krankhafter Veränderungen, die als Indikatoren pathologischer Prozesse wie Epileptogenese und Iktogenese objektiv gemessen und interpretiert werden können (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2011b). Ein Epileptogenese-Biomarker stellt daher ein objektiv messbares Merkmal dar, welches zuverlässig die Entwicklung, Anwesenheit, Schwere, Progression bzw. Lokalisation einer epileptogenen Veränderung identifiziert (ENGEL 2011; SIMONATO et al. 2012; ENGEL et al. 2013). Gegenwärtig existieren noch keine validierten Epileptogenese-Biomarker. Diese wären besonders hilfreich, um nach epileptogener Gehirnverletzung Patienten mit erhöhtem Epilepsierisiko zu identifizieren (LUKASIUK u. BECKER 2014). Des Weiteren wären molekulare Biomarker von Vorteil, welche die Präsenz, den Gewebetyp und den Grad von neuropathologisch geschädigtem Gehirngewebe mit epileptogenem Potential vorhersagen würden (ENGEL et al. 2013). In Anbetracht des fließenden Übergangs der Epileptogenese in spontane epileptische Anfälle, hätten insbesondere jene Biomarker eine große Bedeutung, die

eine Aussage über die dynamischen Veränderungen der Anfallsschwellenwerte erlauben würden (LUKASIUK u. BECKER 2014). Darüber hinaus könnten molekulare Biomarker der Epileptogenese die Vorhersage des Therapieerfolges beziehungsweise Überwachung medikamentöser Therapien ermöglichen (LUKASIUK u. BECKER 2014). Letztendlich könnten Biomarker auch Surrogatmarker für die Epileptogenese darstellen, die eine Vorhersage der Entwicklung spontaner Anfälle ermöglichen würden (ENGEL et al. 2013).

Für die Evaluierung von Epileptogenese-Biomarkern schlugen ENGEL et al. (2013) sogenannte *Proof-of-Concept*-Studien in Tiermodellen vor: (1) Idealerweise sollte zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Epileptogenese Gewebe von Tieren, die eine Epilepsie entwickeln, sowie von Kontrolltieren entnommen und analysiert werden. (2) Im nächsten Schritt sollte in verschiedenen Tiermodellen eine Überprüfung des potentiellen Biomarkers hinsichtlich der Kriterien „Sensitivität“ und „Spezifität“ stattfinden. (3) Erst im darauffolgenden Schritt erfolgt ein translationaler Versuch zur Vorhersage des Biomarker-Kandidaten an geeigneten Patientengruppen.

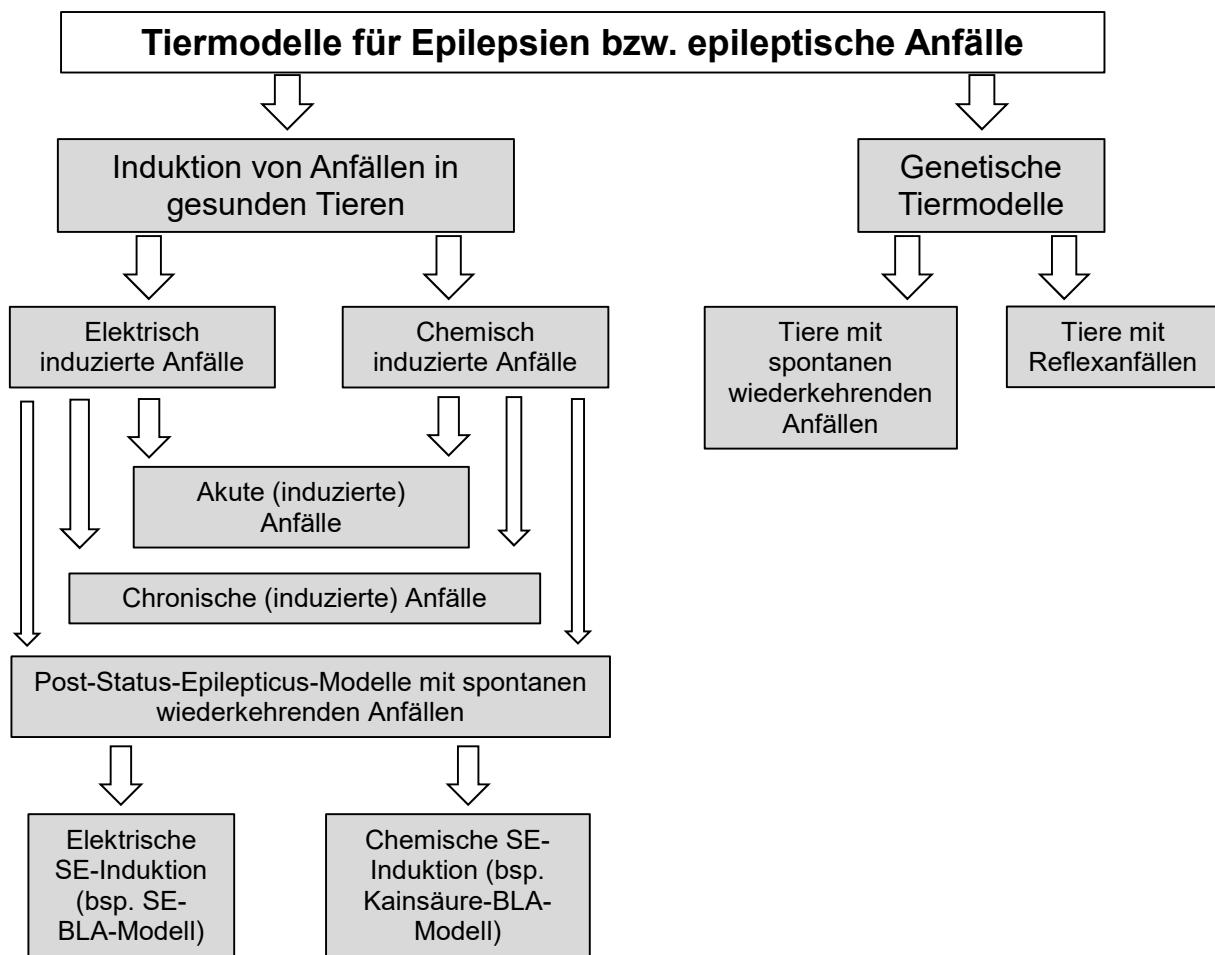
Die idealen Biomarker sollten allerdings nicht nur spezifisch und sensitiv sein, sondern auch einfach zugänglich. Daher wären Epileptogenese-Biomarker von Vorteil, die auf Bildgebungsverfahren des Gehirns beruhen oder aus peripheren Geweben stammen (LUKASIUK u. BECKER 2014). In diesem Zusammenhang wird unter anderem eine Aufregulation inflammatorischer Signalkaskaden als Grundlage molekularer Bildgebungsverfahren diskutiert, um Biomarker der Epileptogenese identifizieren zu können (VEZZANI u. FRIEDMAN 2011; LUKASIUK u. BECKER 2014).

1.6. Tiermodelle

Um neue diagnostische, therapeutische und präventive Strategien entwickeln zu können, ist es essentiell, die grundlegenden Mechanismen der Epilepsieerkrankung zu verstehen. Der aktuelle Wissensstand über Epilepsien basiert größtenteils auf der Forschung mit Tiermodellen, da die Anwendung experimenteller Methoden am Humanpatienten aus ethischen Gründen nicht vertretbar ist (FISHER 1989). An Tiermodelle für Erkrankungen werden grundsätzlich drei Anforderungen gestellt: (1) die Symptomatologie zwischen Tiermodell und Erkrankung muss vergleichbar sein; (2) die pathologischen Mechanismen der Erkrankung müssen im Tiermodell reproduzierbar sein und (3) das Tiermodell soll Aussagen hinsichtlich der klinischen Wirksamkeit von Arzneimitteln ermöglichen. In der experimentellen Epilepsieforschung erfüllen Tiermodelle unter anderen folgende Aufgaben: die Untersuchung

pathophysiologischer Mechanismen, die Evaluierung und Entwicklung neuer anti-epileptogener Behandlungsmethoden und das Studium Epilepsie-assozierter Begleiterscheinungen (Komorbiditäten) (AUVIN u. DUPUIS 2001). Im Rahmen der Epilepsieforschung können Tiermodelle in Anfallsmodelle (akut) und Epilepsiemodelle (chronisch) unterteilt werden (SARKISIAN 2001). Bei Anfallsmodellen werden Anfälle induziert ohne nachfolgende Entwicklung der Epilepsieerkrankung (ENGEL 1992). Im Gegensatz zu den Anfallsmodellen entwickeln die Tiere in Epilepsiemarkellen wiederkehrende spontane Anfälle und ermöglichen dadurch die Erforschung der Epileptogenese (LÖSCHER 1999). Eine Übersicht häufig verwendeter Anfalls- und Epilepsiemodelle findet sich in Abbildung 1.

Abb. 1:



Übersicht der häufig verwendeten Tiermodelle für Epilepsien und epileptische Anfälle (mod. nach LÖSCHER 2011). Experimentelle Grundlage des vorliegenden Projektes war das SE-BLA-Modell. Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlages. SE = *Status epilepticus*, BLA = *basolaterale Amygdala*

Epilepsiemodelle

Epilepsiemodelle umfassen erworbene und genetische Modelle. Letztgenannte werden unterteilt in spontane und induzierte Mutationen (LÖSCHER 1999). Bei den erworbenen Epilepsiemodellen werden epileptische Anfälle mittels elektrischer oder chemischer Stimulation induziert. Zu den am häufigsten verwendeten chemischen Modellen zählen das Kainsäure- und das Pilocarpin-Modell (SARKISIAN 2001). Kainsäure (Glutamat-Analogon) und Pilocarpin (cholinriger Antagonist) können systemisch oder lokal (intrazerebral) injiziert werden und führen zur Entstehung akuter Anfälle (VICTOR NADLER 1981; CAVALHEIRO

1995). Bei Nagetieren führt die Applikation höherer Dosierungen, nach einer kurzen Latenzperiode, zur Entstehung wiederkehrender spontaner Anfälle (CAVALHEIRO 1995). Typische elektrische Modelle stellen das elektrische Kindling- sowie das *Post-Status-Epilepticus*-Modell dar (GODDARD 1967; LÖSCHER 1999). Erstgenanntes Modell beschreibt die wiederholte Anwendung elektrischer Stimulation, um fokale und später generalisierte Anfälle hervorzurufen, die über die Zeit an Dauer zunehmen (GODDARD 1967). Bei dem elektrischen *Post-Status-Epilepticus*-Modell wird durch elektrische Dauerstimulation des HC bzw. der *Amygdala* ein sich selbst erhaltender *Status epilepticus* (SE) induziert. Charakteristisch für das Modell sind das Auftreten wiederkehrender spontaner Anfälle und neuropathologische Veränderungen, die der TLE ähnlich sind (GOODMAN 1998; LÖSCHER 1999). Die ersten spontanen Anfälle treten gewöhnlich nach einer Latenzperiode von etwa drei bis vier Wochen nach Induktion des SE auf. Dabei ist die Dauer des induzierten SE von entscheidender Bedeutung (LÖSCHER 2002). Wird der SE zu früh durch die Applikation von Diazepam oder Pentobarbital unterbrochen, entwickeln die Tiere keine spontan auftretenden wiederkehrenden Anfälle (LEMOS u. CAVALHEIRO 1995). Im vorliegenden Projekt wurde das SE-*basolaterale Amygdala*-(BLA)-Modell (BRANDT et al. 2003) verwendet, um verschiedene Phasen der Epileptogenese und die frühe Phase der Epilepsie-Manifestation zu erforschen (LÖSCHER u. BRANDT 2010).

2. Inflammation im Kontext der Epilepsieerkrankung

2.1. Neuroinflammation

Inflammation ist eine physiologische Antwort auf Verletzung, Infektion oder biologischen Stress, die durch das angeborene Immunsystem vermittelt wird (WALKER u. SILLS 2012). Eine Aktivierung des Immunsystems erfolgt durch eindringende Pathogene oder zellulären Schaden (MAROSO et al. 2011). Die inflammatorische Antwort umfasst die Mobilisation und Interaktion verschiedener Zelltypen und Signalmoleküle, die zu einer lokalen und unter Umständen, zu einer systemischen Reaktion führen (LYMAN et al. 2013). Aufgrund der Blut-Hirn-Schranke, Implantationsakzeptanz, dem Fehlen einer lymphatischen Drainage und relativ niedriger Level von Monozyten und Lymphozyten wird das Zentralnervensystem (ZNS) als immunprivilegiert angesehen. Dennoch treten sowohl immun- als auch inflammations-assoziierte Reaktionen auf, die entweder intrinsisch (vom Gehirn ausgehend) oder aus der Peripherie erworben sein können (CHOI u. KOH 2008). Der Begriff Neuroinflammation

beschreibt die Bandbreite der Immunantworten des ZNS, welche sich auf verschiedene Weise von peripheren Inflammationsprozessen unterscheiden (LYMAN et al. 2013). Im Vergleich zu den starken und teilweise destruktiven inflammatorischen Prozessen der peripheren Gewebe, werden Neurone mit ihrer geringen Regenerationskapazität durch die verhältnismäßig schwachen inflammatorischen Reaktionen im ZNS geschützt (XANTHOS u. SANDKÜHLER 2014). Die angeborene Immunität des Gehirns ist hauptsächlich auf Mikroglia zurückzuführen, welche als residente Makrophagen des ZNS eine erste Verteidigungslinie darstellen (BECHER et al. 2000). Aktuelle Studien deuten allerdings darauf hin, dass bei der angeborenen Immunantwort des ZNS auch Neurone und Astrozyten eine bedeutende Rolle spielen (VEZZANI et al. 2011b). Mikroglia überprüfen, als sogenannte ruhende Mikroglia, kontinuierlich ihr Mikromilieu auf fremde Antigene. Darüber hinaus stellen sie wichtige Phagozyten des ZNS-Parenchys dar und beseitigen so apoptotisches Gewebe (KIELIAN 2014). Durch chemische Stoffe und endogene Gefahrensignale (Alarmine), werden Mikroglia in einen aktivierten Zustand überführt (Abbildung 2) (WALKER u. SILLS 2012). In der Folge kommt es zur Mikroglia-Proliferation und Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen (WALKER u. SILLS 2012). Diese Botenstoffe initiieren eine pro-inflammatorische Signalkaskade, die letztendlich zu lokalisierter Vasodilatation, Extravasation, Rekrutierung von Leukozyten und der Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt. Im weiteren Verlauf wirken Mikroglia als Antigen-präsentierende Zellen (ALOISI et al. 2000). In der Regel endet der inflammatorische Prozess nach Entfernung des verursachenden Stimulus. Astrozyten und Mikroglia setzen dann, im Rahmen von Reparaturaufgaben, anti-inflammatorische Zytokine frei und fördern das neuronale Wachstum (STOLL et al. 2000).

2.2. Inflammations-assoziierte Mechanismen im Kontext der Epileptogenese

Inflammatorische Signalwege spielen eine Rolle bei der Pathogenese neurologischer Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Morbus Alzheimer und Epilepsie (GLASS et al. 2010; VEZZANI et al. 2013b). Eine besondere Form der inflammations-bedingten Epilepsie stellt die Autoimmunerkrankung „Rasmussen-Enzephalitis“ dar (CHOI u. KOH 2008). In diesem Kontext wurde bei Patienten mit Rasmussen-Enzephalitis erstmalig chronische Neuroinflammation mit Aktivierung von Mikroglia, Astrozyten, Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke, der Einwanderung peripherer Immunzellen und Freisetzung von Entzündungsmediatoren beobachtet (RASMUSSEN et al. 1958). Weitere Hinweise über die Bedeutung inflammatorischer Prozesse im Rahmen der Iktogenese erbrachte der Einsatz von

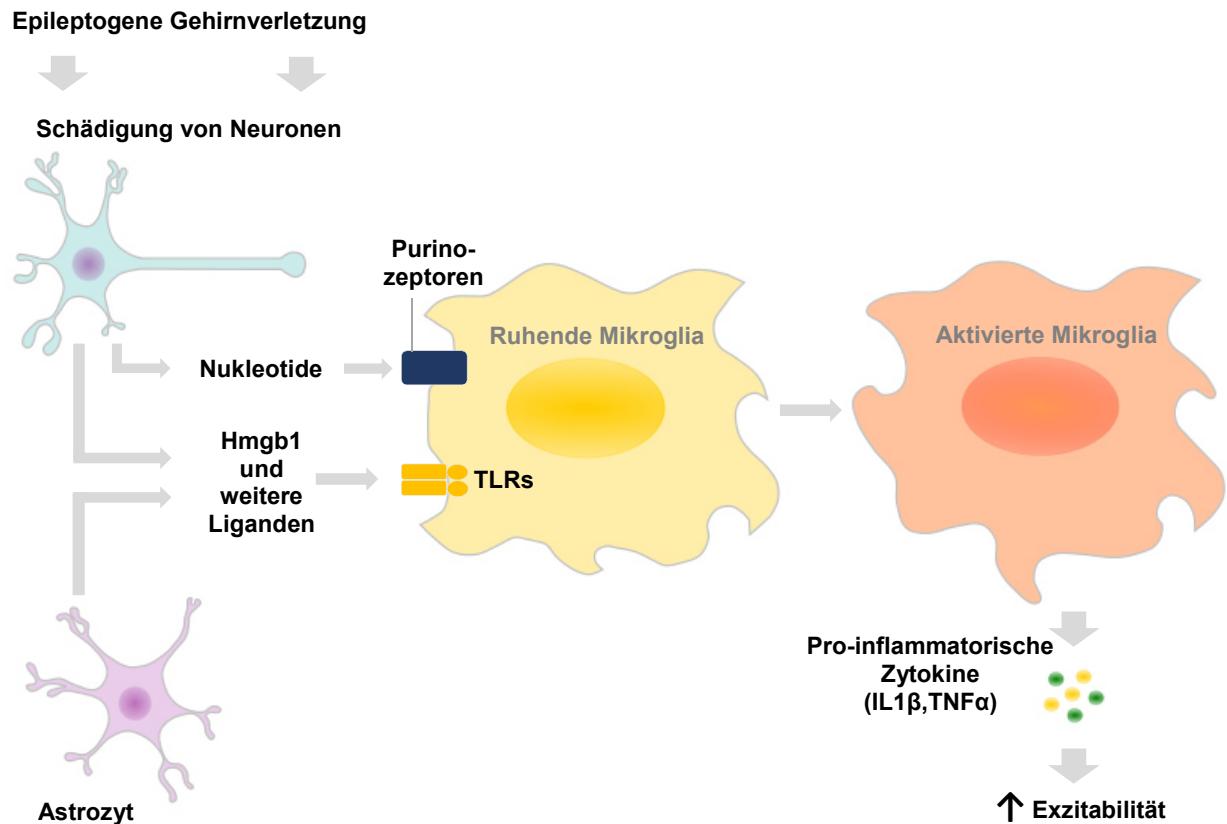
Steroiden und anderen anti-inflammatoryischen Medikamenten bei pharmakoresistenten Epilepsien. Infolge der Applikation konnten krampflösende (antikonvulsive) Effekte beobachtet werden (VEZZANI et al. 2011a). Inflammationsprozesse spielen jedoch auch eine zentrale Rolle bei Epilepsien ohne infektiöse oder immun-bedingte Ursache (VEZZANI et al. 2013a). Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass Neuroinflammation eine intrinsische Eigenschaft des übererregbaren Gehirngewebes von Epilepsien darstellt (VEZZANI et al. 2011a; VEZZANI et al. 2011b; VEZZANI et al. 2013b). Inflammatorische Prozesse sind allerdings nicht nur im chronisch-epileptischen Gehirn vertreten. So konnte nachgewiesen werden, dass die Anfallsaktivität Neuroinflammation induziert und wiederkehrende Anfälle eine chronische Inflammation unterhalten können (VEZZANI et al. 2011a). In diesem Zusammenhang sind einige der inflammations-assoziierten Signalwege bereits nach epileptogenem Insult aufreguliert und bleiben auch während der Latenzphase bestehen (VEZZANI et al. 2013b). Dies führte zu der Hypothese, dass Neuroinflammation im Rahmen der Epilepsieerkrankung nicht nur bei der Iktogenese, sondern auch bei der Epileptogenese eine Rolle spielt (VEZZANI et al. 2013b).

Inflammasom und Toll-like-Rezeptoren

Die Antwort des angeborenen Immunsystems im ZNS wird über *Pattern recognition*-Rezeptoren (PRRs) eingeleitet und durch eine Vielzahl von Signalwegen ausgelöst (HANAMSAGAR et al. 2012). PRRs werden primär von Mikroglia, Makrophagen und Oligodendrozyten exprimiert. Sie erkennen sowohl *Pathogen associated molecular patterns* als auch *Danger associated molecular patterns* (SINGHAL et al. 2014). Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der Aktivierung von Mikroglia. Grundsätzlich lassen sich Membran gebundene PRRs (Toll-like-Rezeptoren) von zytosolischen PRRs (Nod-like-Rezeptoren) unterscheiden (SINGHAL et al. 2014). Die Aktivierung der Nod-like-Rezeptoren (NLRs) führt zu der Zusammensetzung und nachfolgenden Aktivierung zytosolischer Proteinkomplexe, die auch als Inflammasome bezeichnet werden (SINGHAL et al. 2014). Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass Inflammasome, insbesondere durch die Aktivierung von NLRP1 und -3, eine Rolle während dem Prozess der Epileptogenese spielen (MENG et al. 2014; TAN et al. 2015). Inflammasom-Komplexe setzen sich aus drei Hauptkomponenten zusammen: (1) einem zytosolischen PRR (beispielsweise ein Mitglied der NLR-Familie); (2) das Enzym Caspase 1 und (3) ein Adapter-Protein für die Kommunikation zwischen Caspase und PRR (WALSH et al. 2014). Die Aktivierung der pro-inflammatoryischen Caspase führt zu der Spaltung von Pro-Interleukin-(IL)-1 β , Pro-IL-18 und Pro-IL-33 in ihre aktiven Formen (CHAKRABORTY et al.

2010). Die aktiven Interleukine vermitteln dann die inflammatorische Reaktion und/oder Freisetzung von Toxinen durch Glia- und Endothelzellen (CHAKRABORTY et al. 2010).

Abb. 2:



Schematische Darstellung der Mikroglia-Aktivierung über Purinozeptoren und Toll-like-Rezeptoren durch Nukleotide bzw. Toll-like-Rezeptor-Liganden wie Hmgb1 (Abbildung mod. nach SAIJO u. GLASS 2011). Aktivierte Mikroglia führen zu einer Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 β und Tumornekrosefaktor- α . TLR: Toll-like-Rezeptor, IL1 β : Interleukin-1 β , TNF α : Tumornekrosefaktor- α . Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

Aktuelle Studien zeigen, dass Toll-like-Rezeptoren (TLRs) in inflammatorischen Signalwegen, die mit Epilepsie assoziiert sind, eine Bedeutung zukommt (MAROSO et al. 2010; VEZZANI et al. 2011a; WALKER u. SILLS 2012; VEZZANI et al. 2013b). Es konnten bislang 11 verschiedene TLRs beim Menschen und 13 TLRs bei der Maus identifiziert werden (SAIJO et al. 2013). Endothelzellen, Epithelzellen und Astrozyten exprimieren unterschiedliche TLR-Typen. Allerdings konnten nur bei humanen Mikroglia alle bisher identifizierten TLRs durch

mRNA-Analysen nachgewiesen werden (OLSON u. MILLER 2004; KETTENMANN et al. 2011). Die Aktivierung dieser Rezeptoren durch *Pathogen associated molecular patterns* führt zur Rekrutierung von MyD88 (Adapter-Protein zwischen TLRs und dem IL-1-Signalweg) und *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β* (TRIF, Adapter-Protein). Im weiteren Verlauf dieser Signalkaskade vermitteln IκB Kinassen und mitogen-aktivierende Kinassen (MAPKs) die transkriptionale Aktivierung von Inflammationsmediatoren (TAKEUCHI u. AKIRA 2010; HANAMSAGAR et al. 2012). TLRs erkennen jedoch nicht nur *Pathogen associated molecular patterns* sondern auch endogene Moleküle (SAIJO et al. 2013). Zu diesen Molekülen zählen unter anderem Hitzeschockproteine, die potentielle Liganden von TLR2 und TLR4 darstellen (ASEA et al. 2002; VABULAS et al. 2002a). Die Bindung endogener Liganden führt zu der Produktion pro-inflammatorischer Moleküle (Tumornekrosefaktor-α, IL1-β, IL-6, reaktiven Sauerstoff und NO; Abbildung 2) durch Mikroglia (LEHNARDT 2010; HANKE u. KIELIAN 2011). Eine Sekretion von IL-1β und IL-18 erfolgt dabei durch das Zusammenspiel von TLRs und Inflammasom (HANAMSAGAR et al. 2012).

Weitere Mechanismen und Signalwege im Kontext der Epileptogenese

Erste Daten, die eine potentielle Rolle von Inflammationsprozessen bei Epilepsie vermuten ließen, stammten aus Studien über das Zytokin IL-1β, seiner Bindungsstelle dem IL-1-Rezeptor Typ 1 und dem physiologischen kompetitiven Antagonisten IL-1β-Rezeptor-Antagonist (VEZZANI et al. 2011a). Beispielsweise führt ein chemisch oder elektrisch induzierter SE zu einer Aufregulation von allen drei genannten Molekülen (VEZZANI et al. 2008). Zusätzlich zu ihrer anfallsbedingten Aufregulation können sowohl IL-1β, als auch IL-1β-Rezeptor-Antagonist die Sensitivität für anfallsinduzierende Stimuli modulieren (WALKER u. SILLS 2012). Es wird vermutet, dass eine Vielzahl weiterer Moleküle, Signalwege und Mechanismen eine Rolle bei inflammatorischen Ereignissen spielen, die mit Anfällen und Epileptogenese in Verbindung gebracht werden können. Dazu gehören Tumornekrosefaktor-α, transformierender Wachstumsfaktor-β (TGF beta), Cyclooxygenase 2 und Störungen der Blut-Hirn-Schranke (CACHEAUX et al. 2009; FRIEDMAN et al. 2009; KULKARNI u. DHIR 2009; RIAZI et al. 2010). Einige der Mechanismen könnten in die Präzipitation und das Wiederauftreten von Anfällen involviert sein, während bei anderen von einer Beteiligung bei dem Prozess der Epileptogenese ausgegangen wird (VEZZANI u. BARAM 2007). Diese Mechanismen stellen potentielle molekulare Ziele für die Entwicklung von Medikamenten dar (VEZZANI et al. 2011a).

3. Proteomik

3.1. Definition und Einführung

Der Terminus Proteom wurde erstmalig von WILKINS et al. (1996) verwendet, um die Gesamtheit der Proteine zu beschreiben, die durch das Genom kodiert werden (TYERS u. MANN 2003). Letzteres liefert den Bauplan für Proteine, die als Funktionsträger einer Zelle ihre biophysischen und biochemischen Eigenschaften bestimmen (MISHRA 2011; LANGLEY et al. 2013). Die Summe der zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribierten Gene (Transkriptom) verhält sich allerdings nicht linear zum Proteom (LANGLEY et al. 2013). Proteinisoformen, -modifikationen und Protein-Protein-Interaktionen resultieren in einer komplexen Dynamik des Proteoms, die dem verhältnismäßig statischen Genom gegenübersteht. Der Genotyp eines Organismus ist zwar in allen Zellen identisch, allerdings kann die Genregulation durch epigenetische Veränderungen, wie DNA-Methylierung und Histonmodifikation beeinflusst werden (WOLFFE u. MATZKE 1999; JAENISCH u. BIRD 2003). Die Erkenntnisse der Dynamik des Proteoms führen zu einer Anpassung der von WILKINS et al. (1996) eingeführten Definition. Nach aktuellem Wissensstand beschreibt das Proteom die Gesamtheit der exprimierten Proteine sowie deren Modifikationen, die von einem Gewebe oder Organ zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen produziert werden (DERACINOIS et al. 2013). Das Studium des Proteoms wird als Proteomik bezeichnet (ANDERSON u. ANDERSON 1998). Die Proteomforschung lässt sich in die zwei Hauptbereiche „Profiling“ und „funktionelle“ Proteomik untergliedern (CHOUDHARY u. GRANT 2004). Letztere beschäftigt sich mit der Charakterisierung von Proteinaktivitäten, -interaktionen und dem Vorhandensein posttranslationaler Modifikationen (CHOUDHARY u. GRANT 2004). In Analogie zu der Genomforschung befasst sich Profiling-Proteomik mit der Beschreibung des vollständigen Proteoms eines Organismus. Sie umfasst sowohl die Kartierung von Zellorganellen als auch die differentielle Messung von Expressionsraten zwischen Zellen oder Konditionen (CHOUDHARY u. GRANT 2004). Der Ansatz zur differentiellen Messung von Expressionsleveln stellt zugleich die Hauptanwendung in der Proteomforschung dar (LOVRIC 2011a). Ein Beispiel für einen differentiell proteomischen Ansatz ist der Vergleich von Gewebe zwischen einem gesunden und einem erkrankten Individuum (LOVRIC 2011a). Ziel ist es herauszufinden, welche Proteine in spezifische Funktionen involviert sind (LOVRIC 2011a). In der vorliegenden Studie wurde ein differentiell proteomischer Ansatz gewählt, um epileptogenes und gesundes Gehirngewebe im Zeitverlauf miteinander zu vergleichen.

3.2. Neuroproteomik

Neuroproteomik stellt einen Teilbereich der Proteomik dar. Sie versucht proteom-assoziierte Fragestellungen im Hinblick auf das ZNS zu beantworten (MARCUS et al. 2004). Das Gehirn gehört zu den komplexesten und am höchsten entwickelten Organen (SWANSON 2003). Demzufolge gibt es mehr als 1000 Erkrankungen, die mit einer Dysfunktion des Nervensystems assoziiert sind (SOCIETY FOR NEUROSCIENCE 2002). Das Nervensystem ist charakterisiert durch einen hohen Grad an Heterogenität, der sich auch auf zellulärem Level ausprägt (BECKER et al. 2006). Durch Proteomanalysen können die molekulare Zusammensetzung subzellulärer Kompartimente erforscht und Veränderungen in der Verteilung von Proteinen zwischen den Kompartimenten erfasst werden (BECKER et al. 2006). Das Gebiet der Neuroproteomik lässt sich in vier Hauptkategorien untergliedern: (1) Expressions-Neuroproteomik, die sich der qualitativen und quantitativen Katalogisierung des neurologischen Proteoms widmet; (2) Funktionelle Neuroproteomik, bei der funktionelle Eigenschaften individueller Proteine und ihre Organisation in Substrukturen, Komplexen und Netzwerken erforscht werden; (3) Klinische Neuroproteomik, die sich auf die Identifizierung von Biomarkern und Krankheitsmechanismen neurologischer Störungen konzentriert und die (4) Informatische Neuroproteomik, die mittels computergestützter Datenbanken und Werkzeuge proteomische Datensätze aufarbeitet (BAYÉS u. GRANT 2009).

3.3. Massenspektrometrie-basierte Proteomik

Unter den technischen Verfahren hat insbesondere die Massenspektrometrie (MS) an Beliebtheit gewonnen. Durch umfassende Proteinanalysen ist die MS in der Lage, die Komplexität des Proteoms zu bewältigen (HAN et al. 2008). Die drei primären Anwendungen der MS im Rahmen der Proteomik umfassen: (1) Katalogisierung der Proteinexpression; (2) Definierung von Protein-Interaktionen und (3) Identifikation von posttranslationalen Modifikationen (HAN et al. 2008).

Grundlagen der Massenspektrometrie

Im Wesentlichen misst die MS das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) von Ionen in der Gasphase (HAN et al. 2008). Elektrosprayionisation und Matrix-gestützte Laser-Desorption/Ionisation sind die häufigsten Techniken, um Proteine und Peptide für die MS in die Gasphase zu überführen und zu ionisieren (FENN et al. 1989; PANDEY u. MANN 2000). Ein Massenspektrometer besteht aus drei Komponenten: (1) Ionenquelle; (2) Analysator (zur

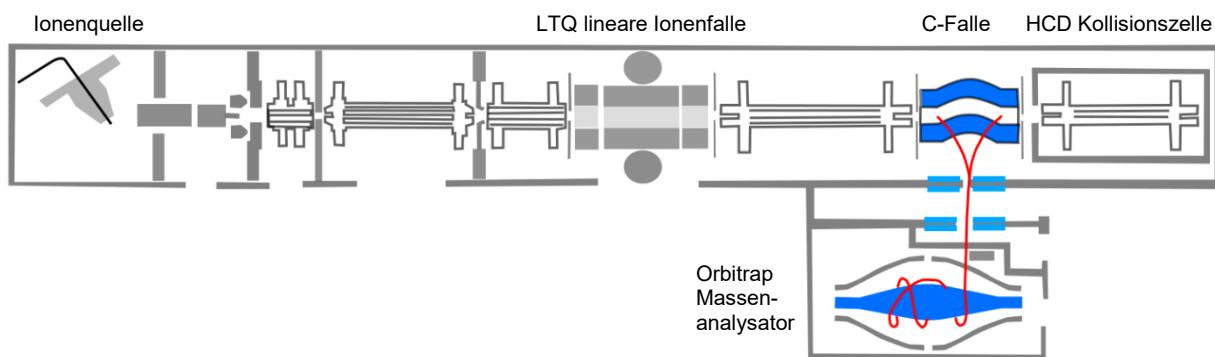
Messung des m/z-Verhältnis), und (3) Detektor (für die Erfassung der Anzahl an Ionen zu jedem m/z-Wert) (AEBERSOLD u. MANN 2003). Der Analysator ist das Kernstück des Massenspektrometers (AEBERSOLD u. MANN 2003). Es werden vier unterschiedliche Analysator-Typen einzeln oder in Kombination (Hybride) miteinander verwendet: (1) Ionenfalle; (2) *Time-of-flight* (3) Quadrupol und (4) Fouriertransformation (AEBERSOLD u. MANN 2003).

Probenanalyse und Proteinidentifikation

Bei der Probenanalyse und Proteinidentifikation werden grundsätzlich zwei unterschiedliche Strategien unterschieden: (1) *Top down* und (2) *Bottom up* (BOGDANOV u. SMITH 2005). *Top down*-Analysen untersuchen die exakte Sequenz von Proteinen, unter größtmöglicher Vermeidung einer Veränderung der Probe (TIPTON et al. 2011). Diese Strategie funktioniert vor allem bei Proteinen mit bekannten Proteinsequenzen aber unbekannten posttranslationalen Modifikationen (LOVRIC 2011b). Die *Bottom up*-Strategie basiert auf der Vorverdauung von Proteinen (üblicherweise durch Trypsin), gefolgt von einer Analyse der Peptidfragmente (MESSANA et al. 2013). Die Peptidanalyse stützt sich auf zwei unterschiedliche Vorgehensweisen: (1) Einfache MS, bei der die Peptide direkt mit einer Genom- oder Proteindatenbank verglichen werden und (2) Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS), die beispielsweise mithilfe der Kollisions-induzierten-Dissoziation Ionenfragmente für den Datenbankabgleich erzeugt (HUNT et al. 1986; CHEN u. PRAMANIK 2009). Wie der Name impliziert, umfasst MS/MS zwei Stadien der massenspektrometrischen Analyse. Im ersten Stadium werden Ionen mit gewünschtem m/z-Wert isoliert (GLISH u. VACHET 2003). Für die weitere Aufspaltung unterlaufen die isolierten Ionen anschließend eine chemische Reaktion (beispielsweise die kollisions-induzierte Dissoziation). Die so entstandenen Produkt-Ionen werden dann in der zweiten Phase der MS/MS analysiert (GLISH u. VACHET 2003). MS/MS-Analysen führen unter anderem zu einer Verbesserung des Signal/Störgeräusch-Verhältnisses (GLISH u. VACHET 2003). Um die maximale Kapazitätsauslastung zu erhöhen, werden zusätzlich zur MS unterschiedliche Protein- und Peptidtrennungsverfahren eingesetzt (AEBERSOLD u. MANN 2003). Für Proteomstudien wird die Kombination der Flüssigkeitschromatographie (LC) mit Tandem-Massenspektrometrie am häufigsten benutzt. Sie ist für die Analyse komplexer Proteinproben unverzichtbar (HUNT et al. 1992). Die differentielle Proteomanalyse des Dissertationsvorhabens wurde, im Rahmen einer Kooperation mit der Abteilung Proteinanalytik des Helmholtz Zentrums München unter Leitung von Frau Doktor Hauck und der Arbeitsgruppe von Frau Professor Deeg am Institut

für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München, mittels LC-MS/MS durchgeführt (s. Kapitel IV 4.2). Der Massenanalysator war ein LTQ-Orbitrap XL (Hybride aus linearer Ionenfalle und Orbitrap). Dieser kombiniert die Stabilität, Sensitivität und MS/MS-Fähigkeit des LTQ mit der Massengenauigkeit und dem hohen Auflösungsvermögen der Orbitrap (HAN et al. 2008). Eine schematische Darstellung eines LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometers findet sich in Abbildung 3.

Abb. 3:



Schematische Darstellung eines LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometers modifiziert nach Thermo Fisher¹. Der LTQ Orbitrap ist ein Hybride aus linearer Ionenfalle und Orbitrap und ermöglicht so Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) komplexer Protein-Proben. Mittels Nanospray-Ionisation werden die Peptide in die Gasphase überführt und ionisiert. Im ersten Schritt der Massenspektrometrie werden Ionen mit gewünschtem m/z -Wert isoliert. Anschließend werden diese durch kollisions-induzierte Dissoziation (HCD Kollisionszelle) fraktioniert. Die so entstandenen Produkt-Ionen werden dann in der Orbitrap analysiert. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Thermo Fisher Scientific GmbH.

3.4. Bioinformatische Datenanalyse

Biostatistik und die Nutzung bioinformatischer Instrumente sind unerlässlich für die Auswertung proteomischer Datensätze. Sie bilden die Grundlage für die Interpretation biologischer Daten und für die Extrahierung biologischer Relevanz aus der unüberschaubaren Menge identifizierter Proteine (KUMAR u. MANN 2009). Die Methoden zur Analyse proteomischer Daten können unterteilt werden in statistische und funktionelle Methoden

¹ <http://planetorbitrap.com/ltq-orbitrap-xl#tab:schematic>

(BESSARABOVA et al. 2012). Erstgenannte dienen der Identifizierung und Quantifizierung von Proteindaten, sowie der Beschreibung zugrundeliegender Variablen. Letztgenannte Methoden nutzen Protein-Datenbanken und verschiedene Programme, um Proteindaten im biologischen Kontext zu analysieren (BESSARABOVA et al. 2012).

Die funktionelle Datenanalyse nutzt den aktuellen Wissensstand über die Eigenschaften und Beziehungen von Proteinen in lebenden Zellen, um damit experimentelle Daten interpretieren zu können (BESSARABOVA et al. 2012). Den häufigsten Typ funktioneller Analysen stellt das *Enrichment* nach exakt definierten Vokabularen mit entsprechend definierten Relationen (ontologische Begriffe) dar (ASHBURNER et al. 2000; BESSARABOVA et al. 2012). Ontologische *Enrichment*-Analysen evaluieren die relative Repräsentanz biologischer Funktionen oder ontologischer Begriffe (*Pathways*, zelluläre Prozesse oder Krankheitsbiomarker) für das auszuwertende proteomische Profil bzw. die jeweilige Proteinliste (BESSARABOVA et al. 2012). Diese Analysen beruhen auf der Zuordnung experimentell gewonnener Daten (Proteinliste oder Proteinprofil) zu funktionellen Ontologie-Begriffen (BESSARABOVA et al. 2012). Die Protein-IDs, Gensymbole der Proteine, usw. dienen dabei als Link zwischen den web-basierten Datenbanken (Ressource der ontologischen Begriffe) und den experimentellen Daten. Der Zuordnung folgt eine Einstufung (Ranking) der Ontologie-Begriffe, basierend auf dem Ausmaß der Übereinstimmung zwischen den jeweiligen Begriffen und der experimentellen Proteinliste, in Relation zu einem entsprechenden Bezugsproteom/-Genom (beispielsweise alle identifizierten Proteine aus der massenspektrometrischen Analyse) (BESSARABOVA et al. 2012). Das Bezugsproteom/-Genom stellt die Grundlage für die statistische Berechnung dar. Hierbei wird die Wahrscheinlichkeit der beobachteten Übereinstimmung zwischen Proteinen/Genen des Experiments und den gewählten Ontologie-Begriffen ermittelt. Diese Wahrscheinlichkeit wird durch den sogenannten „p-Wert“ angegeben. In der Regel werden p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant angesehen (HUANG DA et al. 2009).

Es stehen verschiedene Web-Ressourcen für eine umfassende Datenbankabfrage von Meta-Informationen und *Enrichment*-Analysen zur Verfügung (OVELAND et al. 2015). Eine dieser Ressourcen stellt die *Gene Ontology*-Datenbank dar. Diese lässt sich in drei unterschiedliche Ontologien untergliedern: (1) Biologischer Prozess (bezieht sich auf eine biologische Zielsetzung zu der das Gen bzw. das Genprodukt beiträgt), (2) Molekulare Funktion (definiert nach der biochemischen Aktivität eines Genprodukts) und (3) Zelluläres Kompartiment (bezieht sich auf die Lokalisation biologischer Aktivität des Genprodukts innerhalb der Zelle)

(ASHBURNER et al. 2000; BLAKE u. HARRIS 2008). Ziel des *Gene Ontology*-Konsortiums ist ein strukturiertes, genau definiertes, gemeinsames und kontrolliertes Vokabular zu schaffen, das die Beschreibung von Genen und ihrer Produkte in allen Organismen ermöglicht (ASHBURNER et al. 2000).

Pathway-Analysen

Das Ergebnis der MS im Verlauf einer differentiellen Proteomanalyse sind oft umfangreiche Proteinlisten, die häufig nur wenig Rückschlüsse über die zugrundeliegenden biologischen Vorgänge erlauben. Ein möglicher Lösungsansatz für diese Problematik ist die Unterteilung der langen Proteinlisten in kleinere Gruppen funktionell zusammenhängender Proteine (KHATRI et al. 2012). Diese Gruppierung kann durch *Enrichment*-Analysen (s.o.) nach *Gene Ontology*-Gruppen, oder auf Basis der Proteinzusammengehörigkeit innerhalb biologischer *Pathways* erfolgen (KHATRI et al. 2012). Die Zuordnung funktioneller Informationen aus *Pathway*-Ressourcen dient der Bestimmung biologischer Funktionen und Interaktionen und somit der biologischen Relevanz für die zugrundeliegende Erkrankung (ANGLEY et al. 2013). Für die Erforschung biologischer *Pathways* können öffentliche Datenbanken wie *Gene Ontology* und *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) genutzt werden (KHATRI et al. 2012). Dabei werden durch korrelierende Informationen aus mindestens einer *Pathway*-Datenbank und der experimentellen Proteinliste die *Pathways* identifiziert, die in der zu untersuchenden Erkrankung eine mögliche Rolle spielen (KHATRI et al. 2012). Der Terminus *Pathway* wird allerdings nicht einheitlich verwendet und kann Datenbank abhängig variieren. Signaltransduktionswege, die von Phosphorylierungsreaktionen abhängig sind, fallen ebenso unter die Definition *Pathway*, wie enzym-abhängige metabolische Reaktionen (GREEN u. KARP 2006). Entsprechend sollten unterschiedliche *Pathway*-Ontologien für unterschiedliche Fragestellungen verwendet werden. Die parallele Nutzung verschiedener *Pathway*-Ontologien kann hingegen zu komplementären Ergebnissen führen (GREEN u. KARP 2006). Im Allgemeinen können drei Methoden (Generationen) der *Pathway*-Analyse unterschieden werden: (1) *Over-Representation Analysis*; (2) *Functional Class Scoring* und (3) *Pathway Topology* (KHATRI et al. 2012). Da für die vorliegende Studie eine *Pathway*-Analyse der ersten Generation durchgeführt worden ist, wird im Folgenden genauer auf das Prinzip der *Over-Representation Analysis* eingegangen.

Die *Over-Representation Analysis* evaluiert statistisch die Fraktion von Proteinen/Genen aus der Gesamtzahl der differentiell exprimierten Proteine/veränderten Gene, die einem bestimmten *Pathway* zugeordnet werden kann (KHATRI et al. 2012). In der Literatur wird sie

auch als „*2x2 table method*“ bezeichnet (GOEMAN u. BÜHLMANN 2007). Der *Over-Representation Analysis* liegt folgende Strategie zugrunde: Zuerst wird eine Proteinliste (beispielsweise aus den experimentell gewonnenen Daten) nach spezifischen Kriterien erzeugt (KHATRI et al. 2012). Im darauffolgenden Schritt werden für jeden *Pathway* die mit der Proteinliste übereinstimmenden Proteine gezählt. Dieser Prozess wird für ein entsprechendes Referenzproteom (beispielsweise alle identifizierten Proteine der Analyse) wiederholt (KHATRI et al. 2012). Im Anschluss wird jeder *Pathway* auf Über- oder Unterrepräsentation in der Proteinliste überprüft. Die für diese Überprüfung am häufigsten benutzten Tests umfassen den chi-square, die Binomialverteilung und den hypergeometrischen Test (KHATRI et al. 2012).

III. ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG

Sowohl Krankheiten im Allgemeinen als auch Epilepsien im Besonderen manifestieren sich im Phänotyp eines Organismus. Die Ausprägung des Phänotyps ist dabei auf das Expressionsmuster und die Interaktion von Proteinen zurückzuführen. Das Verständnis molekularer Pathomechanismen hängt demzufolge weitestgehend von der Erforschung des zellulären „Proteincocktails“ ab. In diesem Zusammenhang kommt insbesondere der vergleichenden (differentiellen) Proteomanalyse zwischen erkranktem und gesundem Gewebe eine besondere Bedeutung zu.

Epilepsien gehören zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen bei Hund und Katze sowie beim Menschen (SANDER u. SHORVON 1996; COWAN 2002; CHANDLER 2006; SMITH BAILEY u. DEWEY 2009). Sie resultieren aus einer Kaskade molekularer Veränderungen, die bisher noch größtenteils unerforscht sind. Molekularen Analysen zufolge umfassen solche Mechanismen genetische Mutationen und Dysfunktionen von Signalwegen, die zu der Bildung eines iktogenen Netzwerkes führen können (GOLDBERG u. COULTER 2013). Diesbezüglich stellen insbesondere inflammatorische Prozesse, die infolge einer initialen Schädigung des Gehirns auftreten, Schlüsselkomponenten der Epilepsieentstehung dar (VEZZANI et al. 2013b). Die Entstehung eines übererregbaren Netzwerkes kann demnach die Folge molekularer Veränderungen sein, die durch inflammatorische Mediatoren ausgelöst wurden (PITKÄNEN u. SUTULA 2002; VEZZANI u. GRANATA 2005; VEZZANI et al. 2008). Ein besseres Verständnis dieser molekularen Mechanismen könnte zu der Entwicklung neuer präventiver, diagnostischer und therapeutischer Ansätze führen. Diese Entwicklung würde von Epileptogenese-Biomarkern erheblich profitieren. In diesem Kontext könnten Epileptogenese-Biomarker unter anderem die Kosten der Entdeckung und Validierung antiepileptischer Therapeutika reduzieren sowie anti-epileptogene Interventionen ermöglichen (ENGEL et al. 2013; PITKÄNEN u. ENGEL 2014).

Im Rahmen des Dissertationsvorhabens sollen daher die Veränderungen der molekularen Mechanismen während dem Prozess der Epileptogenese untersucht werden. Hierfür wird eine differentielle Proteomanalyse in der Post-Insult-Phase, Latenzphase und der chronischen Phase mit spontanen wiederkehrenden Anfällen durchgeführt. Durch die anschließende funktionelle Auswertung der Ergebnisse aus der differentiellen Proteomanalyse, werden die molekularen Veränderungen im Kontext biologischer Funktionen analysiert. Das zu untersuchende Gewebe umfasst die Gehirnareale HC und PHC. Diese sind Gehirnstrukturen, denen bei der TLE-Entstehung eine besondere Bedeutung zukommt. Ziel der Arbeit ist es, Einblicke und damit verbunden ein besseres Verständnis der veränderten Pathomechanismen im Kontext der

Epileptogenese zu bekommen. Zusätzlich wird eine hypothesengestützte fokussierte Auswertung der immun- und inflammations-assoziierten Mechanismen durchgeführt, um deren Bedeutung im Kontext der Epileptogenese bedingten Veränderungen zu evaluieren. Darüber hinaus soll die Studie eine Grundlage liefern, potentielle Biomarker für molekulare Bildgebungsverfahren und mögliche Zielstrukturen für die Prävention und Therapie der Epileptogenese zu identifizieren.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Alle Untersuchungen wurden im Rahmen einer Tierversuchsgenehmigung (Gz.55.2-1-54-2532-94-11) durchgeführt. Bei den Tieren handelte es sich um weibliche Ratten des Stammes *Sprague Dawley* (Harlan Laboratories GmbH, Udine, Italien). Die Tiere wiesen bei Ankunft ein durchschnittliches Gewicht von 200-224 g auf. Die Tierhaltung erfolgte einzeln in „Makrolonkäfigen Typ III hoch“. Als Einstreu diente Weichholzgranulat (Grade 5; Altromin GmbH, Lage, Deutschland). Leitungswasser und Ssniff Rattenfutter (Ssniff R/M Haltung Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Das Futter wurde einmal pro Woche und das Wasser zweimal pro Woche erneuert. Das Umsetzen der Tiere in saubere Käfige erfolgte einmal pro Woche. Dabei wurde darauf geachtet, dass dieses mindestens ein bis zwei Tage vor Versuchsphasen stattfand. Die Haltung der Tiere erfolgte bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Zyklus (Licht an 07:00 Uhr; Licht aus 19:00 Uhr MEZ). Die Umgebungstemperatur betrug durchschnittlich 20-24°C und die Luftfeuchtigkeit 45-60 %. Nach ihrer Ankunft konnten sich die Tiere mindestens eine Woche an die neuen Haltungsbedingungen gewöhnen. Vor Beginn der Untersuchungen wurden die Tiere ausgiebig an den Experimentator und sofern notwendig an die Versuchsräume und Versuchsgeräte gewöhnt. Die Versuche erfolgten immer zwischen 07:00 Uhr und 09:00 Uhr MEZ. Dadurch konnten circadiane Einflüsse so gering wie möglich gehalten werden (STEWART et al. 2001).

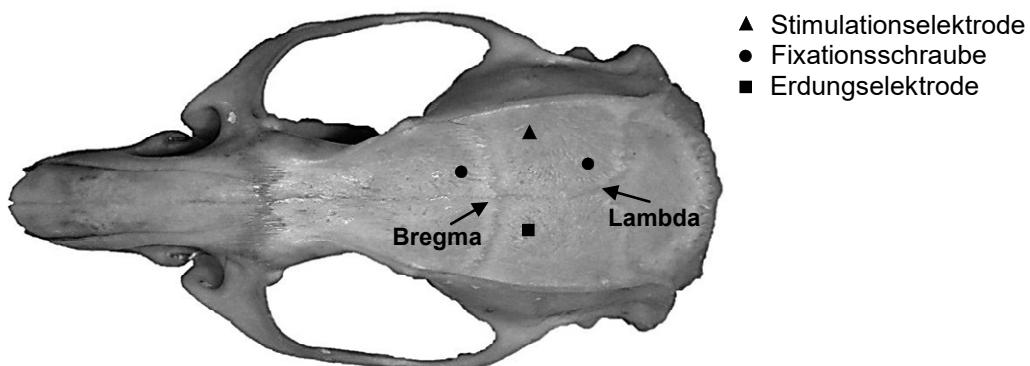
2. Post-Status-Epilepticus-Modell

2.1. Elektrodenimplantation

Im Rahmen des elektrischen SE-Modells wurde den Tieren eine bipolare Ableitungs- und Stimulationselektrode (Tiefenstimulationselektrode aus rostfreiem, Teflon ummanteltem Stahl) in die BLA implantiert (Abbildung 4). Grundlage hierfür war eine stereotaktische Operationstechnik. Als Narkotikum wurde den Tieren vor der Operation 360 mg/kg Chloralhydrat (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) gelöst in 10 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung, intraperitoneal (i.p.) appliziert. Die Überprüfung der Narkosetiefe erfolgte anhand der Lid-, Zwischenzehen- und Kornealreflexe. Bei Ratten mit ausgefallenem Lid- und Zwischenzehenreflex aber noch erhaltenem Kornealreflex, wurde von einer chirurgischen Toleranz ausgegangen. Die peri- und postoperative Analgesie erfolgte 30 min *prä operationem*

und 24 h *post operationem* durch subkutane (s.c.) Applikation von 1 mg/kg Meloxicam (Metacam® Injektionslösung, Boehringer Ingelheim, Deutschland). Für die örtliche Betäubung wurde 1 ml Bupivacain 0,5 %, (JENAPHARM®, mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Deutschland) unter die Kopfhaut injiziert. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurde Bepanthen Augensalbe (Bepanthen®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Die genaue Positionierung der Elektrode erfolgte mithilfe eines stereotaktischen Apparates (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Als Orientierungshilfe diente der stereotaktische Atlas von PAXINOS u. WATSON (2006), der die topografische Beziehung der Hirnstrukturen zu *Bregma* (vorderer Kreuzungspunkt der Knochennähte) abbildet (Abbildung 4). Voraussetzung für eine exakte Elektrodenimplantation ist demnach die Lage von *Bregma* und *Lambda* (hinterer Kreuzungspunkt der Knochennähte) auf derselben horizontalen Ebene (Abbildung 4). Hierfür wurde die Oberkieferhalterung auf -3,9 mm ventral der Interaurallinie eingestellt. Die genaue Überprüfung der Lokalisationsdaten erfolgte im Rahmen von Vorversuchen. Folgende Koordinaten wurden in Bezug auf *Bregma* angewandt: *anterioposterior* -2,2 mm, *lateral* +4,7 mm und *dorsoventral* -8,5 mm. Für die Befestigung der Elektrode wurde jeweils eine Fixationsschraube aus rostfreiem Stahl *rostral* und *kaudal* des Elektrodenbohrlochs angebracht (Abbildung 4). Die Ableitung der Erdungselektrode erfolgte mithilfe einer Schraube, die gegenüberliegend der Elektrode angebracht wurde (Abbildung 4). Kaltpolymerisierender Kunststoff (Paladur®, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) diente dabei der dauerhaften Fixierung der Elektrode. Dieser wurde in zwei Schichten aufgetragen. Die erste Schicht Paladur enthielt zusätzlich 2,1 %-iges Gentamicinsulfat (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), wodurch eine Wundinfektionsprophylaxe erreicht wurde. Die antibiotische Versorgung der Tiere erfolgte für einen Zeitraum von insgesamt acht Tagen (einen Tag *prä operationem*; sechs Tage *post operationem*) zweimal täglich im Abstand von sechs Stunden. Hierfür wurde jedem Tier 0,1 ml Marbofloxacin (Marbocyl®, Vétoquinol, Ravensburg, Deutschland) s.c. appliziert. Stärkere Blutungen während der Elektrodenimplantation wurden mit 1-3 Tropfen Suprarenin (Suprarenin®, Henry Schein Vet, Stuttgart, Deutschland) behandelt. Im Anschluss an die Operation folgte eine sechswöchige Phase der Regeneration.

Abb. 4:



Schematische Darstellung eines knöchernen Rattenschädels. Die Implantation der Stimulationselektrode erfolgte anhand des stereotaktischen Atlas von PAXINOS u. WATSON (2006). *Bregma* und *Lambda* (Kreuzungspunkte der Knochennähte) dienten hierbei als Orientierungshilfe. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Thomas Licko zur Verfügung gestellt.

2.2. SE-BLA-Modell

In der vorliegenden Studie wurde das SE-BLA-Modell verwendet (vgl. Kapitel II.1.6). Dabei wird durch 25-minütige Dauerstimulation der BLA ein SE induziert. Zu Versuchsbeginn erfolgte für jedes Tier eine Bestimmung des Körpergewichts. Zudem wurde von jedem Tier ein basales Elektroenzephalogramm (EEG) abgeleitet. Hierfür wurden die Elektroden der Tiere über ein zweiadriges isoliertes Kabel mit der Elektrodenanschlussbox des Elektroenzephalographen verbunden. Im Anschluss erfolgte ein Umsetzen der Ratten in ausgepolsterte Sichtkästen. Dort wurden sie an das Stimulationsgerät (Stimulus Isolator A365 und Accupulsor A310C, World Precision Instruments, Berlin) angeschlossen. Es folgte eine 25-minütige elektrische Stimulation der Tiere durch biphasische Einzelpulsserien (alternierend positiv-negativ geladene Rechteckimpulse) mit einer Frequenz von 50 Hz und einer Stromstärke von 700 µA. Die Anfallsschwere wurde nach dem in Tabelle 2 dargestellten Schema protokolliert. Nach der elektrischen Stimulation erfolgte eine erneute EEG-Ableitung. Mithilfe dieses EEGs wurde kontrolliert, ob sich die Tiere im SE befinden. Ein SE bestätigte sich durch eine Veränderung des EEGs von circa 3 Hz und mindestens doppelter

Amplitudenhöhe im Vergleich zum Basal-EEG. Im Anschluss wurden die Versuchstiere erneut in gepolsterte Sichtkästen gesetzt und weitere 3 h und 35 min beobachtet. Innerhalb dieses Zeitraums erfolgte eine Protokollierung der Anfallsaktivität. Nach einer Beobachtungszeit von insgesamt 4 h wurde der SE durch die Applikation von 20 mg/kg Diazepam i.p. (Diazepam-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) beendet. Bei den nicht stimulierten Kontrolltieren erfolgte ebenfalls eine Applikation derselben Menge Diazepam. Bis zum Wiedererlangen des Bewusstseins wurden die Tiere auf beheizte Wärmematten gelegt und ihre Vitalfunktionen regelmäßig kontrolliert. Im Anschluss daran wurde ein weiteres EEG abgeleitet und mit dem Basal-EEG sowie dem EEG nach Statusinduktion verglichen. Wenn bei den Tieren keine elektrographische Anfallsaktivität mehr feststellbar war, wurden ihnen insgesamt 7,5 ml körperwarmer Ringerlactat-Lösung (Ri-Lac®, Hartmann B.Braun Vet Care, Melsungen, Deutschland) s.c. und i.p. injiziert. Die Injektion von Ringerlactat erfolgte wiederholt am Morgen des darauffolgenden Tages, sowie im Einzelfall (abhängig vom Gesundheitszustand des Tieres) auch über diesen Tag hinaus. Bis zur selbstständigen Futteraufnahme und vollständigen Genesung der Tiere wurden diese zweimal täglich mit Babybrei und aufgeweichten Pellets gefüttert. Dabei erfolgte eine ständige Kontrolle des Gesundheitszustandes und Protokollierung von Gewicht und Futteraufnahme. Die Beurteilung des Gesundheitszustandes erfolgte anhand eines modifizierten Irwin-Scale (IRWIN 1968). Aufgrund der Belastung durch den SE konnten die Tiere vereinzelt reduzierte Futteraufnahme, Gewichtsverlust < 15 % und eine Abweichung vom Irwin-Scale zeigen. Nach sieben Tagen hätte jedoch jede Abweichung in der Einstufung „normal/unverändert (Irwin-Score = 2)“ zum Versuchsabbruch und zur Euthanasie des betroffenen Tieres geführt.

Anfallsparameter

Die Evaluierung der Anfallsaktivität erfolgte anhand der durch BARAN et al. (1995) modifizierten Einteilung von RACINE (1975) (Tabelle 2). Sie diente als Grundlage für die Beurteilung der im SE-BLA-Modell auftretenden Anfallstypen. Entsprechend der Anfallsaktivität wurde der beobachtete SE in drei Subtypen untergliedert: (1) Nicht-konulsive fokale Anfälle, die sich durch stereotypes Verhalten äußern; (2) Fokale Anfälle, die von einzelnen generalisierten Anfällen immer wieder unterbrochen werden und in solche übergehen können, sowie (3) anhaltend generalisierte Anfälle (BRANDT et al. 2003).

Tab. 2
Beurteilung der Krampfstadien

Krampfstadium	Parameter	Anfallsform
Stadium I	Immobilität, schwache Fazialklonien (Schließen eines oder beider Augen, Zittern der Tasthaare, stereotypes Schnüffeln)	Fokal
Stadium II	Schwere Fazialklonien in Form von klonischen Kaubewegungen bzw. Kopfnicken	
Stadium III	Einseitiger Vorderextremitätenklonus	
Stadium IV	Aufrichten und bilateraler rudernder Vorderextremitätenklonus	
Stadium V	Aufrichten der Tiere mit anschließendem Verlust der Stellreflexe, Umfallen nach hinten oder zur Seite und generalisiert klonische Krämpfe	Generalisiert
Stadium VI	Explosionsartiges Rennen und Springen (Running and bouncing)	

(mod. nach RACINE 1975)

3. Überwachung spontaner Anfälle

In der chronischen Phase (sechs Wochen nach SE) erfolgte eine Video- und EEG-Überwachung der spontanen Anfallsaktivität für den Zeitraum von insgesamt 20 Tagen. Innerhalb dieses Zeitraums wurde das Verhalten der Tiere 24 h täglich und sieben Tage/Woche beobachtet. Hierfür wurden die Tiere in spezielle verglaste Sichtkästen (60 cm x 40 cm x 40 cm) gesetzt. Abtrennvorrichtungen innerhalb der Sichtkästen gewährleisteten dabei den dauerhaften Aufenthalt der Tiere im Überwachungsbereich der Kamera. Für die Zeit der Überwachung wurde ein spezielles Einstreu-Granulat (Rehofix, Ssniff GmbH, Soest, Deutschland) verwendet. Futter und Wasser wurden zweimal täglich kontrolliert und mindestens einmal wöchentlich erneuert. Die Entfernung der Einstreu erfolgte einmal wöchentlich. Vor der Überwachung wurden mehrere Probefürdurchläufe durchgeführt. Hierdurch konnte eine optimale Bildeinstellung für die Videoüberwachung gewährleistet werden. Anfälle, die während einer Manipulation der Tiere sowie vor der Überwachung aufgetreten sind, wurden gesondert vermerkt.

3.1. EEG-Aufzeichnung

Das EEG-Aufzeichnungssystem umfasste folgende Einheiten: (1) Analog-Digitalwandler (PowerLab/800s, ADInstruments Ltd, Hastings, UK); (2) Kanal-Verstärker (Animal Bio Amp, ADInstruments Ltd, Hastings, UK) und (3) Computer mit geeigneter EEG-Auswertungssoftware (Chart 5 für Windows). Für die Ableitung der EEGs wurden die Elektroden der Tiere über ein zweiadriges ummanteltes Kabel mit den jeweiligen Datenerfassungseinheiten verbunden. Um den Tieren ausreichend Bewegungsspielraum zu gewährleisten und dabei ein Verdrehen der Kabel zu vermeiden, wurde ein Telefonkabel-Entwirrer in die Ableitungseinheit eingebaut. Das Hintergrundrauschen der EEGs konnte durch den Einsatz einer Erdungs-Krokodilklemme am Verstärker reduziert werden. Die Signalverarbeitung des EEG-Systems erfolgte mit einer Abtastrate von 200 Hz. Als Filtereinstellungen wurden 0,1 Hz für den *high pass*-Filter und 60 Hz für den *low pass*-Filter gewählt. Die Einstellung des Filters für den Frequenzbereich des Netzstroms betrug 50 Hz. Dies wurde durch die Anwendung eines sogenannten „*Notch*-Filters“ ermöglicht. Durch eine anschließende manuelle Auswertung der EEGs konnte eine exakte Bestimmung des Anfallszeitpunktes ermittelt werden. Verifizierung und Klassifizierung erfolgten anhand der komplementären Videoaufzeichnungen.

3.2. Video-Aufzeichnung

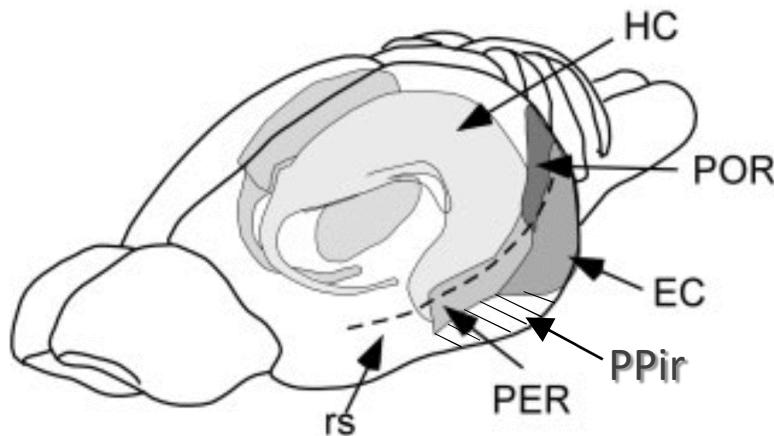
Parallel zu den EEG-Aufzeichnungen erfolgte eine Videoüberwachung der Tiere. Hierfür wurden CCD-Kameras (Conrad Electronic GmbH, München, Deutschland) mit Infrarotempfindlichkeit verwendet. Die Aufzeichnungen erfolgten im Schwarz-Weiß-Bereich. Das Blickfeld einer Kamera erlaubte die parallele Beobachtung von maximal fünf Tieren. Im vorliegenden Versuch wurden für die Überwachung von insgesamt neun Tieren zwei Kameras verwendet. Die Speicherung des Datenmaterials erfolgte über eine interne RAID (*Redundant Array of Independent Discs*). Mithilfe des Programms *Digi-Protect Searcher 6.275 beta* (ABUS Security-Tech, Affing, Deutschland) konnten die Videoaufnahmen analysiert werden. Der komplementäre Abgleich von Videoaufnahmen und EEGs ermöglichte die genaue Feststellung von Anfallszeitpunkt, -dauer und -schwere.

4. Durchführung und Auswertung der differentiellen Proteomanalyse

4.1. Gewebeaufbereitung für die massenspektrometrischen Analysen

Die für die differentielle Proteomanalyse verwendeten Tiergruppen wurden zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach SE euthanasiert. Im Anschluss an die Euthanasie erfolgte die Entnahme der Gehirnregionen HC und PHC. Die weitere Aufbereitung geschah in Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum München und der Arbeitsgruppe von Frau Professor Deeg am Institut für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Um tageszeitliche Einflüsse auf die Versuchsdurchführung zu limitieren, erfolgte eine abwechselnde Euthanasie von SE- und Kontrolltieren. Das Gehirn wurde aus dem knöchernen Schädel herauspräpariert und in eine eisgekühlte Petrischale überführt. Mithilfe eines Skalpells erfolgte die Trennung beider Hemisphären entlang der Medianen. Durch Pinzettenschläge wurde der *entorhinale*, *perirhinale* und *posterior-piriforme Cortex* des PHC von dem umgebenden Gewebe gelöst und anschließend freipräpariert. Die Präparation des HC erfolgte ebenfalls durch vorsichtiges Entfernen des umgebenden Gewebes. Sowohl die *Hippocampi* beider Hemisphären als auch die *parahippocampalen Cortices* wurden gepoolt und bis zur weiteren Aufbereitung in Falcons mit eisgekühlter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2) aufbewahrt. Abbildung 5 zeigt schematisch die präparierten Gehirnregionen des Rattengehirns.

Abb. 5:



Schematische Darstellung eines Rattengehirns (mod. nach FURTAK et al. 2007). In Grautönen dargestellt der HC sowie die *entorhinalen*, *perirhinalen* und *postrhinalen Cortices*. Sie umgeben den *caudalen Pol* des *Sulcus rhinalis*. Unterhalb des *entorhinalen* und *perirhinalen Cortex* findet sich der *posterior-piriforme Cortex* (schraffiert dargestellt). Die drei letztgenannten Strukturen entsprechen der Region des *parahippocampalen Cortex*. PER: *perirhinaler Cortex*, EC: *entorhinaler Cortex*, POR: *postrhinaler Cortex*, PPir: *posterior-piriformer Cortex*, HC: *Hippocampus*, rs: *Sulcus rhinalis*. Abbildung mit freundlicher Genehmigung des Wiley-Blackwell Verlages.

Im weiteren Verlauf wurde eine Gewebehomogenisation und Proteinextraktion durchgeführt. Da die Probenaufbereitung inklusive subzellulärer Fraktionierung im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Professor Deeg am Institut für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt worden ist, werden im Folgenden nur die wesentlichen Schritte beschrieben.

Die Gewebeproben wurden gewaschen und für 15 min bei 37°C in 0,05 % Trypsin-EDTA (Promega, Mannheim, Deutschland) inkubiert. Der enzymatische Verdau zum Aufschluss des Gewebes, wurde durch die Zugabe von 1 mg/ml Trypsin Inhibitor (Trypsin Inhibitor aus Glycine max, Typ I-S, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) und 0,5 ml DNaseI (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) beendet. Durch vorsichtiges Zerreiben erfolgte eine mechanische Dissoziation der Zellen. Die Zellen wurden gewaschen, gezählt und anschließend lysiert. Der Gesamtproteingehalt wurde durch die Bradford-Methode (BRADFORD 1976) bestimmt. Als Probenaufbereitungsschritt für die massenspektrometrische Analyse erfolgte ein FASP-(*filter aided sample preparation*)-Verdau der Proteine der Proben wie bereits

beschrieben von WISNIEWSKI et al. (2009). Hierbei wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein der Proben mittels Trypsin (Promega, Mannheim, Deutschland) verdaut. Abschließend wurden die Eluate angesäuert und im Massenspektrometer gemessen.

4.2. Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrischen Analysen wurden im Rahmen des vorliegenden Projektes in Kooperation mit der Abteilung Proteinanalytik des Helmholtz Zentrums München durchgeführt. Die Durchführung der LC-MS/MS (Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-Analyse) erfolgte, wie von HAUCK et al. (2010) bereits beschrieben, durch Nanosprayionisation mit einem Ultimate3000 nano HPLC-System (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), das gekoppelt war an ein LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland, vgl. hierzu Kap. II.3.3.).

Es wurden 0,5 µg der Probenlösung bei einer Durchflussmenge von 30 µl/min in verschiedenen Puffern auf die Nano Trap Säule (100 µm i.d. × 2 cm, gepackt mit Acclaim PepMap100 C18 Material, Durchmesser 5 µm, 100 Å, Dionex GmbH, Idstein, Deutschland) des HPLC-Systems geladen. Nach 5 min wurden die Peptide eluiert und auf der analytischen Säule (75 µm i.d. × 15 cm, gepackt mit Acclaim PepMap100 C18 Material, Durchmesser 3 µm, 100 Å, Dionex GmbH, Idstein, Deutschland) voneinander getrennt.

Aus dem hochauflösenden MS-Vorscan im Massenspektrometer wurden die 10 abundantesten Peptid-Ionen für die Fragmentierung in der linearen Ionenfalle ausgewählt. Die Peptid-Ionen mussten hierfür mindestens zweifach geladen sein und ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von über 200 aufweisen. Durch dynamischen Ausschluss wurde jedes Peptid-Ion, das für die Fragmentierung ausgewählt wurde, für 60 Sekunden von einer wiederholten Fragmentierung ausgeschlossen. Während der Fragment-Analyse wurde ein hochauflösendes MS-Spektrum mit einer Auflösung von 60.000 und einem Massenbereich von 300-1500 Da aufgenommen.

4.3. Markierungsfreie Peptid-Quantifizierung

Für die markierungsfreie Quantifizierung (vgl. hierzu HAUCK et al. 2010; HAUCK et al. 2012) wurde die Progenesis-Software (Version 2,5, Nonlinear Dynamics Limited, Newcastle upon Tyne, UK) verwendet. Hierfür wurden die Profildaten der MS-Scans und MS/MS-Spektren in Progenesis hochgeladen und in Peak-Listen transformiert. Im nächsten Schritt wurde eine Probe als Referenz ausgewählt, gefolgt von einer automatischen Ausrichtung der anderen Proben

anhand zuvor manuell gesetzter Markierungen. Nach Angleichung der Proben und dem Ausschluss einfach geladener Ionen, sowie Ionen mit Ladungen von mehr als 7-fach, erfolgte eine Unterteilung in die jeweiligen Gruppen (SE- und Kontrolltiere) sowie eine Normalisierung der Roh-Abundanzen aller Eigenschaften.

4.4. Datenbanksuche und Proteinidentifikation

Für die Peptid-Identifizierung erfolgte ein Export aller MS/MS-Spektren aus Progenesis als „Mascot-Datei“. Anschließend wurden diese mit dem Programm „Mascot“ (Version 2,4, Matrix Science Ltd., London, UK) in der Ensembl-Datenbank² für *Rattus norvegicus* (Version 69, 32971 Sequenzen) identifiziert. Folgende Parameter wurden hierfür verwendet: 10 ppm Peptid-Massentoleranz und 0,6 Da Fragment-Massentoleranz; eine verpasste Spaltung wurde erlaubt; Carbamidomethylation wurde als feste Modifikation gewählt; Methioninoxidation sowie Deamidierung von Asparagin und Glutamin wurden als variable Modifikationen zugelassen. Durch die mascot-integrierte *Decoy*-Datenbanksuche wurde, unter Benutzung des *Percolator* Algorithmus, eine durchschnittliche Falschpositivrate (*False Discovery Rate*) von < 2 % ermittelt. Hierbei lag die Grenze des *Percolator score* bei 13 und das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$. Im Anschluss wurden die identifizierten Peptide erneut in die Progenesis-Software geladen. Die Protein-Quantifizierung erfolgte ausschließlich über die *unique peptides* eines identifizierten Proteins. Für die Berechnung der kumulativen normalisierten Abundanzen eines Proteins wurden die normalisierten Abundanzen aller Peptide aufsummiert, die dem jeweiligen Protein zugeordnet wurden. Die weitere Datenanalyse umfasste nur solche Proteine, die mit mindestens zwei *unique peptides* quantifiziert wurden (im Folgenden als „identifizierte Proteine“ bezeichnet). Ein *Student's t-test* wurde durchgeführt, um die normalisierten Abundanzen der individuellen Proteine zu vergleichen. Des Weiteren wurde für jedes Protein das relative Verhältnis der durchschnittlichen Abundanzen von SE- und Kontrolltieren (Quotient aus dem Mittelwert der Abundanzen der SE-Tiere und dem Mittelwert der Abundanzen der Kontrolltiere, *fold change*) errechnet. Proteine mit einem p-Wert < 0,05 und einem *fold change* $\geq 1,5$ wurden als differentiell exprimiert betrachtet.

² <http://www.ensembl.org/index.html>

4.5. Ergänzende Datenbanksuche von RGD-Symbolen und humanen Orthologen

Für die weiteren Analysen, insbesondere die funktionelle Datenauswertung, wurden die Genbezeichnungen der identifizierten Proteine verwendet. Im Verlauf der MS-basierten Datenbanksuche konnte allerdings nicht jedem identifizierten Protein ein Gensymbol zugeordnet werden. Die ergänzende Suche der fehlenden Gensymbole erfolgte unter Anwendung eines eigens zu diesem Zweck geschriebenen Skriptes, welches von der Abteilung für Proteinanalytik des Helmholtz Zentrums München entwickelt wurde. Der Skript-Suchdurchlauf erfolgte in der Ensembl-Datenbank. Das Suchraster umfasste dabei sowohl *Rat Genome Database*-(RGD)-Symbole, als auch humane Orthologe (*HUGO Gene Nomenclature Committee*-(HGNC)-Symbole). Einzelne Proteine, denen durch das automatisierte Suchprogramm weder ein RGD-Symbol noch ein entsprechendes humanes Ortholog zugeordnet werden konnten, wurden mithilfe der spezifischen Proteinsequenzen (FASTA-Sequenzen) unter Verwendung des NCBI Blast Algorithmus³ recherchiert.

4.6. Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung der Proteindaten erfolgte mithilfe der Programmiersprache „R“ (R CORE TEAM 2014). R⁴ ist eine freie Softwareumgebung (*Open Source*) für statistische Berechnungen und grafische Darstellungen (FIELD et al. 2012). Die Funktionalität von R kann, je nach Bedarf, durch Installation von verschiedenen R-Paketen erweitert werden. Das Herunterladen und Speichern dieser Pakete erfolgt dabei online über das *Comprehensive R Archive Network* (CRAN, FIELD et al. 2012). Die in der statistischen Analyse der Proteomdaten verwendeten Pakete werden in den einzelnen Kapiteln erläutert. Die Skripten mit dem jeweiligen R-Code für die einzelnen Auswertungen finden sich im Anhang.

4.6.1. Principal Component-Analyse

Die *Principal Component*-Analyse ist eine weitverbreitete Methode, welche multivariate Datensätze unter Beibehaltung des größtmöglichen Informationsgehaltes, auf wenige neue Variablen reduziert. Dies ermöglicht die explorative Analyse und grafische Darstellung komplexer Datensätze (JOLLIFFE 2002; JACKSON 2003; IVOSEV et al. 2008). Die neuen Variablen (*Principal Components*) stellen Linearkombinationen der ursprünglichen Variablen

³ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

⁴ <http://www.r-project.org/>

dar und werden nach dem Grad an Datenvarianz (Informationsgehalt) den sie repräsentieren hierarchisch gegliedert (IVOSEV et al. 2008). Die Beiträge jeder Variablen zur jeweiligen *Principal Component* werden dabei als *loading* bezeichnet. Die Anzahl der *Principal Components* im untersuchten Datensatz nennt man *scores* (IVOSEV et al. 2008). Die Ergebnisse der *Principal Component*-Analyse lassen sich dann als Projektionen multidimensionaler *scores* und *loadings* in einer zwei-oder dreidimensionalen Grafik darstellen (IVOSEV et al. 2008). Im vorliegenden Projekt wurde eine *Principal Component*-Analyse durchgeführt, um Unterschiede zwischen SE- und Kontrolltieren anhand ihrer Proteinprofile zu untersuchen. Hierfür wurden die normalisierten Abundanzen der identifizierten Proteine von SE- und Kontrolltieren mittels R analysiert. Die Analyse mit R umfasste folgende Pakete: „FactoMineR⁵“, ein R-Paket für multivariate Datenanalysen (HUSSON et al. 2015) und „rgl⁶“, ein R-Paket für interaktive dreidimensionale Grafiken (ADLER et al. 2014). Da die Größenordnung, Verteilungsschiefe (*Skewness*) und *Kurtosis* der Daten das Ergebnis der *Principal Component*-Analyse beeinflussen, erfolgte vor der Analyse eine Transformation des Datensatzes: (1) log₂-Transformierung; (2) Zentrierung, um den mittleren quadratischen Fehler der Datenangleichung zu reduzieren (MIRANDA et al. 2008) und (3) Skalierung, um die Variablen auf eine einheitliche Varianz zu normalisieren und damit zu verhindern, dass bestimmte Eigenschaften die Analyse aufgrund extremer Werte beeinflussen (DUDA u. HART 1973; EKLUNDH u. SINGH 1993). Proteine mit fehlenden Werten bei mindestens einem SE- und/oder Kontrolltier (Abundanz = 0) wurden aus der *Principal Component*-Analyse ausgeschlossen.

4.6.2. Volcano Plots

Um die identifizierten Proteine in HC und PHC im Zeitverlauf grafisch darzustellen und die jeweils differentiell exprimierten Proteine optisch hervorzuheben, wurden *Volcano Plots* verwendet. Das *Volcano Plot*-Histogramm illustriert das Verhältnis von statistischer (p-Wert) und biologischer Signifikanz (*fold change*) in großen Datensätzen. Hierdurch werden Proteine mit hohem *fold change* und niedrigem p-Wert hervorgehoben.

Die Erstellung der Graphen erfolgte mithilfe des R-Paketes „ggplot2⁷“ (HADLEY 2009). Hierfür wurden die log₂-transformierten *fold changes* (log₂-Transformierung ermöglicht eine

⁵ <http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR>

⁶ <http://CRAN.R-project.org/package=rgl>

⁷ <http://ggplot2.org/>

Unterscheidung zwischen Auf- und Herunterregulation) der Proteine gegen die negativ logarithmierten p-Werte (je kleiner der p-Wert desto größer der Skalenwert auf der y-Achse) aufgetragen. Die Verwendung einer Farbkodierung ermöglichte eine Differenzierung der regulierten Proteine von den identifizierten Proteinen. Zusätzlich wurden für die jeweils fünf am stärksten regulierten Proteine die entsprechenden Gensymbole angegeben.

4.6.3. Venn-Diagramme

Die Venn-Diagramme dienten der übersichtlichen Darstellung der gemeinsam regulierten Proteine von HC und PHC. Für die Erstellung der maßstabgetreuen Diagramme wurde das R-Paket „VennDiagram⁸“ verwendet (CHEN 2014).

4.6.4. Proteinexpressionsanalyse mittels Heatmaps

Um die Proteinexpression ausgewählter Proteine im Zeitverlauf zu analysieren, erfolgte eine grafische Darstellung der tierspezifischen (individuellen) Proteinexpressionsunterschiede durch *Heatmaps*. *Heatmaps* dienen der Visualisierung zweidimensionaler Datensätze ($m \times n$ Matrix) mittels skalierter Farbauswahl. Hierdurch können Unterschiede in großen Datensätzen übersichtlich hervorgehoben werden. In diesem Zusammenhang wird eine $m \times n$ Matrix wie folgt verändert: (1) die Spalten und Zeilen der Matrix werden neu angeordnet, sodass ähnliche Profile näher beieinander liegen (clustern) und (2) jeder Wert des Datensatzes wird farblich (nach vorher festgelegtem Farbschlüssel) dargestellt, um die Unterschiede grafisch hervorzuheben (KEY 2012). Im vorliegenden Projekt wurden hierarchisch geclusterte (nur die Proteinprofile wurden geclustert) *Heatmaps* mittels heatmap.2-Funktion des R-Paketes „gplots⁹“ (WARNES et al. 2015) erstellt. Grundlage waren die \log_2 -transformierten individuellen *fold changes* der SE- und Kontrolltiere. Die individuellen *fold changes* errechneten sich aus dem Verhältnis der Protein-Abundanzen des jeweiligen SE- bzw. Kontrolltieres und dem Mittelwert der Protein-Abundanzen aller Kontrolltiere. Für die *Heatmaps* wurde ein Rot-Blau-Farbschlüssel verwendet. Zusätzlich zum Farbschema wurden die nicht-logarithmierten individuellen *fold changes* angegeben. Abhängig vom analysierten Zeitpunkt erfolgte eine chronologische Nummerierung der SE- und Kontrolltiere.

⁸ <http://cran.r-project.org/web/packages/VennDiagram/index.html>

⁹ <http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>

4.7. Funktionelle Datenanalyse

4.7.1. Klassifizierung der differentiell exprimierten Proteine

Die Klassifizierung der differentiell exprimierten Proteine diente einer umfassenden Darstellung der biologischen Prozesse und molekularen Funktionen, welche durch den Prozess der Epileptogenese besonders beeinflusst werden. Die Einteilung der regulierten Proteine erfolgte durch das Klassifizierungssystem von PANTHER¹⁰ (Protein Annotation Through Evolutionary Relationship). PANTHER stellt eine öffentliche Datenbank dar, die Proteinfunktionen mit der Evolution von Proteinsequenzen verknüpft (MI et al. 2007). Das System besteht dabei aus drei funktionellen Modulen. Kernmodul ist eine große Proteinbibliothek die alle proteinkodierenden Gene von insgesamt 82 verschiedenen Organismen enthält. Die Bibliothek setzt sich aus Proteinfamilien (Zusammengehörigkeit auf Basis von Sequenzhomologien) und –Subfamilien (gemeinsame Funktionen) zusammen (MI et al. 2013).

Die differentiell exprimierten Proteine wurden nach den *Gene Ontology*-Kategorien „Biologischer Prozess“ und „Molekulare Funktion“ klassifiziert. Hierfür wurden die Gensymbole der Proteine als humane Orthologe (größerer Informationsgehalt durch umfassendere Datenlage bei *Homo sapiens*) in PANTHER hochgeladen. Im Rahmen der Klassifizierung konnten einzelne Proteine mehreren Prozessen und Funktionen zugewiesen werden. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch das R-Paket „ggplot2“. ZNS-fremde biologische Prozesse (beispielsweise „Reproduction“) wurden nicht aufgeführt.

4.7.2. Pathway-Enrichment-Analyse

Um signifikant veränderte biologische Vorgänge und *Pathways* im Verlauf der Epileptogenese darzustellen, wurde mit den differentiell exprimierten Proteinen eine *Pathway-Enrichment*-Analyse durchgeführt (s. Kap. II.3.4). Hierdurch war es möglich, die relative Repräsentanz biologischer Prozesse unter Berücksichtigung der Protein-Protein-Interaktionen zu evaluieren. Die *Pathway*-Analyse erfolgte mit zwei unterschiedlichen web-basierten Programmen: (1) *Genomatix*¹¹ (Genomatix Software GmbH, München, Deutschland) und (2) *ConsensusPathDB*¹² (eine Meta-Datenbank mit öffentlich zugänglichem Web-Interface KAMBUROV et al. 2011). In diesem Zusammenhang wurden die regulierten Proteine von HC

¹⁰ <http://pantherdb.org/>

¹¹ <https://www.genomatix.de/>

¹² <http://consensuspathdb.org/>

und PHC als humane Orthologe in das „*Genomatix Pathway System*“, bzw. das „Überrepräsentations-Modul“ von *ConsensusPathDB* hochgeladen. Das *Pathway-Enrichment* erfolgte vor dem Hintergrund der gewebespezifisch identifizierten Proteine des jeweiligen Zeitpunktes. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 gewählt. Die weitere Analyse umfasste nur solche *Pathways*, denen mindestens zwei regulierte Proteine zugeordnet werden konnten (Schnittmenge der *Pathways* und der regulierten Proteine). Redundante *Pathways* (infolge vergleichbarer Datenlage unterschiedlicher Datenbanken) mit übereinstimmenden p-Werten wurden ineinander überführt und entsprechend gekennzeichnet. Bei den Ergebnissen wurden zusätzlich zu p-Wert, Proteinbezeichnung und Schnittmenge die Datenbanken (Quelle) angegeben, mithilfe derer die *Pathways* identifiziert wurden. Die Datenbankbezeichnung „*Genomatix*“ diente dem Verweis auf den proprietären Suchalgorithmus von *Genomatix*.

5. Immunhistochemische Validierung der Proteomanalyse

5.1. Gewebeaufbereitung perfundierter Proben

Perfusion

Die transkardiale Perfusionsfixierung wurde im Rahmen der vorliegenden Studie angewendet, um das Gehirngewebe *in vivo* zu fixieren. Bei dieser Methode wird das körpereigene Kreislaufsystem genutzt, um das Fixationsmittel gleichmäßig im ganzen Körper zu verteilen (JONKERS et al. 1984). Vor Durchführung der Perfusion erfolgte die Euthanasie der Tiere. Zu diesem Zweck wurde den Tieren 500 mg/kg Pentobarbital (Narcoren®, Sigma-Aldrich GmbH, München) in die Bauchhöhle injiziert. Nach Eröffnen von Bauch- und Brustwand erfolgte die kardiale Punktionsstelle mittels einer Knopfkanüle, welche an das Perfusionssystem angeschlossen war. Dabei wurde die Kanüle durch die linke Herzkammer in den Aortenbogen vorgeschnitten und mit einer Klemme fixiert. Um das Blut aus dem Kreislaufsystem zu entfernen, wurde dieses mit 300 ml 0,01 M phosphatgepufferte Saline (pH-Wert 7,6) durchspült. Das Anschneiden des rechten Herzohres diente hierbei dem Abfluss für Blut- und Perfusionssflüssigkeit. Danach wurde das System für 20 min auf 4 %-ige Paraformaldehydlösung (1:1 Gemisch aus 8 % Paraformaldehydlösung und 0,2 M phosphatgepufferte Saline, Temperatur 4°C) umgestellt. Die Fixierung des Gewebes war dabei auf die Bildung von Aldehydbrücken zurückzuführen. Im Anschluss an die Perfusion wurde der Kopf des Tieres abgesetzt, die knöcherne Schädeldecke eröffnet und das Gehirn herauspräpariert.

Für die nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Gehirne für 24 h

bei 4°C in 4 %-ige Paraformaldehydlösung verbracht. Anschließend wurden die Gehirne in 30 %-iger Saccharoselösung versetzt mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,6) bei 4°C aufbewahrt. Die Saccharose diente hierbei dem nachhaltigen Gefrierschutz.

Anfertigung von Kryostat-Schnitten

Für die Anfertigung der 40 µm dünnen coronalen Gehirnschnitte wurde ein Kryostat (HM560M, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) verwendet. Mittels Einbettmedium (Tissue freezing medium, Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland) erfolgte die Fixation der perfundierten Gehirne auf dem Blockträger des Kryostaten. Anschließend wurden sechs Schnittserien á drei Unterserien bei einer Objekttemperatur von -21°C angefertigt. Die Aufnahme der Schnitte erfolgte in 0,1 M phosphatgepufferter Lösung (pH 7,6). Nach Beendigung des Schneidevorgangs wurden die Schnitte in 4 ml Gefriermedium (58,6 g Glukose-Monohydrat und 1,4 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat in 500 ml 0,1 M Phosphatpuffer versetzt mit 500 ml 87 %-iger Glyzerin-Lösung) überführt und über Nacht bei -20°C zwischengelagert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte am darauffolgenden Tag eine Kryo-Konservierung der Gehirnschnitte bei -80°C.

5.2. Gewebeaufbereitung von paraffinfixierten Proben

Paraffinfixation

Die Fixierung mit Paraffin (Paraplast®, Sherwood Medical, St. Louis, USA) diente der nachhaltigen Konservierung von Gehirngewebe. Hierfür wurden die Tiere mit 500 mg/kg Pentobarbital (Narcoren®, Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) i.p. euthanasiert. Daraufhin erfolgte bei jedem Tier das Absetzen des Kopfes mit nachfolgender Herauspräparation des Gehirns aus dem knöchernen Schnädel. Dieses wurde anschließend in 4 %-iges Paraformaldehyd überführt und bei einer Temperatur von 4°C gelagert. Nach drei Tagen erfolgte, mithilfe eines Skalpells, das Schneiden der Gehirne in 0,5 cm dünne Blöcke. Diese wurden anschließend im Institut für Tierpathologie der LMU München für die nachfolgende Paraffineinbettung aufbereitet. Der Entwässerungs- und Einbettungsvorgang erfolgte dabei mittels eines Einbettungsautomaten (Histomaster Modell 2050/Di, Bavimed, Birkenau, Deutschland). Hierbei wurden die Gehirnblöcke für 1 h mit Leitungswasser gespült und anschließend in aufsteigener Alkoholreihe (Ethanol 70 % 2 x 2 h, Ethanol 96 % 2 x 2 h, Ethanol 100 % 2 x 1,5 h) entwässert. Nachfolgend wurde das Gewebe dreimalig für 1 h in Xylol-Lösung (Isomerengemisch, W. Gräen GmbH & Co, München) verbracht. Bis zur

Herstellung der Paraffinblöcke am darauffolgenden Tag wurden die Gehirne in 65°C heißem Paraffin (Spezialparaffin, SAV LP GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland) aufbewahrt. Das Ausgießen der Paraffinblöcke erfolgte unter Zuhilfenahme einer Ausgießstation (TES 99, Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland)

Zuschneiden der Paraffinblöcke

Für die Anfertigung der Paraffinschnitte wurde ein Rotationsmikrotom (MICROM, Cambridge Instruments gmbH, Nußloch, Deutschland) verwendet. Die Schnittdicke betrug dabei 5 µm. Das Strecken und Aufziehen der Schnitte auf beschichtete Objektträger erfolgte im Wasserbad bei einer Temperatur von 40°C. Zur Trocknung wurden die Schnitte für 24 h in einen Brutschrank (38°C) verbracht.

5.3. Immunhistochemie

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Methodik der Immunhistochemie angewendet, um das histologische Expressions- und Verteilungsmuster ausgewählter Proteine zu untersuchen und die Ergebnisse der differentiellen Proteomanalyse zu validieren. Für den immunhistochemischen Nachweis der verschiedenen Proteine wurden sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper verwendet. Erstgenannte Antikörper werden aus immunisierten Tieren gewonnen und stammen aus verschiedenen B-Zell-Klonen (polyklonal). Sie können daher an unterschiedlichen Stellen des Antigens (Epitope) binden. Monoklonale Antikörper werden aus einer gezüchteten B-Zell-Linie gewonnen und binden an nur ein einziges spezifisches Epitop. Die Verwendung monoklonaler Antikörper führt aufgrund ihrer höheren Spezifität zu einem eindeutigeren Ergebnis. Diese Spezifität fehlt den polyclonalen Antikörpern. Andererseits kann die Verwendung polyclonalen Antikörpers auch dann noch zu einer Färbung führen, wenn ein Epitop (beispielsweise durch einen vorangegangenen Demaskierungsvorgang) zerstört worden ist (MONTERO 2003).

Free floating-Verfahren und Standardprotokoll

Bei dem *free floating*-Verfahren werden die Gehirnschnitte „frei schwimmend“ in verschiedene Färbe- und Waschlösungen überführt und am Ende des Färbeprozesses auf Objektträger aufgezogen. Die jeweiligen Färbungen wurden für alle Gehirnschnitte simultan und mit denselben Lösungen durchgeführt. Durch dieses Vorgehen sollte die methodisch bedingte Varianz der Farbintensität möglichst gering gehalten werden. Alle immunhistochemischen

Färbungen wurden anhand eines proteinspezifisch modifizierten Standardprotokolls durchgeführt. Zu Beginn jeder Färbung erfolgte ein dreimaliges Waschen der Gehirnschnitte in 0,05 M Tris gepufferter Saline (TBS, pH 7,6). Im darauffolgenden Schritt wurden die Schnitte in Natrium-Citrat-Lösung (NaCitrat, pH 9,0) überführt und 30 min im heißen Wasserbad (80°C) demaskiert. Die Demaskierung wurde durchgeführt, um Epitope freizulegen (Antigen Retrieval), die durch den Fixierungsvorgang (s. Kap. IV.5.1) blockiert wurden (BOENISCH u. HENNE 2003). Nach einem weiteren Waschen der Schnitte in TBS, erfolgte eine Inaktivierung der endogenen Peroxidasereaktion durch Inkubation mit verdünntem Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Im Anschluss wurden die Gehirnschnitte erneut in TBS gewaschen, um das H_2O_2 vollständig zu entfernen. Danach wurden sie für 60 min in Blocking-Lösung (2 % bovines Serumalbumin, 0,3 % Triton-X 100 und 5 % Serum der Tierart des sekundären Antikörpers gelöst in TBS) überführt. Die Blocking-Lösung sollte unspezifische Bindungsreaktionen des primären Antikörpers verhindern. Eine Inkubation der Schnitte mit dem primären Antiserum erfolgte im darauffolgenden Schritt. Die Dauer der Inkubation war dabei abhängig von dem jeweiligen Protein. Durch nachfolgende wiederholte Waschschritte in TBS wurde noch ungebundener primärer Antikörper entfernt. Anschließend wurden die Schnitte für 60 min in biotinyliertem sekundärem Antiserum inkubiert. Das an den sekundären Antikörper gebundene Biotin diente der späteren Farbreaktion und deren Amplifizierung. Ungebundener sekundärer Antikörper wurde nach Ablauf der Inkubationszeit ebenfalls durch wiederholtes Waschen in TBS entfernt. Im letzten Schritt wurden die Schnitte für 60 min in eine Lösung mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (Streptavidin/HRP, 1:1400, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) verbracht und anschließend wiederholt in TBS gewaschen. Eine Visualisierung der Antigen-Antikörper-Konjugate erfolgte anschließend durch die Behandlung der Schnitte mit einer schwermetallverstärkten 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (pro Gehirnserie 1 mg DAB gelöst in 100 µl Aqua dest, 4 ml Tris/Ni-Lösung und 1 µl 30 %-iges H_2O_2). Die Farbreaktion wurde durch wiederholtes Waschen in TBS beendet. Abschließend wurden die Schnitte in Chrom-Gelatine auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Das Eindecken mit Entellan (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) erfolgte am darauffolgenden Tag. Im Folgenden wird auf die Besonderheiten der spezifischen Färbungen eingegangen. Die hierfür verwendeten Antikörper, -konzentrationen und Herstellerinformationen sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

P2X purinoceptor 7

Das Protokoll für die immunhistochemische Färbung von *P2X purinoceptor 7* (P2rx7) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Die Demaskierung und einzelnen Behandlungsschritte erfolgten, soweit nicht anders erwähnt, gemäß dem oben beschriebenen Standardprotokoll. Für die Inaktivierung der endogenen Peroxidasereaktion wurden die Gehirnschnitte 7 min in eine 3 %-ige H₂O₂-Lösung verbracht. Im Anschluss an den Blocking-Schritt wurden die Schnitte über fünf Nächte mit dem primären Antiserum (Tabelle 3) inkubiert. Die Inkubation in sekundärem Antiserum (Tabelle 3) dauerte 60 min. Für die Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Konjugate wurde ein DAB-KIT (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet. Die Inkubation in DAB-Lösung dauerte dabei 2 min.

P2Y purinoceptor 12

Das Protokoll für *P2Y purinoceptor 12* (P2ry12) wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit, durch Modifikation des Standardprotokolls, etabliert. Im Anschluss an wiederholte Waschschritte und Demaskierung, wurden die Gehirnschnitte für 60 min in 0,3 %-ige H₂O₂-Lösung verbracht. Nach dem Blocking-Schritt erfolgte eine Inkubation mit primärem Antiserum (Tabelle 3) für eine Nacht. In Analogie zu P2x7 wurden die Schnitte am darauffolgenden Tag nach wiederholten Waschschritten für 60 min mit sekundärem Antiserum (Tabelle 3) inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten gemäß dem Standardprotokoll; dabei wurden die Gehirnschnitte für eine optimale Anfärbung 1 min in schwermetallverstärkte 3,3'DAB-Lösung verbracht.

Heat shock 70 kDa protein

Da auch für das *Heat shock 70 kDa protein* (Hsp70/ Hspa1a) noch kein Protokoll zur Verfügung stand, wurde dieses im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Die Demaskierung, Inaktivierung der endogenen Peroxidasereaktion (60 min in 0,3 %-iger H₂O₂-Lösung) und das Blocking erfolgten gemäß dem Standardprotokoll. Im Anschluss wurden die Gehirnschnitte eine Nacht mit dem primären Antiserum (Tabelle 3) inkubiert. Die Dauer der Inkubation in sekundärem Antiserum (Tabelle 3) betrug 60 min. Alle weiteren Behandlungsschritte erfolgten in Analogie zum Standardprotokoll. Bezuglich der Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Konjugate wurden die Schnitte 1 min in schwermetallverstärkte 3,3'DAB-Lösung verbracht.

Tab. 3

Übersicht der primären und sekundären Antikörper sowie der verwendeten Konzentrationen

Primärer Antikörper	Konzen- tration	Hersteller	Sekundärer Antikörper	Konzen- tration	Hersteller
anti-P2x7- Rezeptor (polyklonal, Kaninchen)		Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland	biot. Ziege anti-Kaninchen (polyklonal)		Dako, Glostrup Dänemark
anti-P2y12- Rezeptor * (polyklonal, Kaninchen)	1:500	Department of Physiology, UCSF, San Francisco, USA	biot. Ziege anti-Kaninchen (polyklonal)	1:1000	Dako, Glostrup Dänemark
Anti-Hsp70/ Hsp72 (monoklonal, Maus)	1:750	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland	biot. Ziege anti-Maus (polyklonal)	1:1000	Dako, Glostrup Dänemark

* Der P2ry12-Antikörper wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Professor Julius (Professor and Chair, Department of Physiology, UCSF, San Francisco, USA) für immunhistochemische Färbungen zur Verfügung gestellt.

Im Anschluss an die immunhistochemischen Färbungen wurden mittels eines Lichtmikroskops (Olympus BH-2, Japan) das an eine Kamera (Zeiss Axiocam MRc, Göttingen, Deutschland) angeschlossen war, Aufnahmen von HC und PHC angefertigt. Die weitere Aufbereitung der Bilder erfolgte durch das Bildbearbeitungs-Tool von PowerPoint 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA).

6. Versuchsdesign

Im Rahmen des Dissertationsvorhabens wurde eine experimentelle Studie (Gz. 55.2-1-54-2532-94-11) durchgeführt, um die Veränderung molekularer Mechanismen im Verlauf der Epilepsieentstehung (Epileptogenese) zu analysieren. In diesem Kontext wurde *Hippocampus* und *parahippocampaler Cortex* von Tieren, bei denen durch elektrische Stimulation Epileptogenese induziert wurde, und von elektrodenimplantierten Kontrolltieren zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen) nach *Status epilepticus* analysiert. Die Zeitpunkte reflektieren die Post-Insult-Phase und Latenzphase der Epileptogenese sowie den Zeitpunkt der Epilepsie-Manifestation (chronische Phase). Das

entnommene Gewebe diente zum einen der differentiellen Proteomanalyse und zum anderen der immunhistochemischen Validierung und Untersuchung der zuvor generierten Proteomdaten. In diesem Zusammenhang wurde das Projekt in zwei experimentelle Teilversuche untergliedert. Die experimentellen Versuche hinsichtlich der differentiellen Proteomanalyse zwei Tage und zehn Tage nach SE wurden dabei in Zusammenarbeit mit Joanna Goc am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt. Des Weiteren war Maruja Lucia Rettenbeck an den *in vivo*-Versuchen für die immunhistochemischen Analysen in der chronischen Phase beteiligt. Diesbezüglich erfolgte der immunhistochemische Proteinnachweis acht Wochen nach SE an Tieren aus einer weiteren Studie (Gz. 55.2-1-54-2532-94-11). Versuchsplanung und –ablauf beider Teilversuche, sowie der Tiere aus o.a. Studie waren identisch.

Differentielle Proteomanalyse im Verlauf der Epileptogenese

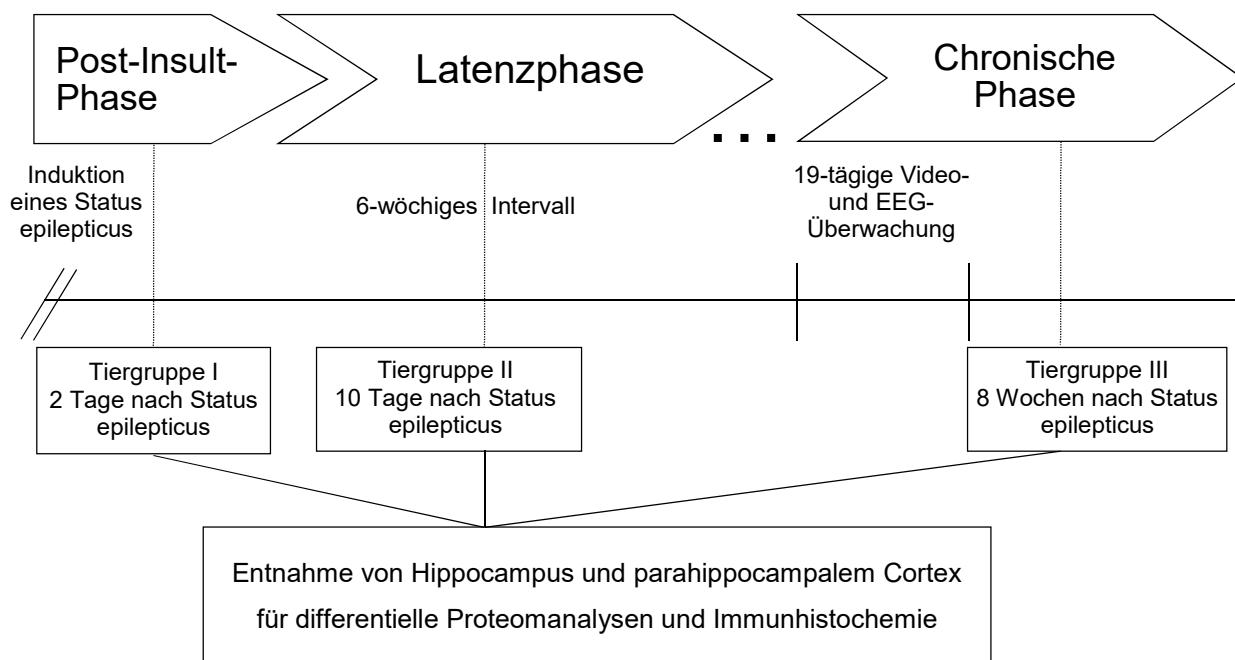
Für die differentielle Proteomanalyse wurden, entsprechend der unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte, drei Tiergruppen verwendet. In diesem Zusammenhang erfolgte, analog der in Kapitel IV.2.1 beschriebenen Methode, eine Elektrodenimplantation an weiblichen *Sprague Dawley* Ratten ($n = 59$). Jede Gruppe wurde anschließend unterteilt nach: (1) elektrische Stimulation der *basolateralen Amygdala* (SE-Tiere) und (2) Schein-Stimulation (Kontrolltiere). Unabhängig von ihrem Einteilungsstatus (SE- und Kontrolltiere) erhielten alle Tiere eine zweimalige Diazepam-Applikation zur Beendigung des SE. Die ersten beiden Tiergruppen wurden zwei und zehn Tage nach SE euthanasiert. Nativ entnommes Gehirngewebe (*Hippocampus* und *parahippocampaler Cortex*) von jeweils fünf SE- und Kontrolltieren pro Gruppe diente der anschließenden differentiellen Proteomanalyse. Die Tiergruppe zur Untersuchung der differentiellen Proteinexpression in der chronischen Phase wurde sechs Wochen nach SE einer 19-tägigen Video- und EEG-Überwachung unterzogen. Im Anschluss an die Überwachung wurden die Tiere euthanasiert. Für die differentielle Proteomanalyse wurde HC und PHC von jeweils fünf SE- und Kontrolltieren entnommen. Dabei wurden nur solche SE-Tiere ausgewählt, die während der Überwachungsphase spontan auftretende Anfälle gezeigt hatten. Die Aufbereitung und Weiterverarbeitung des zerebralen Gewebes erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Frau Professor Deeg am Institut für Tierphysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Die massenspektrometrischen Analysen wurden in der Abteilung Proteinanalytik des Helmholtz Zentrum München, unter Leitung von Stefanie Hauck durchgeführt.

Immunhistochemische Validierung der Proteomdaten

Die Immunhistochemie diente in erster Linie der Validierung der Proteomdaten. Weiterhin wurde das differentielle Expressionsmuster ausgewählter Proteine immunhistochemisch bestimmt. Der zeitliche Ablauf im zweiten Teilversuch stimmte exakt mit dem ersten Teilversuch zur differentiellen Proteomanalyse überein. Für die immunhistochemische Validierung wurden ebenfalls drei Tiergruppen verwendet ($n = 106$). Die Elektrodenimplantation an weiblichen *Sprague Dawley* Ratten und nachfolgende Unterteilung in SE- und Kontrolltiere erfolgten in Analogie zum ersten Teilversuch. Zwei Tage nach Induktion des SE wurden 16 SE- und sieben Kontrolltiere der ersten Tiergruppe perfundiert. Jeweils sieben SE- und Kontrolltiere aus der ersten Tiergruppe wurden für die Paraffinfixierung von HC und PHC euthanasiert. Zehn Tage nach SE erfolgte die Perfusion von zehn SE- und sieben Kontrolltieren der zweiten Tiergruppe. Aus derselben Gruppe wurden wiederum jeweils sieben SE- und Kontrolltiere für die nachfolgende Paraffinfixierung euthanasiert. Die immunhistochemische Validierung der chronischen Phase erfolgte an jeweils zehn SE- und Kontrolltieren aus einer weiteren Studie (Gz. 55.2-1-54-2532-94-11). In Übereinstimmung mit der dritten Tiergruppe des ersten Teilprojektes wurden diese Tiere, sechs Wochen nach SE, einer 19-tägigen Video- und EEG-Überwachung unterzogen. Nachfolgende immunhistochemische Analysen umfassten dabei nur solche SE-Tiere, die während des Überwachungszeitraumes spontane Anfälle gezeigt hatten. In diesem Kontext wurden jeweils fünf SE- und fünf Kontrolltiere euthanasiert, bzw. perfundiert.

Im weiteren Verlauf des Projektes wurden an den perfusionfixierten Gehirnen der drei Tiergruppen *free floating*-Färbungen durchgeführt. Die paraffinfixierten Gehirne dienten der Konservierung des Gewebes für weitere immunhistochemische Untersuchungen in zukünftigen Studien.

Abb. 6:



Übersicht des Versuchsdesigns im zeitlichen Ablauf

V. ERGEBNISSE

1. SE-BLA-Modell

Im vorliegenden Projekt wurden für die differentielle Proteomanalyse und immunhistochemischen Untersuchungen jeweils drei Tiergruppen elektrisch stimuliert, um einen sich selbst erhaltenden SE auszulösen. Die Dauerstimulation erfolgte dabei analog zu den Ausführungen in Kap. IV.2.2.

SE der Tiere, die für die differentielle Proteomanalyse verwendet wurden

Für die Untersuchung der Post-Insult-Phase wurde bei insgesamt sechs Tieren ein SE induziert. Davon zeigten fünf Tiere generalisierte Anfälle vom Typ III. Bei einem der sechs stimulierten Tiere konnten keine Anfälle beobachtet werden. Von den acht SE-Tieren der zweiten Tiergruppe zeigten fünf Tiere generalisierte Anfälle vom Typ III und zwei Tiere generalisierte Anfälle, die von fokalen Anfällen unterbrochen wurden (Typ II). Bei einem Tier konnten keine Anfälle induziert werden. Für die Untersuchung der chronischen Phase wurde bei insgesamt neun Tieren ein SE induziert. Hierbei konnten alle Tiere als Typ III klassifiziert werden. Zusammenfassend zeigten von den insgesamt 23 Tieren, bei denen ein SE induziert wurde, 83 % ($n = 19$) generalisierte Anfälle vom Typ III.

SE der Tiere, die für die immunhistochemischen Analysen verwendet wurden

Für die immunhistochemische Analyse der Post-Insult-Phase wurde bei insgesamt 23 Tieren ein SE induziert. Davon zeigten 19 Tiere generalisierte Anfälle vom Typ III, vier Tiere zeigten während des SE generalisierte Anfälle, die von fokalen Anfällen unterbrochen wurden (Typ II) und ein Tier wies nur fokale Anfälle (Typ I) auf. In der zweiten Tiergruppe wurde ein SE bei 19 Tieren induziert. Darunter ließen sich 16 Tiere als Typ III, zwei Tiere als Typ II und ein Tier als Typ I klassifizieren. Alle zehn Tiere, die für die immunhistochemische Untersuchung der chronischen Phase von Lucia Rettenbeck elektrisch stimuliert wurden, zeigten während dem SE generalisierte Anfälle vom Typ III. Zusammenfassend konnten von den insgesamt 52 Tieren, bei denen ein SE induziert wurde, 87 % ($n = 45$) als Typ III klassifiziert werden.

Überwachung spontaner Anfälle

Die Video- und EEG-Überwachung diente der Kontrolle und Untersuchung spontan auftretender Anfälle infolge einer sechswöchigen Latenzphase. Während der Überwachung wurden die Anfallsdauer und –frequenz der generalisierten Anfälle protokolliert. Die Überwachung der Tiergruppe, welche für die differentielle Proteomanalyse verwendet wurde, umfasste neun SE- und sechs Kontrolltiere. Fünf der neun SE-Tiere zeigten während der 19-tägigen Überwachungsphase einen manipulations-bedingten Anfall und 14 spontane Anfälle. Die mittlere Anfallsfrequenz lag bei 0,8 Anfällen/Tag.

Die Überwachung der Tiergruppe, welche für die Immunhistochemie verwendet wurde, umfasste zehn SE- und zehn Kontrolltiere. Insgesamt wurden bei allen zehn SE-Tieren während der 19-tägigen Überwachungsphase drei manipulations-bedingte und 54 spontane Anfälle nachgewiesen. Die mittlere Anfallsfrequenz lag bei drei Anfällen/Tag. Die Diskrepanz zwischen mittlerer Anfallsfrequenz und Anfallshäufigkeit ist hierbei auf starke individuelle Unterschiede zurückzuführen.

2. Quantitative Proteomik

Um die Veränderung der molekularen Mechanismen im Verlauf der Epileptogenese zu untersuchen, wurde *hippocampales* und *parahippocampales* Gehirngewebe massenspektrometrisch analysiert. Die differentielle Proteomanalyse von SE- und Kontrolltieren erfolgte zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach SE.

Insgesamt konnten jeweils zwei und zehn Tage nach SE 1851 Proteine im HC und 1803 Proteine im PHC identifiziert werden. Die chronische Phase umfasste 1728 und 1966 identifizierte Proteine im HC bzw. im PHC.

2.1. Statistische Auswertung

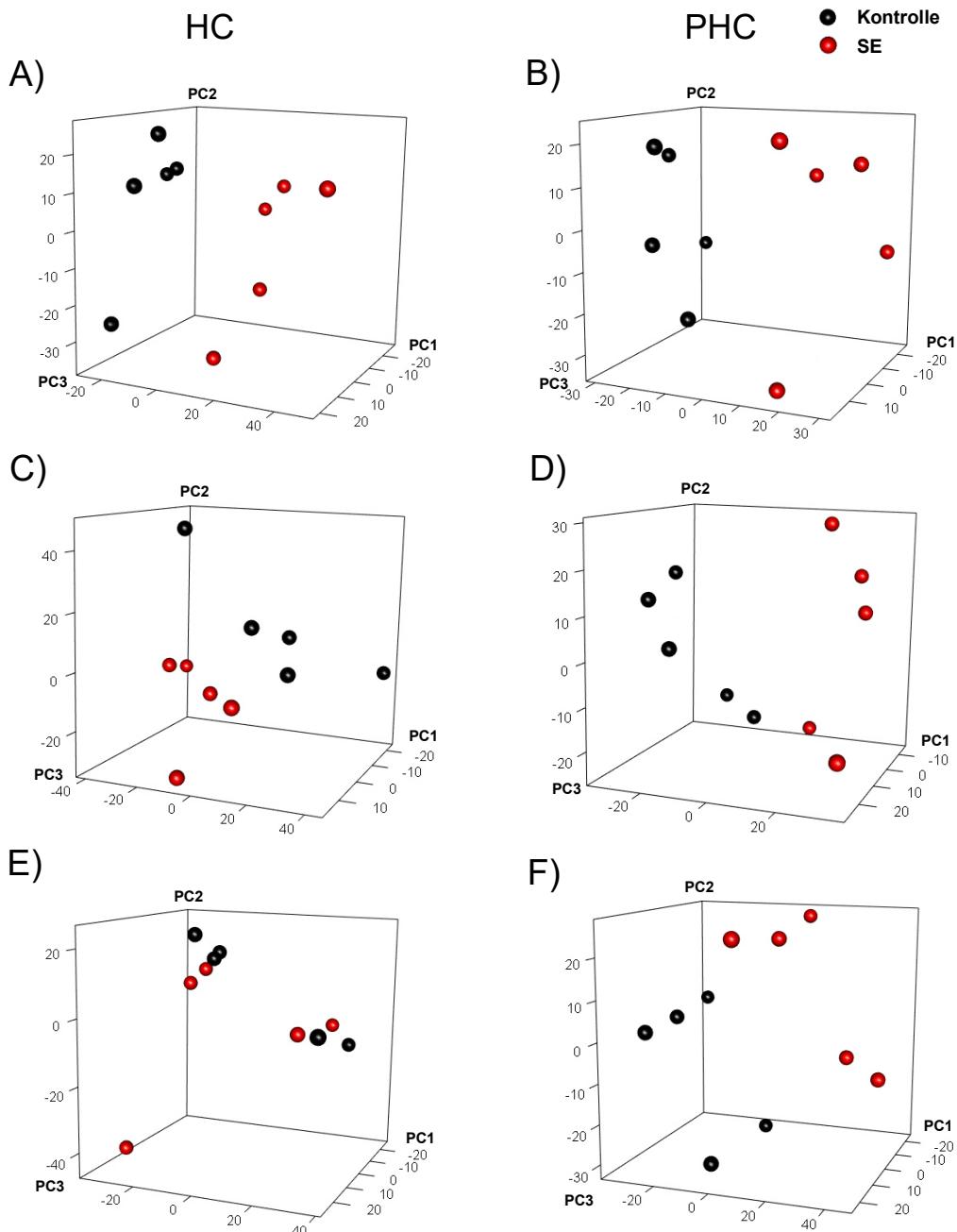
2.1.1. Darstellung der Proteinprofile von SE- und Kontrolltieren

Die globalen Proteinexpressionsunterschiede zwischen SE- und Kontrolltieren wurden mittels *Principal Component*-Analyse (Kap. IV.4.6.1) untersucht. Die *Principal Component*-Analyse und grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgten über das Programm R. Proteine mit fehlenden Werten bei mindestens einem SE- und/oder Kontrolltier wurden aus der Analyse herausgenommen. Von den 1851 identifizierten Proteinen im HC zwei Tage nach SE wurden

1839 Proteine analysiert. Zehn Tage nach SE umfasste die *Principal Component*-Analyse im HC 1845 der 1851 identifizierten Proteine. Die chronische Phase im HC, sowie alle untersuchten Zeitpunkte im PHC, zeigten keine fehlenden Werte. Demzufolge konnte eine *Principal Component*-Analyse im PHC und acht Wochen nach SE im HC, bei allen identifizierten Proteinen durchgeführt werden.

Abbildung 7 illustriert die Ergebnisse der *Principal Component*-Analyse als dreidimensionale Graphen. Dabei beschreibt PC1 die größte Varianz des jeweiligen Datensatzes. Die Lokalisation der Tiere im dreidimensionalen Raum war abhängig von den detektieren Abundanzen der identifizierten Proteine. Demnach gruppierten sich die Tiere, welche ein vergleichbares Proteinprofil hatten. In den Geweben HC und PHC konnte eine deutliche Trennung zwischen SE- und Kontrolltieren beobachtet werden (Abbildung 7 A-D und F). Eine Ausnahme hiervon bildete die chronische Phase im HC. In diesem Gewebe zeigte sich acht Wochen nach SE keine räumliche Trennung zwischen SE- und Kontrolltieren (Abbildung 7 E). Im globalen Vergleich der beiden Tiergruppen zeigten die Kontrolltiere eine geringere Streuung als die SE-Tiere.

Abb. 7:



Principal Component-Analyse der unterschiedlichen Proteinprofile von SE- und Kontrolltieren. Die dreidimensionalen Graphen zeigen die Ergebnisse der *Principal Component-Analyse* in den Geweben HC und PHC zwei Tage (A und B), zehn Tage (C und D) und acht Wochen (E und F) nach SE. PC1-3 entsprechen den Hauptkomponenten mit der größten Varianz der untersuchten Datensätze. Die Größe der kugelförmigen Tier-Projektionen ist abhängig von der Lokalisation im dreidimensionalen Raum (größere Projektionen illustrieren eine geringere Distanz zum Betrachter). Für die Erstellung der Graphen wurde R verwendet.

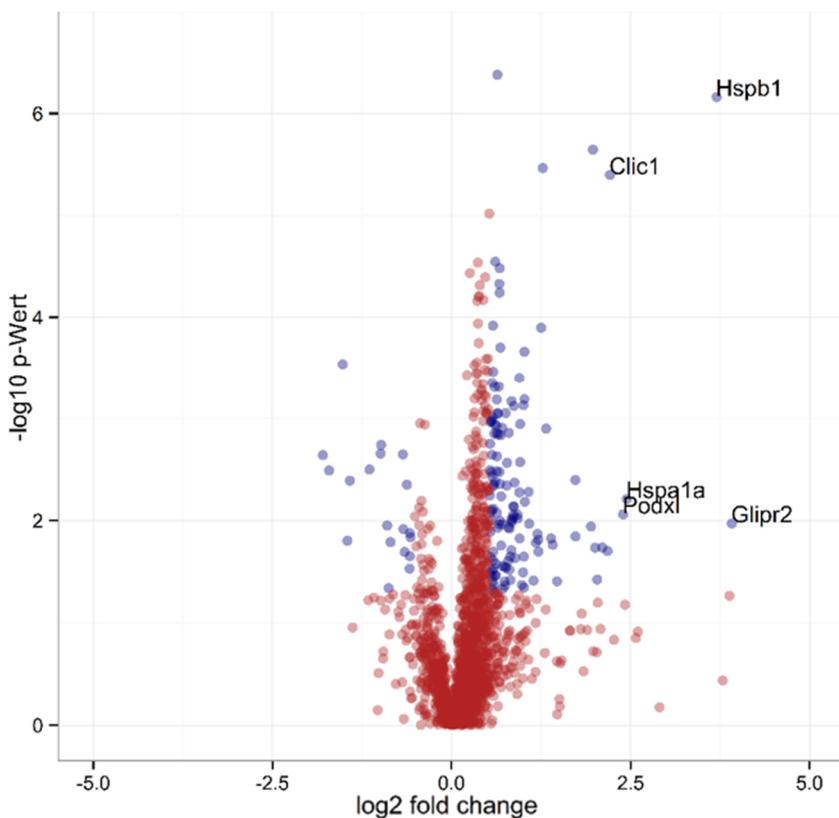
2.1.2. Vergleichende Darstellung der identifizierten Proteine von HC und PHC

Die grafische Darstellung der identifizierten Proteine in HC und PHC erfolgte über das *Volcano Plot*-Histogramm.

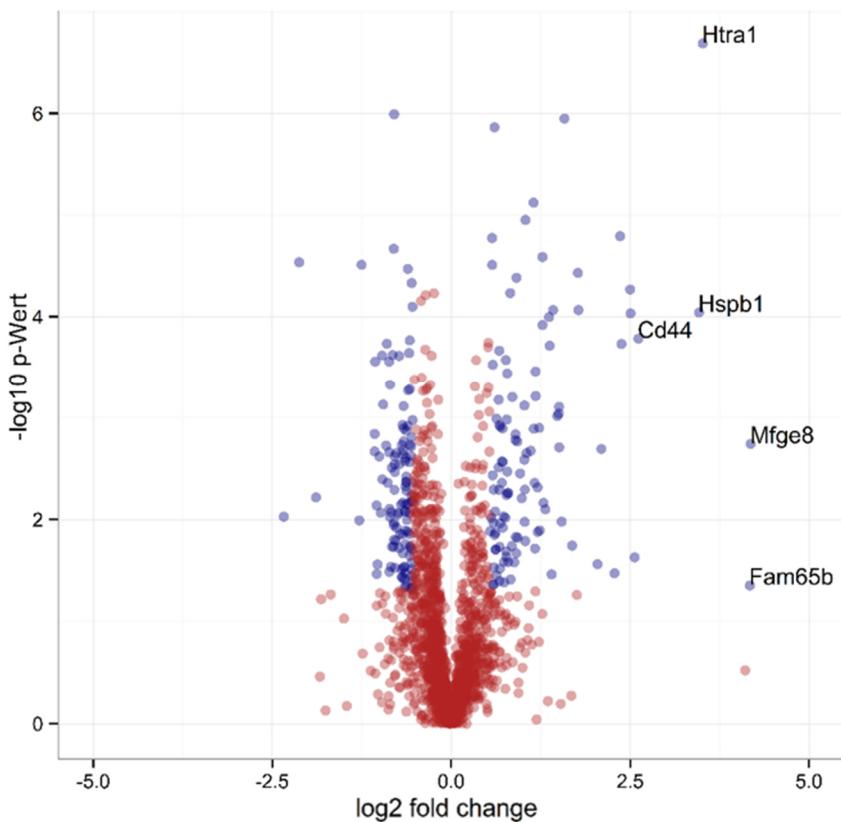
Zwei Tage nach SE ließen sich im HC 152 und im PHC 227 regulierte Proteine darstellen (Abbildung 8). Dabei zeigte der überwiegende Anteil der differentiell exprimierten Proteine im HC eine Aufregulation (Abbildung 8 A). Dieses Proteinexpressionsmuster konnte im PHC nicht beobachtet werden (Abbildung 8 B). Die fünf am stärksten regulierten Proteine umfassten in der Post-Insult-Phase: *Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1* (Glipr2), Hspala, *Podocalyxin* (Podxl), *Chloride intracellular channel protein 1* (Clic1), *Lactadherin* (Mfge8), *Family with sequence similarity 65, member B* (Fam65b), *Serine protease HTRA1* (Htra1), *CD44 antigen* (Cd44) und *Heat shock protein beta-1* (Hspb1). Letztgenanntes Protein zeigte in beiden Gehirnregionen zwei Tage nach SE eine Überexpression (Abbildung 8 A und B).

Abb. 8:

A)



B)



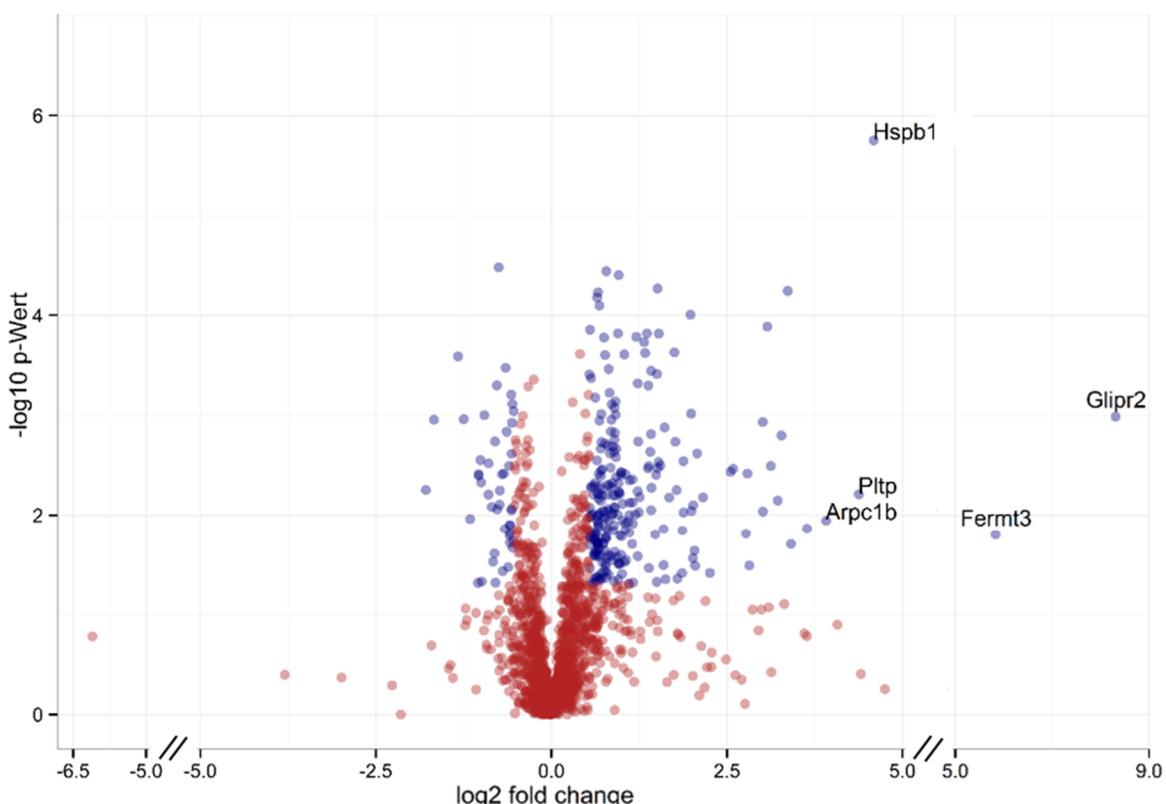
Volcano Plots der identifizierten Proteine des HC (A) und PHC (B) zwei Tage nach SE. Die Histogramme repräsentieren die zweidimensionale Verteilung der identifizierten Proteine nach *fold change* und p-Wert. Proteine mit einem p-Wert $< 0,05$ und einem *fold change* $\geq 1,5$ (differentiell exprimierte Proteine) wurden in blau dargestellt. Die korrespondierenden Genbezeichnungen entsprechen den fünf am stärksten regulierten Proteinen. Für die Erstellung der Histogramme wurde R verwendet.

Zehn Tage nach SE ließen sich im HC 297 und im PHC 432 regulierte Proteine darstellen (Abbildung 9 A und B). Für den überwiegenden Anteil der differentiell exprimierten Proteine im HC konnte in der Latenzphase eine Aufregulation nachgewiesen werden (Abbildung 9 A). Unter diesen Proteinen zeigten insbesondere *Glipr2* und *Fermitin family homolog 3* (*Fermt3*) eine > 32 -fache Aufregulation ($\log_2 \text{fold change} > 5$). Das Protein *Fibulin-1* (*Fbln1*) konnte im HC zehn Tage nach SE nicht dargestellt werden, da es lediglich bei drei der fünf untersuchten SE-Tiere identifiziert wurde. Das Expressionsmuster der regulierten Proteine des PHC stellte sich in den *Volcano Plots* zehn Tage nach SE weitestgehend symmetrisch dar (Abbildung 9 B). Allerdings zeigten im Vergleich der auf- und herunterregulierten Proteine des PHC Erstgenannte eine größere Streuung im *fold change* (Abbildung 9 B). Unter den jeweils fünf

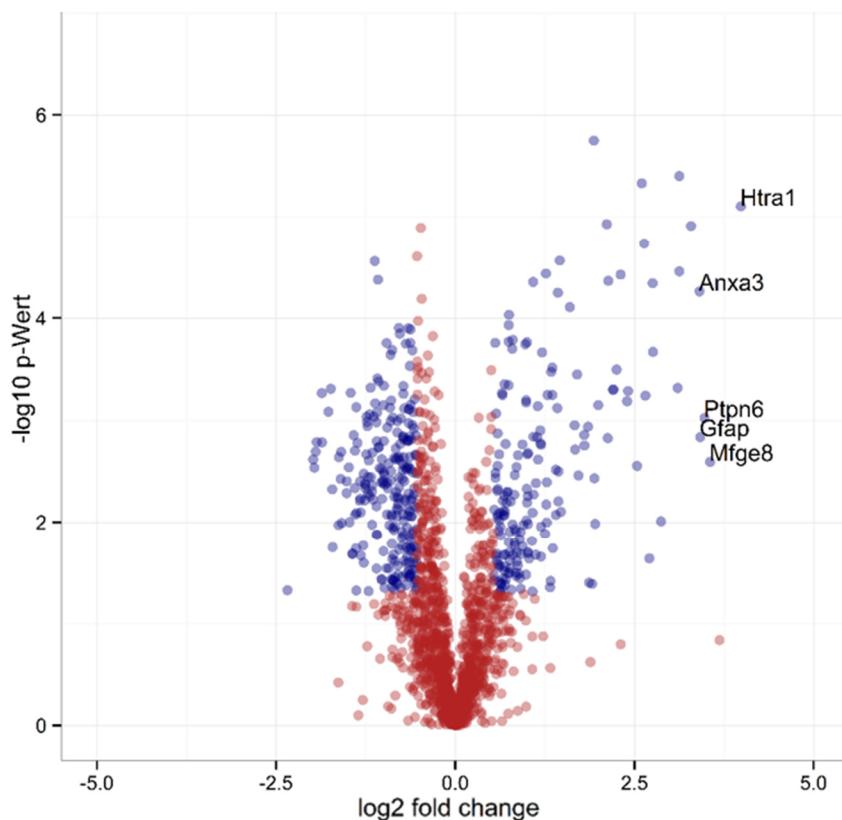
am stärksten regulierten Proteinen beider Gewebe wurden folgende Proteine nachgewiesen: Fermt3, *Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B* (Arc1b), *Phospholipid transfer protein* (Pltp), *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6* (Ptpn6), *Glial fibrillary acidic protein* (Gfap), *Annexin A3* (Anxa3), Hspb1, Glipr2, Htra1 und Mfge8 (Abbildung 9 A und B).

Abb. 9:

A)



B)

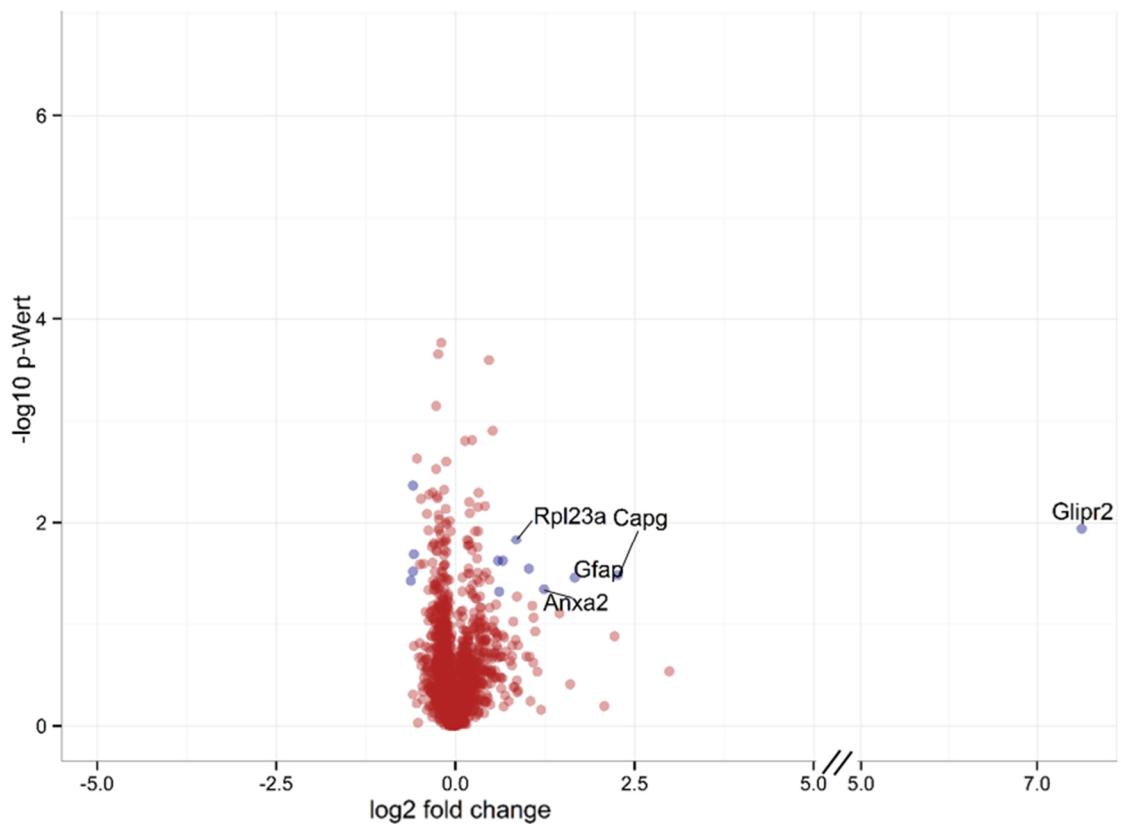


Volcano Plots der quantifizierten Proteine des HC (A) und PHC (B) zehn Tage nach SE. Die Histogramme repräsentieren die zweidimensionale Verteilung der identifizierten Proteine nach *fold change* und p-Wert. Proteine mit einem p-Wert $< 0,05$ und einem *fold change* $\geq 1,5$ (differentiell exprimierte Proteine) wurden in blau dargestellt. Die korrespondierenden Genbezeichnungen entsprechen den fünf am stärksten regulierten Proteinen. Für die Erstellung der Histogramme wurde R verwendet. // = Skalierungswechsel.

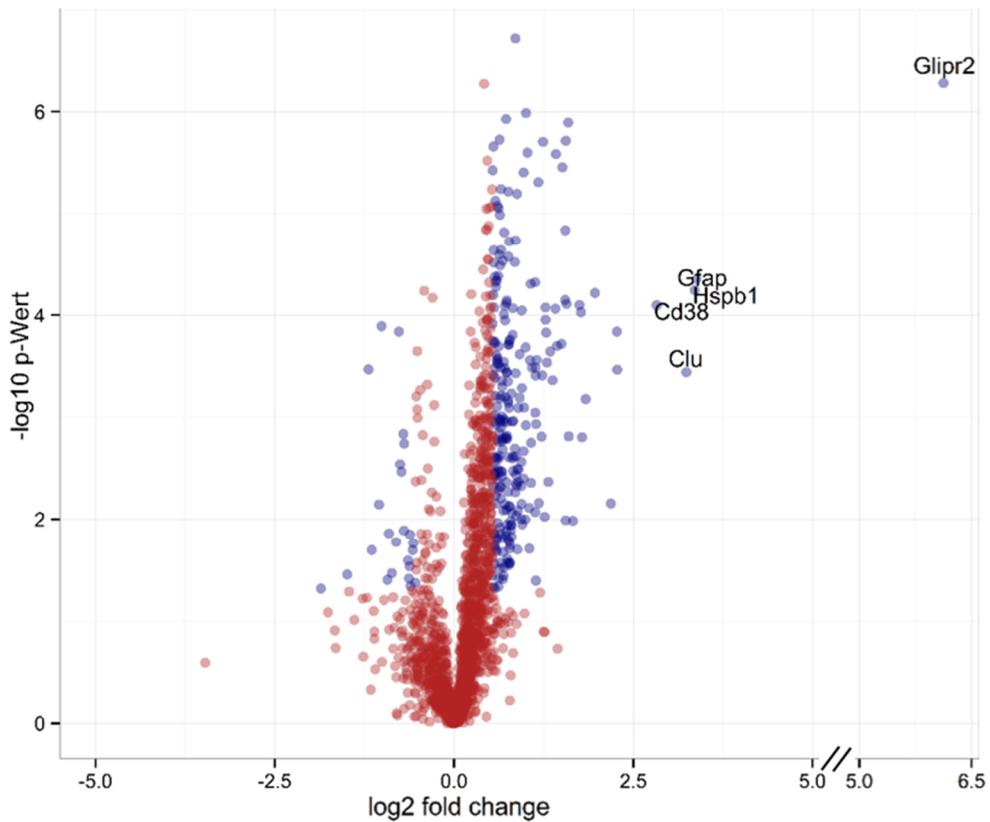
Acht Wochen nach SE ließen sich im HC 13 und im PHC 280 regulierte Proteine darstellen (Abbildung 10 A und B). Der überwiegende Teil der differentiell exprimierten Proteine des PHC zeigte eine Überexpression (Abbildung 10 B). Die jeweils fünf am stärksten regulierten Proteine beider Gehirnregionen acht Wochen nach SE umfassten: *Glipr2*, *Capping protein (actin filament)*, *Gelsolin-like* (*Capg*), *Gfap*, *Annexin A2* (*Anxa2*), *Ribosomal protein L23a* (*Rpl23a*), *Hspb1*, *Clusterin* (*Clu*) und *CD38 molecule* (*Cd38*, Abbildung 10 A und B). *Glipr2* (> 32 -fach aufreguliert) und *Gfap* konnten in beiden Geweben nachgewiesen werden (Abbildung 10 A und B).

Abb. 10:

A)



B)

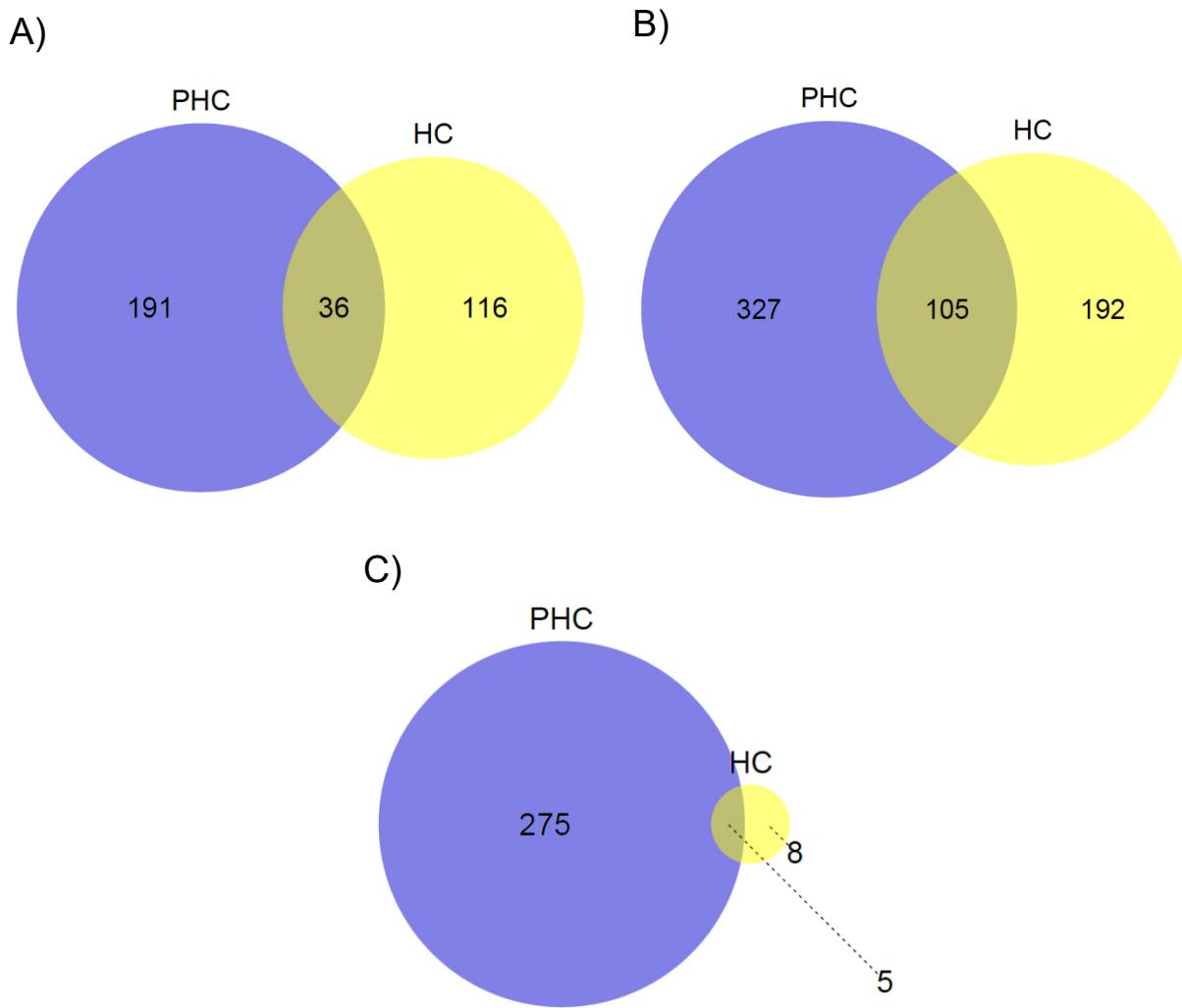


Volcano Plots der identifizierten Proteine des HC (A) und PHC (B) acht Wochen nach SE. Die Histogramme repräsentieren die zweidimensionale Verteilung der identifizierten Proteine nach *fold change* und p-Wert. Proteine mit einem p-Wert $< 0,05$ und einem *fold change* $\geq 1,5$ (differentiell exprimierte Proteine) wurden in blau dargestellt. Die korrespondierenden Genbezeichnungen entsprechen den fünf am stärksten regulierten Proteinen. Für die Erstellung der Histogramme wurde R verwendet. // = Skalierungswechsel.

Schnittmenge der regulierten Proteine von HC und PHC

Die Venn-Diagramme dienten der vergleichenden Darstellung der regulierten Proteine von HC und PHC. In der Post-Insult-Phase zeigte sich eine Schnittmenge von 36 differentiell exprimierten Proteinen (Abbildung 11 A). Zehn Tage nach SE konnten 105 der regulierten hippocampalen Proteine auch im PHC identifiziert werden (Abbildung 11 B). In der chronischen Phase ließen sich fünf der acht regulierten Proteine des HC auch im PHC nachweisen (Abbildung 11 C).

Abb. 11:



Die Venn-Diagramme illustrieren die differentiell exprimierten Proteine von HC und PHC, zwei Tage (A), zehn Tage (B) und acht Wochen (C) nach SE. Für die Erstellung der Diagramme wurde R verwendet.

2.2. Funktionelle Auswertung

Funktionelle Analysen dienen der Identifikation molekularer Veränderungen im biologischen Kontext. Im vorliegenden Projekt wurden unterschiedliche bioinformatische Instrumente und Ansätze verwendet, um die Veränderung der molekularen Mechanismen im Verlauf der Epileptogenese zu erforschen. Die Auswertung und Interpretation der Daten erfolgte sowohl unspezifisch, als auch mit dem Fokus auf immun- und inflammations-assoziierte Vorgänge (literatur-gestützte Hypothese). Basierend auf diesem Vorgehen sind die Ergebnisse der funktionellen Datenanalyse in einen allgemeinen und einen spezifischen Teil untergliedert.

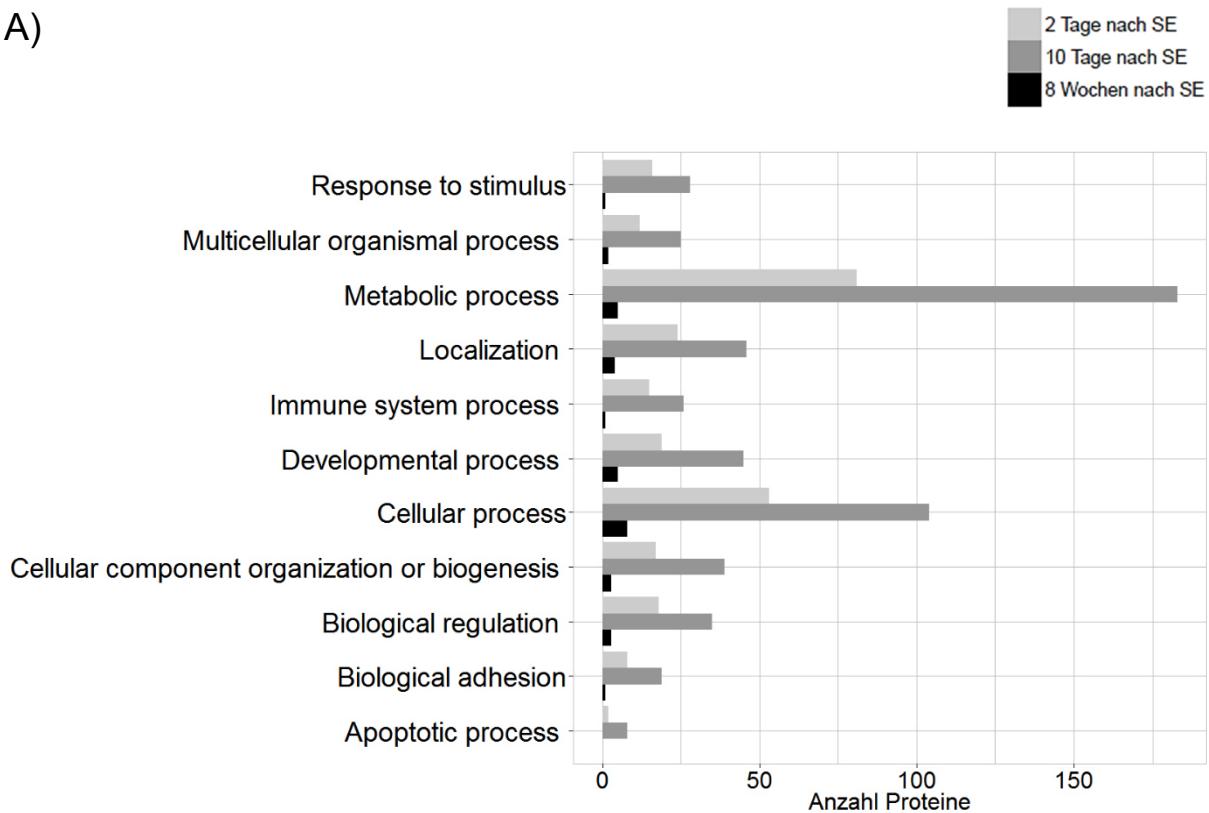
2.2.1. Regulierte biologische Prozesse und molekulare Funktionen

Die Klassifizierung der differentiell exprimierten Proteine ermöglichte eine Darstellung der biologischen Prozesse und molekularen Funktionen, die im Verlauf der Epileptogenese reguliert sind. Die Einteilung der regulierten Proteine in funktionelle Gruppen erfolgte mithilfe des web-basierten Online-Programmes PANTHER (s. Kap. IV.4.7.1). Es konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der regulierten Proteine beider Gewebe ähnlichen funktionellen Kategorien angehört (Abbildungen 12 und 13). Des Weiteren wurde in der Post-Insult-Phase, Latenzphase und chronischen Phase sowohl im HC als auch im PHC ein vergleichbares Klassifizierungsmuster beobachtet (Abbildungen 12 und 13). In diesem Zusammenhang konnte in beiden Gehirnregionen von der Post-Insult-Phase bis zur Latenzphase eine Zunahme in der globalen Regulation der funktionellen Gruppen nachgewiesen werden. Demgegenüber zeigte sich acht Wochen nach SE eine Abnahme in der Regulation dieser Gruppen (Abbildungen 12 und 13).

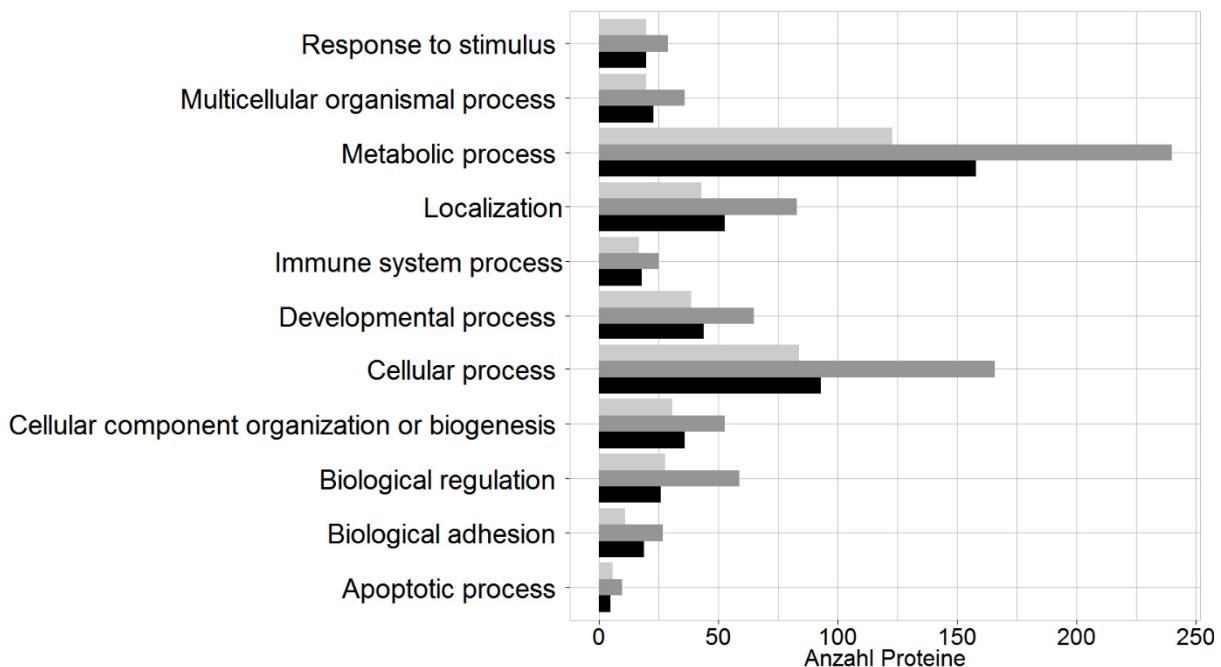
Abbildung 12 repräsentiert das Ergebnis der Klassifizierung nach biologischen Prozessen in den Geweben HC und PHC. Die Mehrheit der differentiell exprimierten Proteine beider Gewebe zeigte eine Beteiligung an metabolischen und zellulären Prozessen. Demnach waren im HC zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach SE 81, 183 bzw. fünf regulierte Proteine in metabolische Prozesse und 53, 104 bzw. acht regulierte Proteine in zelluläre Prozesse involviert (Abbildung 12 A). Im PHC konnten zu den drei untersuchten Zeitpunkten jeweils 123, 240 bzw. 158 regulierte Proteine metabolischen Prozessen und 84, 166 bzw. 93 regulierte Proteine zellulären Prozessen zugeordnet werden (Abbildung 12 B). Für immun- und inflammations-assoziierte Prozesse ließ sich die Kategorie *Immune system process* darstellen. Dieser Kategorie konnten im HC zehn Tage nach SE die meisten regulierten Proteine ($n = 26$) zugeordnet werden (Abbildung 12 A). Demgegenüber zeigte sich im PHC eine vergleichbare Anzahl regulierter Proteine zwei Tage ($n = 17$), zehn Tage ($n = 25$) und acht Wochen ($n = 18$) nach SE (Abbildung 12 B).

Abb. 12:

A)



B)

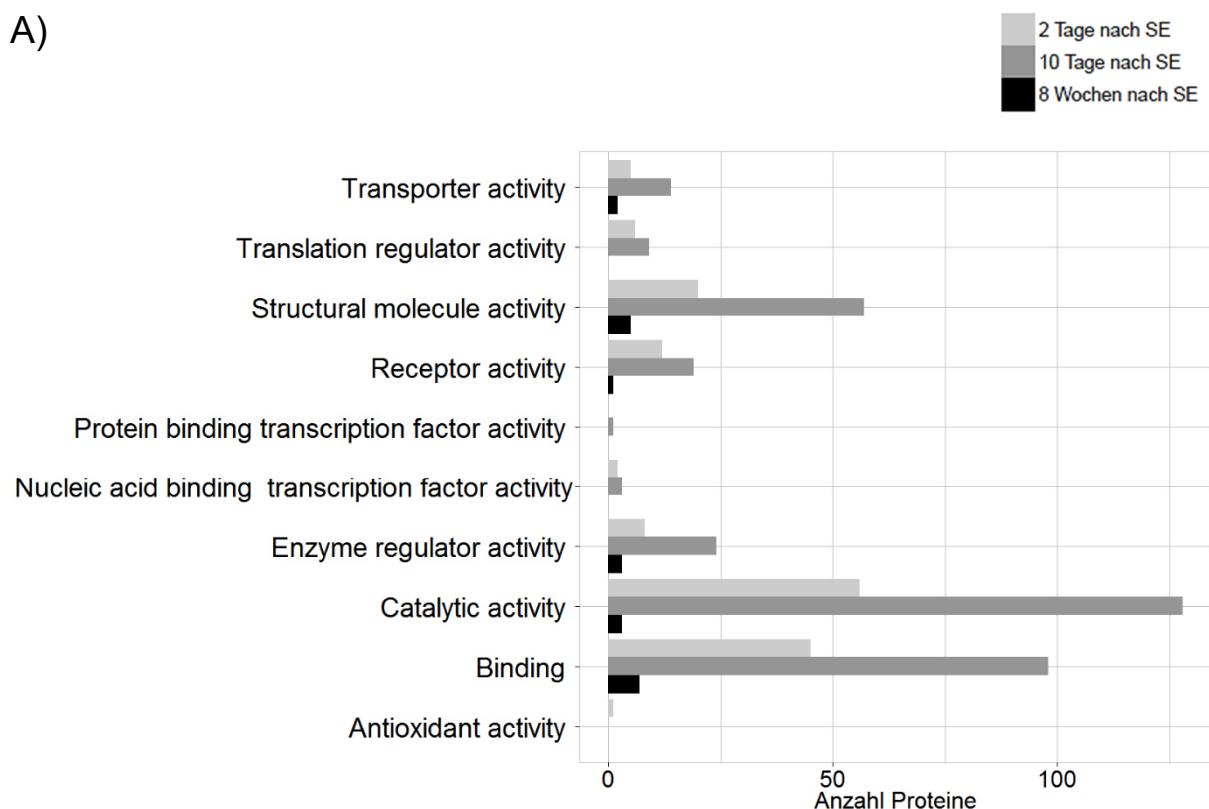


Klassifizierung der regulierten Proteine von HC (A) und PHC (B) nach biologischen Prozessen. In beiden Gehirnregionen dominierten jeweils die funktionellen Kategorien *Metabolic process* und *Cellular process* (A und B). Die Einteilung der Proteine erfolgte durch das Klassifizierungssystem von PANTHER.

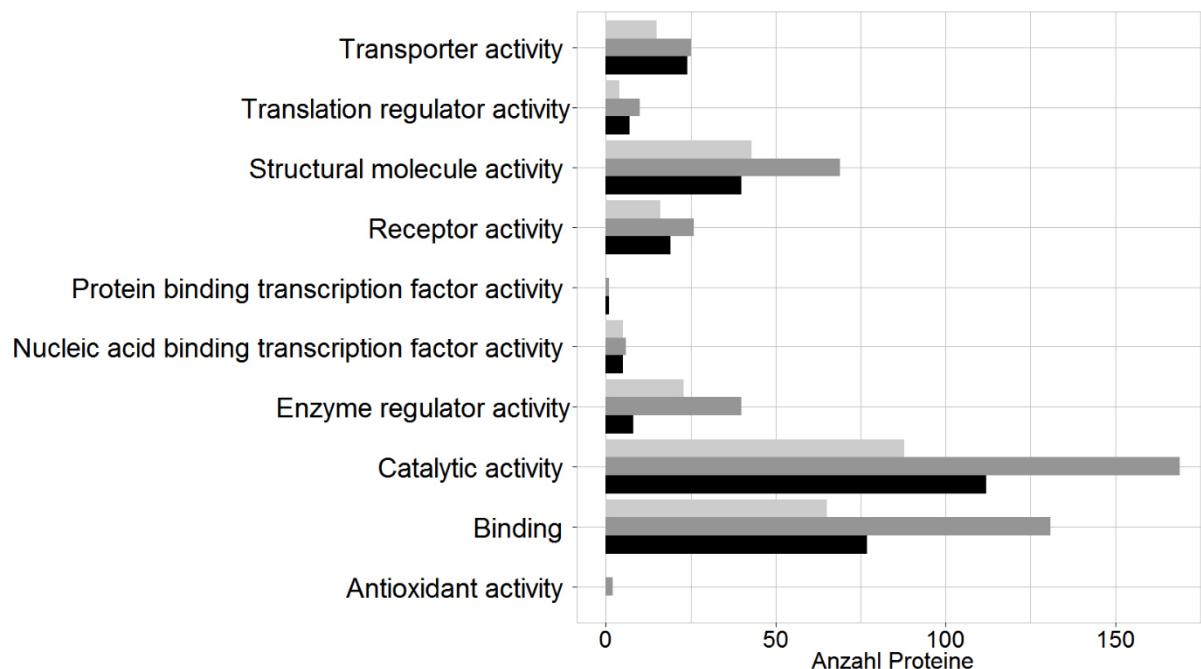
Im Hinblick auf molekulare Funktionen, ließ sich die Mehrzahl der regulierten Proteine von HC und PHC in die funktionellen Gruppen *Catalytic activity*, *Binding* und *Structural molecule activity* einteilen (Abbildung 13). In diesem Zusammenhang zeigten im HC zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach SE 56, 128 bzw. drei regulierte Proteine katalytische Aktivität, sowie 45, 98 bzw. sieben regulierte Proteine adhäsive Funktionen (Abbildung 13 A). Im PHC konnten zu den drei analysierten Zeitpunkten jeweils 88, 196 bzw. 112 regulierte Proteine mit katalytischen Funktionen sowie 65, 131 bzw. 77 regulierte Proteine mit adhäsiven Funktionen in Verbindung gebracht werden (Abbildung 13 B).

Strukturmolekulare Funktionen wurden im HC zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach SE für 20, 75 bzw. fünf regulierte Proteine und im PHC für 43, 69 bzw. 40 regulierte Proteine nachgewiesen (Abbildung 13 A und B).

Abb. 13:



B)



Klassifizierung der regulierten Proteine von HC (A) und PHC (B) nach molekularen Funktionen. In beiden Gehirnregionen waren jeweils die funktionellen Kategorien *Catalytic activity*, *Binding* und *Structural molecule activity* am stärksten vertreten (A und B). Die Einteilung der Proteine erfolgte durch das Klassifizierungssystem von PANTHER.

2.2.2. Ergebnisse der Pathway-Enrichment-Analyse

Um die relative Repräsentanz biologischer Vorgänge und *Pathways* unter Berücksichtigung von Protein-Protein-Interaktionen zu evaluieren, wurde eine *Pathway-Enrichment*-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die regulierten Proteine von HC und PHC in das *Genomatix Pathway System* bzw. das Überrepräsentations-Modul von *ConsensusPathDB* hochgeladen. Das *Pathway-Enrichment* erfolgte vor dem Hintergrund aller identifizierten Proteine des jeweiligen Zeitpunktes und Gewebes.

Top Ten der regulierten *Pathways* nach *Genomatix*

Durch das *Genomatix Pathway System* konnten im HC zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach SE 24, 27, bzw. sieben regulierte *Pathways* dargestellt werden. Im PHC wurden zu den drei untersuchten Zeitpunkten 29, 56 bzw. 37 regulierte *Pathways* nachgewiesen. Eine Übersicht der *Top Ten* der regulierten *Pathways* (Einstufung nach p-Wert) in HC und PHC findet sich in den Tabellen 4 und 5.

Zwei Tage nach SE wurden im HC die immun- und inflammations-assoziierten *Toll like receptor-*, *Myeloid differentiation primary response gene (88)-*, und *p38 mediated by MAPKAP kinases-Pathways* mit den p-Werten 1,29E-04, 1,78E-03 und 4,26E-03 identifiziert (Tabelle 4). Weiterhin zeigten Prozesse, die im Rahmen neurodegenerativer Vorgänge von großer Bedeutung sind (*Antiapoptotic*, *Apoptosis* und *Regulation of telomerase* mit den p-Werten 7,84E-03, 9,86E-03 und 0,019), ein signifikantes *Enrichment* (Tabelle 4). Im PHC konnten zwei Tage nach SE sechs der zehn am stärksten regulierten *Pathways* mit immunologischen und/oder inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht werden: *Unc 51 like kinase* ($p = 1,38E-03$), *Inflammatory* ($p = 5,43E-03$), *Tyrosine protein kinase Src* ($p = 5,97E-03$), *TCR signaling in naive CD4+ T cells* ($p = 9,40E-03$), *Spleen tyrosine kinase* ($p = 9,90E-03$) und *CD19* ($p = 0,014$, Tabelle 5).

Die *Top Ten* der regulierten *Pathways* des HC in der Latenzphase umfassten unter anderem die *Ataxia telangiectasia mutated-*, *Rho cell motility signaling-*, und *Anaplastic lymphoma kinase-Pathways* mit den p-Werten 9,61E-03, 0,012 und 0,017, welche eine Rolle bei der molekularen und zellulären Plastizität spielen (Tabelle 4). Bezugnehmend auf Prozesse der zellulären Plastizität konnte im PHC zehn Tage nach SE der *Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M-Pathway* ($p = 1,53E-03$) unter den *Top Ten* dargestellt werden (Tabelle 5). Des Weiteren wurde zu diesem Zeitpunkt im PHC ein signifikantes *Enrichment* der immun- und inflammations-assoziierten Prozesse *Chemokine (C C motif) ligand 2* und *Spleen tyrosine kinase* mit den p-Werten 3,65E-03 und 2,99E-03 nachgewiesen (Tabelle 5). Eine ausgeprägte Regulation integrin-assozierter Prozesse (*Integrin* mit einem p-Wert von 0,015 im HC sowie *a6b1 and a6b4 Integrin signaling* und *Integrin family cell surface interactions* mit den p-Werten 9,17E-05 und 7,20E-04 im PHC) konnte zehn Tage nach SE in beiden Gehirnregionen dargestellt werden (Tabellen 4 und 5).

Aufgrund der geringen Anzahl differentiell exprimierter Proteine im HC in der chronischen Phase wurden acht Wochen nach SE nur sieben regulierte *Pathways* identifiziert. Unter diesen zeigte der *Inflammatory-Pathway* den niedrigsten p-Wert ($p = 6,34E-04$, Tabelle 4). Demgegenüber umfassten die *Top Ten* der regulierten *Pathways* im PHC zum einen neurodegenerative und proliferative Prozesse, wie beispielsweise *Caspase cascade in apoptosis* ($p = 5,78E-04$ bzw. $p = 2,56E-03$), *Matrix metalloproteinase* ($p = 6,77E-04$), *Proliferation* ($p = 8,19E-04$) und *Ataxia telangiectasia mutated* ($p = 1,47E-03$), und zum anderen inflammatorische Mechanismen, wie den *Inflammatory-Pathway* mit einem p-Wert von 3,48E-03 (Tabelle 5). Integrin-assoziierte Prozesse (*Integrin linked kinase* mit einem p-Wert von 5,52E-03 im HC sowie *Integrin* und *Beta1 integrin cell surface interactions* mit den p-

Werten 1,81E-04 und 4,46E-04 im PHC) spielten, wie bereits in der Latenzphase, auch acht Wochen nach SE in beiden Gehirnregionen eine bedeutende Rolle (Tabelle 5).

Tab. 4
Top Ten der regulierten Pathways im HC

P-Wert	Pathway	Quelle	Proteine
2 Tage nach SE			
1,29E-04	Toll like receptor	Genomatix	TMED7, SSB, HMGB1, SARM1, KCNJ3, DDX1, TOLLIP, HSP90B1
1,78E-03	p38 signaling mediated by MAPKAP kinases	NCI-nature	YWHAE, HSPB1, YWHAZ, YWHAG
4,26E-03	Myeloid differentiation primary response gene (88)	Genomatix	TMED7, HMGB1, SARM1, DDX1, TOLLIP
6,61E-03	Myotonic dystrophy kinase related CDC42 binding kinase	Genomatix	CDC42, MSN, TFRC
7,84E-03	Antiapoptotic	Genomatix	HSPA5, CLU, HSPB1, ANKHD1, PLSCR3, HNRNPL, ANXA5, CD44
8,40E-03	Minichromosome maintenance complex	Genomatix	HERC2, PPP5C
9,86E-03	Apoptosis	Genomatix	TGM2, HSPA5, CLU, HSPB1, PHB, LMNA, CALR, PLSCR3, HSPA1A, HNRNPC, HSP90B1, SDHC, CTSB, EEF1A1, ANXA5, ANP32A
0,012	Secretory	Genomatix	LAMP1, SRM, TMED9, HSPA5, ERP44, RCN2, TMED10, CLU, HMGB1, CALR, TMED2, CD151, SERPINH1, SEC23A, HSP90B1, CTSB, NUDC, CALU, RNPEP, NUCB1
0,013	Inflammatory	Genomatix	TGM2, GPRC5B, HMGB1, EPRS, EHD4, TOLLIP, LTA4H, HSP90B1, CD44
0,019	Regulation of telomerase	NCI-nature	YWHAE, HNRNPC, NCL
10 Tage nach SE			
6,92E-04	Sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal	Genomatix	LAMP1, CTSD, ASAHI, RPSA, SORT1
8,11E-03	Secretory	Genomatix	LAMP1, TMED9, LRP1, TMED10, OGT, PPIB, CALR, APOE, CTSD, TMED2, CYB5A, SEC31A, SCARB2, NSF, FTH1, SERPINH1, SEC23A, CP, HSP90B1, IPO5, CST3, ANXA1, SRM, P4HB, CLU, MLC1, NLN, ABCA1, COPG1, SORT1, CTSB, M6PR, ARHGEF2
9,55E-03	Erk and pi-3 kinase are necessary for collagen binding in corneal epithelia	BioCarta	PLCG1, ACTN1, PFN1, GSN, TLN1, MLC1, VCL
9,61E-03	Ataxia telangiectasia mutated	Genomatix	ADSS, LMNB1, TGM2, PARP1, HNRNPK
0,011	Amyloid beta (A4) precursor protein	Genomatix	GRM5, LRP1, GFAP, ITGAM, APOE, DDOST, SHANK1, CST3, DPYSL2, DBN1, CLU, APLP1, SORT1, CTSB
0,012	Rho cell motility signaling pathway	BioCarta	TRIO, PFN1, GSN, TLN1, VCL
0,015	Integrin	Genomatix	LCP1, ITGAM, CD9, HNRNPU, ITGAL, FLNA, ITGB2, PTK2B, TLN1, VCL, JAM3, CD63, FERMT3, CD44, FERMT2
0,016	ATP binding cassette, sub family G (white)	Genomatix	ATIC, APOE, ABCA1
0,016	Very low density lipoprotein receptor	Genomatix	LRP1, APOE, ABCA1
0,017	Anaplastic lymphoma kinase	Genomatix	ATIC, PKM, SFPQ, HNRNP, CDC37

Tab. 4
Fortsetzung

P-Wert	Pathway	Quelle	Proteine
8 Wochen nach SE			
6,34E-04	Inflammatory	Genomatix	ABI2, CAPG, EHD4
2,03E-03	Glial cell line derived neurotrophic factor	Genomatix	GFAP, ITGB1
5,52E-03	Integrin linked kinase	Genomatix	ITGB1, ANXA2
8,22E-03	Paxillin	Genomatix	ITGB1, MARCKSL1
0,014	Mixed lineage kinase	Genomatix	ABI2, ANXA2
0,019	Caveolin 1	Genomatix	ITGB1, ANXA2
0,034	14 3 3 protein	Genomatix	GFAP, ABI2

Die Pathway-Analyse erfolgte mittels *Genomatix Pathway System*. Als Schwellenwerte wurden ein p-Wert von 0,05 und eine Schnittmenge von mindestens zwei regulierten Proteinen gewählt. Die Großbuchstaben der Gensymbole repräsentieren humane Orthologe.

Tab. 5
Top Ten der regulierten Pathways im PHC

P-Wert	Pathway	Quelle	Proteine
2 Tage nach SE			
4,20E-04	Syndecan-2-mediated signaling events	NCI-nature	NF1, PRRT2, CDC42, EZR, ITGB1, RASA1, ITGA5, GNB2L1
1,38E-03	Unc 51 like kinase	Genomatix	CDC37, SYNGAP1, YWHAZ, PIK3C3
1,41E-03	ATP binding cassette, sub family A (ABC1)	Genomatix	PRKCA, CDC42, PLTP, CAMK4, APOE, SCP2
3,81E-03	Syndecan-4-mediated signaling events	NCI-nature	PRKCA, ITGB1, ACTN1, ITGA5
5,43E-03	Inflammatory	Genomatix	CAPG, AKR1B1, TGM2, ITGB2, EHD4, SRR, TOLLIP, ENTPD1, HSP90B1, CD44, ALB
5,97E-03	Tyrosine protein kinase Src	Genomatix	PRRT2, CDC42, CTTN, EZR, ITGB1, PTK2B, PRKCE, KIFAP3, RASA1, STUB1, FHIT, PTPN6, ACTN1, ANXA2, ITGA5, GNB2L1, PTPRC, ALB, ARRB1
9,40E-03	TCR signaling in naive CD4+ T cells	NCI-nature	PRKCA, CDC42, FLNA, PRKCE, PTPN6, PTPRC
9,90E-03	Paxillin	Genomatix	CDC42, CTTN, FLNA, ITGB2, ITGB1, PTK2B, MCAM, GNB2L1
9,90E-03	Spleen tyrosine kinase	Genomatix	CTTN, EZR, FLNA, ITGB2, PTK2B, RASA1, PTPN6, PTPRC
0,014	CD19	Genomatix	PTPN6, NCL, ENTPD1, ITGA5

Tab. 5
Fortsetzung

P-Wert	Pathway	Quelle	Proteine
10 Tage nach SE			
9,17E-05	a6b1 and a6b4 Integrin signaling	NCI-nature	PRKCA, ITGB1, ITGA6, YWHAQ, YWHAZ, SFN, YWHAQ, GRB2, HRAS, YWHAQ, PRKCA, VSNL1, GFAP, RPS27A, ITPKA, ITGAM, CALB2, ISYNA1, GAP43, CALM1, RYR2, ITPR1, HPCAL1, MARCKS, ANXA2, ANXA6, PPIA, CD48, KCNMA1, HYOU1, ANXA1, AGRN, PRRT2, CACNA2D3, NEFM, ACY1, HADHB, MAP2, PTK2B, ERC2, CAMK4, NDUFC2, AKAP5, PLCD1, TPD52, NECAB2, CALB1, ANXA7, P2RY12, ATP2B2, CACYBP
3,18E-04	Calcium	Genomatix	
5,32E-04	Insulin receptor	Genomatix	RASA1, ACP1, ANXA2, HNRNPU, ACSL6, SYNCRI, SLC2A1, GRB2, HRAS
7,20E-04	Integrin family cell surface interactions	NCI-nature	ITGB1, ITGAM, ITGA6, ITGB8, ITGA1, ITGB2, ITGA5
1,53E-03	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	Genomatix	PRDX6, TPPP, GFAP, MAP4, LMNA, NEFH, ITPR1, STMN1, LMNB1, NSFL1C, NEFM, TMPO, FLNA, MAP2, HIST1H1B, SFN, ABI1, MBP, TPM3, VIM, NCL, SLC9A3R1
2,99E-03	Spleen tyrosine kinase	Genomatix	ITGAM, RASA1, SEMA4D, PTPRC, SH3KBP1, EZR, FLNA, ITGB2, PTK2B, PAK2, CLTB, PTPN6, GRB2
3,65E-03	Chemokine (C C motif) ligand 2	Genomatix	DDAH2, ITGAM, ALB, ACE2, MFGE8, PTK2B, VIM, ADRBK1
3,76E-03	Casein kinase 2	Genomatix	PACsin1, RTN3, SLK, EIF2S2, GAP43, AQP4, MGEA5, APOE, MVP, CALM1, MYH9, HNRNPC, SNCA, NME1, HSP90B1, RPL12, NEFM, EIF5, CDC37, GMFB, SSB, SEPT2, DEK, USP7, RPS5, CLTB, RPL29, MBP, NCL, M6PR, COPS2
4,50E-03	Transferrin receptor (p90, CD71)	Genomatix	LAMP1, CP, MYO6, SLC2A1, ACO1, TF, M6PR
4,64E-03	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	Genomatix	PARK7, SNCA, MIF, ANXA3
8 Wochen nach SE			
1,81E-04	Integrin	Genomatix	LCP1, ITGB1, ITGA6, CD9, ITGAV, AGRN, RAP1A, HNRNPU, SLC3A2, FLNA, TLN1, SLC12A2, TNC, VCL, DAG1, JAM3
4,46E-04	Beta1 integrin cell surface interactions	NCI-nature	ITGB1, ITGA6, ITGAV, CD81, TNC
5,78E-04	Caspase cascade in apoptosis	BioCarta	LMNA, LMNB1, PARP1, LMNB2
6,77E-04	Matrix metalloproteinase	Genomatix	LRP1, STOML2, ITGB1, CD9, ITGAV, HMGA1, NDRG2, CACNA2D3, SLC3A2, FLNA, CLU, JAM3, MIF
8,19E-04	Proliferation	Genomatix	ITGB1, ANXA11, PNP, CD9, ANXA5, PSAT1, ITGAV, HMGA1, CD81, NF1, SLC3A2, SEPT2, HEPACAM, KRT5, TPM3, RPSA, MIF, SLC9A3R1, SHMT2
1,39E-03	ATP binding cassette, sub family C (CFTR/MRP)	Genomatix	RDX, EZR, GSTA1, SLC16A1, GCLC
1,47E-03	Ataxia telangiectasia mutated	Genomatix	KRT16, BTF3, VAMP2, ADSS, LMNB1, PRPF19, PARP1
2,40E-03	Sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal	Genomatix	LAMP1, CTSD, ASAHI, RPSA
2,56E-03	Caspase cascade in apoptosis	NCI-nature	LMNA, APP, LMNB1, GSN, PARP1, VIM, LMNB2
3,48E-03	Inflammatory	Genomatix	HSDL1, GNG12, ALB, HMGA1, CAPG, FOLH1, PARP1, PSMC6, LTA4H, MIF, PLAA

Die Pathway-Analyse erfolgte mittels *Genomatix Pathway System*. Als Schwellenwerte wurden ein p-Wert von 0,05 und eine Schnittmenge von mindestens zwei regulierten Proteinen gewählt. Die Großbuchstaben der Gensymbole repräsentieren humane Orthologe.

Immun- und inflammations-assoziierte Pathways

Die Auswertung der immun- und inflammations-assoziierten *Pathways* basierte auf den Ergebnissen der *Pathway*-Analysen von *Genomatix* und *ConsensusPathDB*. Hierdurch wurde eine umfassende Darstellung der regulierten immunologischen und inflammatorischen Mechanismen während dem Prozess der Epileptogenese ermöglicht (Tabellen 6.1–7.2). Bezugnehmend auf die regulierten *Pathways* konnten in der Post-Insult-Phase im HC sieben bzw. 18 und im PHC 17 bzw. 21 immun- und inflammations-assoziierte *Pathways* dargestellt werden. Zehn Tage nach SE wurden im HC sechs bzw. acht und im PHC 15 bzw. 19 regulierte *Pathways* identifiziert, die mit immunologischen und inflammatorischen Mechanismen in Verbindung stehen. Die immun- und inflammations-assoziierten *Pathways* zwei und zehn Tage nach SE umfassten unter anderem Mechanismen der transendothelialen Leukozytenmigration, TLR-vermittelte Signalwege, Signaltransduktion durch TGF beta, Signalvermittlungsprozesse durch inflammations-assoziierte Integrine, pro-inflammatorische Interleukine, Synthese und Regulation von Prostaglandinen, Prozesse des angepassten Immunsystems, sowie die Aktivierung und Regulation von Hitzeschockproteinen.

In beiden Gehirnregionen wurde zwei Tage nach SE eine Überrepräsentation TLR-assozierter Proteine und ein signifikantes *Enrichment* nachgeschalteter Signalwege wie *Myeloid differentiation primary response gene (88)* ($p = 4,26E-03$), *p38 signaling mediated by MAPKAP kinases* ($p = 1,78E-03$ bzw. $p = 1,27E-03$), *MAPK Signaling Pathway* ($p = 0,015$) und *TNFalpha/NF-kB* ($p = 0,044$) sowie *TNFalpha* ($p = 0,030$) nachgewiesen (Tabellen 6.1-7.2). In diesem Zusammenhang zeigte sich auch eine Regulation der *Interleukin 1* ($p = 0,044$)-, *Interleukin 1 receptor* ($p = 0,042$ bzw. $p = 0,034$)- und *Signal transduction through il1r* ($p = 0,047$)-*Pathways* (Tabellen 6.1-7.2). Des Weiteren konnten zwei Tage nach SE die immun- und inflammations-assoziierten *Pathways* *TGF beta*, *Leukocyte transendothelial migration* und *Chemokine (C C motif) ligand 2* mit den p-Werten 0,016, 0,017 und 0,015 im PHC dargestellt werden (Tabellen 7.1 und 7.2). Letztgenannter Pathway spielt eine bedeutende Rolle bei der *Chemotaxis* von Monozyten und neutrophilen Granulozyten.

In der Latenzphase zeigte sich im HC unter anderem ein signifikantes *Enrichment* der *Pathways* *Leukocyte transendothelial migration* und *Prostaglandin Synthesis and Regulation* mit den p-Werten 0,010 und 2,28E-03 (Tabelle 6.2). In Zusammenhang mit letztgenanntem Signalweg konnte im HC auch eine Regulation des *Phospholipase A2-Pathways* mit einem p-Wert von 0,030 gezeigt werden (Tabelle 6.1). In beiden Geweben ließ sich zehn Tage nach SE eine anhaltende Überrepräsentation TLR-assozierter Proteine darstellen (Tabellen 6.2 und 7.2). Darüber hinaus zeigte sich im PHC eine Regulation von Signalwegen die den TLRs

nachgeschaltet sind: *p38 signaling mediated by MAPKAP kinases* ($p = 7,42\text{E-}03$ bzw. $p = 4,58\text{E-}03$), *p38 mapk signaling pathway* ($p = 0,022$ bzw. $p = 0,017$), *MAPK Signaling Pathway* ($p = 0,042$) und *Tank binding kinase 1* ($p = 4,64\text{E-}03$, Tabellen 7.1 und 7.2). Der *Prostaglandin Synthesis and Regulation-Pathway* wurde im Vergleich zum HC auch im PHC zehn Tage nach SE mit einem p-Wert von $4,99\text{E-}03$ identifiziert (Tabelle 7.2). Des Weiteren konnte im PHC eine Überrepräsentation von Proteinen dargestellt werden, die mit den *Pathways Il8- and CXCR1-mediated signaling events* ($p = 0,037$) und *Chemokine (C C motif) ligand 2* ($p = 3,65\text{E-}03$) assoziiert sind (Tabellen 7.1 und 7.2). Beide *Pathways* spielen im Rahmen der (transendothelialen) Leukozytenmigration eine bedeutende Rolle. Letztgenannter Signalweg wurde zudem zwei Tage nach SE im PHC nachgewiesen (s.o.).

Während der chronischen Phase ließen sich im HC drei bzw. zwei und im PHC sechs bzw. sieben immun- und inflammations-assoziierte *Pathways* darstellen. Zu diesem Zeitpunkt wurden von den insgesamt 13 regulierten Proteinen des HC drei Proteine in der Gruppe *Inflammatory* ($p = 6,34\text{E-}04$) nachgewiesen (Tabelle 6.1). Die immun- und inflammations-assoziierten *Pathways* des PHC umfassten acht Wochen nach SE unter anderem Signalvermittlungsprozesse durch inflammations-assoziierte Integrine und pro-inflammatorische Interleukine sowie die Synthese und Regulation von Prostaglandinen. Bezugnehmend auf letztgenannten Prozess konnten die *Pathways Prostaglandin Synthesis and Regulation* und *Phospholipase A2* mit den p-Werten $5,97\text{E-}04$ und $0,027$ dargestellt werden (Tabellen 7.1 und 7.2). Des Weiteren wurde im PHC eine Überrepräsentation von Proteinen nachgewiesen, die mit der Aktivierung und Regulation von Hitzeschockproteinen in Verbindung stehen (Tabelle 7.2).

Tab. 6.1
Immun- und inflammations-assoziierte Pathways im HC - Genomatix

P-Wert	Pathway	Quelle	Proteine
2 Tage nach SE			
1,29E-04	Toll like receptor	Genomatix	TMED7, SSB, HMGB1, SARM1, KCNJ3, DDX1, TOLLIP, HSP90B1
1,78E-03	p38 signaling mediated by MAPKAP kinases	NCI-nature	YWHAE, HSPB1, YWHAZ, YWHAG
4,26E-03	Myeloid differentiation primary response gene (88)	Genomatix	TMED7, HMGB1, SARM1, DDX1, TOLLIP
0,013	Inflammatory	Genomatix	TGM2, GPRC5B, HMGB1, EPRS, EHD4, TOLLIP, LTA4H, HSP90B1, CD44
0,041	hiv-1 nef: negative effector of fas and tnf	BioCarta	LMNA, PAK2, RASA1
0,042	Interleukin 1 receptor	Genomatix	HMGB1, SARM1, TOLLIP
0,044	Interleukin 1	Genomatix	HSPB1, HMGB1, AQP4, TOLLIP, TMEM126A
10 Tage nach SE			
0,017	Anaplastic lymphoma kinase	Genomatix	ATIC, PKM, SFPQ, HNRNPD, CDC37
0,018	amb2 Integrin signaling	NCI-nature	KNG1, LRP1, ITGAM, ITGB2, TLN1, JAM3
0,021	CD28	Genomatix	PLCG1, NSF, ILF3, ITGAL, FLNA, PTK2B
0,022	Inflammatory	Genomatix	KNG1, ITGAM, ENTPD1, HSP90B1, ANXA1, TGM2, ITGB2, EHD4, P2RX7, PARP1, PEPD, LTA4H, CD44
0,030	Phospholipase A2	Genomatix	KNG1, PTGES2, ANXA5, ANXA1, PRKCG, LTA4H
0,034	T cell receptor	Genomatix	LCP1, PLCG1, RASGRF2, ITPR1, PTPRC, ITGAL, ITGB2, PTK2B, PTPRJ, ARHGEF2
8 Wochen nach SE			
6,34E-04	Inflammatory	Genomatix	ABI2, CAPG, EHD4
2,03E-03	Glial cell line derived neurotrophic factor	Genomatix	GFAP, ITGB1
5,52E-03	Integrin linked kinase	Genomatix	ITGB1, ANXA2

Die Pathway-Analysen erfolgten mittels *Genomatix Pathway System*. Als Schwellenwerte wurden ein p-Wert von 0,05 und eine Schnittmenge von mindestens zwei regulierten Proteinen gewählt. Die Großbuchstaben der Gensymbole repräsentieren humane Orthologe.

Tab. 6.2

Immun- und inflammations-assoziierte Pathways im HC - ConsensusPathDB

P-Wert	Pathway	Quelle	Proteine
2 Tage nach SE			
1,27E-03	p38 signaling mediated by MAPKAP kinases	PID	YWHAZ, HSPB1, YWHAG, YWHAE
1,65E-03	Class I MHC mediated antigen processing & presentation	Reactome	SEC23A, HSPA5, CALR, HERC2, UBA3, UBE2V2, SAR1B, UBR4
2,38E-03	Antigen Presentation: Folding, assembly and peptide loading of class I MHC	Reactome	CALR, SAR1B, SEC23A, HSPA5
2,69E-03	miR-targeted genes in lymphocytes	Wikipathways	HSD17B12, TMED7, ANXA2, RCN2, PPP5C, SLC25A1, G6PD, SEC23A, ABHD11, ACAA2, NCL, TMED2, MPDU1, PTBP1, NUCB1, TMED10
6,76E-03	Trafficking and processing of endosomal TLR	Reactome	CTSB, HSP90B1
9,21E-03	Regulation of HSF1-mediated heat shock response	Reactome	HSPA1A, HSPB1, SERPINH1, YWHAE
0,013	HSF1 activation	Reactome	EEF1A1, HSPA1A, SERPINH1, HSPB1
0,013	Antigen processing and presentation	KEGG	CALR, HSPA1A, CTSB, HSPA5
0,014	TCR	NetPath	YWHAZ, ANXA2, LDHA, G6PD, RASA1, TFRC, NCL, FLNB, EPRS, LDHB
0,015	MAPK Signaling Pathway	Wikipathways	HSPA5, HSPB1, PPP5C, HSPA1A, RASA1, PAK2, CDC42
0,023	FAS pathway and Stress induction of HSP regulation	Wikipathways	LMNA, PAK2, HSPB1
0,023	hiv-1 nef: negative effector of fas and tnf	BioCarta	LMNA, RASA1, PAK2
0,023	mTOR signaling pathway	PID	YWHAZ, YWHAG, EEF2, YWHAE
0,032	Immune System	Reactome	YWHAZ, CALR, SEC23A, TOLLIP, ARPC3, HMGB1, HERC2, HSP90B1, CTSB, DDOST, UBR4, UBA3, HSPA5, FLNB, UBE2V2, SAR1B, SARM1, PAK2, CDC42
0,036	Scavenging by Class A Receptors	Reactome	CALR, HSP90B1
0,043	amb2 Integrin signaling	PID	HMGB1, JAM3, TLN1
0,043	Regulation of toll-like receptor signaling pathway	Wikipathways	TMED7, SARM1, TOLLIP
0,044	Adaptive Immune System	Reactome	YWHAZ, SEC23A, HSPA5, CALR, HERC2, CTSB, UBA3, SAR1B, UBR4, UBE2V2, PAK2, CDC42
10 Tage nach SE			
8,66E-04	Scavenging by Class A Receptors	Reactome	CALR, FTH1, APOE, HSP90B1
2,28E-03	Prostaglandin Synthesis and Regulation	Wikipathways	ANXA1, ANXA3, ANXA2, ANXA5, ANXA4
9,09E-03	Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	Reactome	APOE, HYOU1, CALR, HSP90B1, LRP1, FTH1
0,010	Leukocyte transendothelial migration	KEGG	ACTN1, ITGB2, JAM3, PRKCB, VCL, PTK2B, PRKCG, MSN, PLGG1, ITGAM, CTNNA1, CTNNA2
0,017	amb2 Integrin signaling	PID	JAM3, LRP1, ITGAM, ITGB2, TLN1
0,030	Trafficking and processing of endosomal TLR	Reactome	CTSB, HSP90B1
0,034	FAS pathway and Stress induction of HSP regulation	Wikipathways	LMNA, LMNB1, PARP1, HSPB1
0,034	hiv-1 nef: negative effector of fas and tnf	BioCarta	LMNA, LMNB1, PARP1, GSN

Tab. 6.2

Fortsetzung

P-Wert	Pathway	Quelle	Proteine
8 Wochen nach SE			
6,49E-04 0,043	Leishmaniasis miR-targeted genes in leukocytes	KEGG WikiPathways	MARCKSL1, ITGB1 ANXA2, CAPG

Die Pathway-Analysen erfolgten mittels Überrepräsentations-Modul von *ConsensusPathDB*. Als Schwellenwerte wurden ein p-Wert von 0,05 und eine Schnittmenge von mindestens zwei regulierten Proteinen gewählt. Die Großbuchstaben der Gensymbole repräsentieren humane Orthologe.

Tab. 7.1

Immun- und inflammations-assoziierte Pathways im PHC - Genomatix

P-Wert	Pathway	Quelle	Proteine
2 Tage nach SE			
1,38E-03	Unc 51 like kinase	Genomatix	CDC37, SYNGAP1, YWHAZ, PIK3C3
5,43E-03	Inflammatory	Genomatix	CAPG, AKR1B1, TGM2, ITGB2, EHD4, SRR, TOLLIP, ENTPD1, HSP90B1, CD44, ALB
5,97E-03	Tyrosine protein kinase Src	Genomatix	PRRT2, CDC42, CTTN, EZR, ITGB1, PTK2B, PRKCE, KIFAP3, RASA1, STUB1, FHIT, PTPN6, ACTN1, ANXA2, ITGA5, GNB2L1, PTPRC, ALB, ARRB1
9,40E-03	TCR signaling in naive CD4+ T cells	NCI-nature	PRKCA, CDC42, FLNA, PRKCE, PTPN6, PTPRC
9,90E-03	Spleen tyrosine kinase	Genomatix	CTTN, EZR, FLNA, ITGB2, PTK2B, RASA1, PTPN6, PTPRC
0,014	CD19	Genomatix	PTPN6, NCL, ENTPD1, ITGA5
0,015	Chemokine (C C motif) ligand 2	Genomatix	MFGE8, PTK2B, SLC38A2, VIM, ALB
0,016	TGF beta	Genomatix	PLTP, GFAP, CLU, UBE2O, STUB1, HTRA1, NDRG1, SERPINH1, VIM, CST3, ALB
0,019	Toll like receptor	Genomatix	ITGB2, SSB, SARM1, WDR34, TOLLIP, HSP90B1
0,024	Focal adhesion kinase 1	Genomatix	CDC42, CTTN, TGM2, EZR, ITGB1, PTK2B, MCAM, RASA1, ACTN1, CD44, ITGA5, GNB2L1
0,030	Lymphocyte specific protein tyrosine kinase	Genomatix	PTK2B, RASA1, PTPN6, CD44, PTPRC
0,034	Interleukin 1 receptor	Genomatix	IL1RAP, SARM1, WDR34, TOLLIP
0,035	TCR signaling in naive CD8+ T cells	NCI-nature	PRKCA, PRKCE, PTPN6, PTPRC
0,037	14 3 3 PROTEIN	Genomatix	NF1, FLNA, BSN, ITGB2, GFAP, MVP, YWHAZ, VIM, KPNA3, NEFL, PPP1R9B, YWHAB
0,040	BCR signaling pathway	NCI-nature	PRRT2, RASA1, PTPN6, CAMK2G, PTPRC
0,044	TNF alpha/NF-kB	CellMap	PSMD1, CDC37, FLNA, HSPB1, COPS3, YWHAZ, RPL30, KPNA3, GNB2L1, YWHAB
0,047	Signal transduction through il1r	BioCarta	IL1RAP, TOLLIP

Tab. 7.1

Fortsetzung

P-Wert	Pathway	Quelle	Proteine
10 Tage nach SE			
3,65E-03	Chemokine (C C motif) ligand 2	Genomatix	DDAH2, ITGAM, ALB, ACE2, MFGE8, PTK2B, VIM, ADRBK1
4,64E-03	Tank binding kinase 1	Genomatix	UCHL1, MTDH, CDC37, MAP1LC3A
7,42E-03	p38 signaling mediated by MAPKAP kinases	NCI-nature	HSPB1, YWHAG, YWHAZ, SFN, YWHAQ, YWHAB
7,42E-03	VEGFR3 signaling in lymphatic endothelium	NCI-nature	CRK, ITGB1, ITGA1, PRRT2, ITGA5, GRB2
8,64E-03	TCR signaling in naive CD4+ T cells	NCI-nature	PRKCA, PRKCE, DBNL, PTPRC, CDC42, FLNA, PTPN6, GRB2, HRAS
0,013	Glial cell line derived neurotrophic factor	Genomatix	GFAP, ITGB1, HSPB1, GAP43, SNCA, ENO2, CALB1, ITGA5
0,022	T cell receptor	Genomatix	ITPR1, MFF, STMN1, ACP1, DBNL, PPIA, CD48, PTPRC, EZR, ITGB2, PTK2B, PTPN6, GRB2
0,022	II 3 signaling pathway	BioCarta	PTPN6, GRB2, HRAS
0,022	p38 mapk signaling pathway	BioCarta	HSPB1, CDC42, H3F3A, HRAS
0,029	Inflammatory	Genomatix	ITGAM, ENTPD1, HSP90B1, ANXA1, ALB, CAPG, TGM2, GMFB, ITGB2, EHD4, SRR, TOLLIP, MIF, CD44, SERPINA1
0,033	CD19	Genomatix	ENTPD1, CD48, PTPN6, NCL, ITGA5
0,033	TCR signaling in naive CD8+ T cells	NCI-nature	PRKCA, PRKCE, PTPRC, PTPN6, GRB2, HRAS
0,043	hiv-1 nef: negative effector of fas and tnf	BioCarta	LMNA, RASA1, LMNB1, GSN, PAK2
0,044	Granulocyte colony stimulating factor	Genomatix	ITGAM, PTPN6, GRB2, HRAS
0,044	Role of Calcineurin-dependent NFAT signaling in lymphocytes	NCI-nature	PRKCA, FKB1A, PRKCE, CALM1, YWHAG, CAMK4, YWHAZ, SFN, AKAP5, YWHAQ, YWHAZ
8 Wochen nach SE			
3,48E-03	Inflammatory	Genomatix	HSDL1, GNG12, ALB, HMGA1, CAPG, FOLH1, PARP1, PSMC6, LTA4H, MIF, PLAA
0,018	Glial cell line derived neurotrophic factor	Genomatix	MAOB, GFAP, ITGB1, HSPB1, SLC1A3
0,018	hiv-1 nef: negative effector of fas and tnf	BioCarta	LMNA, LMNB1, GSN, PARP1, LMNB2
0,024	Interleukin 4 receptor	Genomatix	ITGA6, HMGA1
0,027	Phospholipase A2	Genomatix	SUCLG2, AQP4, ANXA5, LTA4H, MIF, PLAA
0,030	Tnfr1 signaling pathway	BioCarta	LMNA, LMNB1, LMNB2

Die Pathway-Analysen erfolgten mittels *Genomatix Pathway System*. Als Schwellenwerte wurden ein p-Wert von 0,05 und eine Schnittmenge von mindestens zwei regulierten Proteinen gewählt. Die Großbuchstaben der Gensymbole repräsentieren humane Orthologe.

Tab. 7.2

Immun- und inflammations-assoziierte Pathways im PHC - ConsensusPathDB

P-Wert	Pathway	Quelle	Proteine
2 Tage nach SE			
6,04E-04	Pathogenic Escherichia coli infection#	Wikipathways; KEGG	YWHAZ, ITGB1, CTTN, PRKCA, ARPC1B, EZR, ARPC3, NCL, CDC42
6,47E-03	AGE-RAGE pathway	Wikipathways	PRKCA, MSN, DDOST, EZR, CDC42
0,012	Signaling by Interleukins	Reactome	YWHAZ, TOLLIP, PTK2B, YWHAB, UBE2V1, PTPN6
0,015	TCR signaling in naive CD4+ T cells	PID	PRKCA, PTPRC, PRKCE, PTPN6, CDC42
0,015	Nitric oxide stimulates guanylate cyclase	Reactome	ITPR1, PRKG2, GUCY1B3
0,015	IKK complex recruitment mediated by RIP1	Reactome	UBE2V1, RPS27A, SARM1
0,016	IL3	NetPath	YWHAZ, PRKCA, GNB2L1, PTPRC, YWHAB, PTPN6
0,017	TCR signaling in naive CD8+ T cells	PID	PRKCA, PTPRC, PRKCE, PTPN6
0,017	Regulation of toll-like receptor signaling pathway	Wikipathways	USP7, PTPN6, TOLLIP, SARM1
0,017	Leukocyte transendothelial migration	KEGG	ITGB1, ACTN1, ITGB2, PRKCA, EZR, RAPGEF4, MSN, PTK2B, CDC42 RPS27A, HSP90B1, RAPGEF4, PTK2B, DDOST, DNM3, YWHAZ, PIK3C3, STUB1, CAMK4, SARM1, ARPC3, YWHAB, ITGB1, ITGB2, PRKCA, CAMK2G, PRKCE, PRKAR1B, UBE2V1, ITPR1, PTPN6, TOLLIP, UBE2O, PTPRC, CDC42
0,017	Immune System	Reactome	ITGB1, CTTN, ARPC3, CD44, ITGA5, ARPC1B, CDC42 ITGB2, RPS27A, HSP90B1, DNM3, UBE2V1, PIK3C3, SARM1
0,021	Shigellosis	KEGG	YWHAZ, TOLLIP, CAMK2G, PTK2B, YWHAB, UBE2V1, PTPN6
0,021	Toll-Like Receptors Cascades	Reactome	PRKCA, H2AFY, NF1
0,021	Cytokine Signaling in Immune system	Reactome	YWHAZ, HSPB1, PRKCA, COPS3, PSMD1, RPL30, CDC37, GNB2L1, KPNA3, YWHAB ITGB2, PRKAR1B, ITPR1, PRKCA, RPS27A, PRKCE, CAMK4, HSP90B1, ARPC3, DDOST, DNM3, YWHAZ, UBE2V1, PIK3C3, SARM1, CDC42
0,027	ATF-2 transcription factor network	PID	
0,030	TNFalpha	NetPath	
0,031	Innate Immune System	Reactome	APOE, ALB, HSP90B1, HBA2
0,036	Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	Reactome	
0,040	Epstein-Barr virus infection	KEGG	YWHAZ, ENTPD1, HSPB1, CD44, PSMD1, VIM, HSPA1A, YWHAB, USP7
0,047	DAG and IP3 signaling	Reactome	PRKCA, ITPR1, PRKCE, CAMK4, PRKAR1B
0,049	Integrin-linked kinase signaling	PID	CDC42, ACTN1, NACA, CDC37

Tab. 7.2

Fortsetzung

P-Wert	Pathway	Quelle	Proteine
10 Tage nach SE			
4,58E-03	p38 signaling mediated by MAPKAP kinases	PID	YWHAZ, HSPB1, YWHAQ, SFN, YWHAB, YWHAG
4,99E-03	Prostaglandin Synthesis and Regulation	Wikipathways	ANXA1, ANXA3, ANXA2, ANXA4, ANXA6
9,80E-03	LKB1 signaling events	PID	YWHAZ, SFN, YWHAQ, CTSD, EZR, CDC37, MAP2, MAPT, YWHAB, YWHAG
0,014	Signaling by Interleukins	Reactome	YWHAZ, TOLLIP, SKP1, HRAS, PTK2B, UBE2V1, YWHAB, CRK, PTPN6
0,014	hiv-1 nef: negative effector of fas and tnf	BioCarta	LMNA, LMNB1, RASA1, PAK2, GSN
0,017	p38 mapk signaling pathway	BioCarta	HRAS, CDC42, H3F3A, HSPB1
0,023	Epstein-Barr virus infection	KEGG	YWHAZ, SND1, ENTPD1, HSPB1, CD44, YWHAQ, PSMD1, PSMD13, USP7, HSPA1A, VIM, PSMD4, YWHAB, PSMC1, PSMC3, YWHAG
0,024	Role of Calcineurin-dependent NFAT signaling in lymphocytes	PID	YWHAZ, AKAP5, CALM1, PRKCA, YWHAQ, PRKCE, CAMK4, SFN, FKBP1A, YWHAB, YWHAG
0,024	Toll-Like Receptors Cascades	Reactome	DHX9, ITGB2, RPS27A, HSP90B1, DNM1, ITGAM, DNM3, DNM2, UBE2V1, PIK3C3, SARM1
0,026	TCR Signaling Pathway	Wikipathways	DBNL, HRAS, VIM, PTK2B, CRK, ITPR1, CDC42
0,026	TCR signaling in naive CD4+ T cells	PID	DBNL, PRKCA, HRAS, PRKCE, PTPRC, PTPN6, CDC42
0,029	Leishmaniasis	KEGG	MARCKSL1, ITGB1, ITGB2, PTPN6, ITGAM
0,032	Fc gamma R-mediated phagocytosis	KEGG	MARCKSL1, PPAP2B, PRKCA, ARPC1B, ARPC5L, PRKCE, MARCKS, PTPRC, DNM2, CRK, CDC42, ASAP1, GSN
0,032	Pathogenic Escherichia coli infection#	KEGG; Wikipathways	ITGB1, YWHAZ, ARPC5L, PRKCA, ARPC1B, YWHAQ, ROCK2, NCL, EZR, CDC42
0,037	IL8- and CXCR1-mediated signaling events	PID	RAB5A, PRKCA, PRKCE, DNM1, ARRB1, ADRBK1
0,040	VEGFR3 signaling in lymphatic endothelium	PID	ITGB1, ITGA1, ITGA5, CRK
0,040	Interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling	Reactome	YWHAZ, CRK, HRAS, PTPN6
0,042	MAPK Signaling Pathway	Wikipathways	MINK1, STMN1, PPP3R1, PPM1A, HSPB1, HSPA1A, MAPT, ARRB1, CRK, MAPK8IP3, RASA1, PAK2, CDC42
0,044	DAG and IP3 signaling	Reactome	CALM1, PRKCA, PRKCE, CAMK4, PRKAR2A, PRKAR1B, ITPR1, ADRBK1
8 Wochen nach SE			
5,97E-04	Prostaglandin Synthesis and Regulation	Wikipathways	ANXA3, ANXA2, ANXA5, ANXA4, ANXA6
3,55E-03	Leukotriene metabolism	EHMN	HSD17B10, HADHB, ACOT2, GSTZ1, ALDH2, ACAA2, ALDH7A1, ALDH1B1, HSD17B4
8,16E-03	FAS pathway and Stress induction of HSP regulation	Wikipathways	LMNB2, LMNA, LMNB1, PARP1, HSPB1
8,16E-03	hiv-1 nef: negative effector of fas and tnf	BioCarta	LMNB2, LMNA, LMNB1, PARP1, GSN
0,029	amb2 Integrin signaling	PID	JAM3, LRP1, RAP1A, TLN1
0,033	miR-targeted genes in leukocytes - TarBase	Wikipathways	CAPG, LMNB2, ANXA2, RAB5C, FMNL2, PNP, TPM3, HMGA1, ACAA2, HNRNPM, TMED10, RHOG, CDIPT
0,034	tnfr1 signaling pathway	BioCarta	LMNB2, LMNA, LMNB1

#Pathways, die mit unterschiedlichen Datenbanken identifiziert wurden.

Die Pathway-Analysen erfolgten mittels Überrepräsentations-Modul von ConsensusPathDB. Als Schwellenwerte wurden ein p-Wert von 0,05 und eine Schnittmenge von mindestens zwei regulierten Proteinen gewählt. Die Großbuchstaben der Gensymbole repräsentieren humane Orthologe..

2.2.3. Hypothesen-gestützte Analyse TLR-assoziierter Proteine

Die *Pathway-Enrichment*-Analyse zeigte in beiden untersuchten Gehirnregionen zwei Tage nach SE eine Überrepräsentation von TLR-assozierten Proteinen (*Toll like receptor*, *Trafficking and processing of endosomal TLR* und *Regulation of toll-like receptor signaling pathway* mit den p-Werten 1,29E-04, 6,76E-03 und 0,043 im HC sowie *Toll like receptor*, *Regulation of toll-like receptor signaling pathway* und *Toll-Like Receptors Cascades* mit den p-Werten 0,019, 0,017 und 0,021 im PHC). In diesem Zusammenhang wurden neun regulierte Proteine im HC und 12 regulierte Proteine im PHC nachgewiesen (Tabellen 6.1–7.2). Während der Latenzphase zeigte sich ebenfalls eine Überrepräsentation von zwei und 11 TLR-assozierten Proteinen in HC und PHC (*Trafficking and processing of endosomal TLR* mit einem p-Wert von 0,030 im HC und *Toll-Like Receptors Cascades* mit einem p-Wert von 0,024 im PHC, Tabellen 6.2 und 7.2). Für einige der regulierten TLR-assozierten Proteine erfolgte eine Expressionsanalyse im Zeitverlauf der Epileptogenese (s. Kapitel IV.4.6.4).

Abbildung 14 zeigt das Expressionsmuster dieser Proteine zwei Tage (Abbildung 14 A und B), zehn Tage (Abbildung 14 C und D) und acht Wochen nach SE (Abbildung 14 E und F). Das *Ribosomal protein 27a* (Rps27a) erreichte zwei und zehn Tage nach SE signifikant erhöhte Expressionslevel im PHC (Abbildung 14 B und D). Der *Pathway*-Datenbank *Reactome* zufolge spielt Rps27a eine Rolle bei dem MyD88-abhängigen, und –unabhängigen TLR-Signalweg (MILACIC et al. 2012; CROFT et al. 2014). Unter den differentiell exprimierten Proteinen zehn Tage nach SE ließen sich unter anderem die Integrine *Integrin beta 2* (Itgb2) und *Integrin alpha M* (Itgam) nachweisen, welche in der Lage sind die TLR-abhängige Signalvermittlung in verschiedenen Zelltypen zu regulieren (YEE u. HAMERMAN 2013; LING et al. 2014). Für Itgb2 konnte eine Überexpression in der Post-Insult-Phase und Latenzphase nach SE im PHC nachgewiesen werden (Abbildung 14 B und D). Demgegenüber zeigte Itgam in beiden Gehirnregionen eine verzögerte Aufregulation zehn Tage nach SE (Abbildung 14 C und D). Die Oberflächenexpression verschiedener TLRs wird durch Dynamin GTPasen reguliert (BARTON u. KAGAN 2009). In den Listen der differentiell exprimierten Proteine wurden die Dynamine *Dynamin 1* (Dnm1), -2 (Dnm2) und -3 (Dnm3) nachgewiesen. Im Hinblick auf Dnm1 wurden die Transkripte Dnm1-201 und Dnm1-202 (Ensembl-IDs: ENSRNOT00000047921 und ENSRNOT00000064039) identifiziert. Interessanterweise zeigte Dnm1-201 im PHC zehn Tage nach SE eine Herunterregulation, wohingegen für Dnm1-202 im HC eine Überexpression dargestellt werden konnte (Abbildung 14 C und D). Dnm2 zeigte nur im PHC zehn Tage nach SE eine Aufregulation (Abbildung 14 D). Demgegenüber wurde im PHC eine Herunterregulation für Dnm3 sowohl in der Früh- als auch in der Latenzphase

nachgewiesen (Abbildung 14 B und D).

Der zelluläre Proteintransport von TLR4 wird unter anderem durch das *Transmembrane emp24 domain-containing protein 7* (Tmed7) reguliert (LIAUNARDY-JOPEACE u. GAY 2014). Eine deutliche Aufregulation dieses Proteins konnte zwei Tage nach SE im HC dargestellt werden (Abbildung 14 A).

Die negativen Regulatorproteine *WD40 domain repeat protein 34* (Wdr34), *Toll-interacting protein* (Tollip) und *Ubiquitin specific peptidase 7* (Usp7) limitieren oder hemmen die TLR-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (DIDIERLAURENT et al. 2006; GAO et al. 2009; COLLERAN et al. 2013). Für Wdr34 und Tollip konnte eine frühe Aufregulation im PHC dargestellt werden (Abbildung 14 B). Zudem zeigten letztgenanntes Protein und Usp7 eine Überrepräsentation im PHC zehn Tage nach SE (Abbildung 14 D). Demgegenüber ließen sich im HC eine frühe Aufregulation von Tollip und eine verzögerte Aufregulation von Usp7 zwei und zehn Tage nach SE darstellen (Abbildung 14 A und C).

Der gut charakterisierte TLR-Ligand *High mobility group box protein 1* (Hmgb1) zeigte eine akute Aufregulation im HC zwei Tage nach SE (Abbildung 14 A). Des Weiteren war der TLR-abhängige Bindungspartner Hsp90b1 in beiden Gehirnregionen sowohl in der Früh- als auch in der Latenzphase nach SE aufreguliert (Abbildung 14 A-D).

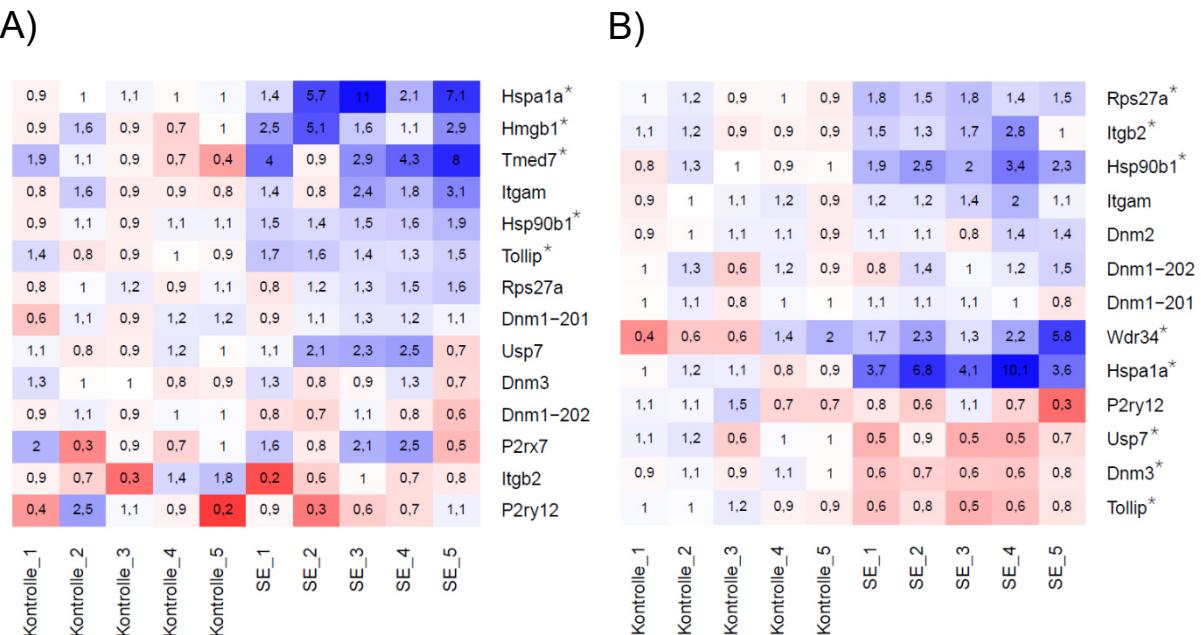
Im Hinblick auf die besondere Bedeutung der TLR-abhängigen Signalvermittlung während dem Prozess der Epileptogenese wurde zusätzlich die differentielle Expression gut charakterisierter TLR-Liganden aus der Literatur bestimmt. Die Analyse umfasste insgesamt 17 potentielle TLR-Protein-Liganden aus zwei *Review*-Artikeln (SLOANE et al. 2010; YU et al. 2010). Fünf der 17 TLR-Liganden konnten in den Proteinlisten nachgewiesen werden. Diese umfassten Hmgb1, Hsp90b1, Hspal1a/ Hsp70, *Heat shock protein 60 kDa* (Hspd1) und *Tenascin C* (Tnc). Tnc ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das hauptsächlich nach Gewebeschädigung, bzw. infolge von Infektionen exprimiert wird (PAALLYSAHO et al. 1993; KAARTEENAHOWIIK et al. 2000; CHIQUET-EHRISMANN u. CHIQUET 2003). Eine Aufregulation von Tnc wurde acht Wochen nach SE im PHC beobachtet (Abbildung 14 F).

Die Aktivierung von TLRs erfolgt unter anderem durch Hitzeschockproteine. Insbesondere Hspal1a spielt in diesem Zusammenhang als endogener TLR-Ligand eine bedeutende Rolle (ASEA et al. 2002; VABULAS et al. 2002a). In HC und PHC konnte zwei Tage nach SE eine deutliche Aufregulation von Hspal1a dargestellt werden (Abbildung 14 A und B). Zudem zeigte sich eine Überexpression von Hspal1a in beiden Gehirnregionen zehn Tage nach SE (Abbildung 14 C und D). Im weiteren Verlauf der Auswertung wurde die differentielle Expression von Hspal1a immunhistochemisch validiert (Abbildung 17).

2.2.4. Aktivierung der inflammatorischen Antwort durch Purinozeptoren

Nach epileptogener Gehirnverletzung existieren neben den TLRs weitere Mechanismen um Mikroglia zu aktivieren und eine inflammatorische Antwort hervorzurufen (VEZZANI et al. 2013b). Diesbezüglich spielen vor allem die Purinozeptoren der Mikroglia eine bedeutende Rolle bei der Freisetzung von Zytokinen und der Chemotaxis (FARBER u. KETTENMANN 2005). In den Listen der differentiell exprimierten Proteine konnten die Purinozeptoren P2rx7 und P2ry12 nachgewiesen werden. Der purinerge Ionenkanal P2rx7 zeigte eine deutliche Aufregulation im HC zehn Tage nach SE (Abbildung 14 C). Im Gegensatz zu P2rx7 konnte eine Überexpression des G-Protein-gekoppelten Purinozeptors P2ry12 in beiden Gehirnregionen dargestellt werden. In diesem Kontext zeigte sich in der Latenzphase nach SE eine Aufregulation von P2ry12 in HC und PHC (Abbildung 14 C und D). Die differentielle Expression von P2rx7 und P2ry12 wurde ebenfalls immunhistochemisch validiert (Abbildungen 18 und 19).

Abb. 14:



C)

1.5	0.9	0.9	0.7	0.9	14.9	22	4.3	1.4	4.2
2.4	1	0.7	0.3	0.5	12.8	16.2	2	0.9	3.4
1.8	0.8	1	0.7	0.8	8.4	7.3	2	1	1.9
0.6	0.9	1.4	2	0.2	6.2	7.8	1.4	2.1	2.8
3.1	1.1	0.4	0.1	0.2	5	3.4	1.1	0.4	4.3
1	1	1	1.1	0.9	2.9	2.8	2.5	1.4	3.1
0.8	1	1.1	1.2	0.9	2	2.5	1.6	1.3	1.9
0.9	0.9	0.6	0.6	1.9	2.6	1.7	2.7	2	2.1
1.5	1.5	0.7	0.6	0.6	1.7	2.3	1.3	0.8	1.8
0.2	0.4	0.3	3.1	1	0.5	1.3	0.7	0.8	2.2
0.8	0.8	1.1	1.4	0.9	1.1	0.9	1.2	1.1	1.1
1	1	1	0.9	1.1	0.9	1.2	1.3	0.9	0.9
1.4	1	1.1	0.7	0.8	0.8	0.8	1.1	1.1	0.6
0.9	1.1	0.7	1.2	1	0.6	0.6	0.7	0.8	0.4

Kontrolle_6 Kontrolle_7 Kontrolle_8 Kontrolle_9 Kontrolle_10 SE_6 SE_7 SE_8 SE_9 SE_10

D)

0.9	0.9	1.4	0.8	1	1.4	2.2	2.2	1.3	1.8
1.3	1.2	1.1	0.7	0.7	2.1	1.9	2.2	1.1	1.6
1.3	0.6	0.9	1.2	1	2.1	2.2	3.3	1.5	2.3
0.8	1	1.1	1.1	1	4.2	3.6	3.7	2.9	4.7
0.9	0.7	0.9	1.4	1.1	1.8	2.2	1.7	1.9	1.2
0.8	0.8	1	1.3	1.1	1.1	1.9	2.4	2.2	1.3
0.5	0.7	1	1	1.7	1	1.4	1.6	2.1	2
0.9	1.1	1.2	0.7	1.1	1.1	1.1	1.1	0.7	1
1.1	0.8	1.1	0.8	1.2	5.8	10.1	12.7	5.2	9.9
Tmed7	Hsp90b1*	Usp7*	Rps27a	Hmgb1	Tollip	Dnm3	Dnm1–202	Dnm1–201	Itgb2*

Kontrolle_6 Kontrolle_7 Kontrolle_8 Kontrolle_9 Kontrolle_10 SE_6 SE_7 SE_8 SE_9 SE_10

E)

1.2	1.1	1.1	0.8	0.8	2.3	1.3	1.3	0.8	0.8
0.8	0.9	0.8	1	1.4	1.5	1	1	0.9	1.3
0.9	0.8	0.9	1.1	1.2	1.4	0.9	0.9	1.1	1.2
0.8	0.8	1	0.7	1.7	1.5	1.1	0.8	0.8	1.3
1	1.1	1	1	0.9	0.9	0.9	1	0.9	0.9
1.1	1.2	1	0.9	0.8	1.2	0.9	0.9	0.8	0.8
0.9	0.9	0.8	1.2	1.2	0.8	0.8	0.8	1.1	0.9
1	1	1.1	0.9	0.9	0.6	0.9	0.9	1.1	1

Kontrolle_11 Kontrolle_12 Kontrolle_13 Kontrolle_14 Kontrolle_15 SE_11 SE_12 SE_13 SE_14 SE_15

0.9	0.2	1.2	1.8	1	3.3	1.7	8.3	5.3	4.2
1	1.2	0.9	0.9	1	1.4	1.3	1.3	1.6	1.5
0.9	1.1	0.8	1	1.1	1.4	1.4	1.5	1.1	1.3
0.8	1	0.8	1.1	1.3	1.4	1.5	1	1.5	1.3
0.7	1	0.8	1.3	1	0.8	1.6	1.1	1.4	1.4
Dnm2	Hsp90b1	Rps27a	Rps27a	Hmgb1	Usp7	Dnm1–201	Tollip	Dnm3	Hmgb1

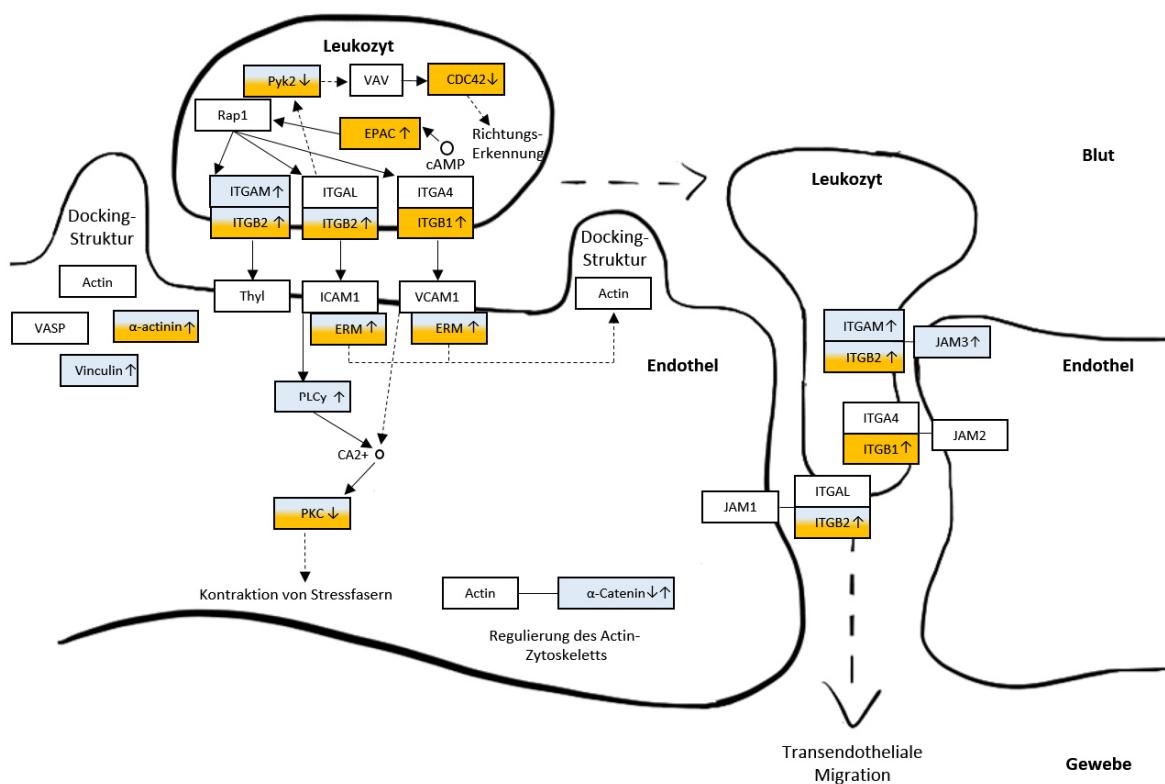
Kontrolle_11 Kontrolle_12 Kontrolle_13 Kontrolle_14 Kontrolle_15 SE_11 SE_12 SE_13 SE_14 SE_15

Expressionsanalyse TLR-assozierter Proteine und Purinozeptoren in HC und PHC zwei Tage (A und B), zehn Tage (C und D) und 8 Wochen (E und F) nach SE. Die Spalten und Zeilen der Heatmaps zeigen die differentiellen Proteinexpressionsdaten der SE- und Kontrolltiere (chronologisch nummeriert) zu den jeweiligen Pathway-Proteinen. Die Anordnung der Proteine folgt einem hierarchischen Cluster-Verfahren. Der Farbverlauf repräsentiert die individuellen *fold changes* der Proteine nach vorangegangener log₂-Transformierung (blau = aufreguliert, rot = herunterreguliert). Die Zellwerte illustrieren die tatsächlichen individuellen *fold changes*. Für die Erstellung der Heatmaps wurde R verwendet. Die differentiell exprimierten Proteine sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

2.2.5. Hypothesen-gestützte Analyse der transendothelialen Leukozytenmigration

Durch die *Pathway-Enrichment*-Analyse konnte im HC und PHC eine Regulation von Proteinen dargestellt werden, die eine bedeutende Rolle bei der transendothelialen Migration von Leukozyten spielen (Abbildung 15). In diesem Kontext zeigte der *Leukocyte transendothelial migration-Pathway* im HC zehn Tage nach SE (p-Wert von 0,010) und im PHC zwei Tage nach SE (p-Wert von 0,017) ein signifikantes *Enrichment* (Tabellen 6.2 und 7.2).

Abb. 15:



Differentiell exprimierte Proteine und deren Interaktionspartner im *Leukocyte transendothelial migration-Pathway* (*Homo sapiens*) modifiziert nach KEGG¹³ (KANEHISA u. GOTO 2000; KANEHISA et al. 2014). Die farbige Markierung repräsentiert die regulierten Proteine bzw. Proteinkomplexe in HC und PHC (blau = HC, orange = PHC). Die Pfeilsymbole illustrieren eine Auf- und/oder Herunterregulation der Proteine. Nicht regulierte Interaktionspartner wurden weiß unterlegt. Die Großbuchstaben repräsentieren humane Orthologe.

¹³ <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>

Basierend auf den identifizierten Proteinen beider Gehirnregionen wurde die differentielle Expression für die Proteine bestimmt, die eine Rolle bei der transendothelialen Leukozytenmigration spielen. Abbildung 16 zeigt die individuellen *fold changes* der Proteine zwei Tage (Abbildung 16 A und B), zehn Tage (Abbildung 16 C und D) und acht Wochen nach SE (Abbildung 16 E und F). Die regulierten Proteine umfassten unter anderem *Moesin* (Msn), *Ezrin* (Ezr) und *Vinculin* (Vcl). Diese Proteine werden für das Andocken von Leukozyten an Endothelzellen benötigt (BARREIRO et al. 2002). Msn zeigte sowohl zwei Tage als auch zehn Tage nach SE eine gesteigerte Expression in beiden Gehirnregionen (Abbildung 16 A-D). Darüber hinaus konnte eine Aufregulation für Msn acht Wochen nach SE im PHC nachgewiesen werden (Abbildung 16 F). Die Regulation von Ezr beschränkte sich ausschließlich auf den PHC. Nach frühzeitiger Induktion von Ezr in der akuten Phase der Epileptogenese wurde eine konstante Überexpression dieses Proteins zehn Tage und acht Wochen nach SE beobachtet (Abbildung 16 B, D und F). Vcl zeigte eine deutliche Aufregulation im HC zehn Tage nach SE sowie im PHC acht Wochen nach SE (Abbildung 16 C und F).

In beiden Gehirnregionen wurde für das Zytoskelett-Protein *Actinin alpha 1* (Actn1) eine deutliche Überexpression nachgewiesen. In diesem Zusammenhang zeigte sich in HC und PHC eine frühe und bis in die Latenzphase anhaltende Aufregulation von Actn1 (Abbildung 16 A- D).

Das Protein *Cell division cycle protein 42* (Cdc42) gehört zur Familie der Rho-GTPasen und damit zu den wichtigsten Koordinatoren zellulärer Migration (RIDLEY 2001). In den Listen der differentiell exprimierten Proteine konnten die Transkripte Cdc42-201 und Cdc42-202 dargestellt werden (Ensembl-IDs: ENSRNOT00000018118 und ENSRNOT00000029025). Beide Transkripte zeigten im PHC sowohl zwei Tage als auch zehn Tage nach SE eine Herunterregulation (Abbildung 16 B und D). Demgegenüber konnte im HC zwei Tage nach SE eine deutliche Aufregulation für Cdc42-202 dargestellt werden (Abbildung 16 A).

Für das *Junctional adhesion molecule 3* (Jam3) wurde in den analysierten Gehirnregionen ein unterschiedliches Proteinexpressionsmuster beobachtet. Demnach konnte für Jam3 im HC eine Überexpression zwei und zehn Tage nach SE gezeigt werden (Abbildung 16 A und C). Im PHC hingegen ließ sich eine Aufregulation für Jam3 nur bei Tieren mit spontanen Anfällen in der chronischen Phase nach SE beobachten (Abbildung 16 F).

Die Proteine *Cadherin-associated proteins alpha 1* und *2* (Ctnna1 und Ctnna2) zeigten im HC zehn Tage nach SE unterschiedliche Expressionsraten. In diesem Kontext ließ sich für Ctnna1 eine Überexpression und für Ctnna2 eine Herunterregulation darstellen (Abbildung 16 C).

Zu den verschiedenen Zeitpunkten der Epileptogenese wurde eine Regulation mehrerer Leukozyten-Integrine beobachtet. Diese umfassten unter anderem die bereits erwähnten Proteine Itgb2 und Itgam sowie *Integrin beta 1* (Itgb1). Für Itgb1 konnte im PHC eine Aufregulation zu allen drei untersuchten Zeitpunkten dargestellt werden (Abbildung 16 B, D und F). Demgegenüber wurde im HC acht Wochen nach SE nur eine temporäre Überexpression von Itgb1 nachgewiesen (Abbildung 16 E).

Abb. 16:

A)

1,2	0,9	0,9	1	1	1,6	1,7	1,2	2	2,8
0,9	1,2	1,1	0,9	1	1,2	2	1,8	1,5	2,2
1,3	1,1	1,2	0,6	0,6	1,8	1,8	1,6	1,4	2,3
1,1	0,7	0,8	1,2	1,2	1,9	1,1	2	2,5	1,6
1	1	0,9	1	1,1	1,4	1,4	1,5	1,5	1
1,1	1	1	1	0,9	0,9	1,3	1,1	1,1	0,9
1,1	0,8	0,8	1,1	1,1	1,7	1,9	1,3	2,4	0,5
0,8	1,6	0,9	0,9	0,8	1,4	0,8	2,4	1,8	3,1
0,8	1,8	1,5	0,6	0,3	1,6	0,7	2	1,7	4,1
0,7	1,5	1,2	0,9	0,7	0,5	1,1	1,1	0,5	2,5
0,9	1	1,3	0,9	0,9	0,8	0,7	0,8	0,8	0,7
0,9	0,7	0,3	1,4	1,8	0,2	0,6	1	0,7	0,8

Kontrolle_1

Kontrolle_2

Kontrolle_3

Kontrolle_4

Kontrolle_5

SE_1

SE_2

SE_3

SE_4

SE_5

B)

1,1	1,2	0,9	0,9	0,9	1,5	1,3	1,7	2,8	1	Itgb2*
1,2	1,3	1	0,9	0,7	1,8	1,7	1,7	1,7	0,9	Itgb1*
0,9	1	1,1	1,2	0,9	1,2	1,2	1,2	1,4	2	Itgam
0,7	0,9	1,2	1,1	1,1	1,1	1,5	1,5	1,9	2,1	Msn*
0,9	0,7	1,4	0,7	1,2	1,8	1,2	1,9	1,4	1,9	Actn1*
1,5	0,5	1,4	0,5	1	1,8	2,1	2,1	2,1	2,1	Ezr*
1	1	1	1,1	1,1	0,9	0,9	1,2	0,8	0,9	Vcl
1	1	1	1	1	1	0,8	0,9	0,9	1	Ctnna2
1,4	0,9	0,9	1	0,8	0,7	0,9	0,9	0,5	0,6	Cdc42-202*
1,3	0,9	0,9	1	0,8	0,7	0,8	0,4	0,5	0,5	Cdc42-201*
0,01	4,4	0,04	0,3	0,2	2	3,8	2,2	0,4	8,5	Ctnna1

Kontrolle_1

Kontrolle_2

Kontrolle_3

Kontrolle_4

Kontrolle_5

SE_1

SE_2

SE_3

SE_4

SE_5

C)

0,9	1	1	1,1	1	3,4	6,1	2,9	1,3	3,3	
1,2	0,9	0,9	0,8	1,3	3,2	3,3	2,5	1,6	2,4	
2,3	1	0,8	0,3	0,7	4	5,7	2,1	0,8	1,5	
1	1	1,1	0,8	1	2,2	1,9	1,6	1	1,8	
0,8	1	1	0,9	1,2	1,5	2,1	1,5	1,1	1,7	
1	1	1,5	0,7	0,9	1,3	2,5	1,2	0,7	1,3	
1,6	1,1	0,7	0,8	0,7	1,8	2	1,3	1,1	1,7	
1,4	1,1	0,9	0,6	1	1,1	0,9	0,9	1,2	1,9	
0,9	0,9	1	1,1	1	1,3	0,6	0,6	1,3	1,4	
1,4	0,9	0,9	1	0,8	0,6	0,6	0,7	0,6	0,5	
1,5	0,9	0,9	0,7	0,9	14,9	22	4,3	1,4	4,2	Itgb2*
0,6	0,9	1,4	2	0,2	6,2	7,8	1,4	2,1	2,8	Itgb2*

Kontrolle_6

Kontrolle_7

Kontrolle_8

Kontrolle_9

Kontrolle_10

SE_6

SE_7

SE_8

SE_9

SE_10

D)

1,1	0,8	1,1	0,8	1,2	5,8	10,1	12,7	5,2	9,9	Itgb2*
1,1	0,8	1	1	1	3,9	6,4	8,7	4,2	7,2	Itgam*
1,1	1	0,9	0,9	1	2,5	2,2	3,5	1,4	3,2	Msn*
1,1	1,1	1,2	0,7	1	2,1	2,2	3,1	1,4	2,6	Itgb1*
0,6	0,7	1,3	1,1	1,4	1,2	1,5	2,3	1,5	1,5	Actn1*
1,9	0,3	0,7	0,7	1,4	2	2,8	3,5	2	3	Ezr*
1	0,9	1,1	1	0,9	1	1,1	0,9	0,7	0,8	Vcl
1	1	1,1	0,9	1	1,1	0,9	0,7	0,8	0,9	Ctnna2
1,4	0,9	1	1,1	1,1	0,6	0,8	0,5	0,5	0,6	Cdc42-202*
1,5	1	1	1	0,5	0,6	0,4	0,5	0,5	0,5	Cdc42-201*
2	0,4	0,003	1,4	1,2	0,3	10,7	4,3	2,5	0,7	Ctnna1

Kontrolle_6

Kontrolle_7

Kontrolle_8

Kontrolle_9

Kontrolle_10

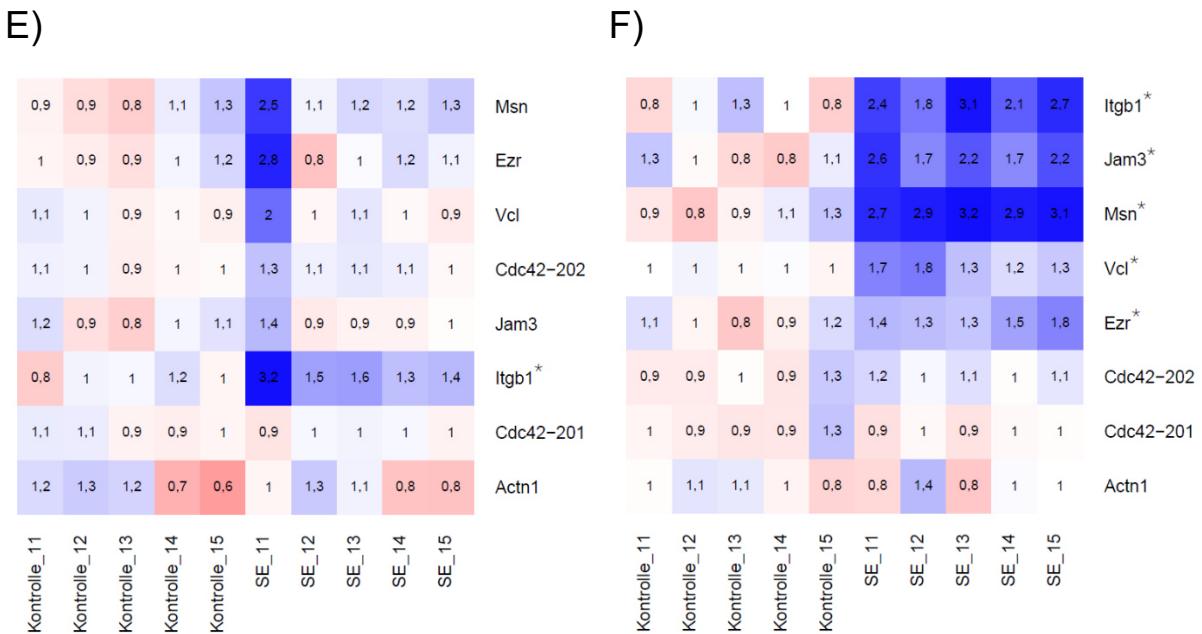
SE_6

SE_7

SE_8

SE_9

SE_10



Expressionsanalyse regulierter Proteine des *Leukocyte transendothelial migration-Pathway* in HC und PHC, zwei Tage (A und B), zehn Tage (C und D) und 8 Wochen (E und F) nach SE. Die Spalten und Zeilen der *Heatmaps* zeigen die differentiellen Proteinexpressionsdaten der SE- und Kontrolltiere (chronologisch nummeriert) zu den jeweiligen *Pathway*-Proteinen. Die Anordnung der Proteine folgt einem hierarchischen Cluster-Verfahren. Der Farbverlauf repräsentiert die individuellen *fold changes* der Proteine nach vorangegangener \log_2 -Transformierung (blau = aufreguliert, rot = herunterreguliert). Die Zellenwerte illustrieren die tatsächlichen individuellen *fold changes*. Für die Erstellung der *Heatmaps* wurde R verwendet. Die differentiell exprimierten Proteine sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

2.3. Immunhistochemische Validierung

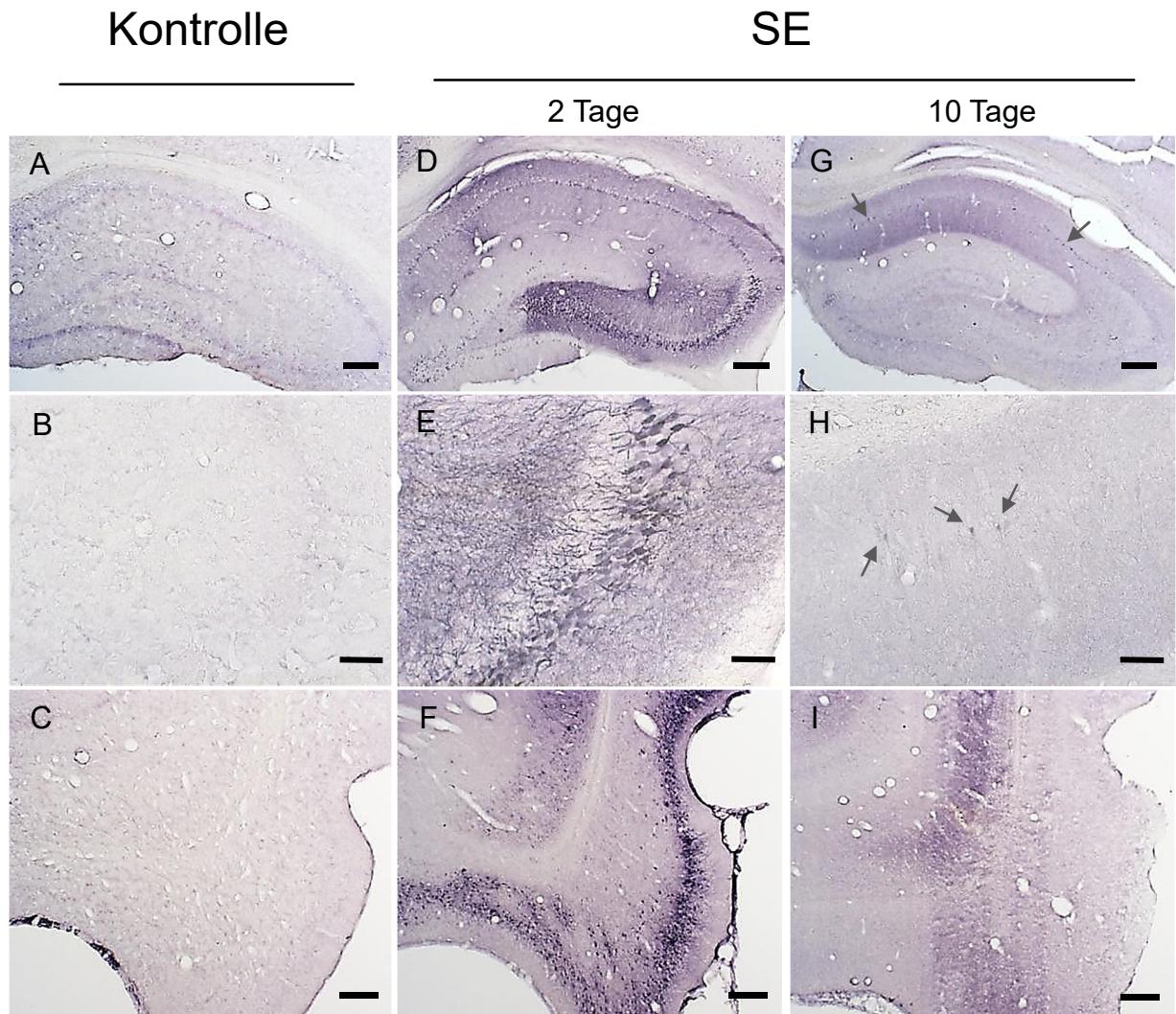
Die Immunhistochemie diente der Validierung ausgewählter Proteomdaten auf zellulärer Ebene. Der immunhistochemische Nachweis umfasste die Proteine Hspal1a (Abbildung 17), P2ry12 (Abbildung 18) und P2rx7 (Abbildung 19) im HC und PHC zu den Zeitpunkten, an denen eine differentielle Expression der Proteine identifiziert werden konnte.

Für Hspal1a wurde zwei Tage nach SE in SE-Tieren in beiden Gehirnregionen eine deutliche Immunreaktion nachgewiesen (Abbildung 17 D-F). Insbesondere konnten immunreaktive Zellen mit dornartig verzweigten Fortsätzen und Zellen mit langen, wenig verzweigten Ausläufern in der CA1 sowie CA3-CA4-Region des HC identifiziert werden (Abbildung 17 D und E). Darüber hinaus ließ sich bei allen SE-Tieren eine scharf umschriebene Grenze der Immunreaktion im *Hilus* der *hippocampalen* Formation nachweisen (Abbildung 17 D). Im PHC zeigten die *perirhinalen*, *entorhinalen* und *posterior-piriformen Cortices* eine deutliche

Immunreaktion in der Frühphase der Epileptogenese (Abbildung 17 F)

Zehn Tage nach SE konnte Hspa1a lediglich in einzelnen Zellen mit langen, wenig verzweigten Ausläufern im *Hilus* der *hippocampalen* Formation und der CA1-Region dargestellt werden (Abbildung 17 G, H und I). In der chronischen Phase wurde bei den SE-Tieren immunhistochemisch keine Expression von Hspa1a nachgewiesen. Die Kontrolltiere zeigten zu keinem der analysierten Zeitpunkte eine Immunreaktion des Hitzeschockproteins (Abbildung 17 A-C).

Abb. 17:

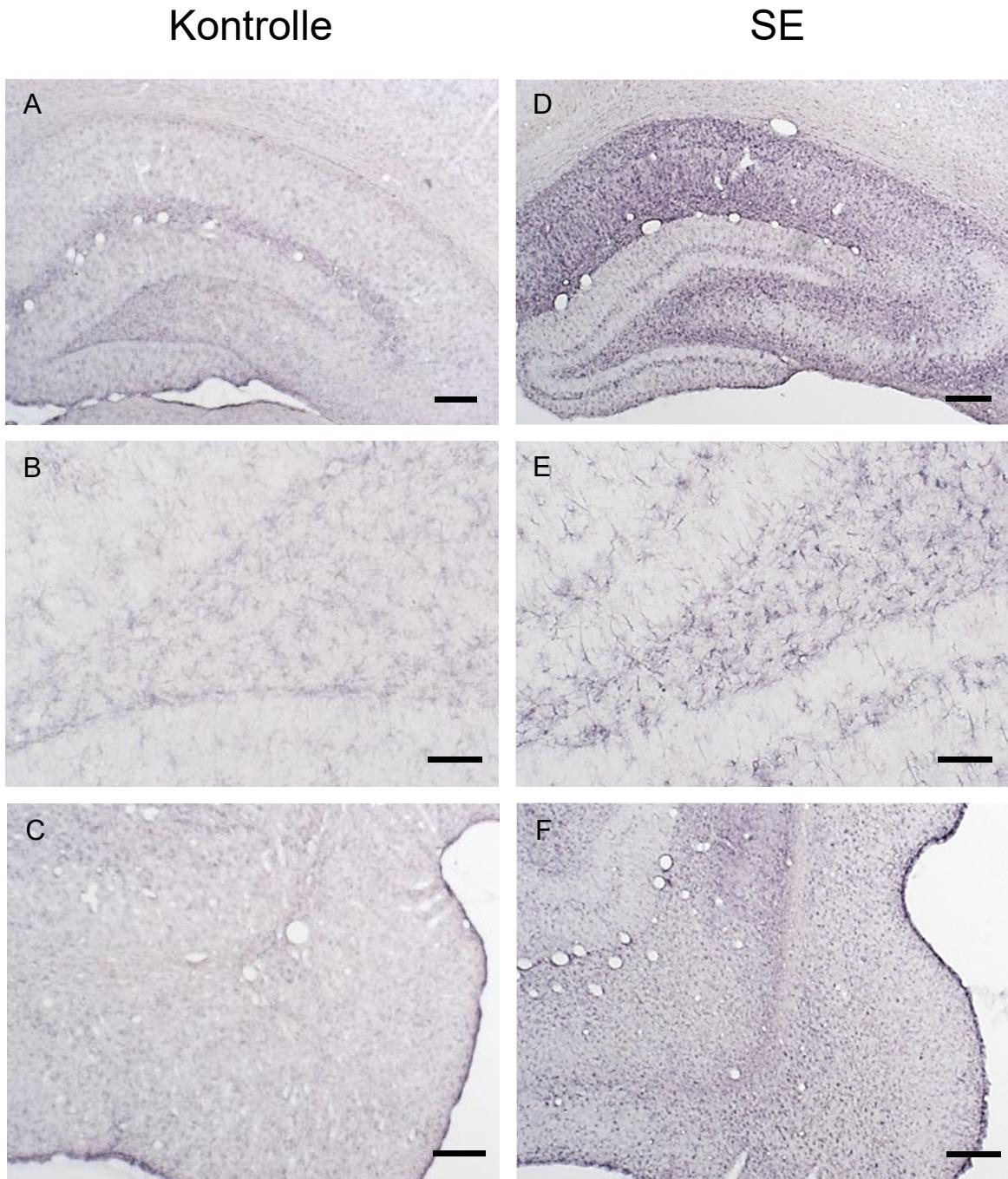


Immunhistochemische Färbung von Hspal1a in HC und PHC zwei und zehn Tage nach SE. Bei den SE-Tieren konnte in der Frühphase der Epileptogenese eine deutliche Expression von Hspal1a in beiden Geweben nachgewiesen werden (D-F). Zehn Tage nach SE ließen sich immunhistochemisch nur vereinzelte Zellen mit langen, wenig verzweigten Ausläufern im *Hilus* der *hippocampalen* Formation und in der CA1-Region (schwarze Pfeile) darstellen (G-I). Die Kontrolltiere zeigten keine nachweisbare Immunreaktion (A-C). Maßstab = 200 µm (obere und untere Bildreihe) und 50 µm (mittlere Bildreihe).

Bei der immunhistochemischen Färbung von P2ry12 wurde eine erhöhte Expression nur in der Latenzphase der Epileptogenese nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine deutliche Immunreaktion in beiden Gehirnregionen beobachtet (Abbildung 18 D-F). Im HC zeigten das *Stratum moleculare*, die Regionen CA1-4 sowie der *Hilus* der *hippocampalen* Formation eine

erhöhte immunhistochemische Anfärbung P2ry12-positiver Zellen (Abbildung 18 D und E). Bei vergrößerter Darstellung des *Hilus* zeigten sich Zellen mit dornartig verzweigten Zellfortsätzen (Abbildung 18 B). Im PHC wurde eine Überexpression von P2ry12 in Zellen der *perirhinalen*, *entorhinalen* und *posterior-piriformen Cortices* nachgewiesen (Abbildung 18 F). Im Vergleich zu den SE-Tieren zeigten die Kontrolltiere zehn Tage nach SE nur eine schwache Immunreaktion des Purinozeptors (Abbildung 18 A-C). Zwei Tage und acht Wochen nach SE konnte zwischen SE- und Kontrolltieren immunhistochemisch kein Unterschied in der Expression von P2ry12 festgestellt werden.

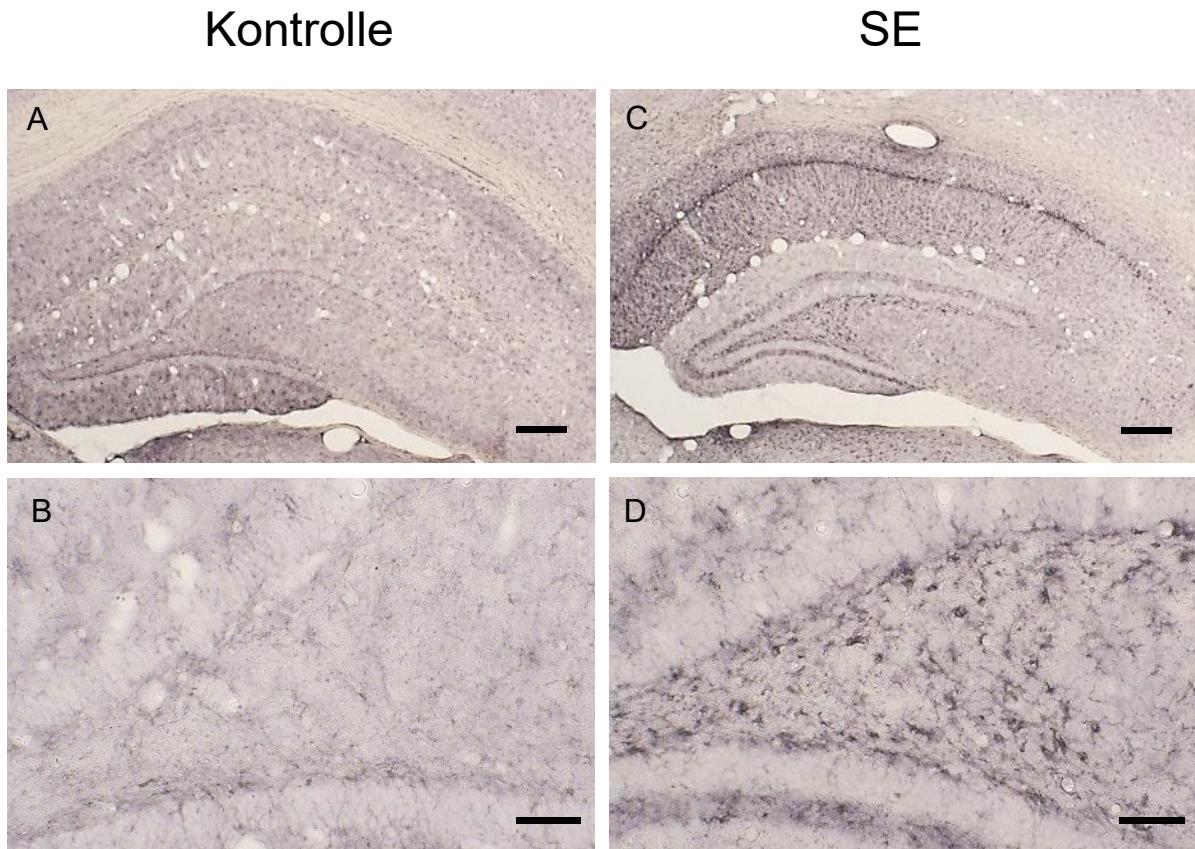
Abb. 18:



Immunhistochemische Färbung von P2ry12 in HC und PHC zehn Tage nach SE. Bei den SE-Tieren konnte immunhistochemisch eine deutliche Expression von P2ry12 dargestellt werden (D-F). Demgegenüber wurde bei den Kontrolltieren nur eine schwache Immunreaktion des Purinozeptors nachgewiesen (A-C). In der vergrößerten Darstellung des Hilus der *hippocampalen* Formation zeigten sich positiv gefärbte dornartig verzweigte Zellen (E). Maßstab = 200 µm (obere und untere Bildreihe) und 50 µm (mittlere Bildreihe).

Eine Überexpression von P2rx7 ließ sich immunhistochemisch zehn Tage nach SE im HC nachweisen. Es wurde eine deutliche Immunreaktion des Purinozeptors im *Stratum pyramidale*, der CA1- und teilweise auch in der CA2-Region, im *Stratum moleculare* und dem *Hilus* der *hippocampalen* Formation dargestellt (Abbildung 19 C und D). Bei vergrößerter Betrachtung des *Hilus* zeigten sich P2rx7-positive Zellen mit dornartig verzweigten Fortsätzen (Abbildung 19 D). Bei den Kontrolltieren wurde vergleichsweise nur eine schwache Immunreaktion von P2rx7 nachgewiesen (Abbildung 19 A und B). Zwei Tage und acht Wochen nach SE im HC, sowie zu allen untersuchten Zeitpunkten im PHC, zeigte sich zwischen SE- und Kontrolltieren kein Unterschied in der Expression von P2rx7.

Abb. 19:



Immunhistochemische Färbung von P2rx7 im HC zehn Tage nach SE. Bei den SE-Tieren konnte immunhistochemisch in der Latenzphase der Epileptogenese eine deutliche Überexpression von P2rx7 dargestellt werden. (C und D). In der vergrößerten Darstellung des *Hilus* der *hippocampalen* Formation ließen sich P2rx7-positive Zellen mit dornartig verzweigten Fortsätzen nachweisen (D). Die Kontrolltiere zeigten nur eine vergleichsweise schwache Immunreaktion von P2rx7 (A und B). Maßstab = 200 µm (obere Bildreihe) und 50 µm (untere Bildreihe).

VI. DISKUSSION

Epilepsien gehören zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen bei Hund und Katze sowie beim Menschen (SANDER u. SHORVON 1996; COWAN 2002; CHANDLER 2006; SMITH BAILEY u. DEWEY 2009). Mit etwa 60-70 % aller fokalen epileptischen Anfälle entspricht die TLE der häufigsten Epilepsieform des Menschen (RUGG-GUNN et al. 2011; TÉLLEZ-ZENTENO u. HERNÁNDEZ-RONQUILLO 2011). Bis heute haben sich alle therapeutischen Strategien zur Beeinflussung und/oder Verhinderung der Epileptogenese als klinisch unwirksam erwiesen (HOLTKAMP u. MEIERKORD 2007; LÖSCHER u. BRANDT 2010). Die größte Hürde der Entwicklung präventiver anti-epileptogener Behandlungsstrategien ist dabei ein fehlendes Verständnis der Epileptogenese zugrundeliegenden Mechanismen (WALKER et al. 2015). In diesem Kontext stellen insbesondere inflammatorische Prozesse, welche infolge einer initialen Schädigung des Gehirns auftreten, Schlüsselkomponenten der Epileptogenese dar (VEZZANI et al. 2013b). Neben der gezielten Erforschung ausgewählter Strukturen und Signalwege haben unter anderem Genom- und Transkriptomstudien zu unserem heutigen Verständnis der epileptogenese-assoziierten molekularen Veränderungen beigetragen (CACHEAUX et al. 2009; OKAMOTO et al. 2010; WANG et al. 2014). Der Transfer der Ergebnisse aus diesen Studien in zelluläre Funktionen ist allerdings mit Einschränkungen verbunden. Zelluläre Funktionen sind im Wesentlichen auf das Expressionsmuster und die Interaktionen von Proteinen zurückzuführen. Prä- und posttranskriptionale Protein-Modifikationen erschweren allerdings die Interpretation von Genexpressionsstudien auf Proteinebene (DE SOUSA ABREU et al. 2009; LANGLEY et al. 2013). In diesem Kontext könnten differentielle Proteomanalysen wesentlich zu unserem Verständnis der ursächlichen Proteine und damit molekularen Mechanismen der Epileptogenese beitragen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die molekularen und im Besonderen die inflammations-assoziierten Mechanismen der Epileptogenese mittels einer differentiellen Proteomanalyse an einem Tiermodell der TLE erforscht. Zudem sollte die Studie eine Grundlage liefern, potentielle Biomarker für molekulare Bildgebungsverfahren und mögliche Zielstrukturen für die Prävention und Therapie der Epileptogenese zu identifizieren.

Umfassende Proteomstudie zur Untersuchung molekularer Mechanismen in den Gehirnregionen HC und PHC während dem Prozess der Epileptogenese

Im vorliegenden Dissertationsvorhaben wurde Gehirngewebe von Ratten in der Post-Insult-Phase, Latenzphase sowie der chronischen Phase mit spontanen wiederkehrenden Anfällen mittels markierungsfreier LC-MS/MS analysiert. Bisherige Proteom-Studien erfolgten größtenteils an humanem Gewebe, um die Pathomechanismen der TLE zu erforschen (EUN et al. 2004; YANG et al. 2005; XIAO et al. 2009; MERIAUX et al. 2014). Die Analyse humaner Gewebeproben ist allerdings mit den Nachteilen verbunden, dass epileptogenese-assoziierte Veränderungen zum Zeitpunkt der Analyse bereits größtenteils abgeschlossen sind und adäquates Kontrollgewebe fehlt. Zudem führt die Untersuchung von humanem *Post-mortem*-Gewebe zu einem großen Datenverlust, da viele Proteine zum Zeitpunkt der Analyse bereits abgebaut wurden.

Um die molekularen Mechanismen der Epileptogenese zu untersuchen, ist es essentiell Veränderungen zu analysieren, welche nach initialem Insult und vor der Manifestation von Epilepsie auftreten (RAOL u. BROOKS-KAYAL 2012). In der Studie von LIU et al. (2008) wurde *hippocampales* Gehirngewebe von Ratten 12 und 72 Stunden nach Pilocarpin-induziertem SE analysiert. Es erfolgten jedoch keine Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten der Epileptogenese. Da epileptogenetische Veränderungen allerdings auch nach dem Auftreten der ersten Anfälle fortschreiten (PITKÄNEN u. SUTULA 2002; PITKÄNEN u. LUKASIUK 2009) ist es wichtig, neben der Früh- und Latenzphase der Epileptogenese auch den Zeitpunkt der Epilepsie-Manifestation zu erfassen. Weiterhin zählt neben dem HC unter anderem der PHC zu den pathologisch betroffenen Gehirnstrukturen bei der TLE (CHANG u. LOWENSTEIN 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden daher HC und PHC in der Post-Insult-Phase, Latenzphase und chronischen Phase analysiert. Nach meinem aktuellen Wissensstand wurde bisher noch keine vergleichbare Zeitverlaufsstudie durchgeführt, um Epileptogenese-assoziierte Veränderungen in unterschiedlichen Gehirnregionen zu untersuchen.

Unterschiedliche Proteinprofile von SE- und Kontrolltieren bestätigen komplexe molekulare Veränderungen im Zeitverlauf der Epileptogenese

Im Rahmen der massenspektrometrischen Protein-Identifikation wurde als initiales Einschlusskriterium eine Quantifizierung mit mindestens zwei Peptiden gewählt. Dieses Kriterium eignet sich, um die Reliabilität der Proteinidentifikation zu erhöhen (HERRMANN et al. 2013). Dies begründet sich darin, dass ein einzelnes Peptid in verschiedenen Proteinen und Protein-Isoformen gefunden werden kann, wodurch die Wahrscheinlichkeit der korrekten

Identifikation eines bestimmten Proteins vermindert wird (MALLICK u. KUSTER 2010; HERRMANN et al. 2013). Weitet man das Einschlusskriterium auf die Quantifizierung mit drei oder mehr Peptiden aus, wird hierdurch die Anzahl der Proteine auf die Hälfte der ursprünglich mit einem Peptid identifizierten Proteine reduziert (HERRMANN et al. 2013). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das gewählte Einschlusskriterium (Quantifizierung mit zwei Peptiden) geeignet ist, um die Reliabilität der Proteinidentifikation bei verhältnismäßig geringem Datenverlust ausreichend zu erhöhen.

In Folge der massenspektrometrischen Analyse und Proteinidentifikation wurden die Abundanzen der identifizierten Proteine von SE- und Kontrolltieren mittels *Principal Component*-Analyse untersucht. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sich die Proteinprofile von SE- und Kontrolltieren zu den drei analysierten Zeitpunkten der Epileptogenese in beiden Gehirnregionen deutlich unterscheiden. Die *Principal Component*-Analyse ermöglicht eine explorative Erforschung komplexer Datensätze durch Dimensionalitätsreduktion multivariater Daten unter Beibehaltung des größtmöglichen Informationsgehaltes (JOLLIFFE 2002; JACKSON 2003; IVOSEV et al. 2008). Diese Form der Datenanalyse wurde bereits von vielen Autoren verwendet, um multivariate Daten aus Genom-weiten Genexpressionsstudien zu analysieren (ALTER et al. 2000; KHAN et al. 2001; RINGNER 2008; LUKK et al. 2010). Die Studie von LUKK et al. (2010) legt nahe, dass Proben mit ähnlichen physiologischen Eigenschaften vergleichbare globale Gen- bzw. Proteinexpressionsprofile aufweisen und folglich in den Graphen der *Principal Component*-Analyse Gruppen bilden (ZHENG-BRADLEY et al. 2010). Demnach ist die fehlende Trennung der Proteinprofile von SE- und Kontrolltieren im HC acht Wochen nach SE vermutlich auf zu geringe Proteinexpressionsunterschiede zwischen den Tiergruppen zurückzuführen. Die im Vergleich zu den Kontrolltieren größere Varianz der SE-Tiere in den verschiedenen Phasen der Epileptogenese reflektiert größere interindividuelle Unterschiede in der Proteinexpression. Die Ergebnisse der *Principal Component*-Analyse tragen zur Validierung der Methodik bei indem gezeigt werden konnte, dass zwischen initialem Insult und dem Auftreten erster Anfälle komplexe molekulare Veränderungen stattfinden (ENGEL u. PEDLEY 2007; GOLDBERG u. COULTER 2013). Weiterhin deuten die Proteinprofile der SE- und Kontrolltiere drauf hin, dass in der chronischen Phase molekulare Veränderungen vorwiegend im PHC auftreten (deutliche Trennung der Proteinprofile von SE- und Kontrolltieren acht Wochen nach SE). Diese Ergebnisse sind jedoch mit Vorsicht zu werten, da „extreme“ Werte und geringer Stichprobenumfang die *Principal Component*-Analyse beeinflussen können.

Während der Epileptogenese finden im HC und PHC verschiedene Prozesse statt, in die unterschiedliche Proteine involviert sind

Im vorliegenden Projekt wurden die differentiell exprimierten Proteine anhand der Parameter „p-Wert“ (Ergebnis der ANOVA) und „fold change“ definiert. Der *fold change*, ein Maß für die Veränderung von Protein-Abundanzen (hier zwischen der SE- und Kontrollgruppe), stellt ein Kriterium zur Definition der differentiell exprimierter Proteine dar (HERRMANN et al. 2013). In der Literatur werden häufig *fold changes* zwischen 1,3 und 2,0 verwendet (UNWIN et al. 2005; MANN 2006; LUNDGREN et al. 2010). Im vorliegenden Projekt wurde ein *fold change* von 1,5 gewählt, um neben dem statistischen auch ein biologisches Signifikanzniveau zu bestimmen. Dies macht deutlich, dass eine einheitliche Standardisierung bezüglich des *fold change* noch nicht gegeben ist.

Die Ergebnisse unserer und anderer wissenschaftlicher Arbeiten sind im Wesentlichen abhängig von dem analytischen Verfahren der Proteinidentifikation, den durchgeführten statistischen Tests und den gewählten Kriterien zur Definition der differentiell exprimierten Proteine. Nur wenn diese Kriterien übereinstimmen, ist eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Studien möglich.

Die Anwendung zusätzlicher herkömmlicher Verfahren (zum Beispiel die Immunhistochemie) ermöglicht es, in diesem Zusammenhang, sowohl die angewendete Methodik als auch einzelne Ergebnisse zu validieren (LIU et al. 2008; HAUCK et al. 2012; KUMAR et al. 2012) und erlaubt somit eine indirekte Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien.

Durch die differentielle Proteomanalyse ließen sich im PHC zu jeder Phase der Epileptogenese mehr regulierte Proteine nachweisen als im HC. Im vorliegenden Projekt umfasste der PHC die *perirhinalen*, *entorhinalen* und *posterior-piriformen Cortices*. Über die *rhinalen Cortices* steht der HC im Informationsaustausch mit dem *Neocortex* (VAN HOESEN 1982; NABER et al. 1999; KEALY u. COMMINS 2011). Dabei kommt dem *entorhinalen Cortex* eine besondere Bedeutung zu. Dieser stellt den Hauptein- und ausgang für Informationen dar, die im HC verarbeitet werden (KANDEL et al. 2000). Informationen, die über *hippocampal*-assoziierte *Cortices* zum HC weitergeleitet werden und solche, die vom HC ausgehen, konvergieren im *entorhinalen Cortex* (KANDEL et al. 2000). Weiterhin konnte durch diverse Studien gezeigt werden, dass der *entorhinal cortex* maßgeblich an Anfallsentladungen des HC beteiligt ist (REN et al. 2014; SHI et al. 2014; VISMER et al. 2015). Bezugnehmend auf den *perirhinalen Cortex* wiesen BUMANGLAG u. SLOVITER (2008) in ihrer Epileptogenese-Studie im elektrischen SE-Modell eine erhebliche Schädigung in dieser Gehirnregion nach. BOLKVADZE et al. (2006) untersuchten im Kindling-Modell die zelluläre Zusammensetzung

verschiedener Schichten der *anterioren*, zentralen und *posterioren piriformen Cortices*. Einhergehend mit den Ergebnissen anderer Studien zeigten BOLKVADZE et al. (2006) eine deutliche Beteiligung des *piriformen Cortex* am kindling-induzierten Prozess der Epileptogenese (LÖSCHER u. EBERT 1996; GROOMS u. JONES 1997; KELLY et al. 2002). Die große Anzahl der regulierten Proteine im PHC während dem Prozess der Epileptogenese könnte auf die massive Veränderung unterschiedlicher Mechanismen in den verschiedenen *Cortices* zurückzuführen sein. Weiterhin impliziert der quantitative Unterschied regulierter Proteine zwischen HC und PHC, dass im PHC stärkere molekulare Veränderungen auftreten als im HC. In Anbetracht der deutlichen molekularen Veränderungen im PHC während dem Prozess der Epileptogenese, sollten diese Gehirnregion und andere HC-assoziierte Gehirnstrukturen in weiteren Analysen genauer untersucht werden.

Im Rahmen der Epileptogenese ist die Mehrzahl der regulierten Proteine an metabolischen sowie zellulären Prozessen beteiligt und erfüllt strukturmolekulare, katalytische sowie adhäsive Funktionen

Um eine Übersicht der quantitativen Beteiligung an biologischen Prozessen und molekularen Funktionen zu erhalten, wurden die differentiell exprimierten Proteine nach den entsprechenden *Gene Ontology*-Kriterien klassifiziert. In diesem Kontext zeigte sich bei allen Prozessen und molekularen Funktionen in beiden Gehirnregionen ein progressiver Verlauf während der Epileptogenese mit Rückgang zum Zeitpunkt der Epilepsie-Manifestation. Dies ist insofern interessant, da in der Post-Insult-Phase aufgrund ausgeprägter Neurodegeneration (SCHWOB et al. 1980; NEVANDER et al. 1985; DU et al. 1995; GORTER et al. 2003), eine stärkere Regulation der einzelnen Kategorien zu erwarten gewesen wäre. Des Weiteren wiesen OKAMOTO et al. (2010) in ihrer Transkriptom-Studie im Pilocarpin-Modell die prominentesten molekularen Veränderungen in der Frühphase der Epileptogenese (drei Tage nach SE) nach. Die Ergebnisse unserer Studie deuten darauf hin, dass in beiden Gehirnregionen die größten molekularen Veränderungen auf Proteinebene erst in der Latenzphase auftreten. Die Mehrheit der differentiell exprimierten Proteine in HC und PHC konnte den Prozessen *Metabolic process* und *Cellular process* zugewiesen werden. Letztgenannter Prozess wird durch das GENE ONTOLOGY CONSORTIUM (2015) als „jedweder Prozess der auf zellulärem Level stattfindet, aber nicht unbedingt auf eine Zelle beschränkt sein muss“ definiert. Im Hinblick auf molekulare Funktionen ließ sich die Mehrzahl der differentiell exprimierten Proteine beider Gehirnregionen den funktionellen Gruppen *Structural molecule activity*, *Catalytic activity* und *Binding* zuordnen. In der Metaanalyse von ARONICA u. GORTER

(2007) wurden die biologischen Prozesse aus verschiedenen Genexpressionsstudien humarer und experimenteller TLE miteinander verglichen. ARONICA u. GORTER (2007) zeigten, dass *Glial activation, Immune response, Ion transport, Synaptic transmission, Signal transduction* und *Synaptic plasticity* zu den am häufigsten identifizierten biologischen Prozessen bei TLE gehören. Die letztgenannten drei Gruppen entsprechen in Übereinstimmung mit der Dissertationsstudie zellulären Prozessen im Rahmen zellulärer Interaktion (*Binding*) und molekularer Plastizität (*Structural molecule activity*). In der Studie von OKAMOTO et al. (2010) wurden biologische Prozesse im Zeitverlauf der Epileptogenese (drei Tage und sieben Tage nach Pilocarpin-induziertem SE, sowie unmittelbar nach dem Auftreten erster Anfälle) analysiert. Hierbei zeigte sich, in Übereinstimmung mit der Klassifizierung unserer Studie, zu allen untersuchten Zeitpunkten eine Überrepräsentation zellulärer Prozesse. Diese waren bestimmt durch strukturmolekulare Aktivität sowie zelluläre Interaktionen. Demgegenüber konnte in der Studie von OKAMOTO et al. (2010) keine vergleichbare Klassifizierung in der Kategorie *Metabolic process* dargestellt werden. Die Ergebnisse der Klassifizierung deuten darauf hin, dass möglicherweise durch Reparatur- und Umstrukturierungsprozesse bedingte Veränderungen die Post-Insult-Phase und Latenzphase im HC sowie darüber hinaus die chronische Phase im PHC dominieren. Hierbei ist zu bedenken, dass der Klassifizierung kein statistischer Test zugrunde liegt und diese somit nur Rückschlüsse über die Quantität der biologischen Prozesse und molekularen Funktionen zulässt. Neben den beschriebenen Übereinstimmungen weichen die einzelnen Studien zum Teil erheblich in ihren Ergebnissen voneinander ab. Dies ist zum einen auf die Benutzung unterschiedlicher Programme und Analyse-Plattformen zurückzuführen, zum anderen hat die Verwendung verschiedener Tiermodelle oder von Patientengewebe Einfluss auf die Ergebnisse. Weiterhin handelt es sich bei den verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten größtenteils um *Microarray*-Studien, deren Ergebnisse auf Genexpressions- und nicht auf Proteinexpressionsanalysen beruhen.

Die Pathway-Enrichment-Analysen lieferten Informationen über signifikant veränderte molekulare Mechanismen während der Epileptogenese und deuteten auf eine wesentliche Rolle immun- und inflammations-assozierter Prozesse hin

Pathway-Enrichment-Analysen ermöglichen die Identifikation veränderter Mechanismen im Kontext biologischer Fragestellungen basierend auf dem funktionellen Zusammenhang von Proteinen. Bisherige *Pathway*-Analysen zur Identifikation epileptogenese-assozierter molekularer Mechanismen beruhten größtenteils auf Genexpressions- und Transkriptomstudien (GORTER et al. 2006; LUKASIUK et al. 2006; CACHEAUX et al. 2009). Neben bereits

beschriebenen Prozessen und Signalwegen lieferten die *Pathway*-Analysen unserer Studie neue und detaillierte Informationen zu regulierten Prozessen auf Proteinebene und in unterschiedlichen Gehirnregionen.

Unter den *Top Ten* der regulierten *Pathways* in der Post-Insult-Phase dominierten im HC neurodegenerative Prozesse. Dies stimmt mit anderen Studien überein, die gezeigt haben, dass die größte Neurodegeneration im HC unmittelbar infolge von Anfällen auftritt (SCHWOB et al. 1980; NEVANDER et al. 1985; DU et al. 1995; GORTER et al. 2003). In geringerem Ausmaß konnte Neurodegeneration auch im PHC bei Tieren mit spontanen Anfällen dargestellt werden. Da in Folge des SE eine zum HC vergleichbare Regulation entsprechender Prozesse im PHC nicht nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass Neurodegeneration in der Post-Insult-Phase vorwiegend im HC stattfindet.

In beiden Gehirnregionen war die Latenzphase geprägt durch Prozesse der molekularen und zellulären Plastizität. Unter diesen zeigte der *Rho cell motility signaling-Pathway*, welcher eine bedeutende Rolle beim Neuritenwachstum spielt (NIKOLIC 2002), ein signifikantes *Enrichment*. Die Ergebnisse tragen zur Validierung der Methodik bei, da erneut gezeigt werden konnte, dass molekulare Veränderungen während der Latenzphase stattfinden, die zu der Bildung eines iktogenen Netzwerkes führen können (GOLDBERG u. COULTER 2013).

In der Latenzphase und chronischen Phase konnte eine deutliche Regulation integrin-assozierter Prozesse unter den *Top Ten* der regulierten *Pathways* in HC und PHC nachgewiesen werden. Diverse Studien deuten auf eine funktionelle Korrelation zwischen der Lokalisation von Integrinen im HC und ihrer Rolle bei neuronalen epileptiformen Aktivitäten hin (CHANG et al. 1993; GROOMS u. JONES 1997). Die Integrin-Expression ist am stärksten in glutamatergen Neuronen und gering in GABAergen Neuronen sowie Glia-Zellen (GALL u. LYNCH 2004). Darüber hinaus konzentriert sich die Expression von Integrinen auf bestimmte Areale, wie beispielsweise die synaptische Membran (GALL u. LYNCH 2004). Die ausgeprägte Regulation integrin-assozierter Prozesse, die in der Dissertationsstudie dargestellt werden konnte, unterstützt die Hypothese, dass Integrine am Prozess der Epileptogenese beteiligt sind (WU u. REDDY 2012).

Bei Tieren mit spontanen Anfällen wurden im PHC sowohl proliferative als auch neurodegenerative Prozesse nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten fortgesetzte molekulare Veränderungen im PHC darstellen, die von anfalls-assoziierten neurodegenerativen Prozessen begleitet werden. Unter den *Top Ten* der regulierten *Pathways* im PHC konnte mitunter eine Regulation des *Matrix metalloproteinase-Pathways* gezeigt werden. Matrix-Metalloproteasen spielen eine wichtige Rolle bei der Umstrukturierung der

perizellulären Umgebung, indem sie extrazelluläre Matrixproteine spalten (YONG et al. 2001). Bei Patienten mit akuter Enzephalopathie und Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke konnten hohe Serum-Level von Matrix-Metalloprotease-9 mit prolongierten Anfällen in Verbindung gebracht werden (SUENAGA et al. 2008). Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass die synaptische Konzentration von Matrix-Metalloprotease-9 einen kritischen Faktor für die Entwicklung von Anfällen darstellt (WILCZYNSKI et al. 2008; MIZOGUCHI et al. 2011). Die Regulation des *Matrix metalloproteinase-Pathways* in unserer Studie impliziert eine Bedeutung von Matrix-Metalloproteasen-assoziierten Proteinen in der chronischen Phase.

Analog zu der Studie von GORTER et al. (2006) und den Ergebnissen der Metaanalyse von ARONICA u. GORTER (2007) deuteten sowohl die *Top Ten* der regulierten *Pathways* als auch die spezifische *Pathway-Enrichment*-Analyse der vorliegenden Dissertationsstudie auf eine ausgeprägte Regulation immun- und inflammations-assozierter Prozesse zu den drei untersuchten Zeitpunkten hin. Die Daten bestätigen eine frühe Induktion inflammatorischer Signalwege mit anhaltender Regulation während der Latenzphase. Bei Tieren mit spontanen Anfällen zeigte sich im Vergleich zum HC ein stärkeres *Enrichment* immun- und inflammations-assozierter Prozesse im PHC. In Anbetracht der Vielzahl regulierter *Pathways* wird im Folgenden nur auf ausgewählte immunologische und inflammatorische Prozesse eingegangen: Signaltransduktion durch TGF beta, TLR-vermittelte Signalwege, leukozytäre transendotheliale Migration und die Synthese und Regulation von Prostaglandinen.

In Folge einer epileptogenen Gehirnverletzung können Störungen der Blut-Hirn-Schranke und Albumin-(Alb)-Extravasation zu einer Aktivierung der TGF beta-Signaltransduktion in Gliazellen führen und somit lokale Entzündungsreaktionen verursachen (IVENS et al. 2007; CACHEAUX et al. 2009; FRIEDMAN et al. 2009; HEINEMANN et al. 2012; VEZZANI et al. 2013b). Durch die kombinierte *Pathway-Enrichment*-Analyse konnte eine Regulation des *TGF beta-Pathways* im PHC in der Frühphase der Epileptogenese dargestellt werden. Ein vergleichbares *Enrichment* konnte zu diesem Zeitpunkt im HC nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass Störungen der Blut-Hirn-Schranke mit nachfolgender Alb-Extravasation und Induktion der Signalvermittlung durch TGF beta im Rahmen der Epileptogenese gewebespezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt sind.

Aktuelle Studien zeigten, dass den TLRs im Kontext inflammatorischer Mechanismen, die mit Epilepsie assoziiert sind, eine große Bedeutung zukommt (MAROSO et al. 2010; VEZZANI et al. 2011a; WALKER u. SILLS 2012; VEZZANI et al. 2013b). In diesem Kontext bestätigt die in unserer Studie nachgewiesene Regulation TLR-assozierter Proteine und nachgeschalteter Signalwege in der Post-Insult-Phase und Latenzphase eine Beteiligung von TLRs an der

Iktogenese und Epileptogenese (MAROSO et al. 2010; VEZZANI et al. 2013b). Darüber hinaus implizieren die *Pathways Myeloid differentiation primary response gene (88)*, *TNF alpha/NF- κ B* und *Interleukin 1, Interleukin 1 receptor* sowie *Signal transduction through il1r* eine rasche Induktion des Myd88-abhängigen TLR-Signalweges in Folge eines epileptogenen Insults.

Neben den TLRs scheint die transendotheliale Leukozytenmigration eine bedeutende Rolle bei der Iktogenese und Epileptogenese zu spielen (SOTGIU et al. 2010; FABENE et al. 2013). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde ein signifikantes *Enrichment* des *Leukocyte transendothelial migration-Pathways* im PHC nach epileptogenem Insult und im HC in der Latenzphase nachgewiesen. Darüber hinaus zeigte sich eine Regulation assoziierter Signalwege im PHC zehn Tage nach SE. Die verzögerte Regulation im HC könnte darauf hindeuten, dass in den untersuchten Gehirnregionen während der Epileptogenese unterschiedliche Mechanismen der transendothelialen Leukozytenmigration eine Rolle spielen. Auf der anderen Seite könnte die verzögerte Regulation der transendothelialen Leukozytenmigration im HC auf einen zum PHC unterschiedlichen Zeitverlauf zurückzuführen sein.

Bei exzessiven inflammatorischen Prozessen nach epileptogenem Insult und im epileptischen Gehirn scheint unter anderem das Enzym Cyclooxygenase-2 eine bedeutende Rolle einzunehmen (GORTER et al. 2006; ROJAS et al. 2014). Des Weiteren zeigten TU u. BAZAN (2003) eine Aufregulation des Proteins Phospholipase A2 im Kindling-Modell. In diesem Kontext konnte in der vorliegenden Dissertationsstudie zehn Tage nach SE in beiden Gehirnregionen eine Regulation des *Prostaglandin Synthesis and Regulation-Pathways* sowie ein signifikantes *Enrichment* des *Phospholipase A2-Pathways* im HC dargestellt werden. In der chronischen Phase der Epileptogenese ließ sich der *Prostaglandin Synthesis and Regulation-Pathway* nur im PHC darstellen. Auf der einen Seite könnten die Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Cyclooxygenase-2 induzierte Prostaglandin-Synthese nicht nur traumatisch bedingt und anfalls-assoziiert auftritt, sondern auch eine Rolle bei der Epileptogenese spielt. Andererseits könnte die Aufregulation von Annexin A1 (Anxa1) durch Hemmung der Phospholipase A2 (LIU et al. 2007) in der Latenzphase protektive Funktionen erfüllen und damit zu einer Reduktion der Cyclooxygenase-2-Aktivität im epileptischen Gehirn beitragen.

Expressionsmuster differentiell exprimierter TLR-assoziierter Proteine im Zeitverlauf der Epileptogenese

Die funktionelle Datenanalyse deutete auf eine Regulation TLR-assoziierter Proteine hin, die in der Lage sind, die TLR-abhängige Signalvermittlung zu beeinflussen und zu modulieren. Eine gesteigerte Signaltransduktion der TLRs, insbesondere von TLR4, wird als

Schlüsselkomponente der inflammatorischen Antwort nach epileptogenem Insult und im epileptischen Gehirn angesehen (MAROSO et al. 2010; FALIP et al. 2013; VEZZANI et al. 2013b). In diesem Kontext fokussierten bisherige Epilepsie- und Epileptogenese-Studien größtenteils auf TLR4-assoziierte Proteine, darunter *Myeloid-Related Protein 8*, *Interleukin-1 type 1 receptor*, *Il1 β* und im Besonderen *Hmgb1* (MAROSO et al. 2010; MAROSO et al. 2011; WALKER u. SILLS 2012; GAN et al. 2014). Detaillierte Analysen zum Expressionsmuster TLR-assozierter Proteine wurden bislang noch nicht durchgeführt. Die vorliegende Studie liefert in diesem Zusammenhang bedeutende Informationen über die chronologische Regulation von Proteinen, die in die TLR-abhängige Signalvermittlung involviert sind.

Das Protein *Rps27a* spielt eine Rolle bei den MyD88-abhängigen und –unabhängigen TLR-Signalwegen (Reactome, MILACIC et al. 2012; CROFT et al. 2014). Die Rekrutierung von Myd88 durch TLRs löst nachgeschaltete Signalwege aus, die zu der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führen (AKIRA et al. 2006). Demzufolge könnten die signifikant erhöhten Expressionsraten von *Rps27a* im PHC mit einer gesteigerten Signalvermittlung durch TLRs in der Früh- und Spätphase der Epileptogenese zusammenhängen. Die Dynamine *Dnm1*, -2 und -3 gehören zur Familie der Dynamin GTPasen. Sie sind in der Lage, die Expression verschiedener TLRs an der Zelloberfläche zu regulieren (BARTON u. KAGAN 2009). HUSEBYE et al. (2006) beschrieben in ihrer Studie, dass eine Hemmung von Dynamin die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung über TLR4 deutlich erhöht. Darüber hinaus zeigten KAGAN et al. (2008), dass eine Internalisierung von TLR4 durch Dynamin nicht nur den TLR4-Signalweg herunterreguliert, sondern auch zu einer Aktivierung des TRIF-related adaptor molecule (TRAM)-TRIF-Signalweges und Induzierung von *Type I interferon* führt. Das in unserer Studie nachgewiesene unterschiedliche Expressionsmuster der Dynamine in HC und PHC scheint demnach mit einer komplexen Regulation und Feinregulation der TLRs sowie assoziierter Signalwege zusammenzuhängen. Ferner deutet das Expressionsmuster der Dynamin-Isoformen und im Besonderen der *Dnm1*-Transkripte auf eine spezifische Regulation von Transportmechanismen innerhalb bestimmter Zellkompartimente hin (URRUTIA et al. 1997; ALTSCHULER et al. 1998). In Anbetracht der komplexen Auf- und Herunterregulation der Dynamin-Isoformen in beiden Gehirnregionen zu verschiedenen Zeitpunkten der Epileptogenese scheint es von besonderem Interesse zu sein, die Auswirkungen des intrazellulären Transports und der oberflächlichen Expression von TLRs in weiteren Studien genauer zu untersuchen.

Im Kontext des intrazellulären TLR-Transports konnte im HC in der Post-Insult-Phase eine Überexpression des Proteins *Tmed7* dargestellt werden. *Tmed7* reguliert unter anderem den

zellulären Proteintransport von TLR4 zur Membranoberfläche (LIAUNARDY-JOPEACE u. GAY 2014). Demnach könnte die rasche Aufregulation von Tmed7 die TLR-vermittelte *hippocampale* Signaltransduktion nach epileptogenem Insult begünstigen.

Die Integrine Itgb2 und Itgam stellen Zelltyp spezifische Modulatoren der TLR-abhängigen Signalvermittlung dar (YEE u. HAMERMAN 2013; LING et al. 2014). Itgam ist in der Lage, den zellulären Transport sowie die Signalvermittlung von TLR4 zu modulieren (LING et al. 2014). Demgegenüber konnte in der Studie von YEE u. HAMERMAN (2013) gezeigt werden, dass Itgb2 als negativer Regulator der TLR-Signalvermittlung fungiert, indem es den NF-κB-Signalweg hemmt. Gleichzeitig aktiviert und fördert Itgb2 die inflammatorische Signalkaskade von *P38 mitogen-activated protein kinases* (YEE u. HAMERMAN 2013). Die Überexpression dieser Integrine in beiden Gehirnregionen unterstreicht die Bedeutung TLR-assozierter Transportmechanismen sowie der Feinregulation inflammatorischer Signalwege in der Post-Insult-Phase und Latenzphase.

Die Proteine Wdr34, Tollip und Usp7 hemmen als negative Regulatorproteine die TLR-vermittelte Aktivierung von NF-κB (DIDIERLAURENT et al. 2006; GAO et al. 2009; COLLERAN et al. 2013). Die Überexpression dieser Proteine in der vorliegenden Studie könnte auf zelleigene Gegenregulationsmechanismen zurückzuführen sein, die einer exzessiven Signaltransduktion durch TLRs entgegenwirken. In diesem Zusammenhang dient die Aufregulation von Tollip im HC und Wdr34 im PHC zwei Tage nach SE möglicherweise dem zellulären Schutz vor zusätzlicher Schädigung durch inflammatorische Prozesse nach epileptogenem Insult. Im Gegensatz zu der Überrepräsentation von Usp7 im HC zehn Tage nach SE, zeigte sich im PHC zwei und zehn Tage nach SE eine Herunterregulation von Usp7 und Tollip. Dies könnte ein Versagen der zellulären Schutzmechanismen im PHC implizieren, wodurch die exzessive Signaltransduktion durch TLRs während dem Prozess der Epileptogenese weiter begünstigt wird.

Zusätzlich zu den exogenen pathogen-assoziierten Molekülen wurden in der Literatur bereits zahlreiche endogene stress- und gewebeschädigungs-assoziierte Moleküle als Liganden der TLRs, insbesondere von TLR4, beschrieben (VABULAS et al. 2002b; PICCININI u. MIDWOOD 2010; PERI u. CALABRESE 2014). In diesem Kontext wird insbesondere die Rolle von Hspa1a wissenschaftlich kontrovers diskutiert. Verschiedene Autoren beschrieben eine agonistische Funktion von Hspa1a auf TLRs mit nachfolgender Freisetzung von Zytokinen (ASEA et al. 2000; ASEA et al. 2002; VABULAS et al. 2002a). Demgegenüber zeigten die Studien anderer Arbeitsgruppen eine antagonistische Rolle des Hitzeschockproteins auf die Signalvermittlung durch TLRs (SINGLETON u. WISCHMEYER 2006; FERAT-OSORIO et

al. 2014). Die frühe Induktion und anhaltende Aufregulation von Hspa1a in HC und PHC in der Latenzphase könnte demnach sowohl pro- als auch anti-inflammatoryische Auswirkungen auf die Epileptogenese haben. Demnach sollten zukünftig weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Funktionsmechanismen von Hspa1a im Zusammenhang mit TLR-assozierter Signaltransduktion zu untersuchen. Immunhistochemisch konnte die Überexpression von Hspa1a in der Post-Insult-Phase validiert werden. Allerdings ließen sich zehn Tage nach SE nur vereinzelte Zellen im *Hilus* der *hippocampalen* Formation darstellen. Die Diskrepanz zwischen Proteomanalyse und Immunhistochemie könnte sich in Konformationsänderungen des Hspa1a-Moleküls während der Latenzphase begründen oder auf die geringere Sensitivität der Immunhistochemie im Vergleich zur differentiellen Proteomanalyse zurückzuführen sein. Neben Hspa1a wurde im Rahmen der vorliegenden Studie eine Aufregulation der TLR-Liganden Hsp90b1, Hmgb1 und Tnc zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Epileptogenese nachgewiesen. Die Überexpression dieser Proteine könnte zusätzlich zu einer Aktivierung und Modulation der Signalvermittlung durch TLRs während der Epileptogenese führen. Informationen über die TLR-Liganden sind hinsichtlich der derzeitigen Bemühungen zur Entwicklung therapeutischer Strategien und Identifizierung von Biomarkern, welche die TLR-vermittelte Neuroinflammation widerspiegeln, von besonderer Bedeutung.

Alternative Aktivierung von Mikroglia durch Purinozeptoren. Neue Erkenntnisse zur Regulation von P2ry12 während dem Prozess der Epileptogenese

In Anbetracht der Tatsache, dass das funktionelle Stadium von Glia-Zellen durch Purinozeptoren moduliert werden kann (FARBER u. KETTENMANN 2005; MAGNI u. CERUTI 2014), wurde in unserer Studie das differentielle Expressionsmuster dieser Rezeptoren genauer analysiert. Der metabotrope Purinozeptor P2ry12 spielt eine wichtige Rolle bei der Motilität und Chemotaxis von Mikroglia (HONDA et al. 2001; FARBER u. KETTENMANN 2005; HAYNES et al. 2006). Die Expression von P2ry12 beschränkt sich hauptsächlich auf Mikroglia (SASAKI et al. 2003); allerdings wird diese in Folge einer Mikroglia-Aktivierung extrem reduziert (HAYNES et al. 2006; ORR et al. 2009). Es konnte nachgewiesen werden, dass Mikroglia von P2ry12-defizienten Mäusen nicht in der Lage sind Nukleotide zu polarisieren, diesen entgegen zu migrieren oder Fortsätze auszubilden (HAYNES et al. 2006). Darüber hinaus zeigten EYO et al. (2014) im Kainat-Modell eine Unterdrückung der anfalls-assoziierten Steigerung mikroglialer Fortsätze und verstärkte Anfallsaktivität bei P2ry12-Knockout-Mäusen. Nach aktuellem Wissensstand wurden noch

keine Studien durchgeführt, welche die Regulation von P2ry12 während dem Prozess der Epileptogenese analysiert haben. Durch die differentielle Proteomanalyse konnte eine verzögerte Induktion des Purinozeptors in beiden Gehirnregionen während der Latenzphase nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Rolle von P2ry12 auf die Aktivierung von Mikroglia, könnte die Überexpression des Purinozeptors zu einer weiteren Sensibilisierung der Mikroglia führen und eine Veränderung ihres funktionellen Stadiums in den betroffenen Gehirnregionen während der Epileptogenese bedingen.

Das Protein P2rx7 stellt einen weiteren Purinozeptor dar, der bei Mikroglia die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α , IL-1 β , Superoxid und NO induzieren kann (HIDE et al. 2000; GENDRON et al. 2003; PARVATHENANI et al. 2003). Eine epilepsie-assoziierte Regulation von P2rx7 wurde bereits in mehreren Studien im SE-Modell nachgewiesen (HENSHALL et al. 2013). In der vorliegenden Studie konnte eine verzögerte *hippocampale* Induktion von P2rx7 während der Latenzphase dargestellt werden. In Anbetracht jüngster Ergebnisse, die eine Herunterregulation des α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor-(AMPAR)-Transports und post-synaptischer Effizienz durch P2rx-Rezeptoren beschreiben (POUGNET et al. 2014), könnte die Überexpression von P2rx7 weitere Auswirkungen auf die Epileptogenese haben.

Die immunhistochemische Analyse validierte das differentielle Expressionsmuster beider Purinozeptoren im HC und von P2ry12 im PHC in der Latenzphase. Die immunhistochemisch nachweisbare konstitutive Expression von P2rx7 im PHC zehn Tage nach SE sowie von beiden Purinozeptoren in den Gehirnregionen HC und PHC in der Post-Insult-Phase und chronischen Phase, konnte durch die differentielle Proteomanalyse nicht nachvollzogen werden. Mögliche Gründe der fehlenden Proteinidentifikation können methodische Komplikationen sein, wie überlappende Signale ko-eluerter Peptide, reduzierte Messwerte durch zu stark verdünnte Peptide oder Hintergrundrauschen welches durch chemische Einflüsse bedingt sein kann (LEVIN u. BAHN 2010; NEILSON et al. 2011).

Expressionsmuster von Proteinen im Rahmen der transendothelialen Leukozytenmigration während der Epileptogenese

Experimentelle Studien und Patientendaten lieferten Hinweise für eine erhöhte Leukozyteninfiltration in das epileptische Gehirn (FABENE et al. 2008; ZATTONI et al. 2011; FABENE et al. 2013). Die Hypothese einer funktionellen Relevanz der transendothelialen Leukozytenmigration für die Iktogenese und Epileptogenese begründet sich auf Studien an Nager-Modellen und Fallberichte von Patienten, welche die Wirkung einer anti-leukozytären

Adhäsions-Therapie bestätigten (SOTGIU et al. 2010; FABENE et al. 2013).

In der vorliegenden Studie konnte eine Regulation von Proteinen nachgewiesen werden, die eine bedeutende Rolle bei der transendothelialen Leukozytenmigration spielen. Die Daten liefern neue Erkenntnisse zum Expressionsmuster dieser Proteine während dem Prozess der Epileptogenese. Interessanterweise zeigte die Analyse eine Regulation der Proteine Msn, Ezr, Vcl und Actn1, die eine wichtige Rolle bei der Bildung von endothelialen *Docking*-Strukturen spielen (GEIGER et al. 2001; BARREIRO et al. 2002). Diese *Docking*-Strukturen bilden Ringe aus Adhäsionsmolekülen, welche von endothelialen kuppelähnlichen Strukturen umgeben sind und damit die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen ermöglichen (PETRI et al. 2008). Das globale Expressionsmuster der Proteine Msn, Ezr, Vcl und Actn1 zeigte im Rahmen der vorliegenden Studie eine frühe und anhaltende Aufregulation in beiden Gehirnregionen. Eine Ko-Regulation wurde allerdings nur für die Proteine Msn und Actn1 nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass unterschiedliche Mechanismen zu einer gesteigerten Leukozytenadhäsion in HC und PHC führen. Darüber hinaus konnte nur im PHC acht Wochen nach SE eine differentielle Expression von Proteinen nachgewiesen werden, die bei der Bildung von *Docking*-Strukturen an Endothelzellen beteiligt sind. Dies könnte auf eine fortgesetzte Leukozytenmigration im PHC während der chronischen Phase zurückzuführen sein.

Integrine stellen eine der zwei wichtigsten Rezeptor-Familien dar, die bei der Leukozytenadhäsionskaskade beteiligt sind (LEY et al. 2007). Durch die differentielle Proteomanalyse wurde eine deutliche Regulation der Leukozyten-Integrine Itgb1, Itgb2 und Itgam in beiden Gehirnregionen nachgewiesen. Im HC wurde eine verzögerte Aufregulation der Integrine in der Latenzphase beobachtet. Demgegenüber zeigte sich im PHC bereits eine frühe und anhaltende Aufregulation von Itgb1 und -2. Eine Überexpression von Itgb1 konnte in beiden Gehirnregionen auch in der chronischen Phase nachgewiesen werden. Das zeitliche Expressionsmuster der Integrine deutet auf eine progressive Zunahme der Leukozytenmigration in das Gehirnparenchym mit deutlicher Infiltration von Leukozyten zehn Tage nach SE hin. Zumindest teilweise scheint die Migration von Leukozyten auch während der chronischen Phase stattzufinden.

Verletzungen des Gehirns und eine gesteigerte transendothiale Leukozytenmigration können eine Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke verursachen und damit zu einer veränderten Expression von *Tight Junction*-Proteinen führen (MORIN-BRUREAU et al. 2011; KIM et al. 2012; DEVINSKY et al. 2013). In der vorliegenden Studie zeigten die *Tight Junction*-Proteine Jam3, Ctnna1 und Ctnna2 ein gewebe- und zeitspezifisches differentielles Expressionsmuster. Die Regulation dieser *Tight Junction*-Proteine bestätigt die Ergebnisse aus vorangegangenen

Studien zu signifikanten Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke in der Früh- und Latenzphase, welche in unterschiedlichen *Reviews* diskutiert wurden (HEINEMANN et al. 2012; KIM et al. 2012; MARCHI et al. 2012; VAN VLIET et al. 2015). Insbesondere die Aufregulation verschiedener *Tight Junction*-Proteine könnte auf kompensatorische Mechanismen hindeuten, welche in Folge einer Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke nach epileptogenem Insult auftreten. Auf der anderen Seite existieren Hinweise darauf, dass eine Assoziation der α -Catenine mit dem Cadherin-Catenin-Komplex die Voraussetzung für eine effiziente transendotheliale Leukozytenmigration darstellt (VAN BUUL et al. 2009).

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Bei Hund und Katze sowie beim Menschen zählen Epilepsien zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen. Im Hinblick auf eine vollständige Prävention der Epilepsieentstehung (Epileptogenese) haben sich bis heute alle therapeutischen Strategien als klinisch unwirksam erwiesen. Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die der Epileptogenese zugrunde liegen, stellt die Grundvoraussetzung für die Identifizierung von therapeutischen Zielstrukturen und Biomarkern dar. Differentielle Proteomanalysen könnten wesentlich dazu beitragen die komplexen epileptogenese-assoziierten molekularen Veränderungen zu erforschen. Daher wurde in der vorliegenden Dissertationsstudie eine differentielle Proteomanalyse in einem Tiermodell der Epileptogenese durchgeführt. Die Induktion der Epileptogenese erfolgte in einem elektrischen *Post-Status-Epilepticus-(SE)-Modell* bei weiblichen *Sprague-Dawley*-Ratten. *Hippocampales* (HC) und *parahippocampales* (PHC) Gehirngewebe von SE- und Kontrolltieren wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (zwei Tage, zehn Tage und acht Wochen nach SE) entnommen und mittels markierungsfreier Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Die Zeitpunkte reflektieren die Post-Insult-Phase, die Latenzphase und die chronische Phase mit spontanen wiederkehrenden Anfällen. Unter Berücksichtigung der besonderen Rolle inflammatorischer Signalwege im Kontext der Epileptogenese, erfolgte neben der unspezifischen Datenanalyse eine fokussierte Auswertung immun- und inflammations-assozierter Prozesse. Die anschließende immunhistochemische Untersuchung der Gewebe diente sowohl der Validierung der Methodik, als auch der Validierung des differentiellen Expressionsmusters ausgewählter Proteine.

Durch die Studie konnte gezeigt werden, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten im PHC mehr Proteine reguliert waren als im HC. Des Weiteren ließen sich in beiden Gehirnregionen die umfangreichsten molekularen Veränderungen in der Latenzphase nachweisen. Durch die *Pathway-Enrichment*-Analyse konnte im HC während der Post-Insult-Phase eine ausgeprägte Neurodegeneration dargestellt werden. Weiterhin zeigte sich in beiden Gehirnregionen eine Regulation Integrin-assozierter Prozesse während der Latenzphase und der chronischen Phase. Ein signifikantes Enrichment neurodegenerativer und proliferativer Signalwege ließ sich im PHC acht Wochen nach SE darstellen. Im Hinblick auf immun- und inflammations-assoziierte Prozesse konnte eine Überrepräsentation entsprechender *Pathways* während der Post-Insult-Phase und der Latenzphase nachgewiesen werden. Die regulierten *Pathways* umfassten unter anderem Toll-like-Rezeptor-(TLR)-vermittelte Signalwege, Synthese und Regulation von Prostaglandinen, leukozytäre transendotheliale Migration und die Signaltransduktion durch

transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF beta). Die inflammatorische Antwort während der chronischen Phase zeigte im PHC eine stärkere Regulation als im HC.

Im Rahmen der immunhistochemischen Validierung konnte das differentielle Expressionsmuster der Proteine *Heat shock 70 kDa protein* (Hspa1a), *P2Y Purinoceptor 12* (P2ry12) und *P2X Purinoceptor 7* (P2rx7) bestätigt werden, die eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von Mikroglia spielen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern neue Erkenntnisse über die komplexen molekularen Veränderungen der Epileptogenese. Darüber hinaus deuten sie auf eine unterschiedliche Veränderung der molekularen Muster von HC und PHC während dem Zeitverlauf der Epileptogenese hin. Die Daten stellen zudem neue Informationen über das differentielle Expressionsmuster zahlreicher Proteine zur Verfügung, die bei wichtigen inflammatorischen Prozessen und Signalwegen eine Rolle spielen. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Regulation TLR-assozierter Proteine und Purinozeptoren, die zu den essentiellen Modulatoren der inflammatorischen Antwort gezählt werden.

Zusammenfassend trägt die vorliegende Arbeit wesentlich zu unserem Verständnis über die molekularen und im Besonderen die inflammatorischen Mechanismen der Epileptogenese bei. Die Ergebnisse liefern eine umfassende Grundlage für die zukünftige Identifikation und Entwicklung von therapeutischen Zielstrukturen und Biomarkern für molekulare Bildgebungsverfahren.

Die funktionellen Einflüsse einzelner Proteine sollten in zukünftigen Studien (zum Beispiel in *Knock-out*-Maus-Modellen) bestätigt und genauer untersucht werden.

VIII. SUMMARY

Epilepsies are one of the most common chronic neurologic disorders in dogs and cats as well as in humans. Regarding the prevention of the development of epilepsy (epileptogenesis), to date all therapeutic strategies have proved to be clinically ineffective. A better understanding of the basic mechanisms of epileptogenesis is a presupposition for the identification of therapeutic targets and biomarkers. Differential proteome analysis can provide substantial information about the molecular alterations during epileptogenesis. Thus, a differential proteome analysis was performed in an animal model of epileptogenesis. For this purpose, an electrical post-status epilepticus-(SE)-model was used to induce epileptogenesis in female Sprague Dawley rats. Hippocampal (HC) and parahippocampal cortex (PHC) tissue were collected from SE- and control animals at three different time points (two days, ten days and eight weeks after SE). Samples were subjected to label-free liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The time points reflect the early post-insult phase, the latency phase and the chronic phase with spontaneous recurrent seizures. Considering the key role of inflammatory signalling during epileptogenesis, data analysis focused on processes linked with immune and inflammatory responses. Subsequently immunohistochemistry was performed for the validation of the methodology and selected proteins of interest.

The study indicates, that in the PHC more proteins were regulated than in the HC at all three time points. Furthermore the most comprehensive molecular alterations were identified during the latency phase in both brain regions. Pathway enrichment analysis revealed a pronounced neurodegeneration in the HC during the early post-insult phase. In addition, both brain regions showed a regulation of integrin-associated processes during the latency phase and during the chronic phase. Eight weeks post-SE, a significant enrichment of neurodegenerative and proliferative signalling was identified in the PHC. With regard to processes linked with immune and inflammatory responses pathway enrichment analysis revealed an overrepresentation of respective pathways during the post-insult phase and during the latency phase. Among others, these pathways comprised pathways associated with Toll-like receptor-(TLR)-signalling, prostaglandin synthesis and regulation, leukocyte transendothelial migration and signalling of cytokine transforming growth factor beta (TGF beta). During the chronic phase inflammatory signalling in the PHC exceeded that in the HC.

Immunohistochemistry confirmed differential expression of the proteins heat shock 70 kDa protein (Hspa1a), P2Y purinoceptor 12 (P2ry12) and P2X purinoceptor 7 (P2rx7) which play a major role in the activation of microglia.

In summary, the data provide novel information about the complex molecular alterations during

epileptogenesis. The results point to different alterations of molecular patterns of hippocampal and parahippocampal cortex tissue during the time course of epileptogenesis. Moreover, novel information about the differential expression of numerous proteins was shown, which play an important role in major inflammatory signalling events. In this context the regulation of TLR-associated proteins and purinoceptors is of particular importance, since these proteins are crucial modulators of the inflammatory response.

The study contributes significantly to our current understanding of the molecular, and in particular the inflammatory mechanisms during epileptogenesis. The data sets provide a comprehensive basis for the future identification and development of therapeutic targets and of biomarkers for molecular imaging.

The functional impact of individual proteins has to be confirmed in follow-up studies, for instance in knockout mouse models.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

ADLER, D., D. MURDOCH u. OTHERS (2014): rgl: 3D visualization device system (OpenGL), R package version 0.95.1201. <http://CRAN.R-project.org/package=rgl>

AEBERSOLD, R. u. M. MANN (2003): Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207

AKIRA, S., S. UEMATSU u. O. TAKEUCHI (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801

ALOISI, F., F. RIA u. L. ADORINI (2000): Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunology today* 21, 141-147

ALTER, O., P. O. BROWN u. D. BOTSTEIN (2000): Singular value decomposition for genome-wide expression data processing and modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10101-10106

ALTSCHULER, Y., S. M. BARBAS, L. J. TERLECKY, K. TANG, S. HARDY, K. E. MOSTOV u. S. L. SCHMID (1998): Redundant and distinct functions for dynamin-1 and dynamin-2 isoforms. *J Cell Biol* 143, 1871-1881

ANDERSON, N. L. u. N. G. ANDERSON (1998): Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19, 1853-1861

ARONICA, E. u. J. A. GORTER (2007): Gene expression profile in temporal lobe epilepsy. *Neuroscientist* 13, 100-108

ASEA, A., S. K. KRAEFT, E. A. KURT-JONES, M. A. STEVENSON, L. B. CHEN, R. W. FINBERG, G. C. KOO u. S. K. CALDERWOOD (2000): HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 6, 435-442

ASEA, A., M. REHLI, E. KABINGU, J. A. BOCH, O. BARÉ, P. E. AURON, M. A. STEVENSON u. S. K. CALDERWOOD (2002): Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70 role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *Journal of Biological Chemistry* 277, 15028-15034

ASHBURNER, M., C. A. BALL, J. A. BLAKE, D. BOTSTEIN, H. BUTLER, J. M. CHERRY, A. P. DAVIS, K. DOLINSKI, S. S. DWIGHT u. J. T. EPPIG (2000): Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics* 25, 25-29

AUVIN, S. u. N. DUPUIS (2001): Outcome of status epilepticus. What do we learn from animal data? *Epileptic Disorders* 1, 1-1

BARAN, H., M. GRAMER, D. HÖNACK u. W. LÖSCHER (1995): Systemic administration of kainate induces marked increases of endogenous kynurenic acid in various brain regions and

plasma of rats. European journal of pharmacology 286, 167-175

BARREIRO, O., M. YÁÑEZ-MÓ, J. M. SERRADOR, M. C. MONTOYA, M. VICENTE-MANZANARES, R. TEJEDOR, H. FURTHMAYR u. F. SÁNCHEZ-MADRID (2002): Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. The Journal of cell biology 157, 1233-1245

BARTON, G. M. u. J. C. KAGAN (2009): A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. Nature reviews. Immunology 9, 535-542

BAYÉS, A. u. S. G. GRANT (2009): Neuroproteomics: understanding the molecular organization and complexity of the brain. Nature Reviews Neuroscience 10, 635-646

BECHER, B., A. PRAT u. J. P. ANTEL (2000): Brain-immune connection: Immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. Glia 29, 293-304

BECKER, M., J. SCHINDLER u. H. G. NOTHWANG (2006): Neuroproteomics—the tasks lying ahead. Electrophoresis 27, 2819-2829

BERENDT, M., C. H. GULLOV u. M. FREDHOLM (2009): Focal epilepsy in the Belgian shepherd: evidence for simple Mendelian inheritance. J Small Anim Pract 50, 655-661

BERG, A. T., S. F. BERKOVIC, M. J. BRODIE, J. BUCHHALTER, J. H. CROSS, W. VAN EMDE BOAS, J. ENGEL, J. FRENCH, T. A. GLAUSER, G. W. MATHERN, S. L. MOSHE, D. NORDLI, P. PLOUIN u. I. E. SCHEFFER (2010): Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. Epilepsia 51, 676-685

BERTRAM, E. H. (2009): Temporal lobe epilepsy: Where do the seizures really begin? Epilepsy & behavior 14, 32-37

BESSARABOVA, M., A. ISHKIN, L. JEBAILEY, T. NIKOLSKAYA u. Y. NIKOLSKY (2012): Knowledge-based analysis of proteomics data. BMC bioinformatics 13, S13

BLAIR, R. D. (2012): Temporal lobe epilepsy semiology. Epilepsy research and treatment 2012, 751510

BLAKE, J. A. u. M. A. HARRIS (2008): The Gene Ontology (GO) project: structured vocabularies for molecular biology and their application to genome and expression analysis. Current protocols in bioinformatics 7.2.1–7.2.9

BLÜMCKE, I., H. BECK, A. A. LIE u. O. D. WIESTLER (1999): Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsy research 36, 205-223

BOENISCH, T. u. C. HENNE (2003): Antigendemaskierung (Epitop-Retrieval). In: Handbuch Immunchemische Färbemethoden. DakoCytomation Hamburg, 30-33, ISBN 3-00-011868-3

BOGDANOV, B. u. R. D. SMITH (2005): Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up. *Mass Spectrometry Reviews* 24, 168-200

BOLKVADZE, T., N. D. DZHAPARIDZE, M. G. ZHVANIYA, N. T. KOTARIYA u. A. TSITSISHVILI (2006): Cellular composition of the piriform cortex of the rat brain in experimental epilepsy. *Neurosci Behav Physiol* 36, 271-274

BRADFORD, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254

BRANDT, C., M. GLIEN, H. POTSCHEKA, H. VOLK u. W. LÖSCHER (2003): Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats. *Epilepsy research* 55, 83-103

BUMANGLAG, A. V. u. R. S. SLOVITER (2008): Minimal latency to hippocampal epileptogenesis and clinical epilepsy after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in awake rats. *The Journal of comparative neurology* 510, 561-580

CACHEAUX, L. P., S. IVENS, Y. DAVID, A. J. LAKHTER, G. BAR-KLEIN, M. SHAPIRA, U. HEINEMANN, A. FRIEDMAN u. D. KAUFER (2009): Transcriptome profiling reveals TGF-β signaling involvement in epileptogenesis. *The Journal of Neuroscience* 29, 8927-8935

CASAL, M. L., R. M. MUNUVE, M. A. JANIS, P. WERNER u. P. S. HENTHORN (2006): Epilepsy in Irish Wolfhounds. *J Vet Intern Med* 20, 131-135

CASCINO, G. D. (2004): Surgical treatment for epilepsy. *Epilepsy research* 60, 179-186

CAVALHEIRO, E. (1995): The pilocarpine model of epilepsy. *The Italian Journal of Neurological Sciences* 16, 33-37

CHAKRABORTY, S., D. K. KAUSHIK, M. GUPTA u. A. BASU (2010): Inflammasome signaling at the heart of central nervous system pathology. *Journal of neuroscience research* 88, 1615-1631

CHANDLER, K. (2006): Canine epilepsy: what can we learn from human seizure disorders? *The Veterinary Journal* 172, 207-217

CHANG, B. S. u. D. H. LOWENSTEIN (2003): Epilepsy. *The New England journal of medicine* 349, 1257-1266

CHANG, F. L., N. HAWRYLAK u. W. T. GREENOUGH (1993): Astrocytic and synaptic response to kindling in hippocampal subfield CA1. I. Synaptogenesis in response to kindling in vitro. *Brain research* 603, 302-308

CHEN, G. u. B. N. PRAMANIK (2009): Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects. *Drug discovery today* 14, 465-471

CHEN, H. (2014): VennDiagram: Generate high-resolution Venn and Euler plots, R package version 1.6.9. <http://CRAN.R-project.org/package=VennDiagram>

CHIQUET-EHRISMANN, R. u. M. CHIQUET (2003): Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 200, 488-499

CHOI, J. u. S. KOH (2008): Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei medical journal* 49, 1-18

CHOUDHARY, J. u. S. G. GRANT (2004): Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nature neuroscience* 7, 440-445

COLLERAN, A., P. E. COLLINS, C. O'CARROLL, A. AHMED, X. MAO, B. MCMANUS, P. A. KIELY, E. BURSTEIN u. R. J. CARMODY (2013): Deubiquitination of NF-κB by Ubiquitin-Specific Protease-7 promotes transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 618-623

COWAN, L. D. (2002): The epidemiology of the epilepsies in children. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 8, 171-181

CROFT, D., A. F. MUNDO, R. HAW, M. MILACIC, J. WEISER, G. WU, M. CAUDY, P. GARAPATI, M. GILLESPIE, M. R. KAMDAR, B. JASSAL, S. JUPE, L. MATTHEWS, B. MAY, S. PALATNIK, K. ROTHFELS, V. SHAMOVSKY, H. SONG, M. WILLIAMS, E. BIRNEY, H. HERMJAKOB, L. STEIN u. P. D'EUSTACHIO (2014): The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic acids research* 42, D472-477

DE SOUSA ABREU, R., L. O. PENALVA, E. M. MARCOTTE u. C. VOGEL (2009): Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* 5, 1512-1526

DERACINOIS, B., C. FLAHAUT, S. DUBAN-DEWEER u. Y. KARAMANOS (2013): Comparative and Quantitative Global Proteomics Approaches: An Overview. *Proteomes* 1, 180-218

DEVINSKY, O., A. VEZZANI, S. NAJJAR, N. C. DE LANEROLLE u. M. A. ROGAWSKI (2013): Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci* 36, 174-184

DICHTER, M. A. (2009): Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. *Archives of neurology* 66, 443-447

DIDIERLAURENT, A., B. BRISSONI, D. VELIN, N. AEBI, A. TARDIVEL, E. KASLIN, J. C. SIRARD, G. ANGELOV, J. TSCHOPP u. K. BURNS (2006): Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* 26, 735-742

DU, F., T. EID, E. LOTHMAN, C. KOHLER u. R. SCHWARCZ (1995): Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy. *The Journal of neuroscience* 15, 6301-6313

DUDA, R. O. u. P. E. HART (1973): Pattern classification and scene analysis. John Wiley & Sons Inc New York, ISBN 0471223611

DUNCAN, J. S., J. W. SANDER, S. M. SISODIYA u. M. C. WALKER (2006): Adult epilepsy. *Lancet* 367, 1087-1100

EKLUNDH, L. u. A. SINGH (1993): A comparative analysis of standardised and unstandardised principal components analysis in remote sensing. *International Journal of Remote Sensing* 14, 1359-1370

ENGEL, J. (2001): A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 42, 796-803

ENGEL, J., JR. (1992): Experimental animal models of epilepsy: classification and relevance to human epileptic phenomena. *Epilepsy research. Supplement* 8, 9-20

ENGEL, J., JR. (2006): Report of the ILAE classification core group. *Epilepsia* 47, 1558-1568

ENGEL, J., JR. (2011): Biomarkers in epilepsy: introduction. *Biomarkers in medicine* 5, 537-544

ENGEL, J., JR., A. PITKÄNEN, J. A. LOEB, F. E. DUDEK, E. H. BERTRAM, 3RD, A. J. COLE, S. L. MOSHE, S. WIEBE, F. E. JENSEN, I. MODY, A. NEHLIG u. A. VEZZANI (2013): Epilepsy biomarkers. *Epilepsia* 54 Suppl 4, 61-69

ENGEL, J. J. u. T. PEDLEY (2007): Chapter 1 - What is Epilepsy? In: *Epilepsy: A comprehensive textbook*. Lippincott-Raven Philadelphia, ISBN 0-7817-5777-0

EUN, J. P., H. Y. CHOI u. Y. G. KWAK (2004): Proteomic analysis of human cerebral cortex in epileptic patients. *Exp Mol Med* 36, 185-191

EYO, U. B., J. PENG, P. SWIATKOWSKI, A. MUKHERJEE, A. BISPO u. L. J. WU (2014): Neuronal hyperactivity recruits microglial processes via neuronal NMDA receptors and microglial P2Y12 receptors after status epilepticus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 10528-10540

FABENE, P. F., C. LAUDANNA u. G. CONSTANTIN (2013): Leukocyte trafficking mechanisms in epilepsy. *Mol Immunol* 55, 100-104

FABENE, P. F., G. NAVARRO MORA, M. MARTINELLO, B. ROSSI, F. MERIGO, L. OTTOBONI, S. BACH, S. ANGIARI, D. BENATI, A. CHAKIR, L. ZANETTI, F. SCHIO, A. OSCULATI, P. MARZOLA, E. NICOLATO, J. W. HOMEISTER, L. XIA, J. B. LOWE, R. P. MCEVER, F. OSCULATI, A. SBARBATI, E. C. BUTCHER u. G. CONSTANTIN (2008): A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nat Med* 14, 1377-1383

FALIP, M., X. SALAS-PUIG u. C. CARA (2013): Causes of CNS Inflammation and Potential

Targets for Anticonvulsants. CNS drugs 27, 611-623

FARBER, K. u. H. KETTENMANN (2005): Physiology of microglial cells. Brain research. Brain research reviews 48, 133-143

FENN, J. B., M. MANN, C. K. MENG, S. F. WONG u. C. M. WHITEHOUSE (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science (New York, N.Y.) 246, 64-71

FERAT-OSORIO, E., A. SANCHEZ-ANAYA, M. GUTIERREZ-MENDOZA, I. BOSCO-GARATE, I. WONG-BAEZA, R. PASTELIN-PALACIOS, G. PEDRAZA-ALVA, L. C. BONIFAZ, P. CORTES-REYNOSA, E. PEREZ-SALAZAR, L. ARRIAGA-PIZANO, C. LOPEZ-MACIAS, Y. ROSENSTEIN u. A. ISIBASI (2014): Heat shock protein 70 down-regulates the production of toll-like receptor-induced pro-inflammatory cytokines by a heat shock factor-1/constitutive heat shock element-binding factor-dependent mechanism. Journal of inflammation (London, England) 11, 19

FIELD, A., J. MILES u. Z. FIELD (2012): Chapter 3 - The R environment. In: Discovering statistics using R. SAGE Publications London, 62-63, ISBN 1446200469

FISHER, R. S. (1989): Animal models of the epilepsies. Brain Research Reviews 14, 245-278

FISHER, R. S., C. ACEVEDO, A. ARZIMANOGLOU, A. BOGACZ, J. H. CROSS, C. E. ELGER, J. ENGEL, L. FORSGREN, J. A. FRENCH u. M. GLYNN (2014): ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. Epilepsia 55, 475-482

FISHER, R. S., W. VAN EMDE BOAS, W. BLUME, C. ELGER, P. GENTON, P. LEE u. J. ENGEL, JR. (2005): Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). Epilepsia 46, 470-472

FRENCH, J., P. WILLIAMSON, V. THADANI, T. DARCEY, R. MATTSON, S. SPENCER u. D. SPENCER (1993): Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. Annals of neurology 34, 774-780

FRIEDMAN, A., D. KAUFER u. U. HEINEMANN (2009): Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy. Epilepsy research 85, 142-149

FURTAK, S. C., S. M. WEI, K. L. AGSTER u. R. D. BURWELL (2007): Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: the perirhinal and postrhinal cortices. Hippocampus 17, 709-722

GALL, C. M. u. G. LYNCH (2004): Integrins, synaptic plasticity and epileptogenesis. Adv Exp Med Biol 548, 12-33

GAN, N., L. YANG, A. OMRAN, J. PENG, L. WU, F. HE, C. ZHANG, Q. XIANG, H. KONG, Y. MA, M. U. ASHHAB, X. DENG u. F. YIN (2014): Myoloid-related protein 8, an

endogenous ligand of Toll-like receptor 4, is involved in epileptogenesis of mesial temporal lobe epilepsy via activation of the nuclear factor-kappaB pathway in astrocytes. Mol Neurobiol 49, 337-351

GAO, D., R. WANG, B. LI, Y. YANG, Z. ZHAI u. D. Y. CHEN (2009): WDR34 is a novel TAK1-associated suppressor of the IL-1R/TLR3/TLR4-induced NF-kappaB activation pathway. Cell Mol Life Sci 66, 2573-2584

GEIGER, B., A. BERSHADSKY, R. PANKOV u. K. M. YAMADA (2001): Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 793-805

GENDRON, F. P., M. CHALIMONIUK, J. STROSZNAJDER, S. SHEN, F. A. GONZALEZ, G. A. WEISMAN u. G. Y. SUN (2003): P2X7 nucleotide receptor activation enhances IFN gamma-induced type II nitric oxide synthase activity in BV-2 microglial cells. J Neurochem 87, 344-352

GENE ONTOLOGY CONSORTIUM (2015): Gene Ontology Consortium: going forward. Nucleic acids research 43, D1049-1056

GLASS, C. K., K. SAIJO, B. WINNER, M. C. MARCETTO u. F. H. GAGE (2010): Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. Cell 140, 918-934

GLISH, G. L. u. R. W. VACHET (2003): The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. Nature Reviews Drug Discovery 2, 140-150

GODDARD, G. V. (1967): Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. Nature 214, 1020-1021

GOEMAN, J. J. u. P. BÜHLMANN (2007): Analyzing gene expression data in terms of gene sets: methodological issues. Bioinformatics 23, 980-987

GOLDBERG, E. M. u. D. A. COULTER (2013): Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. Nature Reviews Neuroscience 14, 337-349

GOODMAN, J. H. (1998): Experimental models of status epilepticus. Neuropharmacology methods in epilepsy research 1, 95-125

GORTER, J. A., P. M. G. PEREIRA, E. A. VAN VLIET, E. ARONICA, F. H. L. DA SILVA u. P. J. LUCASSEN (2003): Neuronal cell death in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy is induced by the initial status epilepticus and not by later repeated spontaneous seizures. Epilepsia 44, 647-658

GORTER, J. A., E. A. VAN VLIET, E. ARONICA, T. BREIT, H. RAUWERDA, F. H. LOPES DA SILVA u. W. J. WADMAN (2006): Potential new antiepileptogenic targets indicated by microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 26, 11083-11110

GOWERS, W. (1881): Epilepsy and other chronic convulsive diseases: their causes, symptoms, & treatment. Churchill London

GREEN, M. u. P. KARP (2006): The outcomes of pathway database computations depend on pathway ontology. *Nucleic acids research* 34, 3687-3697

GROOMS, S. Y. u. L. S. JONES (1997): RGDS tetrapeptide and hippocampal in vitro kindling in rats: evidence for integrin-mediated physiological stability. *Neurosci Lett* 231, 139-142

GULLOV, C. H., N. TOFT, M. M. BAADSAGER u. M. BERENDT (2011): Epilepsy in the Petit Basset Griffon Vendeen: prevalence, semiology, and clinical phenotype. *J Vet Intern Med* 25, 1372-1378

HADLEY, W. (2009): ggplot2: Elegant graphics for data analysis. Springer New York, ISBN 978-0-387-98140-6

HAN, X., A. ASLANIAN u. J. R. YATES III (2008): Mass spectrometry for proteomics. *Current opinion in chemical biology* 12, 483-490

HANAMSAGAR, R., M. L. HANKE u. T. KIELIAN (2012): Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends in immunology* 33, 333-342

HANKE, M. L. u. T. KIELIAN (2011): Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science* 121, 367-387

HAUCK, S. M., J. DIETTER, R. L. KRAMER, F. HOFMAIER, J. K. ZIPPLIES, B. AMANN, A. FEUCHTINGER, C. A. DEEG u. M. UEFFING (2010): Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* 9, 2292-2305

HAUCK, S. M., F. HOFMAIER, J. DIETTER, M. E. SWADZBA, M. BLINDERT, B. AMANN, J. BEHLER, E. KREMMER, M. UEFFING u. C. A. DEEG (2012): Label-free LC-MSMS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. *Journal of proteomics* 75, 4545-4554

HAYNES, S. E., G. HOLLOPETER, G. YANG, D. KURPIUS, M. E. DAILEY, W.-B. GAN u. D. JULIUS (2006): The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature neuroscience* 9, 1512-1519

HEINEMANN, U., D. KAUFER u. A. FRIEDMAN (2012): Blood-brain barrier dysfunction, TGFbeta signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. *Glia* 60, 1251-1257

HENSHALL, D. C., M. DIAZ-HERNANDEZ, M. T. MIRAS-PORTUGAL u. T. ENGEL (2013): P2X receptors as targets for the treatment of status epilepticus. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 237

HERRMANN, A. G., J. L. SEARCY, T. LE BIHAN, J. MCCULLOCH u. R. F. DEIGHTON

(2013): Total variance should drive data handling strategies in third generation proteomic studies. *Proteomics* 13, 3251-3255

HIDE, I., M. TANAKA, A. INOUE, K. NAKAJIMA, S. KOHSAKA, K. INOUE u. Y. NAKATA (2000): Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem* 75, 965-972

HOLTKAMP, M. u. H. MEIERKORD (2007): Anticonvulsant, antiepileptogenic, and antiictogenic pharmacostategies. *Cellular and molecular life sciences* 64, 2023-2041

HONDA, S., Y. SASAKI, K. OHSAWA, Y. IMAI, Y. NAKAMURA, K. INOUE u. S. KOHSAKA (2001): Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 1975-1982

HUANG DA, W., B. T. SHERMAN u. R. A. LEMPICKI (2009): Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 4, 44-57

HULSMEYER, V., R. ZIMMERMANN, C. BRAUER, C. SAUTER-LOUIS u. A. FISCHER (2010): Epilepsy in Border Collies: clinical manifestation, outcome, and mode of inheritance. *J Vet Intern Med* 24, 171-178

HUNT, D. F., R. A. HENDERSON, J. SHABANOWITZ, K. SAKAGUCHI, H. MICHEL, N. SEVILIR, A. L. COX, E. APPELLA u. V. H. ENGELHARD (1992): Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2. 1 by mass spectrometry. *Science (New York, N.Y.)* 255, 1261-1263

HUNT, D. F., J. R. YATES, J. SHABANOWITZ, S. WINSTON u. C. R. HAUER (1986): Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, 6233-6237

HUSEBYE, H., O. HALAAS, H. STENMARK, G. TUNHEIM, O. SANDANGER, B. BOGEN, A. BRECH, E. LATZ u. T. ESPEVIK (2006): Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J* 25, 683-692

HUSSON, F., J. JOSSE, S. LE u. J. MAZET (2015): FactoMineR: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining, R package version 1.29. <http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR>

ILAE (1989): Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 30, 389-399

IRWIN, S. (1968): Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 13, 222-257

IVENS, S., D. KAUFER, L. P. FLORES, I. BECHMANN, D. ZUMSTEG, O. TOMKINS, E. SEIFFERT, U. HEINEMANN u. A. FRIEDMAN (2007): TGF-beta receptor-mediated

albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain : a journal of neurology* 130, 535-547

IVOSEV, G., L. BURTON u. R. BONNER (2008): Dimensionality reduction and visualization in principal component analysis. *Analytical chemistry* 80, 4933-4944

JACKSON, J. (2003): A user's guide to principal components. John Wiley & Sons Inc New Jersey, ISBN 978-0-471-47134-9

JACOBS, M. P., G. G. LEBLANC, A. BROOKS-KAYAL, F. E. JENSEN, D. H. LOWENSTEIN, J. L. NOEBELS, D. D. SPENCER u. J. W. SWANN (2009): Curing epilepsy: progress and future directions. *Epilepsy & Behavior* 14, 438-445

JAENISCH, R. u. A. BIRD (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* 33, 245-254

JOLLIFFE, I. (2002): Principal component analysis. Springer New York, ISBN 0387954422

JONKERS, B., J. STERK u. F. WOUTERLOOD (1984): Transcardial perfusion fixation of the CNS by means of a compressed-air-driven device. *Journal of neuroscience methods* 12, 141-149

KAARTEENAHO-WIIK, R., E. LAKARI, Y. SOINI, R. POLLANEN, V. L. KINNULA u. P. PAAKKO (2000): Tenascin expression and distribution in pleural inflammatory and fibrotic diseases. *J Histochem Cytochem* 48, 1257-1268

KAGAN, J. C., T. SU, T. HORNG, A. CHOW, S. AKIRA u. R. MEDZHITOY (2008): TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 9, 361-368

KAMBUROV, A., K. PENTCHEV, H. GALICKA, C. WIERLING, H. LEHRACH u. R. HERWIG (2011): ConsensusPathDB: toward a more complete picture of cell biology. *Nucleic acids research* 39, D712-D717

KANDEL, E. R., J. H. SCHWARTZ u. T. M. JESSELL (2000): Chapter 62 - Learning and memory. In: *Principles of neural science*. McGraw-Hill New York, ISBN 0838577016

KANEHISA, M. u. S. GOTO (2000): KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 28, 27-30

KANEHISA, M., S. GOTO, Y. SATO, M. KAWASHIMA, M. FURUMICHI u. M. TANABE (2014): Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic acids research* 42, D199-205

KEALY, J. u. S. COMMINS (2011): The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Prog Neurobiol* 93, 522-548

KEARSLEY-FLEET, L., D. O'NEILL, H. VOLK, D. CHURCH u. D. BRODBELT (2013): Prevalence and risk factors for canine epilepsy of unknown origin in the UK. *Veterinary Record* 172, 338-338

KELLY, M. E., W. A. STAINES u. D. C. MCINTYRE (2002): Secondary generalization of hippocampal kindled seizures in rats: examining the role of the piriform cortex. *Brain research* 957, 152-161

KETTENMANN, H., U.-K. HANISCH, M. NODA u. A. VERKHRATSKY (2011): Physiology of microglia. *Physiological reviews* 91, 461-553

KEY, M. (2012): A tutorial in displaying mass spectrometry-based proteomic data using heat maps. *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 16, S10

KHAN, J., J. S. WEI, M. RINGNER, L. H. SAAL, M. LADANYI, F. WESTERMANN, F. BERTHOLD, M. SCHWAB, C. R. ANTONESCU, C. PETERSON u. P. S. MELTZER (2001): Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 7, 673-679

KHATRI, P., M. SIROTA u. A. J. BUTTE (2012): Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges. *PLoS computational biology* 8, e1002375

KIELIAN, T. (2014): Neuroinflammation: good, bad, or indifferent? *Journal of neurochemistry* 130, 1-3

KIM, S. Y., M. BUCKWALTER, H. SOREQ, A. VEZZANI u. D. KAUFER (2012): Blood-brain barrier dysfunction-induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis. *Epilepsia* 53 Suppl 6, 37-44

KULKARNI, S. u. A. DHIR (2009): Cyclooxygenase in epilepsy: from perception to application. *Drugs of today* (Barcelona, Spain: 1998) 45, 135-154

KUMAR, C. u. M. MANN (2009): Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets. *FEBS letters* 583, 1703-1712

KUMAR, G. S., A. K. VENUGOPAL, A. MAHADEVAN, S. RENUSE, H. C. HARSHA, N. A. SAHASRABUDDHE, H. PAWAR, R. SHARMA, P. KUMAR, S. RAJAGOPALAN, K. WADDELL, Y. L. RAMACHANDRA, P. SATISHCHANDRA, R. CHAERKADY, T. S. PRASAD, K. SHANKAR u. A. PANDEY (2012): Quantitative proteomics for identifying biomarkers for tuberculous meningitis. *Clin Proteomics* 9, 12

ANGLEY, S. R., J. DWYER, I. DROZDOV, X. YIN u. M. MAYR (2013): Proteomics: from single molecules to biological pathways. *Cardiovascular research* 97, 612-622

LEHNARDT, S. (2010): Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58, 253-263

LEMOS, T. u. E. A. CAVALHEIRO (1995): Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale 102, 423-428

LEVIN, Y. u. S. BAHN (2010): Quantification of proteins by label-free LC-MS/MS. Methods Mol Biol 658, 217-231

LEY, K., C. LAUDANNA, M. I. CYBULSKY u. S. NOURSHARGH (2007): Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nature reviews. Immunology 7, 678-689

LIAUNARDY-JOPEACE, A. u. N. J. GAY (2014): Molecular and cellular regulation of toll-like receptor-4 activity induced by lipopolysaccharide ligands. Front Immunol 5, 473

LING, G. S., J. BENNETT, K. J. WOOLLARD, M. SZAJNA, L. FOSSATI-JIMACK, P. R. TAYLOR, D. SCOTT, G. FRANZOSO, H. T. COOK u. M. BOTTO (2014): Integrin CD11b positively regulates TLR4-induced signalling pathways in dendritic cells but not in macrophages. Nat Commun 5, 3039

LIU, N.-K., Y. P. ZHANG, S. HAN, J. PEI, L. Y. XU, P.-H. LU, C. B. SHIELDS u. X.-M. XU (2007): Annexin A1 reduces inflammatory reaction and tissue damage through inhibition of phospholipase A2 activation in adult rats following spinal cord injury. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology 66, 932-943

LIU, X. Y., J. L. YANG, L. J. CHEN, Y. ZHANG, M. L. YANG, Y. Y. WU, F. Q. LI, M. H. TANG, S. F. LIANG u. Y. Q. WEI (2008): Comparative proteomics and correlated signaling network of rat hippocampus in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. Proteomics 8, 582-603

LIU, Z., M. MIKATI u. G. L. HOLMES (1995): Mesial temporal sclerosis: pathogenesis and significance. Pediatric neurology 12, 5-16

LÖSCHER, W. (1999): Animal models of epilepsy and epileptic seizures. In: Antiepileptic Drugs. Springer, 19-62, ISBN 3642642446

LÖSCHER, W. (2002): Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. Epilepsy research 50, 105-123

LÖSCHER, W. (2010): Strategies for antiepileptogenesis: Antiepileptic drugs versus target-specific approaches. Epilepsia 51, 88-88

LÖSCHER, W. (2011): Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. Seizure : the journal of the British Epilepsy Association 20, 359-368

LÖSCHER, W. u. C. BRANDT (2010): Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. Pharmacological reviews 62,

668-700

LÖSCHER, W. u. U. EBERT (1996): The role of the piriform cortex in kindling. *Prog Neurobiol* 50, 427-481

LOVRIC, J. (2011a): Chapter 1 - Introduction. In: *Introducing Proteomics: From concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis*. John Wiley & Sons, 1-18, ISBN 1119957192

LOVRIC, J. (2011b): Chapter 3 - Analysis of Peptides/Proteins by Mass Spectrometry. In: *Introducing Proteomics: From concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis*. John Wiley & Sons, 83, ISBN 1119957192

LUKASIUK, K. u. A. J. BECKER (2014): Molecular biomarkers of epileptogenesis. *Neurotherapeutics* 11, 319-323

LUKASIUK, K., M. DABROWSKI, A. ADACH u. A. PITKÄNEN (2006): Epileptogenesis-related genes revisited. *Prog Brain Res* 158, 223-241

LUKASIUK, K. u. A. PITKÄNEN (2009): Seizure-induced gene expression. In: P. A. SCHWARTZKROIN (Ed.), *Encyclopedia of basic epilepsy research*. Academic Press Oxford, 1302-1309, ISBN 0123736889

LUKK, M., M. KAPUSHESKY, J. NIKKILA, H. PARKINSON, A. GONCALVES, W. HUBER, E. UKKONEN u. A. BRAZMA (2010): A global map of human gene expression. *Nature biotechnology* 28, 322-324

LUNDGREN, D. H., S. I. HWANG, L. WU u. D. K. HAN (2010): Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Rev Proteomics* 7, 39-53

LYMAN, M., D. G. LLOYD, X. JI, M. P. VIZCAYCHIPI u. D. MA (2013): Neuroinflammation: The role and consequences. *Neuroscience research* 79, 1-12

MAGNI, G. u. S. CERUTI (2014): The purinergic system and glial cells: emerging costars in nociception. *Biomed Res Int* 2014, 495789

MALLICK, P. u. B. KUSTER (2010): Proteomics: a pragmatic perspective. *Nature biotechnology* 28, 695-709

MANN, M. (2006): Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 952-958

MARCHI, N., T. GRANATA, C. GHOSH u. D. JANIGRO (2012): Blood-brain barrier dysfunction and epilepsy: pathophysiologic role and therapeutic approaches. *Epilepsia* 53, 1877-1886

MARCUS, K., O. SCHMIDT, H. SCHAEFER, M. HAMACHER, A. VAN HALL u. H. E.

MEYER (2004): Proteomics--application to the brain. *Int Rev Neurobiol* 61, 285-311

MARGERISON, J. H. u. J. A. CORSELLIS (1966): Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain : a journal of neurology* 89, 499-530

MAROSO, M., S. BALOSSO, T. RAVIZZA, J. LIU, E. ARONICA, A. M. IYER, C. ROSSETTI, M. MOLTENI, M. CASALGRANDI, A. A. MANFREDI, M. E. BIANCHI u. A. VEZZANI (2010): Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med* 16, 413-419

MAROSO, M., S. BALOSSO, T. RAVIZZA, J. LIU, M. E. BIANCHI u. A. VEZZANI (2011): Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signalling in epilepsy: the importance of IL-1beta and high-mobility group box 1. *J Intern Med* 270, 319-326

MATHERN, G., T. BABB u. D. ARMSTRONG (1997): Hippocampal sclerosis. In: J. ENGEL und T. A. PEDLEY (Eds.), *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Lippincott-Raven Philadelphia, 133-155, ISBN 0397516398

MENG, X. F., L. TAN, M. S. TAN, T. JIANG, C. C. TAN, M. M. LI, H. F. WANG u. J. T. YU (2014): Inhibition of the NLRP3 inflammasome provides neuroprotection in rats following amygdala kindling-induced status epilepticus. *Journal of neuroinflammation* 11, 212

MERIAUX, C., J. FRANCK, D. B. PARK, J. QUANICO, Y. H. KIM, C. K. CHUNG, Y. M. PARK, H. STEINBUSCH, M. SALZET u. I. FOURNIER (2014): Human temporal lobe epilepsy analyses by tissue proteomics. *Hippocampus* 24, 628-642

MESSANA, I., T. CABRAS, F. IAVARONE, F. VINCENZONI, A. URBANI u. M. CASTAGNOLA (2013): Unraveling the different proteomic platforms. *Journal of separation science* 36, 128-139

MI, H., N. GUO, A. KEJARIWAL u. P. D. THOMAS (2007): PANTHER version 6: protein sequence and function evolution data with expanded representation of biological pathways. *Nucleic acids research* 35, D247-D252

MI, H., A. MURUGANUJAN, J. T. CASAGRANDE u. P. D. THOMAS (2013): Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature protocols* 8, 1551-1566

MILACIC, M., R. HAW, K. ROTHFELS, G. WU, D. CROFT, H. HERMJAKOB, P. D'EUSTACHIO u. L. STEIN (2012): Annotating cancer variants and anti-cancer therapeutics in reactome. *Cancers* 4, 1180-1211

MIRANDA, A., Y. LE BORGNE u. G. BONTEMPI (2008): New Routes from Minimal Approximation Error to Principal Components. *Neural Processing Letters*, Springer 27, 197-207

MISHRA, N. C. (2011): Preface. In: *Introduction to Proteomics: Principles and Applications*.

John Wiley and Sons, 13, ISBN 0471754021

MIZOGUCHI, H., J. NAKADE, M. TACHIBANA, D. IBI, E. SOMEYA, H. KOIKE, H. KAMEI, T. NABESHIMA, S. ITOHARA, K. TAKUMA, M. SAWADA, J. SATO u. K. YAMADA (2011): Matrix metalloproteinase-9 contributes to kindled seizure development in pentylenetetrazole-treated mice by converting pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 12963-12971

MONTERO, C. (2003): The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 51, 1-4

MORIN-BRUREAU, M., A. LEBRUN, M. C. ROUSSET, L. FAGNI, J. BOCKAERT, F. DE BOCK u. M. LERNER-NATOLI (2011): Epileptiform activity induces vascular remodeling and zonula occludens 1 downregulation in organotypic hippocampal cultures: role of VEGF signaling pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 10677-10688

NABER, P., M. WITTER u. F. DA SILVA (1999): Perirhinal cortex input to the hippocampus in the rat: evidence for parallel pathways, both direct and indirect. A combined physiological and anatomical study. *European Journal of Neuroscience* 11, 4119-4133

NEILSON, K. A., N. A. ALI, S. MURALIDHARAN, M. MIRZAEI, M. MARIANI, G. ASSADOURIAN, A. LEE, S. C. VAN SLUYTER u. P. A. HAYNES (2011): Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 11, 535-553

NEVANDER, G., M. INGVAR, R. AUER u. B. K. SIESJÖ (1985): Status epilepticus in well-oxygenated rats causes neuronal necrosis. *Annals of neurology* 18, 281-290

NIKOLIC, M. (2002): The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34, 731-745

OKAMOTO, O. K., L. JANJOPPI, F. M. BONONE, A. P. PANSANI, A. V. DA SILVA, F. A. SCORZA u. E. A. CAVALHEIRO (2010): Whole transcriptome analysis of the hippocampus: toward a molecular portrait of epileptogenesis. *BMC Genomics* 11, 230

OLSON, J. K. u. S. D. MILLER (2004): Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *The Journal of Immunology* 173, 3916-3924

ORR, A. G., A. L. ORR, X. J. LI, R. E. GROSS u. S. F. TRAYNELIS (2009): Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction. *Nature neuroscience* 12, 872-878

OVELAND, E., T. MUTH, E. RAPP, L. MARTENS, F. S. BERVEN u. H. BARSNES (2015): Viewing the proteome: how to visualize proteomics data? *Proteomics* 15, 1341-1355

PAALLYSAHO, T., K. TERVO, T. KIVELA, I. VIRTANEN, A. TARKKANEN u. T. TERVO (1993): Cellular fibronectin and tenascin in an orbital nylon prosthesis removed because of

infection caused by *Staphylococcus aureus*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231, 61-65

PANDEY, A. u. M. MANN (2000): Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837-846

PARVATHENANI, L. K., S. TERTYSHNIKOVA, C. R. GRECO, S. B. ROBERTS, B. ROBERTSON u. R. POSMANTUR (2003): P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry* 278, 13309-13317

PAXINOS, G. u. C. WATSON (2006): The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Academic press, ISBN 0080475159

PERI, F. u. V. CALABRESE (2014): Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds: an update. *J Med Chem* 57, 3612-3622

PETRI, B., M. PHILLIPSON u. P. KUBES (2008): The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 180, 6439-6446

PICCININI, A. M. u. K. S. MIDWOOD (2010): DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm* 2010

PITKÄNEN, A. (2010): Therapeutic approaches to epileptogenesis—hope on the horizon. *Epilepsia* 51, 2-17

PITKÄNEN, A. u. J. ENGEL, JR. (2014): Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. *Neurotherapeutics* 11, 231-241

PITKÄNEN, A. u. K. LUKASIUK (2009): Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy & behavior* 14, 16-25

PITKÄNEN, A. u. K. LUKASIUK (2011a): Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet Neurology* 10, 173-186

PITKÄNEN, A. u. K. LUKASIUK (2011b): Molecular biomarkers of epileptogenesis. *Biomarkers in medicine* 5, 629-633

PITKÄNEN, A. u. T. P. SUTULA (2002): Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *The Lancet Neurology* 1, 173-181

POTSCHEKA, H., A. FISCHER, E. L. VON RÜDEN, V. HÜLSMEYER u. W. BAUMGÄRTNER (2013): Canine epilepsy as a translational model? *Epilepsia* 54, 571-579

POUGNET, J. T., E. TOULME, A. MARTINEZ, D. CHOQUET, E. HOSY u. E. BOUE-GRABOT (2014): ATP P2X receptors downregulate AMPA receptor trafficking and postsynaptic efficacy in hippocampal neurons. *Neuron* 83, 417-430

R CORE TEAM (2014): R: A Language and Environment for Statistical Computing, <http://www.R-project.org/>

RACINE, R. J. (1975): Modification of seizure activity by electrical stimulation: cortical areas. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 38, 1-12

RAOL, Y. H. u. A. R. BROOKS-KAYAL (2012): Experimental models of seizures and epilepsies. *Prog Mol Biol Transl Sci* 105, 57-82

RASMUSSEN, T., J. OLSZEWSKI u. D. LLOYD-SMITH (1958): Focal seizures due to chronic localized encephalitis. *Neurology* 8, 435-435

REN, H., Y. J. SHI, Q. C. LU, P. J. LIANG u. P. M. ZHANG (2014): The role of the entorhinal cortex in epileptiform activities of the hippocampus. *Theor Biol Med Model* 11, 14

RIAзи, K., M. A. GALIC u. Q. J. PITTMAN (2010): Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. *Epilepsy research* 89, 34-42

RIDLEY, A. J. (2001): Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends in cell biology* 11, 471-477

RINGNER, M. (2008): What is principal component analysis? *Nature biotechnology* 26, 303-304

ROJAS, A., J. JIANG, T. GANESH, M. S. YANG, N. LELUTIU, P. GUEORGUIEVA u. R. DINGLEDINE (2014): Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia* 55, 17-25

RUGG-GUNN, F. J., J. W. SANDER u. J. E. SMALLS (2011): Epilepsy 2011 From Science to Society: A practical guide to epilepsy

SAIJO, K., A. CROTTI u. C. K. GLASS (2013): Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. *Glia* 61, 104-111

SAIJO, K. u. C. K. GLASS (2011): Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 11, 775-787

SANDER, J. u. S. SHORVON (1996): Epidemiology of the epilepsies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 61, 433

SARKISIAN, M. R. (2001): Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders. *Epilepsy & Behavior* 2, 201-216

SASAKI, Y., M. HOSHI, C. AKAZAWA, Y. NAKAMURA, H. TSUZUKI, K. INOUE u. S. KOHSAKA (2003): Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y12 in microglia in rat brain. *Glia* 44, 242-250

SCHNEBLE, H. (2003): Heillos, heilig, heilbar: die Geschichte der Epilepsie von den

Anfängen bis heute. Walter de Gruyter, ISBN 3110174936

SCHWARTZ-PORSCHE, D. (1986): Epidemiological, clinical and pharmacokinetic studies in spontaneously epileptic dogs and cats. Proceedings of the 4th Annual American College of Veterinary Internal Medicine Forum, Washington DC, 1161-1163

SCHWOB, J., T. FULLER, J. PRICE u. J. OLNEY (1980): Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* 5, 991-1014

SHI, Y. J., X. W. GONG, H. Q. GONG, P. J. LIANG, P. M. ZHANG u. Q. C. LU (2014): Effect of the entorhinal cortex on ictal discharges in low-Mg(2)(+)-induced epileptic hippocampal slice models. *Neural Plast* 2014, 205912

SHORVON, S. D. (2011): The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia* 52, 1052-1057

SIMONATO, M., W. LÖSCHER, A. J. COLE, F. E. DUDEK, J. ENGEL, JR., R. M. KAMINSKI, J. A. LOEB, H. SCHARFMAN, K. J. STALEY, L. VELISEK u. H. KLITGAARD (2012): Finding a better drug for epilepsy: preclinical screening strategies and experimental trial design. *Epilepsia* 53, 1860-1867

SINGHAL, G., E. J. JAEHNE, F. CORRIGAN, C. TOBEN u. B. T. BAUNE (2014): Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. *Frontiers in neuroscience* 8, 315

SINGLETON, K. D. u. P. E. WISCHMEYER (2006): Oral glutamine enhances heat shock protein expression and improves survival following hyperthermia. *Shock* 25, 295-299

SLOANE, J. A., D. BLITZ, Z. MARGOLIN u. T. VARTANIAN (2010): A clear and present danger: endogenous ligands of Toll-like receptors. *NeuroMolecular Med* 12, 149-163

SMITH BAILEY, K. u. C. W. DEWEY (2009): The seizuring cat. Diagnostic work-up and therapy. *J Feline Med Surg* 11, 385-394

SOCIETY FOR NEUROSCIENCE (2002): Brain facts: a primer on the brain and nervous system. Society for Neuroscience, ISBN 0916110001

SOTGIU, S., M. R. MURRIGHILE u. G. CONSTANTIN (2010): Treatment of refractory epilepsy with natalizumab in a patient with multiple sclerosis. Case report. *BMC Neurol* 10, 84

STEWART, L. S., L. S. LEUNG u. M. A. PERSINGER (2001): Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonic-clonic seizure activity. *Epilepsy research* 44, 207-212

STOLL, G., S. JANDER u. M. SCHROETER (2000): Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. In: *Advances in Dementia Research*. Springer, 81-89, ISBN 3211835121

SUENAGA, N., T. ICHIYAMA, M. KUBOTA, H. ISUMI, J. TOHYAMA u. S. FURUKAWA (2008): Roles of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 in acute encephalopathy following prolonged febrile seizures. *J Neurol Sci* 266, 126-130

SWANSON, L. W. (2003): The architecture of the nervous system. In: L. R. SQUIRE, F. E. BLOOM, S. J. MCCONNELL, J. L. ROBERTS, N. C. SPITZER und M. J. ZIGMOND (Eds.), *Fundamental Neuroscience*. Academic Press San Diego, 15-48, ISBN 0126603030

TAKEUCHI, O. u. S. AKIRA (2010): Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820

TAN, C. C., J. G. ZHANG, M. S. TAN, H. CHEN, D. W. MENG, T. JIANG, X. F. MENG, Y. LI, Z. SUN, M. M. LI, J. T. YU u. L. TAN (2015): NLRP1 inflammasome is activated in patients with medial temporal lobe epilepsy and contributes to neuronal pyroptosis in amygdala kindling-induced rat model. *Journal of neuroinflammation* 12, 18

TÉLLEZ-ZENTENO, J. F. u. L. HERNÁNDEZ-RONQUILLO (2011): A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research and treatment* 2012

TIPTON, J. D., J. C. TRAN, A. D. CATHERMAN, D. R. AHLF, K. R. DURBIN u. N. L. KELLEHER (2011): Analysis of intact protein isoforms by mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry* 286, 25451-25458

TU, B. u. N. G. BAZAN (2003): Hippocampal kindling epileptogenesis upregulates neuronal cyclooxygenase-2 expression in neocortex. *Exp Neurol* 179, 167-175

TYERS, M. u. M. MANN (2003): From genomics to proteomics. *Nature* 422, 193-197

UNWIN, R. D., A. PIERCE, R. B. WATSON, D. W. STERNBERG u. A. D. WHETTON (2005): Quantitative proteomic analysis using isobaric protein tags enables rapid comparison of changes in transcript and protein levels in transformed cells. *Mol Cell Proteomics* 4, 924-935

URRUTIA, R., J. R. HENLEY, T. COOK u. M. A. MCNIVEN (1997): The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 377-384

VABULAS, R. M., P. AHMAD-NEJAD, S. GHOSE, C. J. KIRSCHNING, R. D. ISSELS u. H. WAGNER (2002a): HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277, 15107-15112

VABULAS, R. M., H. WAGNER u. H. SCHILD (2002b): Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 270, 169-184

VAN BUUL, J. D., F. P. VAN ALPHEN u. P. L. HORDIJK (2009): The presence of alpha-catenin in the VE-cadherin complex is required for efficient transendothelial migration of leukocytes. *Int J Biol Sci* 5, 695-705

VAN HOESEN, G. W. (1982): The parahippocampal gyrus: new observations regarding its cortical connections in the monkey. *Trends in neurosciences* 5, 345-350

VAN VLIET, E. A., E. ARONICA u. J. A. GORTER (2015): Blood-brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy. *Semin Cell Dev Biol* 38, 26-34

VEZZANI, A., E. ARONICA, A. MAZARATI u. Q. J. PITTMAN (2013a): Epilepsy and brain inflammation. *Experimental neurology* 244, 11-21

VEZZANI, A., S. BALOSSO u. T. RAVIZZA (2008): The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain, behavior, and immunity* 22, 797-803

VEZZANI, A. u. T. Z. BARAM (2007): New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy currents / American Epilepsy Society* 7, 45-50

VEZZANI, A., J. FRENCH, T. BARTFAI u. T. Z. BARAM (2011a): The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 7, 31-40

VEZZANI, A. u. A. FRIEDMAN (2011): Brain inflammation as a biomarker in epilepsy. *Biomarkers in medicine* 5, 607-614

VEZZANI, A., A. FRIEDMAN u. R. J. DINGLEDINE (2013b): The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacol* 69, 16-24

VEZZANI, A. u. T. GRANATA (2005): Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46, 1724-1743

VEZZANI, A., M. MAROSO, S. BALOSSO, M.-A. SANCHEZ u. T. BARTFAI (2011b): IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. *Brain, behavior, and immunity* 25, 1281-1289

VICTOR NADLER, J. (1981): Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life sciences* 29, 2031-2042

VISMER, M. S., P. A. FORCELLI, M. D. SKOPIN, K. GALE u. M. Z. KOUBESSI (2015): The piriform, perirhinal, and entorhinal cortex in seizure generation. *Front Neural Circuits* 9, 27

WALKER, L. u. G. J. SILLS (2012): Inflammation and epilepsy: the foundations for a new therapeutic approach in epilepsy? *Epilepsy Currents* 12, 8-12

WALKER, L. E., N. MIRZA, V. L. YIP, A. G. MARSON u. M. PIRMOHAMED (2015): Personalized medicine approaches in epilepsy. *J Intern Med* 277, 218-234

WALKER, M., H. WHITE u. J. SANDER (2002): Disease modification in partial epilepsy. *Brain : a journal of neurology* 125, 1937-1950

WALSH, J. G., D. A. MURUVE u. C. POWER (2014): Inflammasomes in the CNS. *Nature reviews. Neuroscience* 15, 84-97

WANG, Z., Y. FAN, J. XU, L. LI, D. HENG, S. HAN, J. YIN, B. PENG, W. LIU u. X. HE (2014): Transcriptome Analysis of the Hippocampus in Novel Rat Model of Febrile Seizures. *PloS one* 9, e95237

WARNES, G. R., B. BOLKER, L. BONEBAKKER, R. GENTLEMAN, W. HUBER, A. LIAW, T. LUMLEY, M. MAECHLER, A. MAGNUSSON, S. MOELLER, M. SCHWARTZ u. B. VENABLES (2015): gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data, R package version 2.17.0. <http://CRAN.R-project.org/package=gplots>

WEISSL, J., V. HULSMAYER, C. BRAUER, A. TIPOLD, L. L. KOSKINEN, K. KYOSTILA, H. LOHI, C. SAUTER-LOUIS, M. WOLF u. A. FISCHER (2012): Disease progression and treatment response of idiopathic epilepsy in Australian Shepherd dogs. *J Vet Intern Med* 26, 116-125

WILCZYNSKI, G. M., F. A. KONOPACKI, E. WILCZEK, Z. LASIECKA, A. GORLEWICZ, P. MICHALUK, M. WAWRZYNIAK, M. MALINOWSKA, P. OKULSKI, L. R. KOLODZIEJ, W. KONOPKA, K. DUNIEC, B. MIODUSZEWSKA, E. NIKOLAEV, A. WALCZAK, D. OWCZAREK, D. C. GORECKI, W. ZUSCHRATTER, O. P. OTTERSEN u. L. KACZMAREK (2008): Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *J Cell Biol* 180, 1021-1035

WILKINS, M. R., E. GASTEIGER, J.-C. SANCHEZ, R. D. APPEL u. D. F. HOCHSTRASSER (1996): Protein identification with sequence tags. *Current Biology* 6, 1543-1544

WILLIAMSON, P. D., J. A. FRENCH, V. M. THADANI, J. H. KIM, R. A. NOVELLY, S. S. SPENCER, D. D. SPENCER u. R. H. MATTSON (1993): Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: II. Interictal and ictal scalp electroencephalography, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and pathology. *Annals of neurology* 34, 781-787

WISNIEWSKI, J. R., A. ZOUGMAN, N. NAGARAJ u. M. MANN (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* 6, 359-362

WOLFFE, A. P. u. M. A. MATZKE (1999): Epigenetics: regulation through repression. *Science (New York, N.Y.)* 286, 481-486

WU, X. u. D. S. REDDY (2012): Integrins as receptor targets for neurological disorders. *Pharmacol Ther* 134, 68-81

XANTHOS, D. N. u. J. SANDKÜHLER (2014): Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nature Reviews Neuroscience* 15, 43-53

XIAO, F., D. CHEN, Y. LU, Z. XIAO, L. F. GUAN, J. YUAN, L. WANG, Z. Q. XI u. X. F. WANG (2009): Proteomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with idiopathic

temporal lobe epilepsy. Brain research 1255, 180-189

YANG, J. W., T. CZECH, E. GELPI u. G. LUBEC (2005): Extravasation of plasma proteins can confound interpretation of proteomic studies of brain: a lesson from apo A-I in mesial temporal lobe epilepsy. Brain Res Mol Brain Res 139, 348-356

YEE, N. K. u. J. A. HAMERMAN (2013): β 2 integrins inhibit TLR responses by regulating NF- κ B pathway and p38 MAPK activation. European journal of immunology 43, 779-792

YONG, V. W., C. POWER, P. FORSYTH u. D. R. EDWARDS (2001): Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. Nature reviews. Neuroscience 2, 502-511

YU, L., L. WANG u. S. CHEN (2010): Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. J Cell Mol Med 14, 2592-2603

ZARA, F. u. A. BIANCHI (2009): The impact of genetics on the classification of epilepsy syndromes. Epilepsia 50, 11-14

ZATTONI, M., M. L. MURA, F. DEPREZ, R. A. SCHWENDENER, B. ENGELHARDT, K. FREI u. J. M. FRITSCHY (2011): Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 31, 4037-4050

ZHENG-BRADLEY, X., J. RUNG, H. PARKINSON u. A. BRAZMA (2010): Large scale comparison of global gene expression patterns in human and mouse. Genome biology 11, R124

X. ANHANG

1. Lösungen und Substanzen

Blocking-Lösung

- in Carrier-Lösung
- 11 % Normalserum (Ziege)
- 2 % Bovines Serumalbumin

Carrier-Lösung

- in TBS
- 1 % Normalserum (Ziege)
- 1 % Bovines Serumalbumin
- 0,3 % Triton X

Chrom-Gelatine-Lösung

- 0,7 g Gelatine + 0,07 g Chrom III
- mit 100 ml Aqua dest. vermischen
- langsam auf 60 °C erhitzen, bis sich die Gelatine gelöst hat
- langsam abkühlen lassen
- eine Messerspitze Thymol dazu geben

DAB-Lösung

- 1 mg DAB x 4 HCL in 100 µl Aqua dest. lösen
- 4 ml Tris/Ni-Lösung
- 1 µl 30 %iges H₂O₂ frisch hinzufügen

Gefriermedium

- 4,28 g Glukose
- 0,07 g MgCl₂-Hexahydrat in 25 ml 0,1 M Phosphatpuffer lösen
- ad 50 ml Glycerin

30 % Glukose-Lösung

- 6 g Glukose
- ad 20 g 0,1 M Phosphatpuffer

Natrium-Citrat-Puffer

- 2,94 g tri-NaCitat Dihydrat auf 1000 ml Aqua dest.
- einstellen auf pH 9,0 mit NaOH

4 % Paraformaldehydlösung

- 100 ml 8 % Paraformaldehydlösung
- mit 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer verdünnen

8 % Paraformaldehydlösung (Stammlösung)

- 800 ml Aqua dest. auf 60-70 °C erhitzen
- 80 g Paraformaldehyd zufügen
- Tropfenweise 6 M NaOH zugeben bis die Lösung klar wird
- abkühlen lassen
- auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen und anschließend filtrieren

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2)

- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Na₂HPO₄
- 0,27 g KH₂PO₄
- mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

0,01 M Phosphatgepufferte 0,9 % Kochsalzlösung

- 0,9 % NaCl
- 0,2 M Phosphatpuffer
- mit HCl auf pH 7,6 einstellen

0,4 M Phosphatpuffer (Stammlösung)

- 45,43 g/l Na₂HPO₄ (wasserfrei)

- 12,48 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O
- in Aqua dest. und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

0,05 M Tris gepufferte Saline (TBS)

- 0,9 % NaCl
- 0,05 M Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
- mit 32 %iger HCl auf pH 7,6 einstellen

Tris-Nickel-Lösung

- in 0,05 M TBS
- 0,6 % Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat
- mit 2 M NaOH auf pH 7,6 einstellen

Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Anti-Hsp70/Hsp72 Antikörper (Maus, monoklonal)	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Anti-P2x7 Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Anti-P2y12 Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	Department of Physiology, UCSF, San Francisco, USA
Augensalbe (Bepanthen®)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Biot. Ziege anti-Kaninchen Antikörper (polyklonal)	Dako, Glostrup, Dänemark
Biot. Ziege anti-Maus Antikörper (polyklonal)	Dako, Glostrup, Dänemark
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Bupivacain (JENAPHARM®)	mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Deutschland
Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Diaminobenzidin-Reaktionslösung (DAB Kit SK-4100)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Diazepam (Diazepam-ratiopharm®)	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
DNasel	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Einbettmedium (Tissue freezing medium®)	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
Eindeckmittel (Entellan®)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethacridinlactat-Monohydrat (Rivanol®)	Dermapharm AG, Grünwald, Deutschland
Ethanol 95 % und 99,9 % für Immunhistochemie	AgrAlko AG, München, Deutschland
Ethanol 99 % für Paraffinfixierung	CLN GmbH, Niederhummel, Deutschland
Gelatine, gepulvert	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gentamicinsulfat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kaltpolymerisierender Kunststoff (Paladur®)	Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Marbofloxacin (Marbocyl®)	Vétoquinol, Ravensburg, Deutschland
Meloxicam (Metacam®)	Boehringer Ingelheim, Deutschland
Natriumchlorid-Lösung (isoton)	B.Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Natrium-Citrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Pentobarbital (Narcoren®)	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Ringerlactat-Lösung (Ri-Lac®)	Hartmann B.Braun Vet Care, Melsungen, Deutschland
Serum (Ziege)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Spezialparaffin	SAV LP GmbH, Flinstbach a. Inn, Deutschland
Streptavidin/Meerrettichperoxidase	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Suprarenin	Henry Schein Vet, Stuttgart, Deutschland
Thymol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

Tris[hydroxymethyl]-aminomethan	Thermo Scientific, Rockford, USA
Triton x – 100	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA	Promega, Mannheim, Deutschland
Trypsin Inhibitor aus Glycine max (Sojabohne), Typ I-S	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Xylol-Ersatzmedium (Rotihistol®)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Xylol-Isomerengemisch	W. Gräen GmbH & Co, München, Deutschland

2. Geräte

Geräte und Software für die in vivo Versuche

Geräte / Software	Hersteller
Analog-Digitalwandler PowerLab/800s	ADInstruments Ltd, Hastings, UK
Beobachtungskäfige (Glasaquarien)	Domes Aquaristik, München, Deutschland
Dentalbohrer	Fa. Karl Fischer, Pforzheim, Deutschland
Digi-Protect Searcher 6.275 beta software	ABUS Security-Tech, Affing, Deutschland
EEG- und Stimulationskabel	Conrad Elektronik, München, Deutschland
EEG-Auswertungssoftware Chart 5	ADInstruments, Spechbach, Deutschland
Ein-Kanal-Verstärker Animal Bio Amp	ADInstruments Ltd, Hastings, UK
Personalcomputer	Verschiedene Bezugsquellen
Stereotaktischer Apparat	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Stimulationseinheit (Stimulus Isolator A365 und Accupulsor A310C)	World Precision Instruments, Berlin, Deutschland
Tierkäfige	EHRET GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland
Videoüberwachung (CCD-/ GCD-Kameras)	Conrad Elektronik, München, Deutschland

Weitere Geräte und Software

Geräte / Software	Hersteller / URL
Axiocam Mrc	Carl Zeiss, Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
BH2-Lichtmikroskop	Olympus, Japan
Bildanalysesoftware KS 400	Carl Zeiss, Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
ConsensusPathDB	http://consensuspathdb.org/
Excel 2010/2013	Microsoft, Redmond, WA, USA
Genomatix	https://www.genomatix.de/
Kryostat HM560M	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland
Mascot Software Version 2.4	Matrix Science Ltd., London, UK
Nano Trap Säule und analytische Säule für HPLC-System	Dionex GmbH, Idstein, Deutschland
Objektträger Histobond	Paula Marienfeld GmbH und Co. KG, Lauder- Königshofen, Deutschland
Paraffin-Ausgießstation TES 99	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Paraffin-Einbettungsautomat (Histomaster Modell 2050/DI)	Bavimed, Birkenau, Deutschland
PowerPoint 2010/2013	Microsoft, Redmond, WA, USA
Progenesis Software Version 2.5	Nonlinear Dynamics Limited, Newcastle upon Tyne, UK
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Programmiersprache R	http://www.r-project.org/
PANTHER Classification System	http://pantherdb.org/
Rotationsmikrotom (MICROM)	Cambridge Instruments GmbH, Nußloch, Deutschland
Ultimate3000 nano HPLC-System	Dionex, Sunnyvale, CA, USA

3. R-Skripten

Verwendete Pakete und Programmcodes für die statistische und funktionelle Datenauswertung mittels R.

Heatmap

```
##### R-Paket(e) #####
library(gplots)

##### Einlesen und Bearbeiten der Daten #####
data <- read.csv("Dateipfad.csv")

options(OutDec=",") #Dezimaltrennzeichen=","

#log2-Transformierung und Datenkonvertierung in ein Matrixformat
mat_data <- data.matrix(log2(data[,2:ncol(data)]))
rownames(mat_data) <- data[,1]

#Datenbearbeitung (Runden) für nachfolgende Zellenbeschriftung
mat <- data.matrix(data[,2:ncol(data)])
mat <- ifelse(mat>0.05, round(mat, digits=1), round(mat, digits=2))

#Definierung der Farbskalierung für die Heatmap
my_palette <- colorRampPalette(c("red", "white", "blue")) (n=299)

##### Erstellung der Heatmap #####
heatmap.2(mat_data, cellnote=mat, notecol="black", notecex=0.80, scale="none",
           key=FALSE, density.info="none", trace="none", margins=c(10,9),
           col=my_palette, dendrogram="none", cexCol=1.0, cexRow=1.0,
           Colv=FALSE)
```

PCA

```
##### R-Paket(e) #####
library(FactoMineR)
library(rgl)

##### Einlesen und Bearbeiten der Daten #####
data1 <- read.csv("Dateipfad.csv")

data2 <- log2(data1[,3:ncol(data1)]) #log2-Transformierung der Daten

#Zentrierung und Skalierung der Daten mit nachfolgender PCA
pca1=prcomp(data2, scale.=TRUE)

Tiergruppe <- data1$Tiergruppe

##### Matrix mit Eigenwerten #####
pca2=PCA(data2, graph=FALSE)
pca2$eig

##### Erstellung des 3D-Graphen #####
plot3d(pca1$x, pca1$y, pca1$z, col=Tiergruppe, size=2, type='s',
       xlab="x", ylab="y", zlab="z", box=FALSE, main="Titel")
```

Säulendiagramm

```
#####
##### R-Paket(e) #####
require(ggplot2)
#####
##### Einlesen und Bearbeiten der Daten #####
data1 <- read.csv("Dateipfad.csv")
head(data1) #Wiedergabe der ersten Datenwerte
tail(data1) #Wiedergabe der letzten Datenwerte
#Definierung der zeitlichen Reihenfolge innerhalb des Diagramms
data1$Zeitpunkt <- factor(data1$Zeitpunkt, levels=c("8 Wochen nach SE",
"10 Tage nach SE", "2 Tage nach SE"))
#####
##### Erstellung des Säulendiagramms #####
#'=Biologischer.Prozess oder Molekulare.Funktion
ggplot(data=data1, aes(x='~', y=Proteine,
fill=factor(Zeitpunkt))) +
  geom_bar(position="dodge", stat="identity") + coord_flip() +
  labs(y="Anzahl Proteine") +
  scale_fill_grey(start=0, end=.8) + theme_bw() +
  theme(panel.background=element_rect(fill="transparent", colour="gray"),
axis.line=element_line(colour="gray"),
panel.border=element_blank(),
panel.grid.major=element_line(colour="gray"),
panel.grid.minor=element_line(colour="gray"),
axis.text.y=element_text(size=28),
axis.text.x=element_text(size=24),
axis.title.x=element_text(size=24),
legend.position="none",
axis.title.y=element_blank())
```

Venn-Diagramm

```
#####
##### R-Paket(e) #####
library(VennDiagram)
#####
##### Erstellung des Venn-Diagramms #####
#'=Zahlenwert abhängig vom jeweiligen Datensatz
draw.pairwise.venn(areal='~', area2='~', cross.area='~',
category=c("PHC", "HC"), lty="blank", fill=c("blue3", "yellow1"),
alpha=0.5, cat.pos=c(0,0), cat.dist=0.025, cat.cex=2,
fontfamily=rep("sans", 3), cat.fontfamily=rep("sans", 2), cex=2,
ext.text=TRUE, ext.line.lty=2, ext.line.lwd=1, ext.pos=rep(135, 1),
ext.dist=rep(0, 1))
)
```

Volcano-Plot

```
#####
##### R-Paket(e) #####
require(ggplot2)
#####
##### Einlesen und Bearbeiten der Daten #####
data1 <- read.csv("Dateipfad.csv")
head(data1$logFC) #Wiedergabe der ersten Werte der ausgewählten Spalte
```

```
head(data1$P.Value) #Wiedergabe der ersten Werte der ausgewählten Spalte

#Regulierte Proteine
data1$threshold=as.factor(abs(data1$logFC)>=0.536 & data1$P.Value<0.05)

#Beschriftung der fünf am stärksten regulierten Proteine (Wert für data1$logFC
#'~'=Zahlenwert abhängig vom jeweiligen Datensatz
data_text=data1[(abs(data1$logFC)>='~') & (data1$P.Value<0.05),]

##### Erstellung des Volcano-Plots #####
g=ggplot(data=data1, aes(x=logFC, y=-log10(P.Value), colour=threshold)) +
  geom_point(alpha=0.4, size=2.4) +
  theme_bw() +
  theme(legend.position="none") +
  xlim(c(-5, 5)) + ylim(c(0, 7)) + #Begrenzung der x- und y- Achse
  xlab("log2 (SE/Kontrolle)") + ylab("-log10 p-Wert") +
  scale_colour_manual(values=c("firebrick", "navy"))

#Beschrifitung der fnf am stärksten regulierten Proteine
g + geom_text(data=data_text, aes(x=logFC - .01, y=-log10(P.Value) + .01,
  label=ID), colour="black", hjust=0, vjust=0, size=4)
```

XI. DANKSAGUNG

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka, möchte ich an dieser Stelle meinen größten Dank aussprechen. Ihr Vertrauen und Engagement sowie ihre hervorragende Betreuung haben diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht. Weiterhin möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe sowie für die fachkompetente Anleitung im wissenschaftlichen Arbeiten herzlich bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch meiner Betreuerin, Frau Dr. Vera Russmann. Sie stand mir während der Zeit meiner Doktorarbeit sowohl bei wissenschaftlichen als auch bei persönlichen Fragestellungen stets zur Seite. Dabei war sie mir nicht nur eine wertvolle Arbeitskollegin, sondern auch eine sehr gute Freundin. Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. Eva-Lotta von Rüden bedanken, die mich vor allem in der letzten Phase meiner Doktorarbeit intensiv unterstützt hat. Ihre persönliche und fachliche Kompetenz haben mir in zahlreichen Situationen sehr weitergeholfen. Weiterhin danke ich Katharina Kistler, Josephine Salvamoser und Lucia Rettenbeck für die wundervolle Zeit und die anregenden Diskussionen.

Hinsichtlich der aktiven Unterstützung bei den *in vivo*-Experimenten möchte ich mich bei Joana Goc und Lucia Rettenbeck bedanken.

Ein großer Dank gilt auch allen technischen Mitarbeitern des Institutes für ihre tatkräftige Hilfe bei den *in vivo*-Experimenten und den immunhistochemischen Färbungen. Dies sind Olga Cabezas, Marion Fisch, Sieglinde Fischlein, Barbara Kohler, Regina Rentsch, Claudia Siegl, Angela Vicedomini und Manfred Kutschka. Sabine Vican danke ich für die hervorragende Betreuung und Pflege der Tiere.

Die Einarbeitung in das komplexe Themengebiet der Proteomik wäre ohne die beratende Unterstützung zahlreicher Personen kaum möglich gewesen. Allen beteiligten Personen möchte ich daher meinen herzlichen Dank aussprechen. Namentlich hervorzuheben sind hierbei Herr Dr. Tobias Straub und Herr Stephan Müller.

Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg und Frau Dr. Stefanie Hauck danke ich für die Durchführung der Gewebehomogenisation, Proteinextraktion und massenspektrometrischen Analysen. Zudem haben sie mir gezeigt, wie wichtig eine auf Respekt basierende zwischenmenschliche Kommunikation für eine gute Zusammenarbeit ist.

Bei Herrn Prof. David Julius möchte ich mich für die freundliche Bereitstellung des P2ry12-Antikörpers bedanken.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie und Henrika Jodeleit, die mich in allen Phasen der Doktorarbeit bedingungslos unterstützt und mir zur Seite gestanden haben. Ihre Liebe und ihr Vertrauen gaben mir den nötigen Rückhalt für die erfolgreiche Durchführung des Projektes.