

Aus der Klinik für Neurochirurgie
(Direktor: Prof. Dr. M. Synowitz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**„Immunhistochemische und molekularbiologische Analysen der
Schadenskaskaden in Myelomeningozelengeweben in Korrelation
zum klinischen Verlauf“**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Bea Drucks (geb. Kowitzke)
aus Menden (Sauerland)

Kiel 2017

1. Berichtstatter: Frau PD Dr. med. Friederike Knerlich-Lukoschus

2. Berichtstatter: PD Dr. med. Sarah von Spiczak

Tag der mündlichen Prüfung: 02.08.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 21.03.2017

gez.: Prof. Dr. med. dent. Christof Dörfer

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

„Und wenn ein Sturm dich in die Knie zwingt,
halt dein Gesicht einfach gegen den Wind.
Egal, wie dunkel die Wolken über dir sind,
sie werden irgendwann vorbeiziehen.“

Die Toten Hosen

In Gedenken an meinen Opa und meine Oma

Hans Kowitzke

Ursula Wrede

Meiner Oma

Hildegard Kowitzke

Meinen Eltern

Ursula Wrede-Kowitzke und Manfred Kowitzke

Meinem Ehemann

Sebastian Drucks

in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	1
II Abbildungsverzeichnis	4
III Tabellenverzeichnis	5
IV Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung	9
1.1 Epidemiologische Daten	10
1.2 Embryologische Entwicklung	11
1.3 Pathologie.....	13
1.3.1 Mediatoren der posttraumatischen Inflammation: Zytokine und ihre Rezeptoren ..	16
1.3.2 Neuroprotektive Zytokine: Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor.....	19
1.3.3 Transkriptionsfaktor: Hypoxia-inducible factor	20
1.4 Diagnostik und klinische Symptomatik	22
1.5 Therapie.....	24
1.6 Zielsetzung	27
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Entparaffinierung	29
2.1.1 Ablauf der Entparaffinierung.....	30
2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	30
2.2.1 Färbeablauf	31
2.3 Gewebeatlantent	32
2.4 Immunhistochemie.....	32
2.4.1 Ablauf der Immunfärbung mit Histofine® Simple Stain	32
2.4.2 Ablauf der Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung	33
2.4.3 Doppelimmunfluoreszenzfärbung.....	34
2.4.4 Tripleimmunfluoreszenzfärbung.....	35

2.4.5 Spezifität der verwendeten Antikörper	39
2.5 Mikroskopie und Auswertung	42
2.6 Densitometrie	42
2.7 Molekularbiologische Analyse	43
2.7.1 RNA-Isolation aus formalin-fixiertem paraffin-eingebettetem (FFPE-) Gewebe ...	43
2.7.2 Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung	44
2.7.3 DNA-Verdau und Herstellung von cDNA	44
2.7.4 Target Assay-Mix	45
2.7.5 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	46
2.7.6 Relative Quantifizierung der Amplifikationsprodukte.....	49
2.8 Statistik und Signifikanzniveau	51
2.9 Klinische Daten	51
2.10 Ethische Anforderungen.....	52
3 Ergebnisse	53
3.1 Analyse der Hämatoxylin-Eosin-Färbung anhand der Gewebeatlantent	53
3.2 Vorarbeiten zur Immunhistochemie	55
3.3 Expressionsmuster verschiedener Gewebemarker	58
3.3.1 Densitometrische Analyse der GFAP-und Vimentin-Immunreaktivität	67
3.4 Expressionsmuster von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor: Ergebnisse der qualitativen, semiquantitativen und densitometrischen Auswertungen.....	70
3.4.1 Zelluläre Lokalisation von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor	76
3.4.2 Densitometrische Analysen der Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor- Immunreaktivitäten.....	79
3.5 Expressionsmuster von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor: Ergebnisse der qualitativen, semiquantitativen und densitometrischen Auswertungen.....	81
3.5.1 Zelluläre Lokalisation von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor	86
3.5.2 Densitometrische Analysen der Erythropoetin- und Erythropoetin-Rezeptor- Immunreaktivitäten.....	89

3.6 Expressionsmuster von Hypoxia Inducible Factor: Ergebnisse der qualitativen, semiquantitativen und densitometrischen Auswertungen.....	91
3.7 Ergebnisse PCR	94
3.8 Klinische Daten	95
3.9 Korrelation der klinischen Daten mit den densitometrisch objektivierten Immunreaktivitäten.....	99
4 Diskussion.....	100
4.1 Erste Arbeitsschritte - Methodische Aspekte und histopathologische Analyse der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte.....	101
4.2 Etablierung der zellulären Plakodenmarkerprofile und Identifizierung zellulärer Träger potentieller Schadenskaskaden.....	102
4.3 Expressionsmuster von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor: Identifikation spezifischer Botenstoffe von posttraumatischen Schadenskaskaden in der MMC-Plakode	105
4.4 Erythropoetin, Erythropoetin-Rezeptor und Hypoxie-induzierbare Faktoren in der MMC-Plakode: Mögliche Ansatzpunkte für neuroprotektive Therapiestrategien.....	107
5 Zusammenfassung	109
6 Literaturverzeichnis	111
7 Anhang.....	121
7.1 Ethikvotum	121
7.2 Danksagung	122
7.3 Lebenslauf	123

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....	9
Abbildung 2.....	13
Abbildung 3.....	14
Abbildung 4.....	16
Abbildung 5.....	21
Abbildung 6.....	24
Abbildung 7.....	28
Abbildung 8.....	54
Abbildung 9.....	55
Abbildung 10.....	56
Abbildung 11.....	56
Abbildung 12.....	57
Abbildung 13.....	62
Abbildung 14.....	63
Abbildung 15.....	64
Abbildung 16.....	65
Abbildung 17.....	66
Abbildung 18.....	69
Abbildung 19.....	74
Abbildung 20.....	75
Abbildung 21.....	78
Abbildung 22.....	80
Abbildung 23.....	84
Abbildung 24.....	85
Abbildung 25.....	88
Abbildung 26.....	88
Abbildung 27.....	90
Abbildung 28.....	93
Abbildung 29.....	94
Abbildung 30.....	110
Abbildung 31.....	121

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	17
Tabelle 2	30
Tabelle 3	31
Tabelle 4	36
Tabelle 5	37
Tabelle 6	38
Tabelle 7	41
Tabelle 8	45
Tabelle 9	48
Tabelle 10.....	48
Tabelle 11.....	48
Tabelle 12.....	50
Tabelle 13.....	61
Tabelle 14.....	73
Tabelle 15.....	76
Tabelle 16.....	83
Tabelle 17.....	86
Tabelle 18.....	97
Tabelle 19.....	98
Tabelle 20.....	99

IV Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celcius
ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Aqua bidest.	lat. Aqua bidestillatum = doppelt destilliertes Wasser
Aqua dest.	lat. Aqua destillatum = destilliertes Wasser
BSA	engl. bovine serumalbumine
CD3/CD11b/CD68	engl. cluster of differentiation
cDNA	engl. copy deoxyribonucleic acid = kopierte Desoxyribonukleinsäure
CK Pan	Panzytokeratin
CNPase	2', 3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase
C_T	engl. cycle of threshold = Schwellenwertzyklus
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
EMA	engl. epithelial membrane antigen = Epitheliales Membranantigen
EPO	Erythropoetin
EPO-R	Erythropoetin-Rezeptor
et al.	lat. et alii = und andere
Fab	engl. fragment antigen binding = Antigen-bindendes Fragment
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FFPE	Formalin-fixiert, paraffin-eingebettet
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	engl. glial fibrillary acidic protein = saures Gliafaserprotein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF	engl. hypoxia inducible factor = Hypoxie-induzierbarer Faktor

HIF-1a/HIF-1 α	engl. hypoxia inducible factor -1 alpha = Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 alpha
HIF-2a/HIF-2 α	engl. hypoxia inducible factor -2 alpha = Hypoxie-induzierbarer Faktor-2 alpha
HMB45	engl. human melanoma black
HRE	engl. hypoxia response elements
Ig	Immunglobulin
IL-1b/IL-1 β	Interleukin-1-beta
JAK-2	Janus-Kinase-2
Min	Minute
MMC	engl. myelomeningocele = Myelomeningozele
Mon	Monat/Monate
mRNA	engl. messenger ribonucleid acid = Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NeuN	engl. neuronal nuclei
NF 200kD	Neurofilament 200 Kilodalton
OD	Optische Dichte
P	Primer
PCR	engl. polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PBS	engl. phosphored buffered saline = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pH	lat. potentia hydrogenii = Stärke des Wasserstoffs, negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pVHL	Von-Hippel-Lindau-Protein
qPCR	engl. quantitative real-time PCR
rcf	engl. relative centrifugal force = Relative Zentrifugalkraft
RNA	engl. ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	engl. revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
Sek	Sekunde
SMA	engl. smooth muscle actin = Aktin, glatte Muskulatur

SYN	Synaptophysin
Taq	lat. thermus aquaticus
TBS(T)	engl. Tris-buffered saline (Tween®) = Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCR	engl. T-cell-receptor = T-Zellrezeptor
TCS	engl. tethered cord syndrome
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TNF-1R1	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VIM	Vimentin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Bei den Neurulationstörungen kommt es zum Ausbleiben (Araphie) beziehungsweise einer fehlerhaften Umwandlung der Neuralplatte zum Neuralrohr (Dysraphie) mit einhergehenden Störungen der daran anschließenden Umbildungsvorgänge im Bereich des Rückenmarks und seiner angrenzenden mesenchymalen Gebilde (Rückenmarkshäute, Achsenorgan der Wirbelsäule und deren Anhänge, Haut) (siehe Abschnitt 1.2). Die Myelomeningozele (MMC) gehört zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen und ist die schwerste Form der Spina bifida (siehe Abschnitt 1.1). Bei der Myelomeningozele liegt eine Spaltbildung der Wirbelsäule vor. Durch diesen Spalt stülpen sich Teile des Rückenmarks und seiner Häute in einer Zyste nach außen. Dabei liegen die betroffenen Rückenmarkabschnitte als flache Platte (= neurale Plakode) offen und exponiert an der Körperoberfläche, ohne von den angrenzenden mesodermalen und ektodermalen Strukturen schützend abgedeckt zu sein (siehe Abbildung 1 und Abschnitt 1.3).

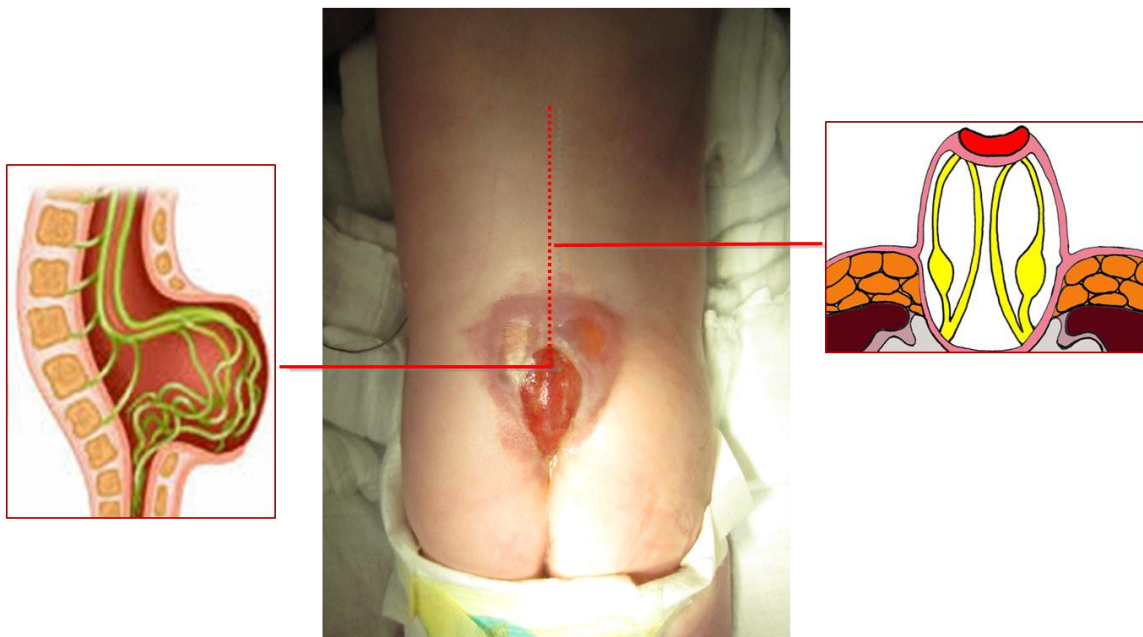


Abbildung 1

Lumbosakrale Myelomeningozele (MMC) mit exponierter Plakode am Rücken eines Neugeborenen (Knerlich-Lukoschus, 2012). Links: Schematische Darstellung des Defekts in sagittaler Ebene. Rechts: Axiale schematische Darstellung der MMC mit der dorsal frei liegenden Plakode, den anterior davon abgehenden Nervenfasern und der nach lateral in die Faszie eingehenden Hirnhaut.

Die Myelomeningozele ist als Manifestation einer generalisierten Malformation des Zentralen Nervensystems mit einer Vielzahl von komplexen und häufig lebenslang therapiebedürftigen Problemen assoziiert. Da die derzeitigen Therapieoptionen auf die chirurgische Rekonstruktion schützender Hüllen um das frei liegende Rückenmark und die plastische Deckung des Hautdefekts beschränkt sind, können sie nicht alle Aspekte dieses Krankheitsbildes suffizient abdecken. Dementsprechend ist das „Langzeitoutcome“ trotz Verbesserungen der chirurgischen Verfahren und Hilfsmittel nicht zufriedenstellend und ein selbstständiges, unabhängiges Leben der betroffenen Kinder nur selten möglich. Folglich ist es notwendig, die primäre Versorgung der Myelomeningozele zu optimieren und mögliche Angriffspunkte für gezielte, die chirurgischen Optionen ergänzende Therapiestrategien zu identifizieren. Bei der Entstehung der MMC geht man von einem mehrphasigen Verlauf aus, der neben dem Aspekt des strukturell-anatomischen Neurulationsdefekts auch sekundäre Läsionskaskaden und ihre schädigenden Mediatoren umfasst (siehe Abschnitt 1.3). Aufgrund der Tatsache, dass es bisher nur wenige Daten zu den zellulären sekundären Schädigungsmechanismen gibt, liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Erforschung von Botenstoffen und zellulären Mechanismen, die diese Kaskaden in humanem Plakodengewebe unterhalten. Dabei sollen in strukturell charakterisierten Gewebeproben, die während der primären, postnatalen Operation der Myelomeningozelen in der Klinik für Neurochirurgie am USKH Kiel gewonnen wurden, mögliche Mediatoren mit inflammatorischem und neuroprotektivem Potential, die in sekundären Schadenskaskaden nach traumatischen Rückenmarkverletzungen (siehe Abschnitt 1.3), aber auch während der Rückenmarkentwicklung eine Rolle spielen, identifiziert werden (Zytokine und ihre Rezeptoren). In diesem Zusammenhang sollen mögliche Ansatzpunkte für zukünftige, die operativen und rekonstruktiven Therapieoptionen ergänzende Maßnahmen demonstriert werden.

1.1 Epidemiologische Daten

Die Inzidenz der Neuralrohrdefekte beträgt 0,1-5 pro 1000 Lebendgeburten weltweit, wobei die Spina bifida als eine der häufigsten Fehlbildungen des ZNS mit einer Inzidenz von 0,5-3,5 pro 1000 Lebendgeburten weltweit auftritt (2, 3).

Die Variabilität der Inzidenz von dysraphischen Fehlbildungen ist groß, in Abhängigkeit von ethnischer Herkunft, Geographie und aktuellen Umweltbedingungen.

Die höchsten Inzidenzraten für Neuralrohrdefekte werden in Großbritannien mit einer Inzidenz von 2,4-3,8 pro 1000 Lebendgeburten und in Irland mit einer Inzidenz von 5 pro 1000 Lebendgeburten verzeichnet. In Kontinentaleuropa hingegen liegt die Inzidenz lediglich bei 0,1-0,6 pro 1000 Lebendgeburten. Das höchste Risiko für das Auftreten von Neuralrohrdefekten findet man bei „Hispanics“, wohingegen Afroamerikaner und Asiaten selten erkranken (2, 3). Einen nicht zu unterschätzenden Faktor stellt hierbei auch die relativ hohe Abortrate nach Diagnosestellung während der Schwangerschaftsvorsorge in nicht-katholischen Ländern dar. Zudem wurde das Vorkommen von Neuralrohrdefekten durch die prophylaktische Einnahme von Folsäure in westlichen Ländern reduziert (4).

Im Hinblick auf die Myelomeningozele kommt diese Fehlbildung in Deutschland bei einer von 2000 Lebendgeburten vor (5). Die Eltern eines Kindes mit Spina bifida haben ein erhöhtes Risiko von 5 % für die Geburt eines weiteren Kindes mit einer dysraphischen Fehlbildung und 15 % für die Geburt eines dritten Kindes mit einem Neuralrohrdefekt (3).

1.2 Embryologische Entwicklung

Die Neuralrohrdefekte beinhalten eine heterogene Gruppe von Krankheitsbildern. Diese können einerseits durch eine nicht abgeschlossene Neurulation, andererseits durch einen unvollständigen Verschluss einer oder mehrerer Hüllen des Neuralrohrs zustande kommen. Dabei werden meistens Teile des Neuralrohrs an der Körperoberfläche exponiert. Die Unterteilung erfolgt in vier Gruppen: die offene Neuralplatte (Anenzephalie), das externalisierte Neuralrohr (Enzephalomeningozele, Myelomeningozele), externalisierte Meningen (kraniale und spinale Meningozelen), offensichtlicher skelettaler Defekt (Cranium bifidum occultum und Spina bifida occulta) (4).

Die kritische Phase für die Entstehung einer Dysraphie liegt dabei in der sehr frühen Embryonalentwicklung (18. bis 30. Tag), also in einem Zeitraum, in dem viele Frauen noch nicht wissen, dass sie schwanger sind. Im Folgenden werden die wesentlichen Schritte der Neurulation, die für das Verständnis von Dysraphien essentiell sind, kurz zusammengefasst.

Die Neurulation unterteilt sich in zwei Abschnitte. Die primäre Neurulation umfasst die folgenden vier Stadien: Entstehung der Neuralplatte, Ausgestaltung der Neuralplatte, Krümmung der Neuralplatte, Verschluss der Neuralrinne. Der sekundäre Teil der Neurulation beinhaltet eine Zellaggregation am kaudalen Teil des Neuralrohrs zur Bildung eines Markkanals, der eine Verbindung mit dem Hauptneuralrohr herstellt (4).

Die Entstehung der Neuralplatte wird am 18. Tag während der Embryogenese induziert. Dabei verdickt sich das Ektoderm und die neuroektodermalen Zellen der sich entwickelnden Neuralplatte wachsen und durchlaufen dabei eine Pseudoschichtenbildung. Die Neuralplatte wird ausgestaltet, indem diese rostrokaudal verlängert, mediolateral verschmälert und apikobasal verdickt wird. Zusätzlich wird die Neuralplatte dadurch modifiziert, dass sich in der Mittellinie die Chorda dorsalis bildet und die neuroepithelialen Zellen kleiner und keilförmig werden. Anschließend kommt es zur Krümmung der Neuralplatte. Dieser Vorgang beginnt während der zweiten Phase der primären Neurulation und beinhaltet mehrere morphogenetische Veränderungen. Dazu zählen die Entstehung von Angelpunkten („Hinge points“ HP), die für den formenden Prozess, die Entstehung der Neuralfalten und die Verschmelzung der Neuralfalten zuständig sind. Bei den Angelpunkten handelt es sich um Zellen der Neuralplatte, die sich selektiv am angrenzenden Gewebe des Notochords verankern. Es entstehen ein Angelpunkt in der medialen Linie (MHP) und zwei in der dorsolateralen Region (DLHP). Die Zellen beginnen sich keilförmig zu verformen, woraus eine longitudinale Furchung der Neuralplatte resultiert. Durch gerichteten Druck auf die Widerlager in Form der Angelpunkte kommt es zu Aufwölbungen und Einziehungen der Zellverbände, die dazu führen, dass sich eine Neuralrinne bildet. Im Bereich des späteren Hirns sind die Neuralfalten breit, da sich dort im weiteren Verlauf ein ausgedehntes Lumen entwickelt. Im Gegensatz dazu sind die Neuralfalten im Bereich des späteren Rückenmarks schmaler. Dort kommen die lateralen Wände des sich entwickelnden Neuralrohrs in Kontakt mit der Mittellinie. Dadurch kommt es zur Bildung eines schlitzförmigen Lumens. Das vierte Stadium der primären Neurulation beinhaltet die Fusion der Neuralfalten. Das nicht neuronale Ektoderm (späteres Oberflächenektoderm) löst sich vom Neuroepithel und verschmilzt mit dem späteren Oberflächenektoderm der gegenüberliegenden Neuralfalte. Die neuroepithelialen Schichten verschmelzen und formen die Deckplatte des Neuralrohrs (siehe Abbildung 2). Zuletzt verschließen sich der Neuroporus cranialis und der Neuroporus caudalis. Die Neurulation ist ein multifaktorieller Prozess, der von intrinsischen und extrinsischen Faktoren beeinflusst wird. Die intrinsischen Antriebskräfte sind vorrangig für die Formung der Neuralplatte durch Veränderungen der Zellform und -position und die Regulierung der Anzahl der Neuroepithelzellen verantwortlich (4).

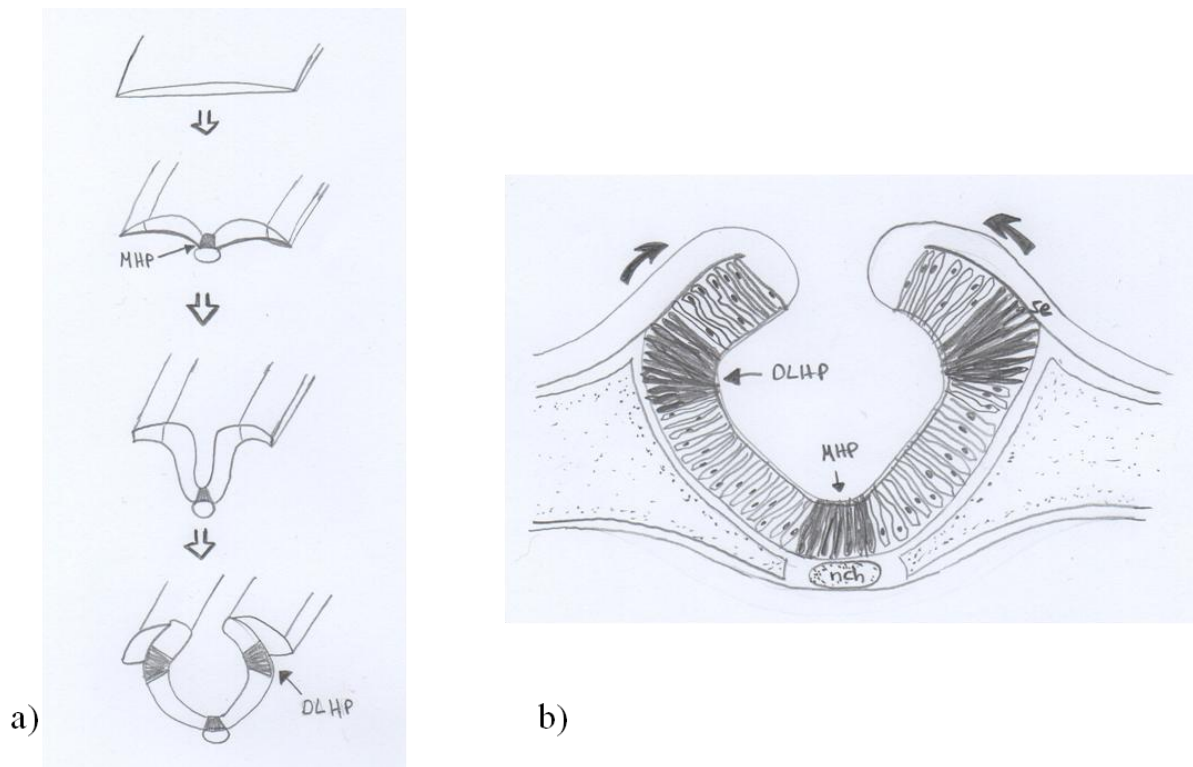


Abbildung 2

Morphogenetische Ereignisse während der Neurulation am Beispiel von Hühnern.

- a) *Formung, Faltung, Erhebung und Verschmelzung der Neuralplatte auf der Höhe des späteren Mittelhirns/Rhombenzephalons*
- b) *Darstellung des Angelpunkte-Modells („Hinge Points“). Die Neuroepithelzellen in den entsprechenden Bereichen werden keilförmig (schwarz). DLHP = dorsolateral hinge point; MHP = median hinge point; nch = notochord, se = surface ectoderm.*
(aus „Clinical Neuroembryology“; ten Donkelaar, Lammens, Hori, 2006)

1.3 Pathologie

Bezüglich der Pathogenese der Myelomeningozele geht man von einem zweiphasigen Schädigungsverlauf des Plakodengewebes in utero aus. Sonographische Untersuchungsreihen dokumentierten bei Feten mit einer Myelomeningozele einen sukzessiven Verlust von primär nachweisbaren Extremitätenbewegungen während der späten Schwangerschaft (6). In tierexperimentellen Untersuchungen zur Myelomeningozele war diese Beobachtung reproduzierbar und ging mit histologischen Veränderungen des Plakodengewebes während der weiteren fetalen Entwicklung einher. Ergänzt wurden diese Beobachtungen durch den Nachweis einer direkt toxischen Wirkung von Amnionflüssigkeit auf nervales Gewebe (7).

Durch histologische Analysen konnte demonstriert werden, dass embryonales humanes Plakodengewebe aus dem frühen fetalen Stadium tatsächlich eine weitestgehend normale Differenzierung aufzuweisen scheint (8). Basierend auf diesen Beobachtungen formulierte Heffez die „Two-Hit“-Hypothese (7), nach der die primäre Neurulationsstörung („first hit“) durch intrauterine sekundäre Verletzungen der Plakode während der anschließenden weiteren fetalen Entwicklung bis zur Geburt („intrauterine spinal cord injury“ = „second hit“) verkompliziert wird. Die primäre Neurulationsstörung führt dazu, dass das Rückenmark offen an der Körperoberfläche zu liegen kommt (siehe Abbildung 3).

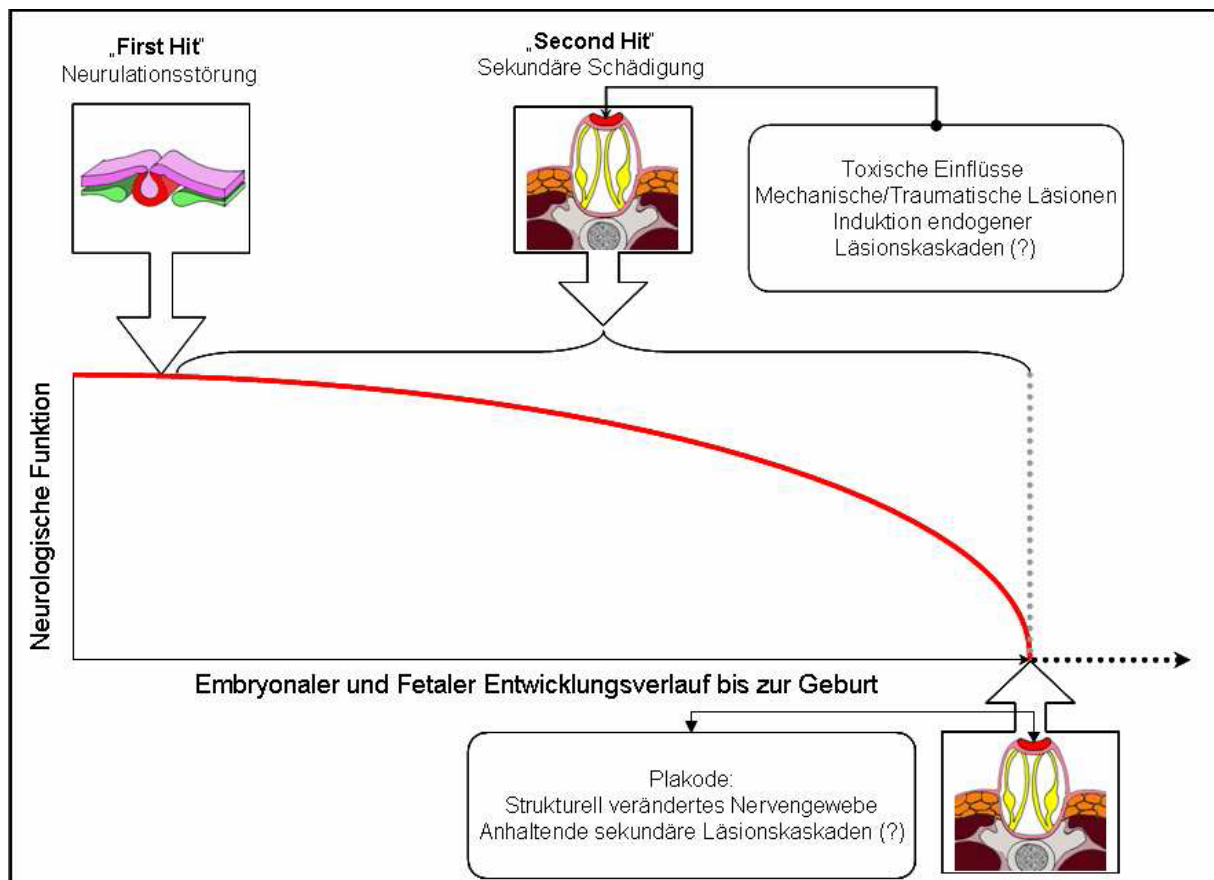


Abbildung 3

Schematische Darstellung der „Two-Hit“-Hypothese mit der erweiterten Fragestellung nach anhaltenden sekundären Läsionskaskaden (Knerlich-Lukoschus, 2012).

Stiefel et al. haben erstmals diesen postulierten zweiphasigen intrauterinen MMC-Verlauf in einem genetischen Maus-Modell-Versuch, bei dem spontan ohne äußere Manipulationen Myelomeningozelen auftreten, nachweisen können. In embryonalen und frühen fetalen Stadien waren die neuronalen Strukturen im Plakodengewebe der Mäuse zunächst normal entwickelt und die Tiere akquirierten parallel regelrechte neurologische Funktionen.

Im weiteren Entwicklungsverlauf kam es dann sekundär zu einem Verlust der primär vorhandenen neurologischen Funktionen und neuronalen Zellen in der Plakode und den angrenzenden nervalen Strukturen (9, 10).

In histologischen Analysen von humanem MMC-Gewebe wurde nachgewiesen, dass das Plakodengewebe von der zellulären Struktur her gliotisch, teilweise nekrotisch verändert war und oft eine starke inflammatorische Komponente aufwies (10, 11). Es ergaben sich außerdem Hinweise auf einen sekundären neuronalen Zellverlust mit apoptotischem Zelltod und spinaler Atrophie neben rein strukturellen Veränderungen wie beispielsweise der Reduktion dorsaler Elemente im Sinne fehlerhafter dorsoventraler Entwicklungsmuster (12). Weitere histologische Untersuchungen im Tierversuch wiesen eine stark ausgeprägte Astrozytose auch in Rückenmarkabschnitten rostral der Neurulationsstörung nach, welche als mögliche Ursache für einen „Tethering“-Mechanismus des Rückenmarks im Rahmen der sekundären Gewebetraumatisierungen interpretiert werden kann (13). Zusammenfassend liegen damit den Myelomenigozele-assoziierten klinischen Folgen komplexe Mechanismen zugrunde, die sich nicht ausschließlich auf die primäre Neurulationsstörung zurückführen lassen und hinsichtlich therapeutischer Optionen ein hohes Verbesserungspotential bergen.

In unserer Hypothese gehen wir davon aus, dass es zu einem „Third Hit“ kommt (siehe Abbildung 4). Das heißt, dass durch die Traumatisierung des Plakodengewebes wie nach einem Neurotrauma Läsionskaskaden induziert werden, die auch über die Geburt hinaus anhaltend zur sekundären Schädigung führen beziehungsweise die nervale Mikroumgebung entscheidend mit beeinflussen.

Neben diesen histologischen Untersuchungen zur Struktur von Plakodengeweben gibt es bisher keine Untersuchungen zur Identifizierung der Mediatoren beziehungsweise zellulären Mechanismen, die der sekundären Schädigungskaskade in MMC-Geweben zugrunde liegen. Basierend auf den Forschungen von Knerlich-Lukoschus et al. (14-17) zu den sekundären Schädigungsmechanismen nach traumatischen Gehirn- und Rückenmarkläsionen sollte durch die vorgelegte Arbeit überprüft werden, ob insbesondere Zytokine auch eine Rolle als Botenstoffe in den traumatischen Schadenskaskaden des Plakodengewebes spielen.

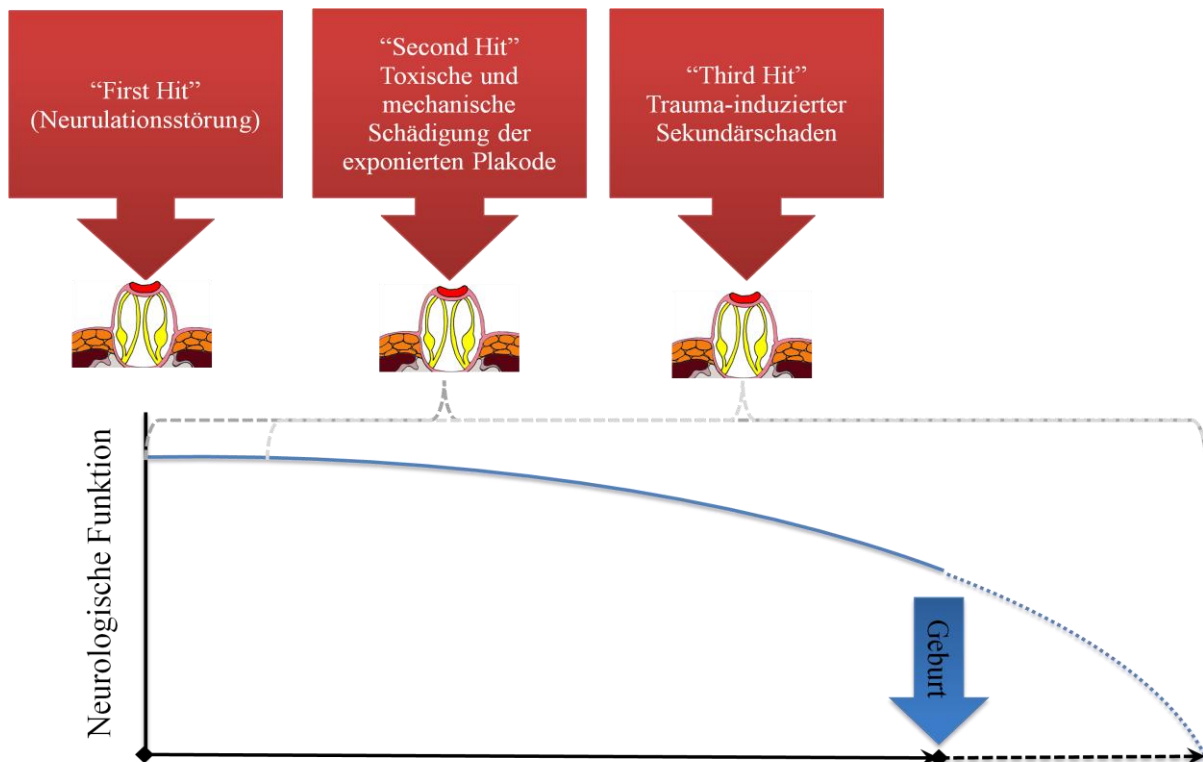


Abbildung 4

Schematische Darstellung der „Three-Hit-Hypothese“:

Multifaktorielle Schädigung der Plakode während der intrauterinen Entwicklung und darüber hinaus, was zu einem progredienten neurologischen Funktionsverlust führen kann.

1.3.1 Mediatoren der posttraumatischen Inflammation: Zytokine und ihre Rezeptoren

Traumatische Schädigungen des Rückenmarks und des Gehirns induzieren eine Kaskade von zellulären, molekularen und metabolischen Prozessen, die in ihrer Gesamtheit unter dem Begriff des „Sekundärschadens“ zusammengefasst werden. Diese Schadenskaskaden führen im weiteren Verlauf nach dem Primärschaden zu einem sukzessiven Untergang funktionsfähiger Zellen und anhaltendem Funktionsverlust (7, 8). Dabei spielen inflammatorische Mechanismen eine wesentliche Rolle (14-17). Getragen werden diese Prozesse durch unterschiedliche Botenstoffe, wobei den so genannten Zytokinen eine Schlüsselfunktion zukommt (14, 15).

Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Polypeptiden (klassifiziert als Proteine, Peptide oder Glykoproteine), die von unterschiedlichen Zelltypen sezerniert werden und klassischerweise als Aktivatoren des Immunsystems und Initiatoren der inflammatorischen zellulären Antwort identifiziert wurden (18). Jedes Zytokin hat dabei seine Rezeptoren, über die teilweise sehr komplexe intrazelluläre Signalkaskaden induziert werden. Die Zytokinrezeptoren werden in sieben Rezeptorfamilien unterteilt, deren Ligation pleiotrope, redundante, synergistische und/oder antagonistische Wirkungen hervorrufen kann. Die Bindung von Interleukin-1-beta führt beispielsweise zu einer Inflammation, während Interleukin 10 antiinflammatorisch wirkt (siehe Tabelle 1) (18).

Tabelle 1

Auflistung der Zytokinrezeptoren

(zusammengestellt aus „Grundwissen Immunologie“; Schütt, Bröker; 2011)

	Bezeichnung Zytokinrezeptoren	Beispiele Liganden
Gruppe 1	Hämatopoetin-Rezeptorfamilie	EPO, IL-2-5, IL-7, IL-9
Gruppe 2	Interferon-Rezeptorfamilie	IL-10, IFN α
Gruppe 3	TNF-Rezeptorfamilie (death receptors)	TNF α , CD 27, CD 30
Gruppe 4	Immunglobulin-Rezeptorfamilie	IL-1b
Gruppe 5	Tyrosinkinase-Rezeptoren	M-CSF
Gruppe 6	Serin-/Threoninkinase-Rezeptoren	TGFb
Gruppe 7	Chemokin-Rezeptoren	CCL 18, CXCL 12

Im Sinne ihrer „traditionellen“ Rolle als Organisatoren des Immunsystems sind Zytokine unter anderem auch im ZNS für die Rekrutierung und Chemotaxie von Leukozyten in den Entzündungsherd von wesentlicher Bedeutung. Inzwischen ist darüber hinaus eine Vielzahl anderer Funktionsbereiche identifiziert worden, in die Zytokine als Signalmoleküle involviert sind. So haben Zytokine unter anderem in Entwicklungsprozessen des ZNS wichtige regulatorische Funktionen. Darüber hinaus wurden sie als Mediatoren von neurodegenerativen Prozessen (Alzheimer, Multiple Sklerose) identifiziert und spielen eine Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation. Zytokine sind somit auf Grund ihrer Multifunktionalität unter physiologischen und pathologischen Bedingungen in Hinblick auf den Sekundärschaden nach Läsionen im zentralen Nervensystem besonders interessant (18, 19).

Beispielsweise wird nach traumatischen kortikalen Läsionen Interleukin-1beta (IL-1beta/IL-1b) in der Penumbra induziert und ist mit sekundären Prozessen, wie zum Beispiel dem apoptotischen Zelluntergang, assoziiert (20). In Untersuchungen zur Erforschung von Zytokinen und ihren Rezeptoren in der sekundären Schadenskaskade nach spinalen Läsionen konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1-beta und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-a) in dem Läsionsrand in der Frühphase induziert wurden (20). Darüber hinaus wurden chemotaktische Zytokine (sogenannte Chemokine) wie CCL2, CCR3, SDF-1 alpha und ihre Hauptrezeptoren nicht nur früh in der primär gesetzten Läsion selbst induziert, sondern zeigten im weiteren Verlauf nach dem primären Trauma jeweils charakteristische zeitliche, anatomische und zelluläre Expressionsmuster entlang der gesamten spinalen Achse. So wurden sie unter anderem in der weißen Substanz des Rückenmarks, einer Stammzellnische des adulten ZNS, in astrozytären und neuronalen Vorläuferzellen exprimiert (14, 15). Die Zytokine waren auch im späteren Verlauf auf signifikant erhöhtem Niveau im Vergleich zu ihrer konstitutiven Nachweisbarkeit in Kontrollgeweben messbar und konnten mit klinisch relevanten Spätkomplikationen nach dem Trauma (motorisches und schmerzassoziertes Verhalten) korreliert werden (14, 16). Des Weiteren wurden durch lokale Rückenmarkläsionen, aber auch weit über das spinale Niveau hinaus, in verschiedenen Gehirnregionen Zytokine induziert, die für kognitive und schmerzrelevante Prozesse von Bedeutung sind. Beispielsweise waren CCL2/CCR2 und CCL3/CCR1 nach spinalen thorakalen Läsionen unter anderem signifikant erhöht in hippocampalen Subregionen, bestimmten Thalamuskernen und Bereichen des periaquäduktalen Graus nachweisbar (17).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass inflammatorische Zytokine und ihre Rezeptoren in zelluläre Prozesse involviert sind, die auch bei der sekundären Schadenskaskade im Plakodengewebe von Bedeutung sein könnten (Inflammation, Rekrutierung und Migration von Zellen, Angiogenese, Apoptose, Stammzelldifferenzierung, De- und Remyelinisierung, Gliose etc.). Ferner könnten sie für die Entstehung der typischen Myelomeningozele-assoziierten Langzeitkomplikationen (Tethered-Cord-Syndrom, weitergehender sekundärer Zell- und Funktionsverlust etc.) verantwortlich sein.

1.3.2 Neuroprotektive Zytokine: Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor

Neben proinflammatorischen Zytokinen werden auch Zytokine mit neuroprotektiven Eigenschaften nach unterschiedlichen ZNS-Läsionen induziert: So wurden Erythropoetin (EPO) und sein Rezeptor (EPO-R) nach traumatischen und ischämischen Einflüssen auf erhöhtem Niveau nachweisbar (21, 22).

In Untersuchungen nach spinalen Läsionen wurden Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor in unterschiedlichen anatomischen Arealen zeit- und läsionsabhängig induziert (23-26). Dieses primär für die Blutbildung essentielle Ligand-Rezeptor-Paar wird, wie mittlerweile erwiesen ist (siehe unten), nicht nur auf Erythrozytenvorläuferzellen, sondern zusätzlich auf endothelialen, neuronalen und anderen Zelltypen exprimiert (27). Entsprechend wurden für Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor multiple „nicht hämatopoetische“ Aktivitäten sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen identifiziert.

Erythropoetin ist ein Glykoprotein (bestehend aus 166 Aminosäuren) mit einer molekularen Masse von 30-34 kDa. Es weist dabei strukturelle Übereinstimmungen mit Wachstumshormonen und anderen Mitgliedern der Klasse-1-Zytokin-Superfamilie (zu der zum Beispiel Interleukine und das Thrombopoetin gehören) auf (28). Sein Rezeptor Erythropoetin-Rezeptor besteht aus einzelnen transmembranen Polypeptidsträngen, die sich nach der Aktivierung durch Erythropoetin zu einem Homodimer zusammenlagern. Seine zytoplasmatischen Domänen binden an die Janus-Kinasen (JAK)-2, die dann in den aktiven Zustand übergehen (29). Durch die Bindung von Erythropoetin an EPO-R kommt es zu einer Konformationsänderung der zytoplasmatischen Rezeptorabschnitte, wodurch zwei Janus-Kinasen eng zusammengeführt werden. Durch Transphosphorylierungen von JAK-2 und EPO-R werden komplexe Signaltransduktionskaskaden induziert (30). Dabei bestimmt das Ausmaß der EPO-R-Expression auf der Zelloberfläche die EPO-Antwort in dem jeweiligen Organ. Die Erythropoetin-Produktion wird unter anderem während Stresssituationen (Hypoxie, Ischämie) auf dem Transkriptionslevel über die „Hypoxia-inducible Factors“ (HIF) reguliert. Von besonderer Bedeutung ist dabei der Hypoxia-inducible factor-2-alpha (HIF-2-a) (21, 31). Die EPO-Produktion findet während der embryologischen Entwicklung in der Leber statt und wird noch pränatal auf die Nieren übertragen, sodass der primäre Bildungsort für Erythropoetin beim Erwachsenen in den peritubulären interstitiellen Zellen mit neuronalem Charakter in der Niere liegt (22, 32, 33).

Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor wurden auch in weiteren Organsystemen, wie beispielsweise dem ZNS, nachgewiesen (34, 35). EPO und EPO-R waren in Studien von Tsai et al. in Mausembryonen vom embryonalen Tag 7,5 (E 7,5) bis E11 im gesamten Neuralrohr nachweisbar (36). In Untersuchungen von Knerlich-Lukoschus et al. zur Entwicklung des Mittelhirns der Maus konnte unter anderem gezeigt werden, dass zum Zeitpunkt E11 EPO-R vor EPO in radialer Glia exprimiert wird, an der im späteren Verlauf der Gehirnentwicklung EPO-positive neuronale Subpopulationen nachweisbar wurden (23).

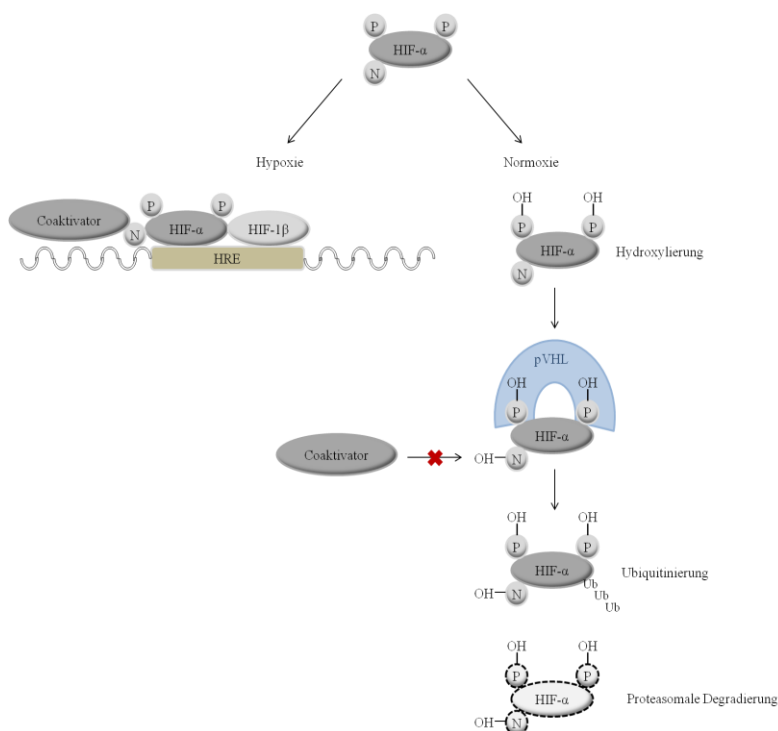
Zudem bestand eine zeitliche und räumliche Korrelation mit dem Auftreten von Apoptosebändern und dem Abnehmen beziehungsweise dem Verschwinden der EPO- und EPO-R-Expressionen. Die zeitliche Abfolge der Expressionsmuster von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor in unterschiedlichen, interagierenden Zelltypen und die zeitliche beziehungsweise räumliche Beziehung dieser Expressionsmuster zu apoptotischen Prozessen lassen den Schluss zu, dass das Ligand-Rezeptor-Paar EPO und EPO-R eine große Bedeutung für die Neurogenese und morphometrische Prozesse während der ZNS-Entwicklung hat (23). Weitere Untersuchungen von Knabe et al. zur spinalen Entwicklung zeigten ebenfalls Zusammenhänge zwischen der Erythropoetin-Rezeptor-Expression in radialer Glia, dem späteren Auftreten von EPO-positiven neuronalen Subpopulationen und von apoptotischen Prozessen parallel zu der abnehmenden EPO/EPO-R-Expression im Rückenmark (24). Dabei wurde der anti-apoptotische Effekt von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor in mehreren experimentellen Ansätzen nachgewiesen (25, 26). Ebenfalls wurde durch mehrere Studien belegt, dass Erythropoetin in der klinischen Anwendung das Potential für neuroprotektive Therapieoptionen bei neurodegenerativen und ischämischen Erkrankungen birgt (37-40). Die skizzierten Eigenschaften von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor könnten somit auch bei der Entwicklung regenerativer Therapiestrategien Neurulationsstörungen betreffend genutzt werden.

1.3.3 Transkriptionsfaktor: Hypoxia-inducible factor

Der menschliche Körper reagiert auf Hypoxie mit Anpassungen verschiedener Systeme, wie beispielweise einer gesteigerten Hämatopoese und einer verstärkten Atmung, was den Zustand einer adäquaten Sauerstoffversorgung wiederherstellen soll. Diese Veränderungen werden unter anderem durch transkriptionale Mechanismen koordiniert, nämlich den Hypoxia-inducible factors (41).

Die HIF-Familie der Transkriptionsfaktoren wurde erstmals im Zusammenhang mit der EPO-Expression beschrieben. Die EPO-Produktion wird bei hypoxischen Gewebszuständen über HIF durch eine vermehrte Transkription der Gene gesteigert (42). Besonders HIF-1 wird ubiquitär exprimiert. Zelluläre Studien haben gezeigt, dass HIFs direkt oder indirekt mehrere hundert Gene regulieren, die eine große Bandbreite von Funktionen inklusive Angiogenese, Zellwachstum, Apoptose, Stoffwechsel und Vasomotorik abdecken (41).

„Hypoxia-inducible factors“ sind Heterodimere, die aus einer Alpha- und einer Beta-Untereinheit bestehen und unter hypoxischen Bedingungen an sogenannte „hypoxia response elements“ (HRE) an bestimmten Genabschnitten binden (43). Die Beta-Untereinheit wird konstitutiv exprimiert, wohingegen die Alpha-Untereinheit sauerstoffsensitiv ist. Wenn keine Sauerstoffunterversorgung vorliegt, wird HIF durch Hydroxylierung spezifischer Aminosäurereste innerhalb der Alpha-Untereinheit inaktiviert. Die Hydroxylierung hat wiederum eine Interaktion mit dem Von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) zur Folge, welches einen Komplex mit bestimmten Ubiquitin-Ligasen bildet und letztlich zur proteolytischen Inaktivierung durch proteasomale Degradierung führt (siehe Abbildung 5) (43).



Schematische Darstellung der HIF-Aktivität unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen. HRE = Hypoxia response element; N = Asparagin; P = Prolin; OH = Hydroxylgruppe; Ub = Ubiquitin.

Abbildung 5

1.4 Diagnostik und klinische Symptomatik

Die Möglichkeiten der pränatalen Diagnostik umfassen Serumuntersuchungen, Sonographie und Magnetresonanztomographie (MRT).

Bei der Schwangerenvorsorge wird die Konzentration des Alpha-1-Fetoproteins im maternalen Serum und im Fruchtwasser erfasst, da diese unter anderem bei offenen dysraphischen Defekten ansteigt (4, 5).

Die wichtigste Säule der pränatalen Diagnostik bezüglich Neuralrohrdefekten ist die sonographische Untersuchung (siehe Abbildung 6) (4, 5). Die indirekten kranialen Zeichen sind in der Assoziation der Spina bifida mit der Chiari-Malformation Typ II begründet. Hierbei liegt eine verkleinerte hintere Schädelgrube vor, wodurch die Kleinhirntonsillen, der Hirnstamm und der vierte Ventrikel im Foramen magnum oder dem zervikalen Spinalkanal eingeklemmt werden. Die Zeichen mit einer hohen Sensitivität (ab der 16. SSW sichtbar) sind die obliterierte Cisterna magna mit einem dysplastischen Cerebellum und einer abnormalen anterioren Krümmung („Banana sign“). Frontale halbmondförmige Erosionen („Lemon sign“) treten nur bei der Hälfte der Fälle auf (bis zur 22.-24. SSW sichtbar). Ferner kann eine Ventrikulomegalie detektiert werden. Direkte Zeichen vieler Fehlbildungen werden häufig übersehen, weshalb die Detektion der indirekten Zeichen eine wesentlich bedeutendere Position einnimmt (5).

Sollte sich bei der sonographischen Untersuchung der Verdacht auf eine dysraphische Fehlbildung beim Kind ergeben, wird meist ein MRT durchgeführt, womit auch verschlossene Neuralrohrdefekte detektiert werden können (5).

Das Risiko für chromosomale Anomalien liegt bei 8-16 %. Sollten assoziierte Malformationen vorliegen, kann eine Karyotypisierung durchgeführt werden (5).

Die klinische Symptomatik ist abhängig von der Lokalisation und der Größe des Defekts. Daher können sich die motorischen Ausfälle auf das Fehlen von Reflexen beschränken oder in Form einer Tetraplegie ausgeprägt sein. Zudem können Störungen der Sensibilität und Muskelatrophien sowie Bein- und Rückenschmerzen variabler Stärke vorkommen. Die assoziierten Krankheitsbilder sind nicht zwangsläufig vorhanden und umfassen ein weites Spektrum. Dazu zählen Fuß- und Beinfehlbildungen, Hüftdysplasien, Veränderungen der spinalen Krümmung zum Beispiel in Form der Skoliose, Störungen des Urogenitaltrakts (neurogene Blase etc.), Mastdarmentleerungsstörungen und Entwicklungsstörungen der Geschlechtsorgane.

Die schwerwiegendsten Komplikationen sind der shuntpflichtige Hydrozephalus, das Tethered-Cord-Syndrom, die Chiari II-Malformation und die Syringomyelie. Durch das Auftreten dieser Komplikationen kann es zu dramatischen neurologischen Verschlechterungen kommen.

Der häufigste Grund für eine Verschlechterung des neurologischen Status ist eine Malfunktion des Shunts, mit dem der Hydrozephalus behandelt wird (44). Ein symptomatisches Tethering des Rückenmarks ist der zweithäufigste Grund für eine neurologische Verschlechterung (5). Es kommt zur Anheftung des Rückenmarks, wodurch Zugspannung auf das Rückenmark ausgelöst wird, was wiederum zu Infarkten in dem betroffenen Gebiet und dadurch zu neurologischen Defiziten führen kann (5). Bei einem symptomatischen Tethered-Cord-Syndrom sollte ein operatives Lösen des Rückenmarks, das so genannte Untethering, vorgenommen werden, da es ohne den chirurgischen Eingriff bei 60 % der Patienten innerhalb von 5 Jahren zu orthopädischen und neurologischen Verschlechterungen kommt (45). Die Chiari II-Malformation ist definiert als Herniation des Kleinhirns bei Patienten mit einer Myelomeningozele und beinhaltet komplexe Malformationen des Schädels, des Hirns, der Wirbelsäule und des Rückenmarks, die eine Einklemmung des Hirnstamms mit variablem Schweregrad nach sich ziehen können (5). Ferner führt das Vorliegen einer Chiari II-Malformation zu einer chronischen Liquorzirkulationsstörung, die wiederum die Bildung einer Syringomyelie zur Folge hat. Bei der Syringomyelie handelt es sich um eine Ausbuchtung des Rückenmarks, die sich über mindestens zwei Segmente erstreckt und in der Regel mit einer subarachnoidalen Obstruktion und einer Einschränkung des Liquorflusses einher geht. Dadurch kann es zu einer Minderversorgung des Rückenmarks mit Blut kommen. Die Syringomyelie ist im MRT als Aufweitung des Spinalkanals sichtbar. Klinisch ergeben sich diffuse Schmerzen und Sensibilitätsstörungen (5).

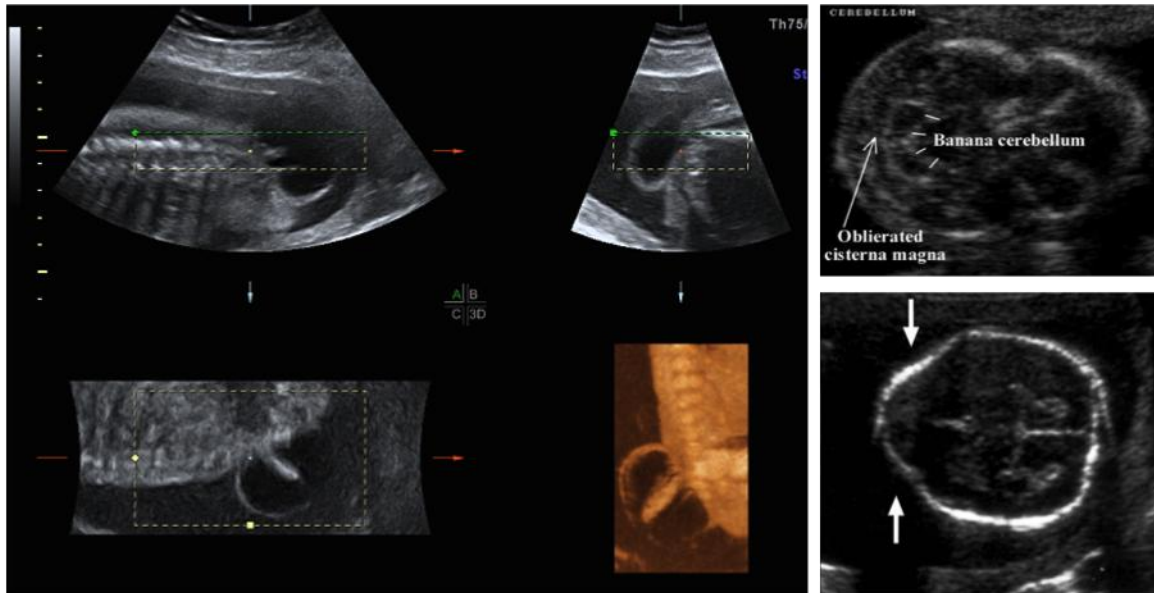


Abbildung 6

Sonographische Diagnostik einer dysraphischen Fehlbildung.

Links: Sonographie einer lumbosakralen Myelomeningozele

Rechts oben: „Banana sign“

unten: „Lemon sign“

1.5 Therapie

Die initiale Therapie der Myelomeningozele dient der schützenden Abdeckung neuraler Strukturen, der Prävention von Liquorverlust sowie der Minimierung des Infektionsrisikos und ist damit primär chirurgisch. Sie umfasst die operative Beseitigung der äußerlich störenden Fehlbildung, die Rekonstruktion eines Durasacks mit ausreichender Liquorpassage, die schonende Deckung des Rückenmarks sowie dessen Wurzeln und den liquordichten, spannungsfreien Wundverschluss. Zusätzlich zur primären Operation müssen sich die meisten Patienten lebenslang therapeutischen Interventionen (Shunt-OPs/-Revisionen bei Hydrozephalus, Reoperationen bei TCS, orthopädische Korrekturoperationen, invasive urodynamische Messungen und Schrittmacherimplantationen etc.) unterziehen. Grundsätzlich kann die chirurgische Versorgung der Myelomeningozele intrauterin zwischen der 20. und 25. Schwangerschaftswoche oder postnatal vorgenommen werden. Der intrauterine Verschluss des Neuralrohrdefekts soll die Verschlechterung des neurologischen Zustandes der Patienten durch chemische Effekte des Fruchtwassers und des Mekoniums auf das sonst exponierte neuronale Gewebe einerseits und durch das direkte mechanische Trauma während der Geburt andererseits verhindern (5).

Um die Folgen der pränatalen Myelomeningozelenreparatur besser beurteilen zu können, wurden zunächst verschiedene Studien an Tieren (Affenfeten, Schaffeten) durchgeführt. Diese ergaben, dass eine frühe operative Versorgung der MMC zu einer Normalisierung der motorischen und sensiblen Funktionen führt (46, 47). Es folgten Untersuchungen an humanen Feten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten operiert wurden, mit dem Ergebnis, dass das Auftreten eines shuntpflichtigen Hydrozephalus und einer Chiari-Malformation verringert werden konnte (48-54). Die fetalchirurgische Operationsvariante ist jedoch mit höheren Risiken bezüglich der maternalen und fetalen Morbidität und Mortalität behaftet, sodass bei der Auswahl des richtigen Operationszeitpunktes immer die Reduktion der Effekte, die durch die Myelomeningozele hervorgerufen werden könnten, gegen die Morbidität und das Frühgeburtsrisiko abgewogen werden müssen.

Trotz der durchgeführten Studien konnten keine eindeutigen Aussagen für oder gegen die fetale Operationsvariante getroffen werden, weshalb Adzick et al. eine randomisierte, multizentrische (VU, TCHP, University of California, San Francisco) Studie (MOMS= Management of Myelomeningocele Study) ins Leben riefen (55). Die primären Endpunkte beinhalteten den fetalen beziehungsweise neonatalen Tod und die Shuntpflichtigkeit nach zwölf Monaten sowie die Feststellung der mentalen Entwicklung und der motorischen Funktion unter Einbeziehung der Läsionshöhe nach 30 Monaten. Als sekundäre Endpunkte wurden unter anderem Komplikationen, die während der Operation und/oder während der Schwangerschaft auftraten, maternale, fetale und neonatale Morbidität und Mortalität, das Auftreten einer Chiari II-Malformation und der Zeitpunkt der ersten Shuntimplantation registriert. Bei den Patienten der Studiengruppe gab es gehäuft Schwangerschaftskomplikationen. Außerdem kam es in allen Fällen zu Frühgeburten (zwischen der 30.-34. Schwangerschaftswoche). Die Studienteilnehmer der Kontrollgruppe, die erst postnatal chirurgisch behandelt wurden, wurden durchschnittlich in der 37. Schwangerschaftswoche geboren. Die MOMS-Studie ergab eine Reduktion der Shuntpflichtigkeit und der Kleinhirnherniation durch die Fetalchirurgie. Allerdings ergaben sich durch die pränatale Operation mehr Tethered-Cord-Syndrome im späteren Verlauf. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass in der pränatal behandelten Studiengruppe die mentale Entwicklung signifikant besser ausfiel und der Unterschied zwischen der motorischen Funktion und dem anatomischem Level der Läsion wesentlich geringer war (55).

Diese Studien führten zur Einführung der fetalen Chirurgie in spezialisierten Zentren. Das Standardverfahren ist aber weiterhin die postnatale Versorgung. Dabei wird ein möglichst früher Verschluss (innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Geburt) der Myelomeningozele vorgenommen, da das Risiko einer Infektion und der Verlust der motorischen Funktionen stetig steigen (56).

Bei der Operation in der Klinik für Neurochirurgie (UKSH, Campus Kiel) werden zunächst die einzelnen neuralen Strukturen mikrochirurgisch identifiziert. Anschließend werden schrittweise das Neuralrohr, die Dura und der Spinalkanal auf dem Niveau der Fehlbildung rekonstruiert. Die Präparation erfolgt möglichst plakodenerhaltend, da dieses Gewebe als potentiell funktional erachtet wird. Abschließend wird die Haut plastisch geschlossen.

1.6 Zielsetzung

Bei der Entwicklung von Therapiestrategien bezüglich einer optimierten MMC-Versorgung müssen nach den bisherigen Ausführungen zwei wesentliche Aspekte berücksichtigt werden: zum einen der strukturell-anatomische des primären Neurulationsdefektes selbst, zum anderen der sekundären Läsionskaskaden und ihrer schädigenden Mediatoren, die neurale Strukturen in der Plakode sukzessive schädigen und zu einem stetigen sekundären Funktionsverlust führen. Bezüglich der zellulären Schädigungsmechanismen gibt es bisher wenige Daten und entsprechend lag der Fokus der vorgelegten Arbeit auf der Erforschung von Botenstoffen und zellulären Mechanismen, die diese Kaskaden in humanem Plakodengewebe unterhalten könnten (siehe Abbildung 7).

Konkret sollte daher

1. das postpartal, während der neurochirurgischen Versorgung durch unsere Institution entnommene MMC-Gewebe, anatomisch, durch immunhistochemische Färbungen mit strukturellen Antikörpern charakterisiert werden.
2. durch qualitative und semiquantitative immunhistochemische Analysen untersucht werden, ob und wie stark spezielle inflammatorische Botenstoffe (proinflammatorische Zytokine), die während neurotraumatischer Veränderungen im zentralen Nervensystem eine Rolle spielen, auch im Plakodengewebe induziert werden.
3. untersucht werden, ob in der Plakode auch neuroprotektive Zytokine (Epo, EpoR), die während der Entwicklung des ZNS eine Rolle spielen, nachweisbar sind.
4. mit Mehrfachmarkierungen die entsprechenden Zelltypen identifiziert werden, die die zu untersuchenden Zytokine exprimieren (Erstellen der zellulären Expressionsprofile).
5. die histologischen Analysen (quantifizierte Immunreaktivitäten) ergänzt beziehungsweise soweit möglich mit klinisch relevanten Daten bezüglich des jeweiligen Ausgangs- und Verlaufsbefundes korreliert werden.

Diese Untersuchungen sollten zum tieferen Verständnis sekundärer Veränderungen in spinalen Neuralrohrdefekten beitragen, die das funktionelle „Outcome“ beeinflussen und potentielle Ansätze für die Entwicklung zukünftiger innovativer Therapiestrategien liefern.

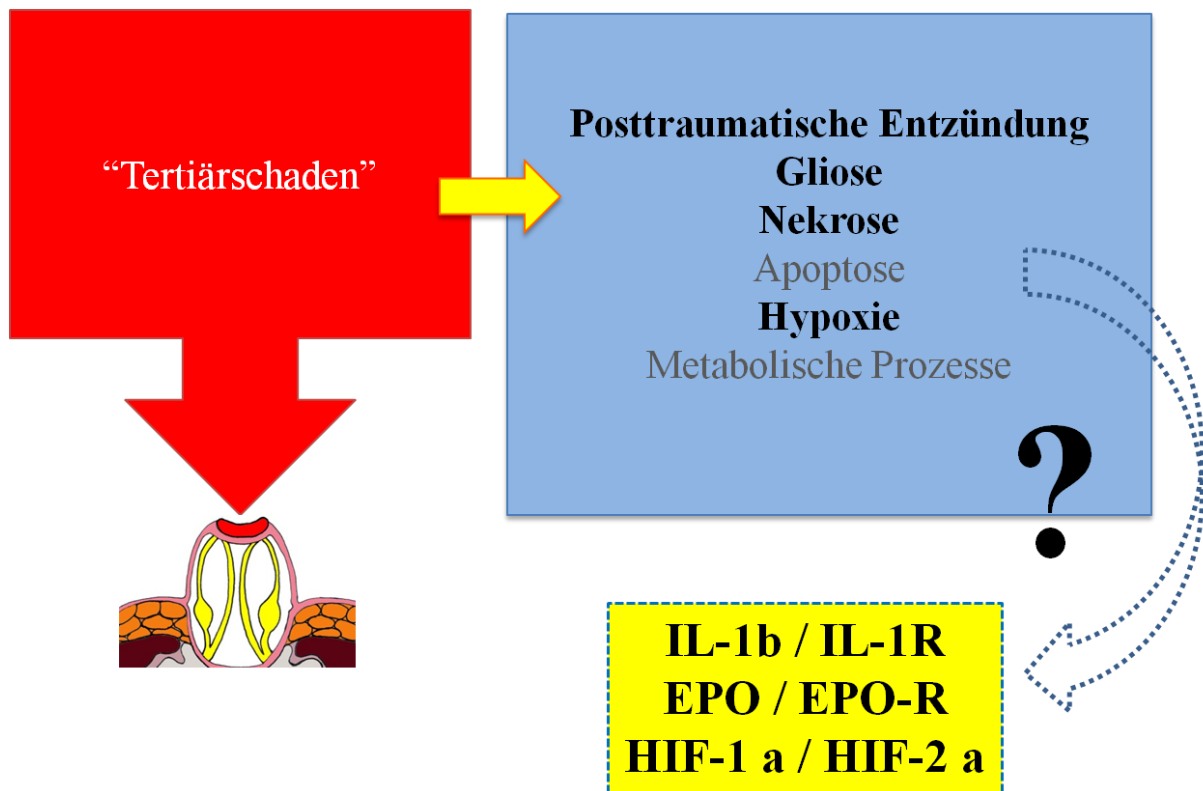


Abbildung 7

Schematische Darstellung der Kernfrage der vorliegenden Arbeit.

2 Material und Methoden

Es wurden im Vorfeld zunächst 17 MMC-Gewebeblöcke aus dem neuropathologischen Repertoire der hiesigen Neurochirurgie von 1993 bis 2015 herausgefiltert, in denen nervalles Gewebe sicher nachweisbar war. Da bei dem hiesigen MMC-Operationsregime die Plakoden nicht komplett reseziert werden, war eine entsprechende Vorselektion notwendig. Dabei wurde Gewebe gewählt, das innerhalb von 72 Stunden nach der Geburt bei der MMC-Operation als Probe entnommen wurde. Von den ausgewählten Fällen wurden 6 µm dicke Serienschnitte angefertigt, die dann zunächst mit etablierten strukturellen Markerantikörpern (Glial fibrillary acidic protein = GFAP, Synaptophysin = SYN, Epithelial membrane antigen = EMA, Smooth muscle actin = SMA, Human melanoma black 45 = HMB45, Vimentin = VIM, Panzytokeratin = CK Pan, Neurofilament 200kD= NF 200kD, Neuronal nuclei = NeuN, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase = CNPase, Cluster of differentiation 11b = CD11b, Cluster of differentiation = CD68) immunhistochemisch gefärbt und anschließend qualitativ sowie semiquantitativ ausgewertet wurden. Parallel wurden relevante klinische Daten erhoben und die individuellen klinischen Verläufe herausgearbeitet. Danach wurden die Färbungen bezüglich der Zytokine Interleukin-1-beta und Erythropoetin sowie deren entsprechende Rezeptoren für weitere qualitative und semiquantitative (densitometrische) Analysen etabliert. Weiterhin wurde die Immunreaktivität von Hypoxia-inducible factor 1/2-alpha im Zusammenhang mit der EPO-Expression untersucht. Je nach Befund wurden die Expressionsmuster der Zytokine durch entsprechende Mehrfachimmunfluoreszenzmarkierungen spezifischen Zelltypen zugeordnet.

2.1 Entparaffinierung

Da es sich beim Plakodengewebe um humanes Gewebe handelt, das zur Haltbarmachung und späteren Bearbeitung in Paraffin eingebettet wurde, mussten die Schnitte vor den Färbungen entparaffiniert werden.

2.1.1 Ablauf der Entparaffinierung

Zunächst wurden die Paraffinschnitte in Xylol gewaschen (zweimal, je 5 Min). Anschließend wurden die Schnitte mit einer absteigenden Ethylalkoholreihe behandelt (zweimal 100 %, zweimal 96 %, je 2 Min). Danach wurden die Schnitte für 10 Minuten in eine Methanol-H₂O₂ (30 %)-Mischung eingelegt. Es folgte die Fortsetzung der absteigenden Ethylalkoholreihe (zweimal 96 %, zweimal 70 %, je 2 Min). Nach zweimaligem Waschen in Aqua dest. (je 2 Min) wurden die Schnitte in einen mit Citratpuffer gefüllten Schnellkochtopf (Elo 99389 Praktika, Spabrücken, Deutschland) (Dampfstufe 2) gelegt und bei höchster Hitze für zwei Minuten gekocht. Abschließend wurden die Schnitte umgehend in eine mit Aqua dest. gefüllte Küvette umgebettet und für 20 Minuten stehen gelassen.

Tabelle 2

Bei der Entparaffinierung verwendeter Puffer

Pufferlösung:	Citratpuffer (pH 6,0) 9 ml Stammlösung A (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>): 0,1 M Zitronensäure (= 21,01 g C ₆ H ₈ O ₇ xH ₂ O in 1000 ml Aqua dest.) 41 ml Stammlösung B (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>): 0,1 M Natriumcitrat (= 29,41 g C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ x2H ₂ O in 1000 ml Aqua dest.) gelöst in 450 ml Aqua dest.
---------------	--

2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Identifizierung der neuronalen Anteile der Plakoden und zur Erstellung der Gewebeatlantanten zur späteren genaueren Charakterisierung des Myelomeningozelengewebes durch die immunhistochemischen Färbungen wurden alle Fälle mit Hämatoxylin und Eosin modifiziert nach McManus et al. gefärbt (57). Zusätzlich wurden gesunde Rückenmarkpräparate und entzündete Hirnschnitte nach demselben Protokoll gefärbt.

2.2.1 Färbeablauf

Nach der Entparaffinierung (siehe 2.1.1) wurden die Schnitte zunächst bei Raumtemperatur (RT) mit frischem depolymerisiertem Paraformaldehyd (4 %) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) fixiert (30 Min). Nach dem Waschen mit PBS (zweimal, je 10 Min) erfolgte die Kernfärbung in Hämatoxylin (5 Min) und ein kurzes Eintauchen in ein Alkohol-Essigsäuregemisch. Dann wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gebläut (5 Min). Die Gegenfärbung wurde mit Eosin (0,1 %) gelöst in Aqua dest. vorgenommen (1 Min). Das überschüssige Eosin wurde mittels Aqua dest. (zweimal, je 2 Min) entfernt. Anschließend folgte die Dehydratation mit einer aufsteigenden Ethylalkoholreihe (zweimal 96 %, zweimal 100 %, je 2 Min). Zuletzt wurden die Schnitte in Xylol gewaschen (zweimal, je 5 Min), eingebettet (Eukitt®, Merck) und mit den passenden Deckgläschen versehen.

Tabelle 3

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung verwendete Puffer und Färbelösungen (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Fixierlösung:	Paraformaldehyd (4 %) in PBS
Färbelösungen:	Hämatoxylin: 1 g Hämatoxylin 50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecyhydrat reinst 0,2 g Kaliumjodat in 1000 ml Aqua dest. lösen 5 ml 25 %-ige Salzsäure Eosin: 1 g Eosin in 1000 ml Aqua dest. lösen
Pufferlösung:	PBS (= phosphatgepufferte Kochsalzlösung) (pH 7,4): 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat) x 7H ₂ O 1,4 KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat) gelöst in Aqua dest.

2.3 Gewebeatlant

Zur Differenzierung der unterschiedlichen Gewebetypen und zur Reproduzierbarkeit der Färbegergebnisse wurden die histologischen Schnitte, die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt worden waren, abgezeichnet, die verschiedenen Gewebetypen gekennzeichnet und besonders die neuronalen Bereiche hervorgehoben.

2.4 Immunhistochemie

Zum Nachweis der verschiedenen Gewebetypen innerhalb der Plakoden wurden immunhistochemische Färbungen mit kommerziell erhältlichen Antikörpern durchgeführt. Bei der Verwendung von Antikörpern einer bestimmten Spezies kann es zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Kreuzreaktionen mit Serumproteinen anderer Spezies kommen. Daher wird eine Präadsorption der Antikörper gegen bestimmte Serumproteine anderer Spezies vorgenommen, um die möglichen Kreuzreaktionen zu minimieren. Im Rahmen der Präadsorption gegen nahe verwandte Spezies kann die Epitoperkennung der Antikörper zum Teil stark reduziert sein. Daher wurden zunächst Kontrollfärbungen durchgeführt, um die Antikörper zu überprüfen. Für die Charakterisierung der histologischen Schnitte wurden Immunfärbungen nach der Histofine®-Komplex-Methode vorgenommen und zur Überprüfung der Zytokinexpression wurden Immunfärbungen nach der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode durchgeführt (58). Um die zelluläre Lokalisation der Zytokine darzustellen, schlossen sich daran Doppel- und Tripleimmunfluoreszenzfärbungen an. Als Zellmarker wurden bei den Färbungen monoklonale und polyklonale Antikörper gegen spezifische Zellstrukturproteine (siehe Tabellen 5 und 6) verwendet.

2.4.1 Ablauf der Immunfärbung mit Histofine® Simple Stain

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert (siehe Punkt 2.1.1) und in frischem depolymerisiertem Paraformaldehyd (4 %) in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) bei Raumtemperatur für 30 Minuten fixiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS (je 5 Min) erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur beziehungsweise entsprechend den Anforderungen der jeweiligen Primärantikörper.

Im Anschluss daran wurden die Schnitte in Aqua dest. (2 Min) und TBS (dreimal, je 5 Min) gewaschen. Nachdem die Schnitte gründlich vom restlichen Puffer befreit worden waren, erfolgten die tropfenweise Zugabe von Histofine[®] Simple Stain und die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Schnitte erneut in TBS gewaschen (dreimal, je 5 Min) und anschließend mit AEC bedeckt, für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und mit Aqua dest. gewaschen (2 Min). Die Kernfärbung wurde mit Hämalaun (5 Min) und die folgende Bläuung unter fließendem Leitungswasser (5 Min) durchgeführt. Abschließend wurden die Schnitte mit Aqua dest. gewaschen (2 Min) und in ein spezielles Medium (Aquatex[®], Merck, Darmstadt, Deutschland) und die passenden Deckgläschen eingebettet.

2.4.2 Ablauf der Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert (siehe Punkt 2.1.1) und mit frischem depolymerisiertem Paraformaldehyd (4 %) für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Darauf folgte zweimaliges Waschen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (je 1 Min) und der Transfer in eine mit TritonX-100 (0,3 %)- H₂O₂ (3 %)-Mischung gefüllte Küvette mit 30-minütiger Inkubation. Anschließend wurden die Schnitte erneut in PBS gewaschen (zweimal, je 10 Min). Danach wurden die Schnitte mit 10 %-igem Serum (je nach Ursprungstier der sekundären Antikörper) benetzt, wobei durch 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur die unspezifischen Bindungen blockiert wurden. Ohne erneutes Waschen wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper, der in TritonX-100 (0,3 %) und 2 %-igem Blockierungsserum verdünnt wurde, bei 4°C für 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst in PBS gewaschen (zweimal, je 10 Min) und dann mit dem sekundären biotinylierten Antikörper (verdünnt 1:200 in PBS und 1,5 %-igem Blockierungsserum) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der 60 Minuten erfolgte das zweimalige Waschen in PBS (je 10 Min) und die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectorstain-Elite-ABC-Kit) für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte zweimalig in PBS gewaschen (je 10 Min) und mit der Diaminobenzidin (55)-Färbelösung versehen. Die DAB-Färbereaktion wurde nach 4 Minuten mit Leitungswasser gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun für 30-60 Sekunden. Um das Hämalaun von den Schnitten zu entfernen, wurden diese für 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt.

Des Weiteren wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethylalkoholreihe dehydriert (70 %, 80 %, 95 %, 100 %, je 1 Min) und in Xylol gewaschen (dreimal, je 10 Min). Abschließend wurden die Schnitte mit einem Eindeckmedium (Roti®-Mount) und den passenden Deckgläschen versehen.

2.4.3 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte (siehe Punkt 2.1.1). Anschließend wurden die Schnitte in einer Aceton-Methanol(1:1)-Mischung (-20° C) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und dreimalig in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween 20 (TBST) gewaschen (je 10 Min). Als nächstes wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethylalkoholreihe (20 %, 70 %, je 2 Min) dehydriert. Die Kontrastfärbung wurde mit Sudanschwarz (1 % in 70 %-igem Ethanol) für 10 Minuten vorgenommen. Darauf folgte die Rehydrierung durch das Schwenken in 70 %-igem Ethanol und die Einlage in 20 %-igem Ethanol für 2 Minuten. Danach wurden die Schnitte in TBST gewaschen (dreimal, je 10 Min). Die Blockierung erfolgte für 60-80 Minuten bei Raumtemperatur durch 0,1 % BSA-0,2 % Glycin verdünnt in TBS. Im Anschluss daran wurde der in TBST verdünnte primäre Primärantikörper auf die Schnitte getropft und diese für 24 Stunden bei 4° C inkubiert. Danach erfolgten sämtliche Arbeitsschritte im abgedunkelten Labor. Am zweiten Tag wurden die Schnitte zunächst dreimal in TBST gewaschen (je 10 Min) und dann mit dem fluoreszierenden sekundären Primärantikörper verdünnt in TBST für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST (je 10 Min) wurde der in TBST verdünnte, primäre Sekundärantikörper aufgetropft und die Schnitte bei 4° C für 24 Stunden inkubiert. Der dritte Tag begann mit dem Waschen der Schnitte in TBST (dreimal, je 10 Min) und dem Markieren ebenjener mit dem in TBST verdünnten, fluoreszierenden sekundären Sekundärantikörper und der Inkubation für eine Stunde bei 37° C. Anschließend wurden die Schnitte erst in TBST (einmal 10 Min) und dann in TBS gewaschen (zweimal, je 10 Min). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI verdünnt in TBS (1:30000) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die abschließende Waschung wurde mit TBS durchgeführt (dreimal, je 10 Min). Vor dem Einbetten in das entsprechende Medium (Immomount) und der Abdeckung mit den passenden Deckgläschen wurden die Schnitte in Aqua dest. geschwenkt.

2.4.4 Tripleimmunfluoreszenzfärbung

Zuerst erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte (siehe Punkt 2.1.1). Anschließend wurden die Schnitte in einer Aceton-Methanol(1:1)-Mischung (-20° C) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und dreimalig in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween 20 (TBST) gewaschen (je 10 Min). Als nächstes wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethylalkoholreihe (20 %, 70 %, je 2 Min) dehydriert. Die Kontrastfärbung wurde mit Sudanschwarz (1 % in 70 %-igem Ethanol) für 10 Minuten vorgenommen. Darauf folgte die Rehydrierung durch das Schwenken in 70 %-igem Ethanol und die Einlage in 20 %-igem Ethanol für 2 Minuten. Danach wurden die Schnitte in TBST gewaschen (dreimal, je 10 Min). Die Blockierung erfolgte für 60-80 Minuten bei Raumtemperatur durch 0,1 % BSA-0,2 % Glycin verdünnt in TBS. Im Anschluss daran wurde der in TBST verdünnte primäre Primärantikörper und der primäre Sekundärantikörper auf die Schnitte getropft und diese für 24 Stunden bei 4° C inkubiert. Danach erfolgten sämtliche Arbeitsschritte im abgedunkelten Labor. Am zweiten Tag wurden die Schnitte zuerst dreimal in TBST gewaschen (je 10 Min) und dann mit dem fluoreszierenden sekundären Primärantikörper und sekundären Sekundärantikörper verdünnt in TBST für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST (je 10 Min) wurde das entsprechende Fab-Fragment in TBST verdünnt aufgetragen und bei Raumtemperatur für eine Stunde belassen. Danach wurden die Schnitte erneut in TBST gewaschen (dreimal, je 10 Min). Anschließend wurde der in TBST verdünnte, primäre Tertiärantikörper aufgetropft und die Schnitte bei 4° C für 24 Stunden inkubiert. Der dritte Tag begann mit dem Waschen der Schnitte in TBST (dreimal, je 10 Min) und dem Markieren ebenjener mit dem in TBST verdünnten, fluoreszierenden sekundären Tertiärantikörper und der Inkubation für eine Stunde bei 37° C. Anschließend wurden die Schnitte erst in TBST (einmal 10 Min) und dann in TBS gewaschen (zweimal, je 10 Min). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI verdünnt in TBS (1:30000) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die abschließende Waschung wurde mit TBS durchgeführt (dreimal, je 10 Min). Vor dem Einbetten in das entsprechende Medium (Immomount) und der Abdeckung mit den passenden Deckgläschen wurden die Schnitte in Aqua dest. geschwenkt.

Tabelle 4

Bei den immunhistochemischen Färbungen verwendete Puffer und Reagenzien

Pufferlösungen:	<p>PBS (= phosphatgepufferte Kochsalzlösung) (pH 7,4): 137 mM NaCl (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>) 2,7 mM KCl (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>) 4,3mM Na₂HPO₄ (Dinatriumhydrogenphosphat) x 7H₂O (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>) 1,4 KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat) gelöst in Aqua dest.</p> <p>TBS (Tris-Buffered-Saline) (= Tris-gepufferte Kochsalzlösung; TRIS= Tris-hydroxymethyl-aminomethan C₄H₁₁NO₃) (pH 7,4) (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>) gelöst in Aqua dest.</p>
Reagenzien:	<p>Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (<i>Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan</i>) AEC Substrate-Chromogen (3-Amino-9-Ethylcarbazol) (<i>Dako, Hamburg, Deutschland</i>): 1 AEC Tablette gelöst in 2,5 ml Dimethylforinamid und 47,5 ml Acetatpuffer; zur Anwendung 2 ml Farblösung mit 1µl 30 %-igem H₂O₂ aktivieren Färbelösung Hämalau (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>) Einbettungsmedium Aquatex® (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>) Paraformaldehyd (4 %) (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>) Wasserstoffperoxid (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>) TritonX-100 (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>) ABC-Komplex: Vectastain-Elite-ABC-Kit (<i>Vector, Burlingame, CA, USA</i>) Diaminobenzidin (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>) Einbettungsmedium Roti®-Mount (<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>) Aceton-Methanol-Gemisch (1:1, -20° C) (<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>) Färbelösung Sudanschwarz (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>) 0,1 % BSA, 0,2 % Glycin gelöst in TBS (<i>Merck, Darmstadt,</i></p>

	<i>Deutschland</i>) Färbelösung DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>) Einbettungsmedium Immomount (<i>Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland</i>)
--	--

Tabelle 5
Monoklonale Antikörper

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Quelle
CD3 Rabbit IgG	Intrazytoplasmatischer Anteil CD3 in T-Zellen	1:300	NeoMarkers, Fremont, USA
CD11b Mouse IgG	Mikroglia, Makrophagen	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
CK Pan Mouse IgG	Keratine (Keratin Pan Ab-1)	1:50	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
CNPase Mouse IgG	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase; Oligodendrozyten	1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
EMA Mouse IgG	Epitheliales Gewebe (Epithelial Membrane Antigen)	1:100	Dako, Hamburg, Deutschland
GFAP Rabbit Anti-Cow	Astrozyten (Glial Fibrillary Acidic Protein)	1:200	Dako, Hamburg, Deutschland
HMB 45 Mouse IgG	Melanozyten (Human Melanom Black)	1:1000	NeoMarkers, Fremont, USA
NeuN Mouse IgG	Neuronen (Neuronal Nuclei)	1:500	Merck, Darmstadt, Deutschland

NF 200 kD Mouse IgG	Neurofilament	1:10000	Chemicon International, Hofheim am Taunus, Deutschland
SMA Mouse IgG	Glatte Muskelzellen (Actin, Smooth Muscle Ab-1)	1:400	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
SYN Rabbit IgG	Neuroendokrine Zellen (Synaptophysin)	1:100	Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
VIM Mouse IgG	Mesenchymale Zellen (Vimentin, Intermediärfilament)	1:200	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland

Tabelle 6
Polyklonale Antikörper

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Quelle
CD68 (ED1) Rabbit IgG	Makrophagen, Monozyten	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Epo Goat IgG	Erythropoetin in humanem Gewebe	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
EpoR Rabbit IgG	Erythropoetin-Rezeptor in humanem Gewebe	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
GFAP Rabbit IgG	Astrozyten (Glial Fibrillary Acidic Protein)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
HIF-1 alpha Rabbit IgG	Hypoxia-inducible- factor 1 alpha	1:100	Novusbio, Littleton, USA
HIF-2 alpha Rabbit IgG	Hypoxia-inducible- factor 2 alpha	1:100	Novusbio, Littleton, USA
IL-1 β Rabbit IgG	Interleukin-1 β	1:100	Endogen, Rockford, IL, USA

IL-1RI Rabbit IgG	Interleukin-1-Rezeptor- I	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
----------------------	------------------------------	-------	--

2.4.5 Spezifität der verwendeten Antikörper

GFAP ist ein Protein, das im ZNS als Hauptbestandteil der zytoplasmatischen Intermediärfilamente von Gliazellen, insbesondere Astrozyten, vorkommt (59). Daher kann GFAP als Marker für Astrozyten verwendet werden. Zusätzlich kommt GFAP in Stammzellen und Ependymzellen im ZNS und in einigen Zelltypen außerhalb des ZNS vor (z.B. Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem). Normalerweise wird GFAP als Biomarker in der Hirntumor-Diagnostik verwendet, um gliale Tumore zu identifizieren (z.B. Glioblastom, Astrozytom) (60, 61). Ferner kann einer verringerten GFAP-Konzentration eine akute Infektion des Nervensystems oder eine neurodegenerative Erkrankung zugrunde liegen. Bei Synaptophysin handelt es sich um ein integrales Membranprotein, das vor allem in präsynaptischen Vesikeln im ZNS und in der Netzhaut, aber auch in Vesikeln im Nebennierenmark und an den motorischen Endplatten vorkommt (62). In der Klinik wird Synaptophysin als Tumormarker für neuroendokrine Tumore verwendet (z.B. Medulloblastom). Des Weiteren dient dieses Protein in der Pathologie dazu, Zellen zu identifizieren, die an der synaptischen Signalweiterleitung beteiligt sind (63-65).

NeuN ist ein neuronenspezifisches Kernprotein, das in nahezu allen neuronalen Zelltypen im Nervensystem exprimiert wird, also auch in Purkinje-Zellen des Kleinhirns, olfaktorischen Zellen und Retinazellen. Es eignet sich sowohl für die immunhistochemische Charakterisierung von embryonalem als auch adultem Gewebe, da NeuN bereits auftritt, wenn die neuronalen Zellen gebildet und ihrer terminalen Bestimmung zugeführt werden. NeuN wurde außerdem in embryonalen Tumorzellen gefunden (66).

Neurofilamente gehören zu den Intermediärfilamenten und bilden zusammen mit den Aktinfilamenten und den Mikrotubuli das Zytoskelett von Nervenzellen (67). Sie sind somit maßgeblich an dem strukturellen Aufbau der Nervenzellen beteiligt. Die Neurofilamente werden je nach ihrem Molekulargewicht in drei Gruppen unterteilt (light=NF-L, medium=NF-M, heavy=NF-H), wobei das in dieser Arbeit verwendete Neurofilament mit 200 kD zu den NF-H gehört.

CNPase ist ein Enzym, das vorrangig im Myelin von Oligodendrozyten im ZNS und zu einem wesentlich geringeren Anteil in Schwannzellen im peripheren Nervensystem nachgewiesen wurde (68). Daher eignet sich der Markerantikörper CNPase zur Darstellung von Oligodendrozyten.

CD11b und CD68 sind Proteinkomplexe aus der Gruppe der Cluster-of-differentiation-Komplexe, die in Mikroglia (Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen) nachweisbar und an phagozytotischen und apoptotischen Prozessen beteiligt sind (69, 70).

Bei CD3 handelt es sich ebenfalls um einen Proteinkomplex aus der Gruppe der Cluster-of-differentiation-Komplexe, der zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor (T-cell-receptor=TCR) einen Komplex bildet, der T-Zellen aktiviert, die an der inflammatorischen Reaktion beteiligt sind (71).

EMA wird in verschiedenen physiologischen und neoplastischen Epithelien exprimiert. Zusammen mit anderen Markern kann EMA dazu dienen, Gewebe hinsichtlich ihres Ursprungs in lymphatische und epitheliale Gewebe zu unterteilen. Weiterhin konnte die Expression von EMA in bestimmten T-Zell-Lymphomen und Plasmozytomen demonstriert werden (72-75).

SMA sind Autoantikörper, die gegen Bestandteile von glatten Muskelzellen, nämlich gegen bestimmte Aktinfilamente gerichtet sind. Dieser Marker wird in der Klinik zum Beispiel bei der Diagnostik einer Autoimmunhepatitis verwendet. Das Vorkommen von SMA wurde außerdem für einige Tumore und auch bei gesunden Patienten beschrieben, sodass der Nachweis von SMA nicht automatisch mit dem Vorliegen einer Autoimmunerkrankung gleichzusetzen ist (76).

Vimentin ist ein Protein, das wie GFAP zu den Intermediärfilamenten gehört. Es kommt in verschiedenen mesenchymalen Zellen (Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, Lymphozyten, etc.) vor, aber auch in anderen Zelltypen, wie beispielsweise Epithelzellen (77). Neben seiner physiologischen Funktion als Bestandteil des Zytoskeletts spielt Vimentin eine Rolle in entdifferenzierten Karzinomen. Hier zeigt sich meistens eine Koexpression mit Zytokeratinen (z.B. Nierenzellkarzinom). Des Weiteren wurde von vielen Autoren die Koexpression von Vimentin und GFAP in Gliomen beschrieben (78-80).

HMB 45 ist ein monoklonaler Antikörper, der zusammen mit einem Antigen (Pmel 17), das in melanozytären Tumoren (z.B. Melanom) exprimiert wird, eine Immunreaktion auslöst. Ferner kommt es gegebenenfalls zu einer positiven Reaktion durch das Vorhandensein von fetalen Melanozyten oder Nävuszellen. HMB45 dient in der Klinik als Tumormarker für Melanome.

Allerdings kommt es bei einigen Subtypen des Melanoms zu keiner Reaktion, ebenso wie bei den nicht-melanozytären Malignomen (81).

Der letzte Standardmarker, der zum Einsatz kam, war CK Pan. CK Pan ist ein polyklonaler Antikörper, der gegen die Zytokeratine gerichtet ist. Zytokeratinfilamente gehören zu den Intermediärfilamenten und bilden somit einen der Hauptbestandteile des Zytoskeletts. In der Pathologie wird dieser Antikörper genutzt, um festzustellen, welche originäre Struktur neoplastische Veränderungen aufweisen (epithelial oder nicht-epithelial) (82, 83).

Tabelle 7

Immunglobuline, sekundäre Antikörper, Seren, Fab-Fragmente

Immunglobuline	<ul style="list-style-type: none"> • Hasenimmunglobulin-G IgG (<i>abcam, Cambridge, UK</i>)
Sekundäre Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> • Antiserum des Pferdes gegen biotinyliertes Maus-IgG (<i>Vector, Burlingame, CA, USA</i>) Verdünnung 1:200 • Antiserum des Hasen gegen biotinyliertes Ziegen-IgG (<i>Vector, Burlingame, CA, USA</i>) Verdünnung 1:200 • Antiserum der Ziege gegen biotinyliertes Hasen-IgG (<i>Vector, Burlingame, CA, USA</i>) Verdünnung 1:200 • Antiserum des Affen gegen Hasen-IgG (<i>Invitrogen, Darmstadt, Deutschland</i>) Verdünnung 1:200, Alexa Fluor 555 • Antiserum des Affen gegen Ziegen-IgG (<i>Invitrogen, Darmstadt, Deutschland</i>) Verdünnung 1:200, Alexa Fluor 555 • Antiserum des Affen gegen Maus-IgG (<i>Invitrogen, Darmstadt, Deutschland</i>) Verdünnung 1:200, Alexa Fluor 488 • Antiserum des Affen gegen Hasen-IgG (<i>Invitrogen, Darmstadt, Deutschland</i>) Verdünnung 1:200, Alexa Fluor 488

Seren	<ul style="list-style-type: none"> • Normales Ziegen Serum (<i>Jackson Immuno Research, Newmarket, UK</i>) • Normales Pferdeserum (<i>Jackson Immuno Research, Newmarket, UK</i>) • Normales Hasenserum (<i>Jackson Immuno Research, Newmarket, UK</i>)
Fab-Fragmente	<ul style="list-style-type: none"> • Affini Pure Fab Fragment des Affen gegen Hasen-IgG (<i>Jackson Immuno Research, Newmarket, UK</i>) • Affini Pure Fab Fragment des Affen gegen Maus-IgG (<i>Jackson Immuno Research, Newmarket, UK</i>)

2.5 Mikroskopie und Auswertung

Die Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (Axiovert 200, *Zeiss*) und einem Fluoreszenzmikroskop mit ApoTome (Observer.Z1, *Zeiss*; ApoTome.2, Power Supply, *Zeiss*; Ebq 100 Isolated, *Kübler*) beurteilt und mit den Programmen AxioVision Rel.4.8 und ZEN pro 2012 fotografisch festgehalten (AxioCam MRC5 und MRm, *Zeiss*). Die qualitativen und die densitometrischen Auswertungen erfolgten anhand der Fotos (Formate tif, ziv).

Die Beurteilung, ob eine Färbung der Bereiche vorlag, bezog sich dabei grundsätzlich nur auf die Areale der Schnitte, die zuvor durch eingehende Beurteilung der Hämatoxylin-Eosin-Färbungen als Rückenmarksgewebe identifiziert werden konnten.

2.6 Densitometrie

Mit Hilfe der densitometrischen Messungen wurden die Schnitte semiquantitativ beurteilt. Hierbei wird die Farbdichte der Fotos, die von den Schnitten angefertigt wurden, mit einem speziellen Computerprogramm gemessen und in Form eines Diagramms mit den Expressionsstärken der jeweils untersuchten Zytokine korreliert. Auf diese Weise kann man anhand der Diagramme das Expressionsniveau der verschiedenen Fälle untereinander und das der Kontrollschnitte von gesunden Rückenmarkpräparaten miteinander vergleichen.

2.7 Molekularbiologische Analyse

Zur Gewinnung von RNA wurde aus formalinfixiertem und paraffineingebettetem Gewebe RNA extrahiert und cDNA synthetisiert. Diese wurde mittels Real-time Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) auf das Vorliegen der Mediatoren der Schadenskaskaden in Myelomeningozelengeweben untersucht.

2.7.1 RNA-Isolation aus formalin-fixiertem paraffin-eingebettetem (FFPE-) Gewebe

Die IL-1b-, IL-1R1-, EPO- und EPO-R-mRNA-Mengen in den Plakoden (n = 6), in den adulten Kontrollgeweben (n = 4) und den fetalen Kontrollgeweben (n = 4) wurden mittels Real-time RT-PCR gemessen. Hierfür wurden TaqMan Primer-Sonden verwendet. Die RNA der einzelnen Proben wurde aus jeweils zehn 5 µm dicken Paraffinschnitten mit Hilfe des High Pure FFPE RNA Isolations-Kits isoliert. Die Plakoden und das Rückenmarksgewebe der Kontrollen wurden von den Schnitten geschabt. Zu dem präparierten Gewebe wurden 800 µl Xylene und 400 µl Ethanol hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen und Spinintervallen wurde der Überstand abgelassen und 1 ml Ethanol hinzugefügt. Anschließend wurde nach erneuten kurzen Vortexintervallen der Überstand entfernt. Die so erhaltenen Gewebepellets wurden bei 55° C getrocknet (10 Min). Vor einer 30-minütigen Inkubation bei 85° C und 600 Umdrehungen pro Minute wurden 100 µl RNA Lysis Buffer, 16 µl SDS and 40 µl Proteinase K hinzugegeben. Danach wurden die Proben auf unter 55° C heruntergekühlt und mit 80 µl Proteinase K vermischt und für 30 Minuten bei 55° C inkubiert. Im Anschluss daran wurden 325 µl RNA Binding Buffer und 325 µl reines Ethanol hinzugefügt. Nachdem das Lysat auf einem Filterrohr platziert wurde, wurden die Proben zentrifugiert (30 Sek 6000 rpm und 2 Min 16000 rpm) und anschließend mit 100 µl DNase Working Solution vermischt. Die Inkubation auf dem Filterpapier erfolgte bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Nach zweimaligem Waschen und Zentrifugation bei 6000 rpm (zweimal 20 Sek) und bei 16000 rpm (2 Min) wurde die RNA mit 20 µl RNA Elution Buffer herausgelöst. Zuletzt wurde erneut bei 6000 rpm zentrifugiert (1 Min).

2.7.2 Photometrische RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung

Um äquivalente Mengen an RNA im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu verwenden, wurde der RNA-Gehalt der Proben gemessen.

Das Nanodrop 2000c Spectrophotometer® (*Thermo Scientific, Wilmington, USA*) wurde benutzt, um die RNA in den Extraktionsproben zu messen und mögliche Kontaminationsquellen zu identifizieren. Nach Eichen des Spektrometers mit 2 µl Aqua dest. wurden 2 µl des Eluats zugegeben und gemessen.

2.7.3 DNA-Verdau und Herstellung von cDNA

In der Real-Time PCR wird nur c-(copy)DNA oder DNA detektiert. Daher musste die aus den Paraffinschnitten gewonnene Gesamt-RNA durch Reverse Transkription in cDNA überführt werden. Dies erfolgte mittels RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase.

Vor der Herstellung der cDNA erfolgte ein DNA-Verdau zur Eliminierung genomischer DNA, da diese sonst im Rahmen der PCR eine Fehlerquelle darstellen würde. Da beide Arbeitsschritte im Gradienten-Cycler durchgeführt wurden und einander angeschlossen waren, werden sie im Folgenden auch im direkten Übergang abgehandelt.

Reinigung der Gesamt-RNA von genomischer DNA:

Zur Herstellung identischer Konzentrationen aller Proben und Erreichen des für diesen Arbeitsschritt geforderten Mengenverhältnisses wurden Verdünnungen von 2 µg RNA ad 7 µl Aqua dest. angefertigt. Im Falle der mit High Pure FFPE RNA Isolation Kit gewonnenen RNA musste das dafür einzusetzende RNA-Volumen (x) zunächst aus den ermittelten Konzentrationen der Proben (RNA) berechnet werden ($2 \mu\text{g}/\text{RNA} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = x [\mu\text{l}]$).

Der RNA-Probe wurde ein MasterMix beigefügt, zusammengesetzt aus je 1 µl DNase-Puffer (10x) sowie 1 µl DNase (1 u/µl). Daraufhin erfolgte eine Inkubation von 15 Minuten bei 37° C und im Anschluss die Zugabe von jeweils 1 µl EDTA (20 mM), um den Verdauungsprozess zu stoppen. Bei 65° C erfolgte eine weitere Inkubation für 10 Minuten.

Herstellung von cDNA (reverse Transkription):

Den Proben wurden daraufhin jeweils 2 µl Random Hexamer-Primer-Gemisch (Verdünnung 1:10) hinzugefügt. Dieses Gemisch bestand aus willkürlich ausgewählten kurzen Oligonukleotidsequenzen, die über die gesamte Länge der RNA unspezifisch binden und somit der Reversen Transkription als Startpunkt dienen. Es erfolgte eine Inkubation bei 70° C (5 Min, Schmelzen der RNA-Sekundärstrukturen). Dann wurden die Proben auf Eis gekühlt (2 Min). Nach kurzer Zentrifugation der Proben bei 10.000 rcf wurden jeweils 8 µl Mastermix hinzugefügt. Es folgten nacheinander Inkubationen bei 25° C (10 Min, Annealing), bei 42° C (60 Min, Elongation) und bei 70° C (10 Min, Denaturierung der Reversen Transkriptase), um die Reaktion zu beenden. Erneut wurden die Proben zum Abkühlen auf Eis gelegt. Die Proben wurden unverdünnt weiterverwendet. Diese durch Reverse Transkription hergestellte cDNA konnte nun im Weiteren als Template für die PCR dienen.

Tabelle 8

Ansatz zu Herstellung von cDNA

Volumen	Reagenz
4 µl	Reaktionspuffer (5x)
2 µl	dNTP- Mix (10 mM)
1 µl	ddH ₂ O
1 µl	Reverse Transskriptase

2.7.4 Target Assay-Mix

Zur Vervielfältigung spezifischer c-DNA-Sequenzen im Rahmen der Real-Time Polymerase-Kettenreaktion mittels TaqMan-Methode, kamen Target Assays zum Einsatz. Diese enthalten spezifische Primer und Sonden.

Die Sequenzen der aus 15- 30 Basen bestehenden Primer müssen jeweils so gewählt werden, dass sie komplementär zu Zielsequenzen der zu vervielfachenden DNA sind.

Folgende Primer wurden verwendet (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*): Epo (Hs01071097_m1), EpoR (Hs00959427_m1), GAPDH (Hs99999905_m1), IL-1beta (Hs01555410_m1) und IL-1R1 (Hs00991010_m1).

2.7.5 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Nach Isolation der RNA aus dem Paraffinmaterial, photometrischer RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätsbeurteilung sowie dem genomischen DNA-Verdau und der Reversen Transkription waren die Voraussetzungen zur Untersuchung der Proben mittels quantitativer Real-Time PCR erfüllt. Die quantitative Real-Time PCR ist eine sensitive, reproduzierbare und spezifische Methode, mit der die Expression eines Genes nachweisbar ist. Im Unterschied zur konventionellen PCR ermöglicht die Real-Time-Methode eine Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte und ihre Visualisierung. Die Quantifizierung und Visualisierung werden dabei mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen umgesetzt, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit erfasst werden. Da die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt, lassen sich über die Fluoreszenzzunahme direkte Rückschlüsse auf die Zunahme der PCR-Amplifikate ziehen. Zur Auswertung wird die logarithmisch-lineare Phase des Fluoreszenz-Anstiegs verwendet. Hier werden optimale Reaktionsbedingungen angenommen. So liefert jeder einzelne Zyklus bereits Informationen für die quantitative Auswertung. Die hier verwendete Methode basierte auf dem TaqMan-Prinzip und wurde mittels eines „Quantstudio® 5 Single Color Real-time PCR detection system“ (*Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific, USA*), einer Kombination aus Thermocycler und Fluoreszenzoptik, durchgeführt. Das System ermöglicht die Amplifikation und die simultane Messung der Fluoreszenzzunahme und damit den Nachweis des PCR-Produktes. Die Quantifizierung der PCR-Amplifikate wurde durch softwaregestützte Berechnung des Fluoreszenzschwellyklus, auch Cycle of Threshold, oder C_T -Wert genannt, angegeben. Dieser Wert beschreibt die Zykluszahl, bei der die Reporterfluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Je höher der C_T -Wert einer Probe ausfällt, desto geringer ist der Gehalt an mRNA der untersuchten Zielsequenz.

Um die TaqMan-Methode durchführen zu können, muss dem Ansatz der PCR zusätzlich zu den für die Amplifikation erforderlichen spezifischen Primern eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde zugegeben werden, die an die zu amplifizierende cDNA bindet. Diese TaqMan-Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert ist, der die Extension dieses Endes während der PCR vermeiden soll.

Wird die intakte TaqMan-Sonde durch ultraviolettes Licht zur Fluoreszenz angeregt, kommt es durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher zur Unterdrückung des Reporter-Farbstoffes.

Zunächst hybridisiert die Sonde während der PCR mit den Primern an den Matrizenstrang. Sie wird jedoch im Rahmen der Extensionsphase durch Aktivierung der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der TaqMan-Polymerase hydrolysiert. Dieser Prozess führt zu einer Aufhebung der räumlichen Nähe von Reporter und Quencher und damit des FET. Somit steigt entsprechend der Akkumulation der PCR-Amplifikate die Fluoreszenz des Reporters mit jedem Zyklus der PCR. Da nicht-hybridisierte freie Sonden keine Spaltung erfahren, ist das entstehende Fluoreszenz-Signal sequenzspezifisch und zu jedem Zeitpunkt proportional zur Konzentration der amplifizierten Zielsequenz.

Um einen besseren Vergleich der C_T -Werte der Proben ermöglichen zu können, wurde zusätzlich zu den spezifischen Primern auch jeweils der Gehalt des Haushaltsgens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) in einem eigenen Ansatz untersucht.

Dieses Haushaltsgen soll als nicht reguliertes Gen unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden und dient daher als interner Standard. Jede Primermischung, die verwendet wurde, wurde durch eine Negativkontrolle überprüft. Das heißt, es wurde lediglich der Primermix ohne Zugabe von cDNA in ein Well gegeben. Diese Negativkontrollen sollten bei regelrechter Arbeitsweise keine PCR-Amplifikate aufweisen. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Durchführung der PCR:

Auf jede 96-Well-Platte wurden nun zunächst jeweils 2 μ l cDNA (100 ng) pro Well als Doppelbestimmung vorgelegt. Es folgte die Zugabe von jeweils 18 μ l eines Primer-spezifischen Reaktionsansatzes. Somit resultierte ein Gesamtvolumen von 20 μ l pro Well.

Alle cDNA-Proben wurden jeweils auf den Gehalt der folgenden Primer untersucht: GAPDH, Epo, Epo-R, IL-1b, IL-1R1. Für jeden Primer erfolgte, wie zuvor bereits beschrieben, eine Negativkontrolle. In die hierfür vorgesehenen Wells wurde daher ausschließlich der jeweilige Primer-spezifische Reaktionsansatz ohne cDNA pipettiert. Für die Untersuchung von GAPDH fand zusätzlich eine Positivkontrolle statt, um den internen Standard zu validieren. Schließlich wurden die Platten mit einer optischen Folie verschlossen, zur Analyse in das „Quantstudio® 5 Single Color Real-time PCR detection system“ eingelegt und das Programm am hierfür vorgesehenen Laptop gestartet.

Tabelle 9*Ansatz für TaqMan-PCR*

Volumen	Reagenz
10 µl	TaqMan Universal Master Mix
7 µl	ddH ₂ O
1 µl	Target Assay Mix

Tabelle 10*Real-Time PCR-Programm*

Zyklus	Wiederholungen	Zeit	Temperatur	Prozessbeschreibung
1	-	10 Min	95° C	Polymeraseaktivierung
2	50	15 Sek	95° C	Denaturierung
3	-	1 Min	60° C	Annealing und Kettenverlängerung

Tabelle 11*Gebrauchsfertige Reagenziensysteme und zugehörige Bezugsquellen.**Die genaue Zusammensetzung der Reagenziensysteme wird durch den Hersteller geschützt und kann daher im Folgenden nicht weiter angegeben werden.*

Reagenziensysteme	Hersteller
DNase (Konzentration.: 1U/µl) DNase-Puffer (10x), DNase Stop	Promega, Madison, WI, USA
dNTP Mix 10mM, 1ml	Thermo Scientific, Waltham, USA
RevertAid TM H Minus Reverse Transkriptase, Reaktionspuffer (5x) (Konzentration: 200 U/µl)	Thermo Scientific, Waltham, USA
TaqMan [®] -Universal PCR Master Mix	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
High Pure FFPE RNA Isolation Kit -RNA Tissue Lysis Buffer -Proteinase K, PCR grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland Roche Life Sciences

<ul style="list-style-type: none"> -RNA Binding Buffer -Wash Buffer I -Wash Buffer II -DNase I -DNase Incubation Buffer (1x) -RNA Elution Buffer -Reagent Preparation Buffer -High Pure Filter Tubes -Collection Tubes 	
---	--

2.7.6 Relative Quantifizierung der Amplifikationsprodukte

Wie bereits zuvor erwähnt, sollten die ermittelten Genexpressionswerte aller Marker nicht nur rein quantitativ erfasst, sondern zusätzlich in Relation zu der GAPDH-Expression der gleichen Probe gesetzt werden. Dieses Vorgehen ermöglichte schließlich den Vergleich zwischen den relativen Genexpressionen im MMC-Gewebe und den Kontrollgeweben. Die relative Quantifizierung erfolgte über die Ermittlung der sogenannten ΔC_T -Werte, deren Berechnung folgende Formel zugrundeliegt:

$$\Delta C_T p = (1C_T p + 2C_T p) / 2 - (1C_T \text{ GAPDH} + 2C_T \text{ GAPDH}) / 2$$

Dabei steht $C_T p$ für die erforderlichen Threshold-Zyklen der jeweiligen Primer-Ansätze und $C_T \text{ GAPDH}$ dementsprechend für die Threshold-Zyklen des GAPDH-Ansatzes, die zur Überschreitung des festgelegten Schwellenwertes führen. Die Zahlen 1 und 2 stellen die Doppelbestimmungen der jeweiligen Probe dar, aus denen somit jeweils der Mittelwert gebildet wurde. Der Mittelwert des C_T -Wertes von GAPDH wurde jeweils von den Mittelwerten der anderen Primer-Ansätze subtrahiert um schließlich den $\Delta C_T p$ -Wert des jeweiligen Primer-Ansatzes zu erhalten.

Da sich der ΔC_T -Wert umgekehrt proportional zur Fluoreszenzzunahme der Probe verhält, steht er in diesem Verhältnis auch zu den PCR-Amplifikaten. Zur weiteren Auswertung der PCR-Ergebnisse wurde im Rahmen der Stimulationen der n-fache Unterschied der Genexpression zwischen den unterschiedlich stimulierten Zellen nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{n-facher Unterschied } p = 2^{\frac{-\Delta C_T \text{ MMC}}{2} - \frac{-\Delta C_T \text{ Kontrolle}}{2}}$$

Der n-fache Unterschied p , der für jeden Marker (P, Primer-Ansatz) in allen Stimulationsversuchen berechnet wurde, stellt also die n-fache Über- oder Unterexpression der untersuchten Zytokine dar. Es wird das Verhältnis der ΔC_T -Werte von MMC (ΔC_T MMC) zu den Kontrollen (ΔC_T Kontrolle) gebildet.

Tabelle 12

Geräte, Verbrauchsmaterialien und dazugehörige Bezugsquellen

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Autoklav (Lösungen)	Goessner, Hamburg, Deutschland
Autoklav (S2 Abfall)	Syntec, Hamburg, Deutschland
Brutschrank, Heracell 240	Hereaus GmbH, Langenselbold, Deutschland
Digitalkamera, AxioCam MRm	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Einmalpipette (10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eismaschine: AF-10	Scotsman, Glasgow, Schottland
Eppendorfgefäß	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank	National Lab GmbH, Mölln, Deutschland
Gefrierschrank	Sanyo, Moriguchi, Japan
Gefrierschrank	Kryotec, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank	National Lab GmbH, Mölln, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Messzylinder	Duran/Schott-Glas, Mainz, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
optische Folie	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PCR-Detektionssystem, iQ5™ Multi Color real-time PCR Detection System + Laptop und iCycler Optical System Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
pH-Meter: WTW, pH 526	WTW, Weilheim, Deutschland

Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexer, REAX top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Waage EW600-2M	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Waage CP224S-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge, Biofuge pico	Hereaus GmbH, Osterode, Deutschland
Zentrifuge, 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.8 Statistik und Signifikanzniveau

Sämtliche statistischen Auswertungen wurden mit Excel[®] (Version 2010) durchgeführt. Hierbei wurde mit dem in Excel implementierten Student'schen t-Test (zweiseitig) auf Signifikanz getestet. Das Signifikanzniveau wurde dabei wie folgt gewählt: Signifikant bei p kleiner gleich 0,05, gekennzeichnet mit Sternchen/Dreieck (*/ Δ); hoch signifikant bei p kleiner gleich 0,01, gekennzeichnet mit zwei Sternchen/Dreiecken (**/ $\Delta\Delta$); höchst signifikant bei p kleiner gleich 0,001, gekennzeichnet mit drei Sternchen/Dreiecken (***/ $\Delta\Delta\Delta$).

Die Korrelation der klinischen Daten wurde mit IBM SPSS Statistics 22 vorgenommen. Als Korrelationskoeffizient diente der Pearson-Korrelationskoeffizient.

2.9 Klinische Daten

Zur Beurteilung der klinischen Relevanz der experimentellen Ergebnisse wurden die klinischen Daten der Patienten erfasst. Hierbei ging es um die Lokalisation, die Größe und die Beschaffenheit des spinalen Neuralrohrdefekts sowie um die mit der Myelomeningozele assoziierten Erkrankungen und den neurologischen Befund der Patienten.

Die klinischen Daten wurden mit Hilfe des klinikinternen digitalen Archivs Orbis der Klinik für Neurochirurgie, des Archivs der Kinderklinik und des neurochirurgischen Archivs des UKSH, Campus Kiel, erhoben.

2.10 Ethische Anforderungen

Es wurde ausschließlich Material untersucht, das ohnehin bei der indizierten primären Operation der Myelomeningozele gewonnen wurde. Es wurde kein Gewebe nur für diese Studie entnommen. Die Patienten bzw. die Erziehungsberechtigten wurden entsprechend der gesetzlichen Vorgaben über die geplanten Untersuchungen aufgeklärt. Das positive Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät Kiel liegt vor (siehe Abschnitt 7.2).

3 Ergebnisse

Histologisch untersucht wurde Myelomeningozelengewebe, das während der primären Operation (innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Geburt) in der Klinik für Neurochirurgie im Zeitraum von 1993-2015 gewonnen wurde. Hierbei wurden die Paraffinschnitte von Fällen aus der neuropathologischen Datenbank (Dr. Hugo, emeritiert) selektiert, die genügend Plakodengewebe für die folgenden Färbungen aufwiesen. So ergab sich eine Zahl von 17 Patientenfällen zur weiteren Analyse.

3.1 Analyse der Hämatoxylin-Eosin-Färbung anhand der Gewebeatlanten

Von den 17 untersuchten Patientenfällen wurden Gewebeatlanten erstellt, die dazu dienen sollten, sich beim Mikroskopieren besser auf dem Schnitt „zurechtzufinden“ (siehe Abbildung 8). Zunächst wurden die unterschiedlichen Gewebe der während der Operation gewonnenen Proben und besonders die Plakode beziehungsweise das Plakodengewebe identifiziert, da während der Operation plakodenerhaltend bzw. –rekonstruierend vorgegangen wurde. Daher handelte es sich bei dem identifizierten Plakodengewebe entsprechend nur um Fragmente. Auf den erstellten Gewebeatlanten wurden die verschiedenen Gewebebereiche gekennzeichnet und die Bereiche, in denen gliales Gewebe oder Plakodengewebe vorlag, hervorgehoben. Alle Schnitte wiesen Epidermisanteile mit Hornlamellen und subkutane Anteile auf. Teilweise wurden Hautanhangsgebilde wie Haarbälge und diverse Drüsentypen wie Talgdrüsen und Schweißdrüsen sichtbar. Des Weiteren wiesen die meisten Gewebeproben subkutanes Fett in Form einzelner Fettgewebsinseln innerhalb anderer Gewebsstrukturen oder lobulierte Fettgewebsareale auf. In den meisten Fällen waren große Areale der Schnitte von verschiedenen Bindegewebstypen (locker, hyalinisiert, derb kollagen, parallel kollagen) bedeckt. Ferner waren einige Bindegewebsbereiche narbenartig verändert. In zwei Fällen konnten Bereiche mit quergestreifter Muskulatur sowie Hämosiderinablagerungen identifiziert werden und in einem Fall wurde eine zystische Veränderung mit squamösem Epithel und Keratohyalinkörnern im Sinne eines Epidermoids sichtbar. Neben dem Plakodengewebe, das in verschiedener Ausprägung (kleine Areale bis breite Bänder) in allen Schnitten vorkam, wurden in vielen Fällen zusätzlich kleine periphere Nerven, Nervenwurzeln und Ganglienzellansammlungen sichtbar. Stellenweise wiesen die Schnitte Ependymzellen auf.

Außerdem waren an mehreren Stellen Teile des Zentralkanals angeschnitten. Innerhalb des Rückenmarksgewebes wurden teilweise perivaskuläre Granulozytenmanschetten nachgewiesen. Vakuolisierungen und Nekrosen wurden als morphologische Korrelate der Plakodenschädigung gewertet. Außerhalb des Rückenmarksgewebes gab es ebenfalls in manchen Fällen herdförmige, dichte Granulozytenansammlungen und zusätzlich reaktive Gefäßvermehrungen.

Die anonymisierten adulten Rückenmarksgewebe, die als Kontrolle dienten, wurden als regelrecht entwickelt beschrieben. Die graue und weiße Substanz war unauffällig und es gab keinen Anhalt für entzündliche Veränderungen. Im anonymisierten Hirngewebe, das zur Etablierung der proinflammatorischen Antikörper diente, wurden perivaskuläre Rundzellinfiltrate und Mikrogliaknötchen identifiziert, die wegweisend für das Vorliegen eines entzündlichen Prozesses waren.

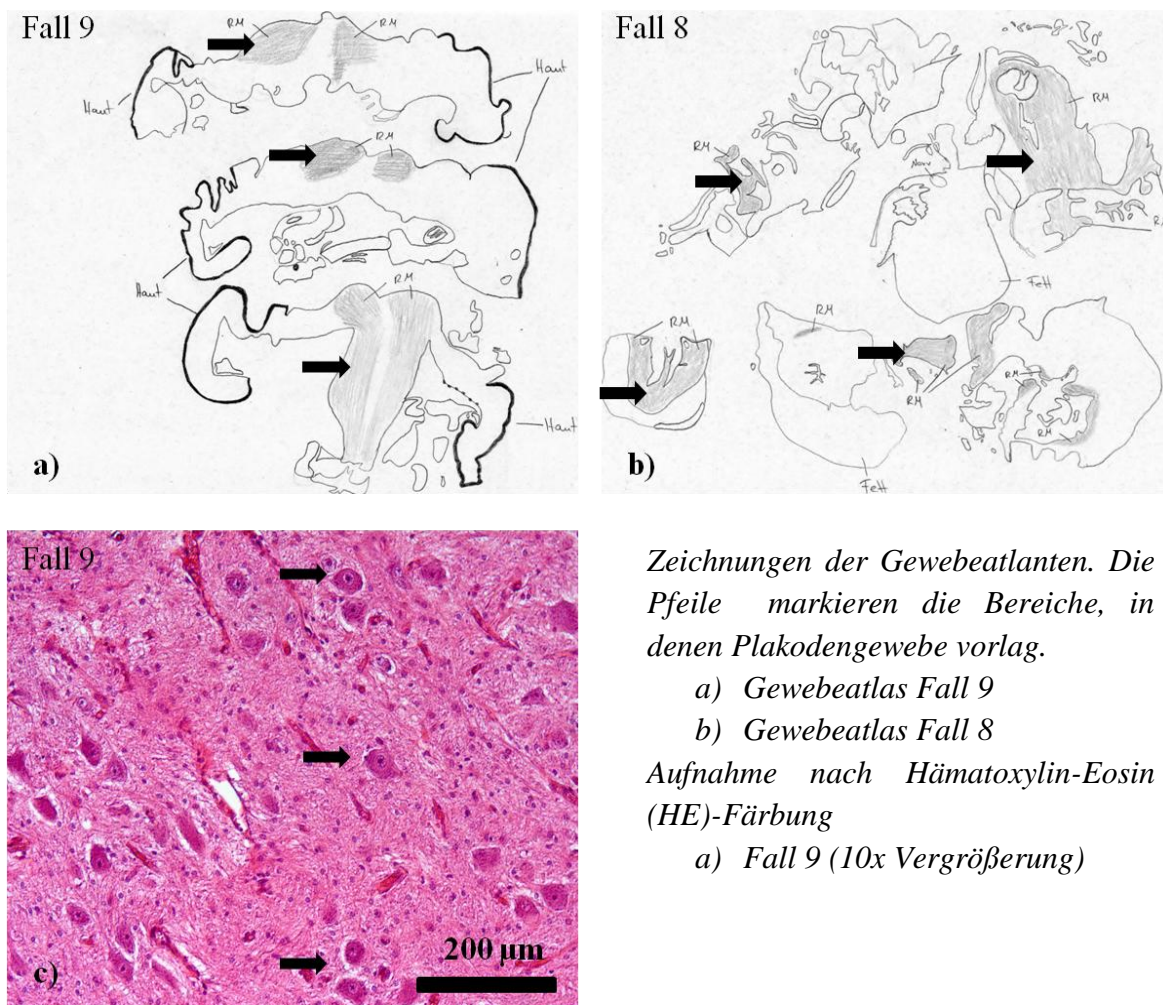


Abbildung 8

3.2 Vorarbeiten zur Immunhistochemie

Vor der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen mit den Standardmarkern und den Zytokinen wurden diverse Vorarbeiten geleistet. Abbildung 9 zeigt die Serumkontrollen für die verwendeten Seren von Hase, Pferd und Ziege auf dem adulten Rückenmarkskontrollgewebe. Es wird deutlich, dass, wie erwartet, keine Färbung erfolgte.

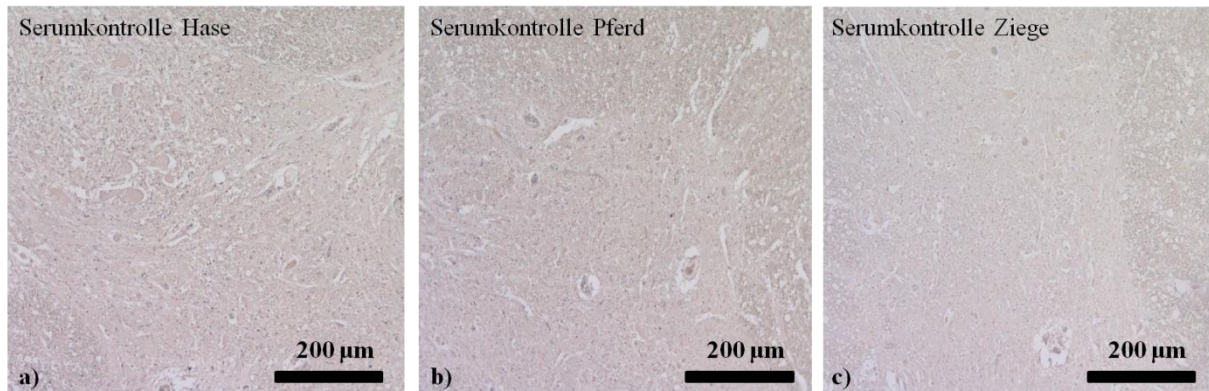


Abbildung 9

Aufnahmen nach Diaminobenzidin-Färbungen der Kontrollgewebe (adultes Rückenmark)

- a) Serumkontrolle Hase (10x Vergrößerung)*
- b) Serumkontrolle Pferd (10x Vergrößerung)*
- c) Serumkontrolle Ziege (10x Vergrößerung)*

Um die proinflammatorischen Antikörper zu etablieren, wurden die Antikörper gegen Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor zunächst auf entzündetem anonymisiertem adultem Hirngewebe getestet (siehe Abbildung 10). Hierbei zeigte sich sowohl bei der Färbung mit einem Antikörper gegen Interleukin-1-beta als auch bei seinem Rezeptor eine deutliche Färbung. Somit ist davon auszugehen, dass sich Interleukin-1-beta in entsprechender Verdünnung gut dazu eignet, die entzündlichen Geschehnisse in der Plakode darzustellen.

Weiterhin wurde mit dem neuroprotektiven Zytokin Erythropoetin und einem passenden Kontrollpeptid eine Präadsorption durchgeführt. Bei der Verwendung von Antikörpern einer bestimmten Spezies kann es zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Kreuzreaktionen mit Serumproteinen anderer Spezies kommen. Daher wurde eine Präadsorption der Antikörper gegen bestimmte Serumproteine anderer Spezies vorgenommen, um die möglichen Kreuzreaktionen zu minimieren. Im Rahmen der Präadsorption gegen nahe verwandte Spezies kann die Epitoperkennung der Antikörper zum Teil stark reduziert sein.

Aufgrund dessen wurden zunächst Kontrollfärbungen durchgeführt, um die Antikörper zu überprüfen (siehe Abbildung 11).

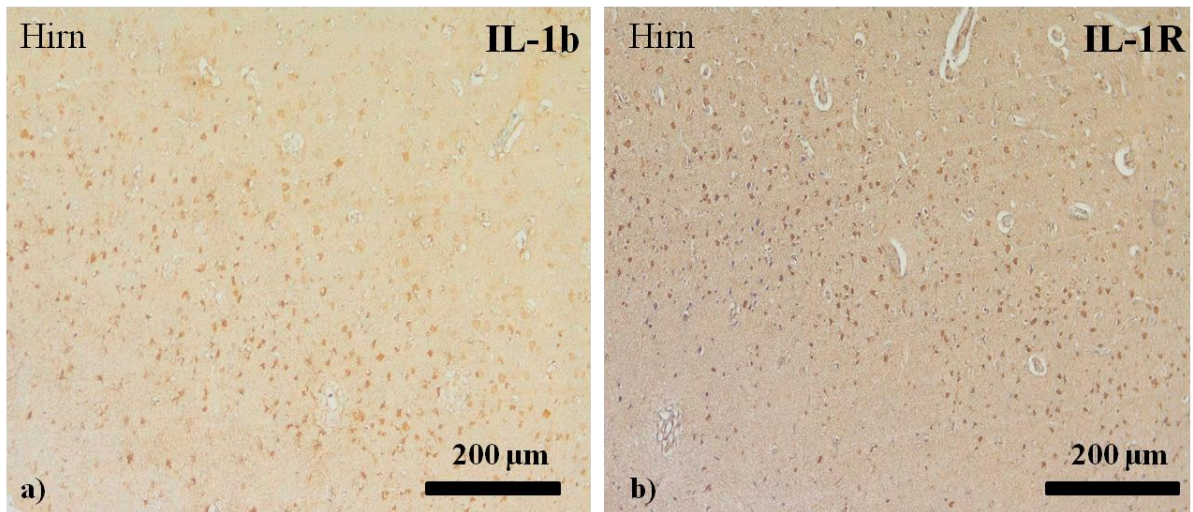


Abbildung 10

Aufnahmen nach Diaminobenzidin-Färbungen des anonymisierten adulten entzündeten Hirngewebes mit einem Antikörper gegen

- a) Interleukin-1-beta (10x Vergrößerung)*
- b) Interleukin-1-R (10x Vergrößerung)*

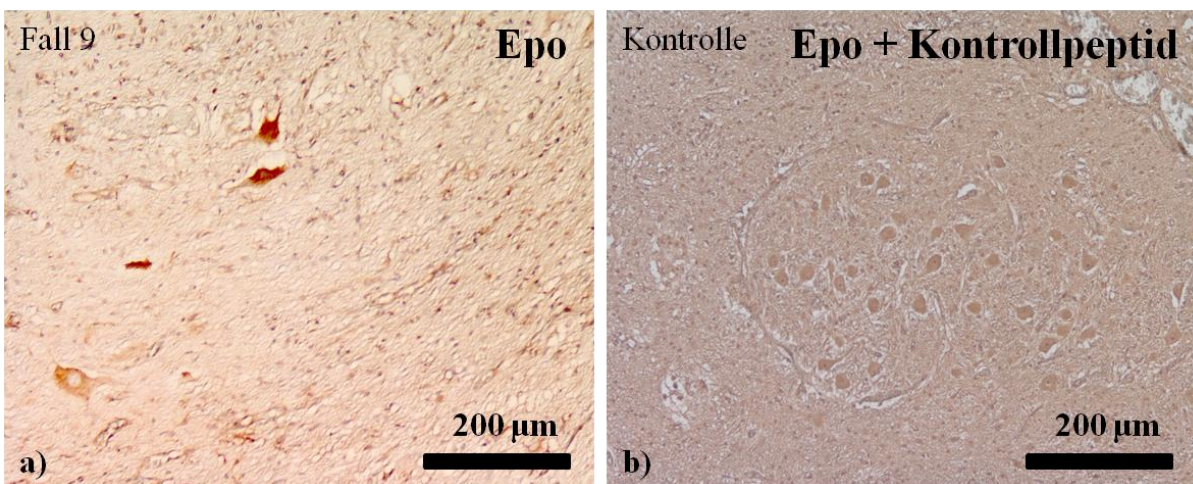


Abbildung 11

Aufnahmen nach Diaminobenzidin-Färbung mit einem Antikörper gegen

- a) Erythropoetin auf einem der MMC-Schnitte (10x Vergrößerung): Die Färbung der einzelnen Neurone auf der Abbildung hebt sich deutlich vom Hintergrund ab.*
- b) Erythropoetin und dem entsprechenden Kontrollpeptid auf adultem Rückenmark, das als Kontrollgewebe diente (10x Vergrößerung): Die Neurone geben sich kaum von der Färbung des Hintergrunds ab.*

Zusätzlich wurden die Färbungen mit Antikörpern gegen die proinflammatorischen und neuroprotektiven Zytokine auf verschiedenen fetalen Rückenmarkkontrollgeweben durchgeführt. Es handelt sich dabei um vier Kontrollschnitte aus der 32. bis 36. Schwangerschaftswoche. Dieses Vorgehen diente dazu, den Vergleich der Plakoden mit, zeitlich gesehen, ähnlich weit entwickeltem Rückenmark zu ermöglichen. Es wurde deutlich, dass Interleukin-1-beta und sein Rezeptor, wie im adulten Kontrollgewebe, nicht exprimiert werden. Erythropoetin und sein Rezeptor sind zwar im fetalen Gewebe vorhanden, allerdings in wesentlich geringerer Ausprägung als in einigen MMC-Fällen (siehe Abbildung 12).

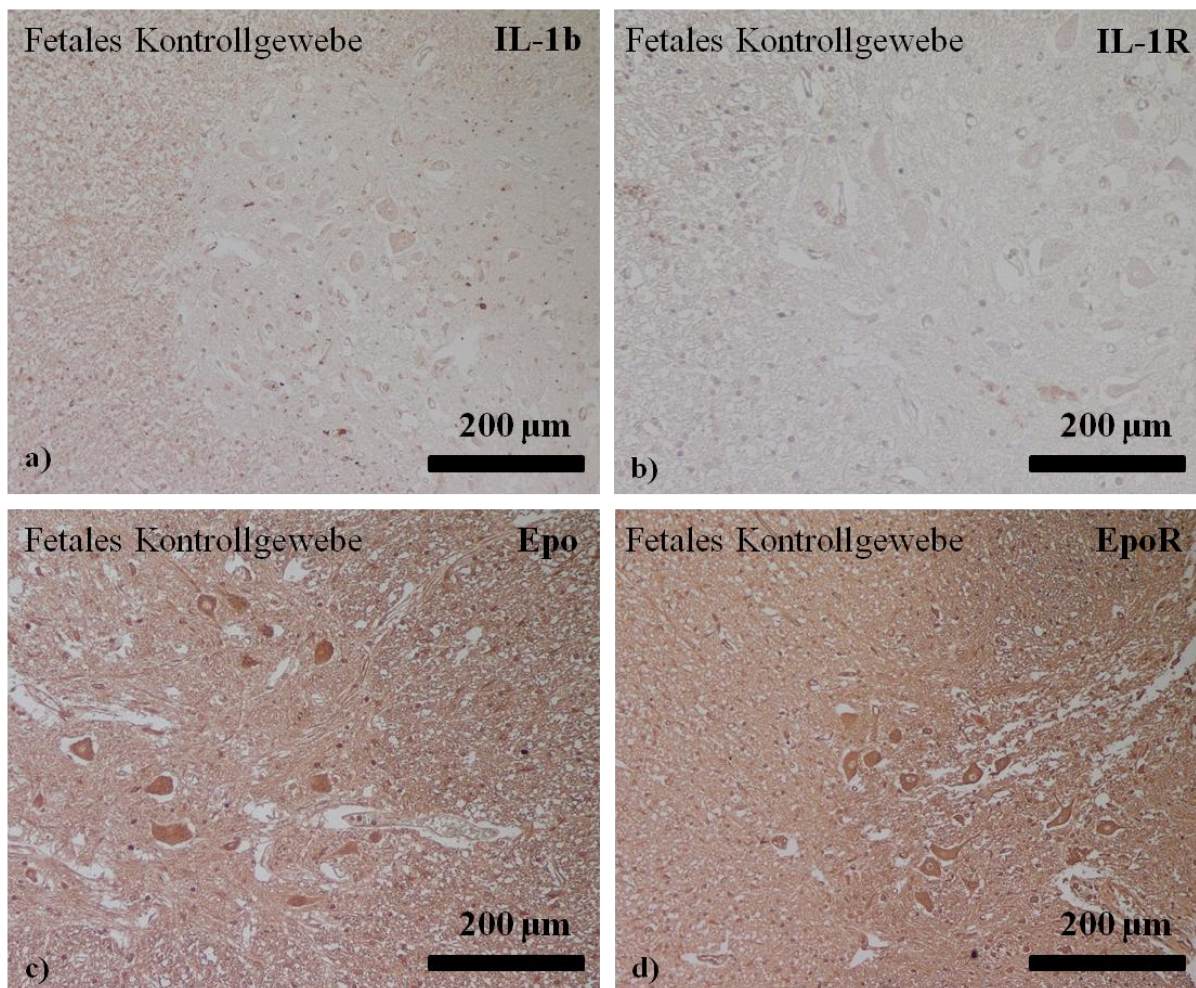


Abbildung 12

Aufnahmen nach Diaminobenzidin-Färbungen des fetalen Kontrollgewebes mit einem Antikörper gegen

- a) Interleukin-1-beta (10x Vergrößerung)*
- b) Interleukin-1-Rezeptor (10x Vergrößerung)*
- c) Erythropoetin (10x Vergrößerung)*
- d) Erythropoetin-Rezeptor (10x Vergrößerung)*

3.3 Expressionsmuster verschiedener Gewebemarker

Folgende Standardmarker wurden in dieser Arbeit verwendet: Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Synaptophysin (84), Neuronal Nuclei (NeuN), Neurofilament (NF 200kD), CNPase, CD11b, CD68, CD3, Epithelial Membrane Antigen (EMA), Smooth Muscle Actin (SMA), Vimentin (85), Human Melanoma Black (HMB45) und Panzytokeratin (CK Pan). Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte anhand einer zuvor festgelegten Punkteskala zwischen null und zwei. Null entsprach hierbei keiner feststellbaren Färbung beziehungsweise lediglich der Färbung des Hintergrunds. Die Vergabe der Eins erfolgte bei vereinzelter oder schwacher Färbung und die Zwei entsprach einer starken und konsistenten Färbung (siehe Tabelle 17).

Bei den Färbungen mit dem Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) galt es festzustellen, welche Bereiche des untersuchten MMC-Gewebes aus histologischer Sicht gliales Gewebe enthielten. Die Gewebeproben wiesen in allen 17 Fällen eine konsistente und starke Färbung auf (siehe Tabelle 13). Somit konnte demonstriert werden, dass die zelluläre Struktur in den Bereichen, die zuvor in den Gewebeatlanten als Rückenmark identifiziert worden waren, zu einem großen Teil aus glialem Gewebe bestand beziehungsweise großflächig Astrozyten zu finden waren (siehe Abbildung 13 und 18). Die höhere mikroskopische Auflösung zeigte die GFAP-positiven Astrozyten in einem morphologisch aktiven Zustand mit weit verzweigten, dicken Zellausläufern. Alle Fälle wiesen Hinweise auf eine Astroglie auf.

Die semiquantitative Analyse der gefärbten Schnitte ergab für Synaptophysin eine starke und/oder konsistente Färbung in 64,7 % der Fälle und eine schwache, vereinzelte Immunreaktivität in fast 23,5 % der Fälle. Lediglich bei zwei der gefärbten Schnitte konnte keine Expression von Synaptophysin festgestellt werden (siehe Tabelle 13 und Abbildung 13). Da es sich bei den Kontrollgeweben um gesunde adulte Rückenmarkpräparate handelte, konnte in allen vier Kontrollen eine starke und konsistente Immunreaktivität bezüglich GFAP und Synaptophysin festgestellt werden, wobei sich keine Anhalte für eine Astroglie ergaben (siehe Tabelle 13 und Abbildung 16).

Vimentin (85) ist ein Protein, das wie GFAP zu den Intermediärfilamenten gehört. Die durchgeführten Färbungen bildeten - genau wie bei den Färbungen mit Antikörpern gegen GFAP - in allen Fällen eine starke und konsistente Immunreaktivität ab (siehe Tabelle 13 und Abbildung 15).

Neben GFAP und Synaptophysin wurden noch fünf weitere Marker verwendet, die im Nervengewebe exprimiert werden: Antikörper gegen NeuN, NF 200kD, CNPase und Mikroglia marker (CD11b und CD68).

Die Färbung mit Antikörpern gegen NeuN ergab in allen 17 Fällen eine Färbung. In 64,7 % der Fälle kam es, wie bei Synaptophysin, zu einer starken und konsistenten Immunreaktivität (siehe Abbildung 13). Die übrigen sechs Fälle wiesen eine schwache und/oder partielle Färbung auf (siehe Tabelle 13). Bei den Färbungen mit einem Antikörper gegen NF 200kD zeigte sich in über 58,8 % der Fälle eine starke und konsistente Immunreaktivität (siehe Abbildung 13). In den übrigen sieben Fällen konnte man in der semiquantitativen Analyse vereinzelte Immunreaktivitäten ausmachen (siehe Tabelle 13). Bezüglich der angefärbten zellulären Strukturen wurde NeuN vor allem in den Zellkernen und Neurofilament sowohl innerhalb der Somata der Zellen als auch in den Zellausläufern sichtbar. Die Färbungen mit einem Antikörper gegen CNPase bewirkten in 14 von 17 Fällen eine Färbung (siehe Tabelle 13). In 52,9 % der Fälle kam es zu einer starken Färbung (siehe Abbildung 14). Die übrigen fünf Fälle wiesen eine schwache oder partielle Färbung auf. In drei Fällen konnte keine Färbung festgestellt werden.

Die Färbungen mit Antikörpern gegen bestimmte Proteinkomplexe von mikroglialen Zellen ergaben sowohl bezüglich CD 11b als auch CD 68 eine starke Färbung in fast 17,6 % der Fälle. Insgesamt kam es in 53,9 % der MMC-Gewebeproben zu einer sichtbaren Immunreaktivität. In acht der untersuchten Plakoden konnte keine Färbung festgestellt werden (siehe Tabelle 13).

Neben den neuronalen Standardmarkern wurden verschiedene andere Gewebemarker verwendet. Um die inflammatorischen Gewebeanteile zu identifizieren, wurden die Schnitte mit einem T-Zellmarker versehen. Hierbei handelte es sich um einen Antikörper, der gegen CD3 gerichtet ist. In drei der zwanzig Fälle kam es zu einer ausgeprägten Immunreaktivität (siehe Abbildung 14), was das Ausmaß der entzündlichen Veränderungen in diesen Geweben erkennen lässt. Weitere sechs Fälle wiesen eine lokalisierte und/ oder schwache Färbung auf, was darauf schließen lässt, dass es hier zu moderateren Entzündungsreaktionen gekommen ist. In den übrigen acht Fällen konnte die Expression des CD3-Antigens nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 13). Die anderen Gewebemarker (EMA, SMA, VIM, HMB 45, CK Pan) dienten zur weiteren Charakterisierung der MMC-Gewebeproben.

Da es sich bei dem MMC-Gewebe teilweise um epitheliales Gewebe handelt, wurde die Expression von EMA in variablem Ausmaß festgestellt. Elf Fälle wiesen eine starke und drei Fälle eine schwache Färbung auf (siehe Abbildung 14). In den übrigen drei Fällen konnte durch die semiquantitative Analyse keine Färbung dokumentiert werden (siehe Tabelle 13).

SMA wurde in allen Fällen in den Plakoden und den übrigen Gewebeanteilen erwartungsgemäß in Endothelzellen exprimiert, darüber hinaus kam es nicht zu einer Immunreaktivität (siehe Tabelle 13 und siehe Abbildung 14).

Durch den Einsatz von Antikörpern gegen HMB 45 kam es in keinem der zwanzig Fälle zu einer positiven Reaktion (siehe Tabelle 13 und Abbildung 15).

Der letzte Standardmarker, der zum Einsatz kam, war CK Pan. In 88,2 % der Fälle konnte keine Immunreaktivität von CK Pan nachgewiesen werden. Lediglich zwei der 17 Fälle wiesen eine Färbung auf (siehe Tabelle 13 und Abbildung 15).

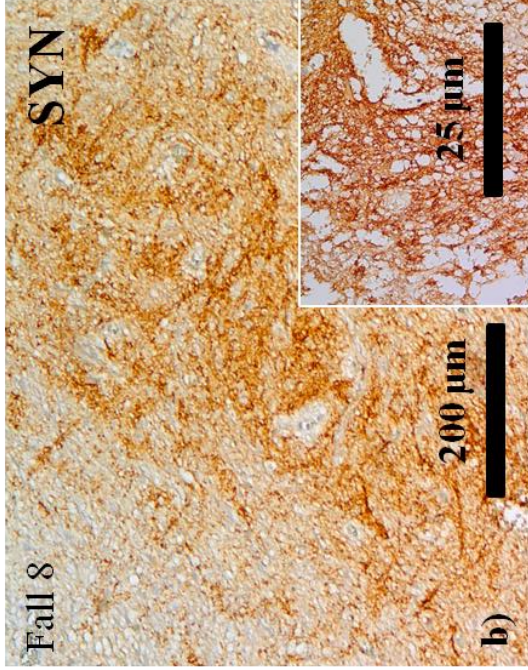
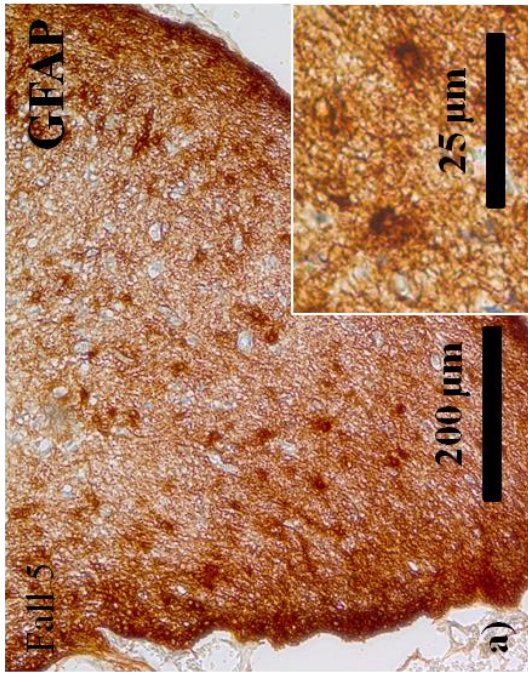
Zusammenfassend wiesen die in den HE-Schnitten identifizierten Plakodengewebe charakteristische Markerprofile auf. In allen MMC-Gewebeproben waren starke gliotische Veränderungen nachweisbar (GFAP- und Vimentinfärbungen). Entzündliche Veränderungen im Sinne von inflammatorischen CD3-immunpositiven Zellen wurden in mehr als der Hälfte der Fälle direkt sichtbar. Die Färbungen der anderen Standardmarker in adulten Rückenmarkkontrollgeweben ergaben ein ähnliches Bild wie bei den untersuchten Fällen (siehe Tabelle 13 und Abbildungen 16-17). Inflammatorische Zellen waren dabei in den Rückenmarkkontrollen nicht nachweisbar, ebensowenig die in den Plakoden so ausgeprägte Astroglie. Das lässt darauf schließen, dass die neuronalen Anteile der Plakode aus histologischer Sicht dem gesunden Rückenmark zumindest ähneln.

Tabelle 13

Immunreaktivität der Standardmarker in den Kontrollgeweben und den Plakoden der Patientenfälle. 2 = starke und konsistente Immunreaktivität; 1 = schwache, partielle Immunreaktivität; 0 = keine Färbung/Hintergrundfärbung. Kontrollen: adultes Rückenmark (n=4).

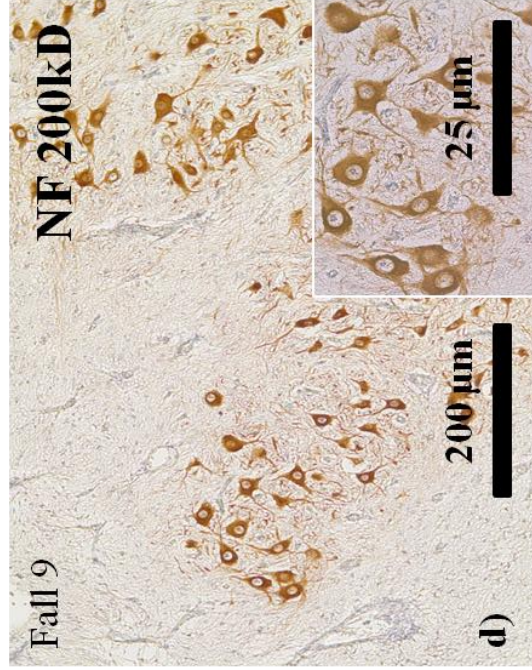
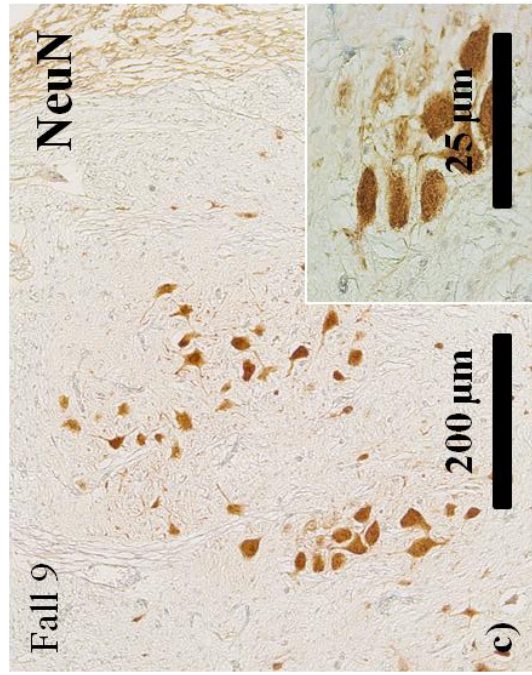
GFAP=Glial Fibrillary Acidic Protein, SYN= Synaptophysin, NeuN=Neuronal Nuclei, NF=Neurofilament, EMA=Epithelial Membrane Antigen, SMA=Smooth Muscle Actin, VIM=Vimentin, HMB45=Melanoma Antigen, CK Pan=Panzytokeratin.

	GFAP	S Y N	Neu N	NF 200kD	CNP ase	CD 3	E M A	S M A	V I M	HMB 45	CK Pan	CD 11b	CD 68
Fall 1	2	1	1	1	1	1	2	0	2	0	0	1	1
Fall 2	2	2	2	2	2	0	1	0	2	0	2	0	0
Fall 3	2	1	1	1	1	2	0	0	2	0	0	2	2
Fall 4	2	2	2	2	1	0	2	0	2	0	0	0	0
Fall 5	2	2	2	2	1	0	2	0	2	0	0	0	0
Fall 6	2	0	2	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0
Fall 7	2	2	2	2	2	1	2	0	2	0	0	1	1
Fall 8	2	2	2	2	2	0	2	0	2	0	0	0	0
Fall 9	2	2	1	1	1	0	2	0	2	0	0	0	0
Fall 10	2	2	2	2	2	0	2	0	2	0	0	0	0
Fall 11	2	1	1	1	1	1	2	0	2	0	0	1	1
Fall 12	2	0	1	1	1	0	1	0	2	0	0	0	0
Fall 13	2	2	2	2	0	1	2	0	2	0	0	1	1
Fall 14	2	2	2	2	0	2	2	0	2	0	1	2	2
Fall 15	2	1	1	1	1	1	0	0	2	0	0	1	1
Fall 16	2	2	2	2	1	2	2	0	2	0	0	2	2
Fall 17	2	2	2	1	0	1	1	0	2	0	0	1	1
Kon- trollen	2	2	2	2	2	0	1	0	2	0	1	0	0



Aufnahmen nach DAB-Färbung mit einem Antikörper gegen

- a) GFAP (Fall 5; 10x Vergrößerung)
- b) Synaptophysin (Fall 8; 10x Vergrößerung)
- c) NeuN (Fall 9; 10x Vergrößerung)
- d) NF 200 kD (Fall 9; 10x Vergrößerung)



In der rechten unteren Ecke der Abbildungen a)-d) ist jeweils eine Ausschnittsvergrößerung dargestellt (40x Vergrößerung).

Abbildung 13

Aufnahmen nach
DAB-Färbung mit
einem Antikörper
gegen

- a) CNPase (Fall 8; 10x Vergrößerung)
- b) CD3 (Fall 16; 10x Vergrößerung)
- c) EMA (Fall 8; 10x Vergrößerung)
- d) SMA (Fall 1; 10x Vergrößerung)

In der rechten unteren
Ecke der Abbildungen
a) und b) ist jeweils
eine
Ausschnittsvergrößeru
ng dargestellt
(40x Vergrößerung).

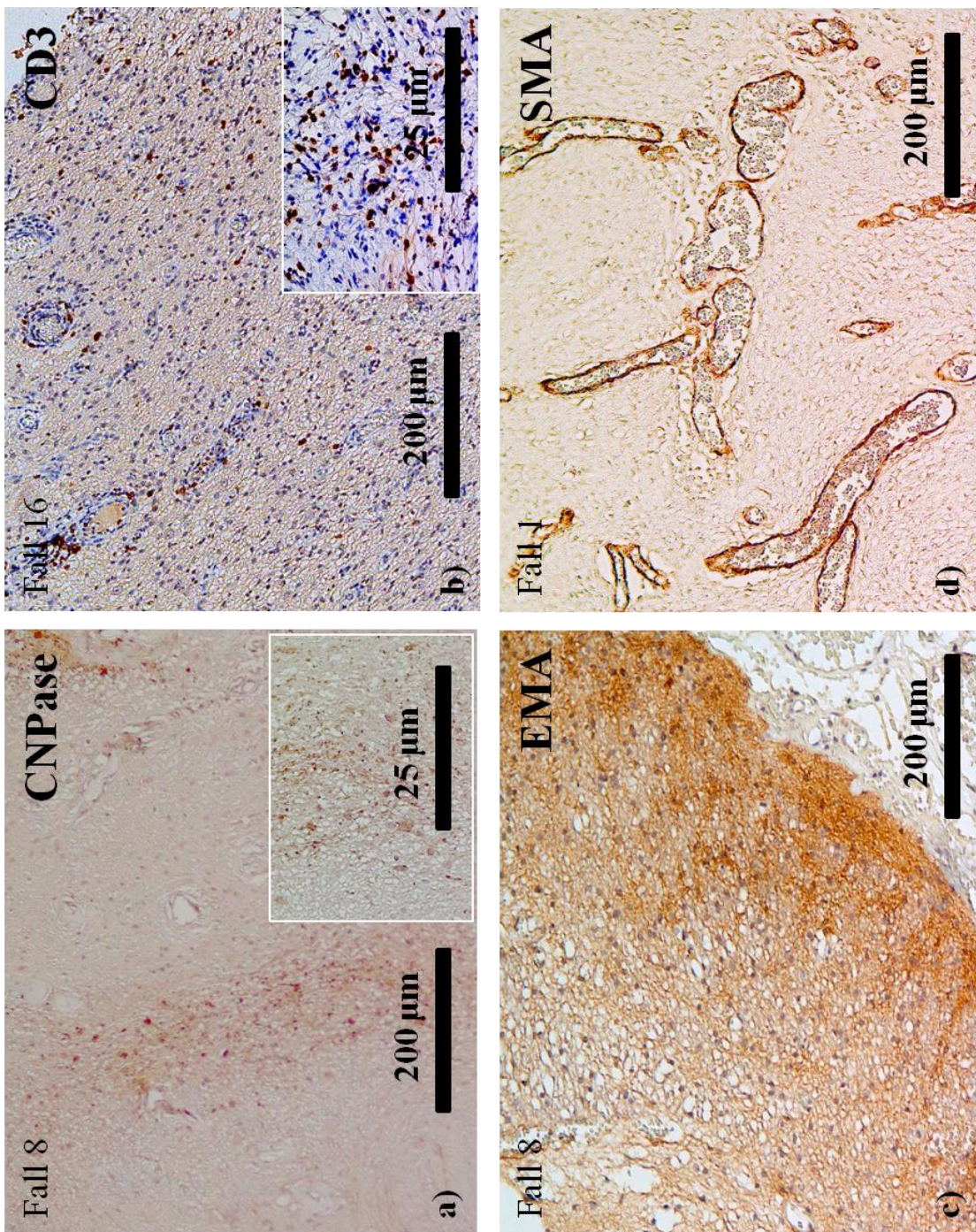
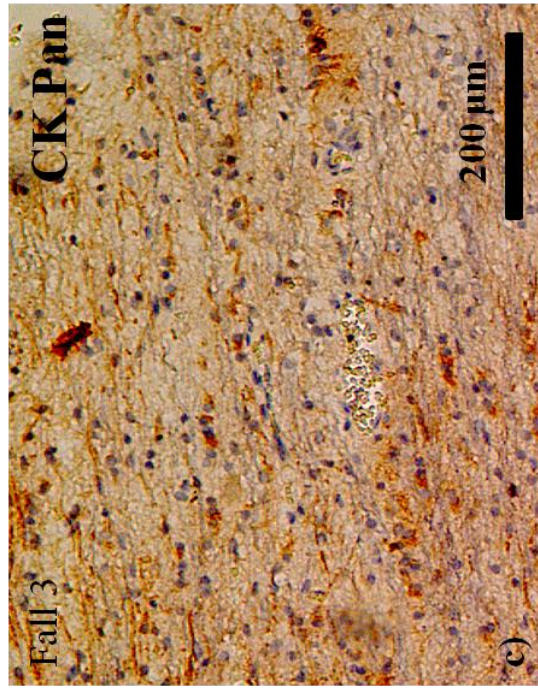
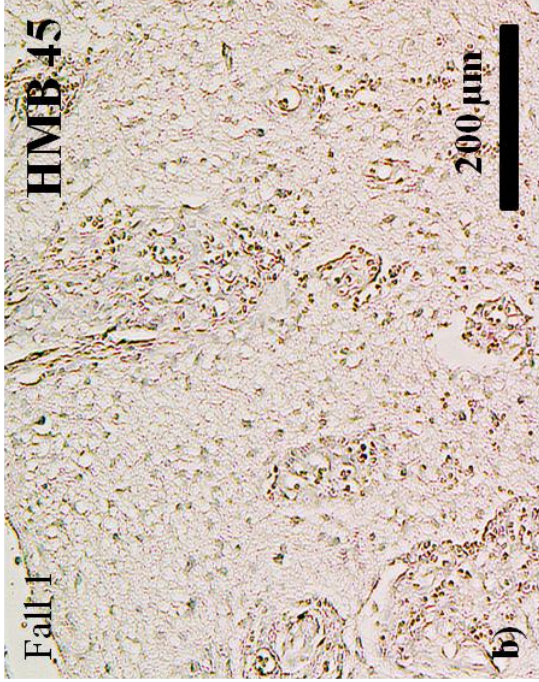
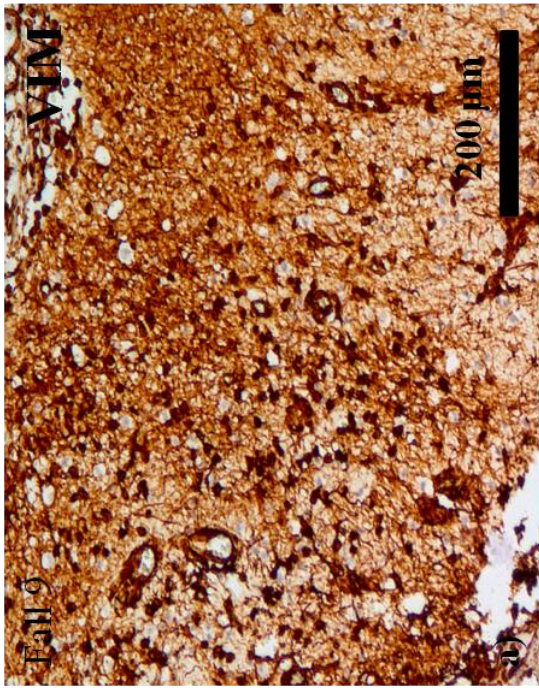


Abbildung 14



Aufnahmen nach DAB-Färbung mit einem Antikörper gegen

a) Vimentin (Fall 9; 10x

Vergrößerung):

Die Abbildung zeigt repräsentativ

für die meisten MMC-

Gewebeproben eine starke

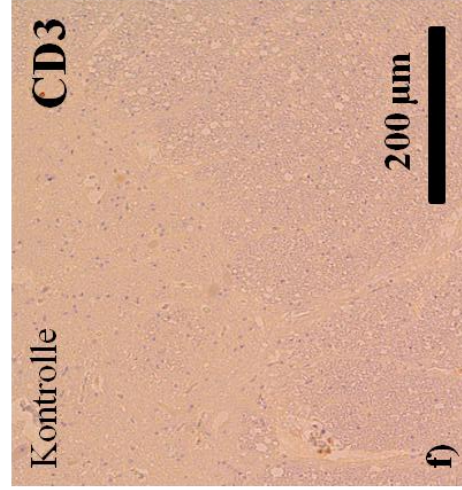
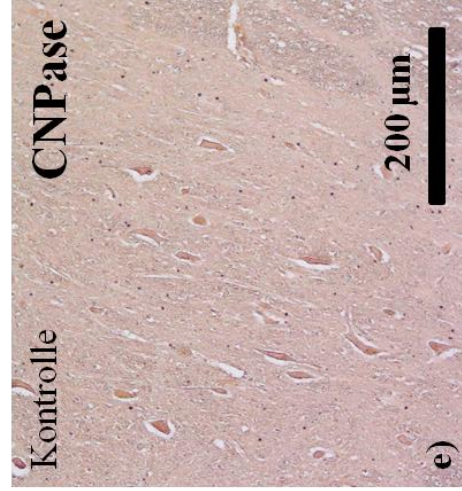
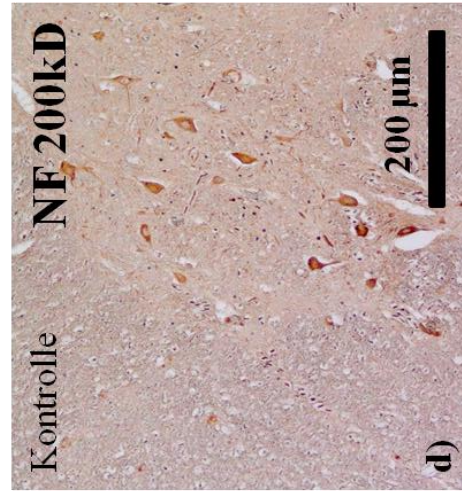
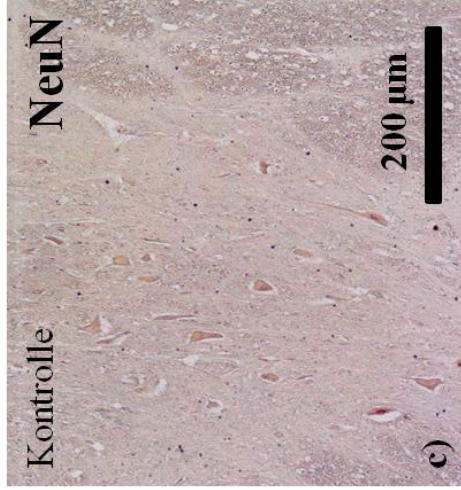
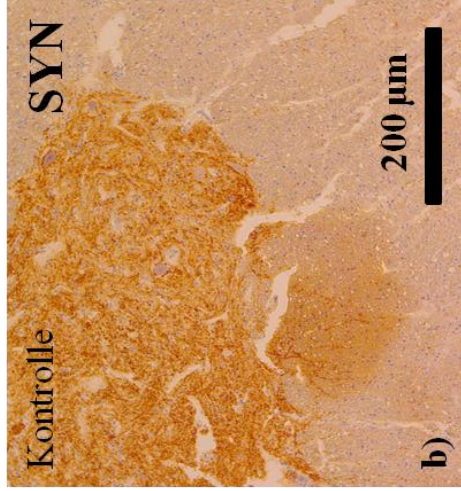
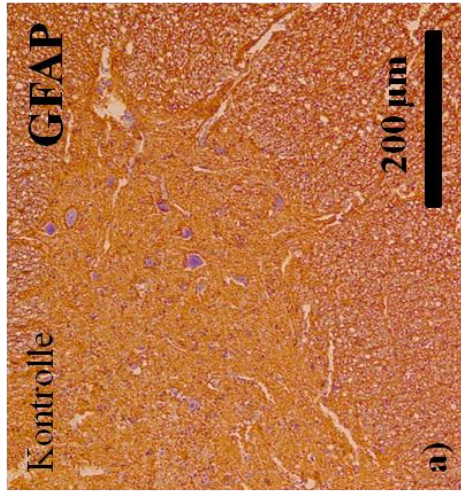
Immunreaktivität des

Intermediärfilaments Vimentin.

b) HMB 45 (Fall 1; 10x Vergrößerung)

c) CK Pan (Fall 3; 10x Vergrößerung)

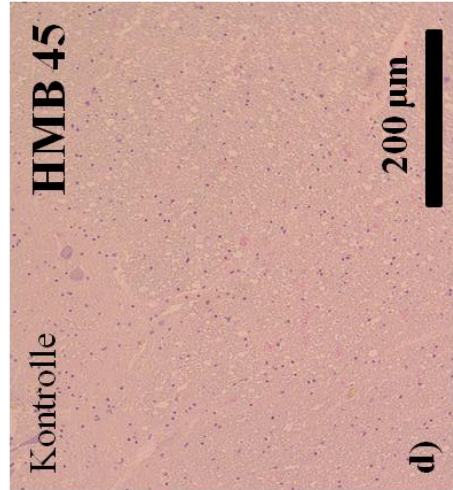
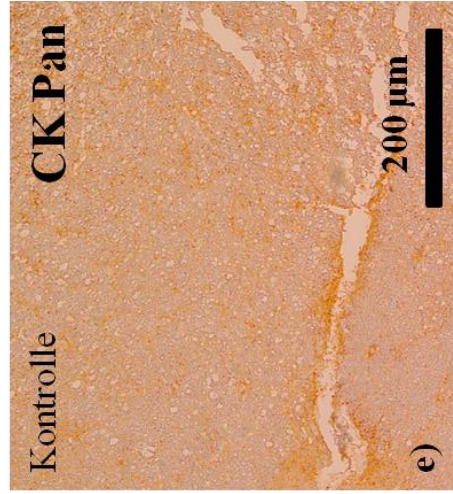
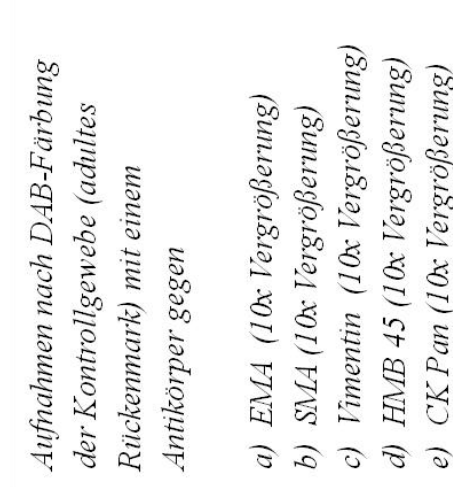
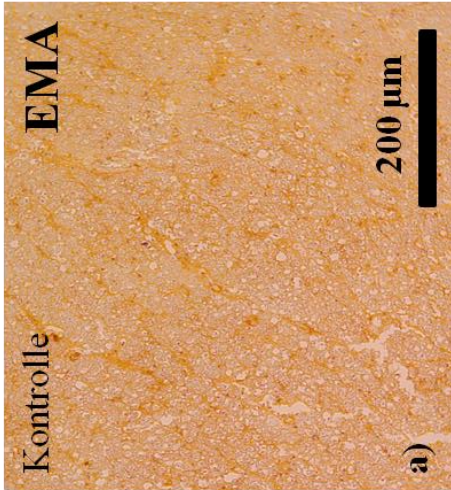
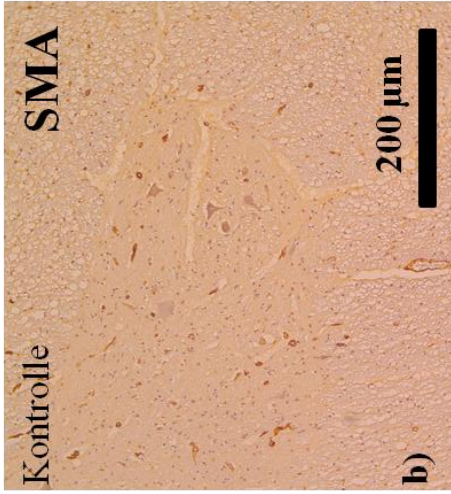
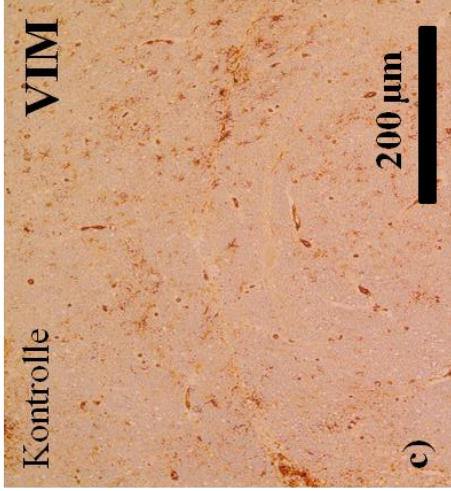
Abbildung 15



Aufnahmen nach
DAB-Färbung der
adulten
Rückenmarksgewebe
mit einem Antikörper
gegen

- a) GFAP (10x
Vergrößerung)
- b) (10x
Vergrößerung)
- c) NeuN (10x
Vergrößerung)
- d) NF 200kD
(10x
Vergrößerung)
- e) CNPase (10x
Vergrößerung)
- f) CD3 (10x
Vergrößerung)

Abbildung 16



*Aufnahmen nach DAB-Färbung
der Kontrollgewebe (adultes
Rückenmark) mit einem
Antikörper gegen*

- a) EMA (10x Vergrößerung)*
- b) SMA (10x Vergrößerung)*
- c) Vimentin (10x Vergrößerung)*
- d) HMB 45 (10x Vergrößerung)*
- e) CK Pan (10x Vergrößerung)*

Abbildung 17

3.3.1 Densitometrische Analyse der GFAP- und Vimentin-Immunreaktivität

Um die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertungen bezüglich der Immunreaktivität von GFAP und Vimentin zu verifizieren, wurden densitometrische Analysen vorgenommen.

In der densitometrischen Auswertung von GFAP ergab sich ein Expressionsniveau, das in allen Fällen über dem der adulten und in 94,1 % der Fälle über dem der fetalen Kontrollgewebe lag. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt gewählt: signifikant bei $p \leq 0,05$ (gekennzeichnet durch */ Δ), hoch signifikant bei $p \leq 0,01$ (gekennzeichnet durch **/ $\Delta\Delta$), höchst signifikant bei $p \leq 0,001$ (gekennzeichnet durch ***/ $\Delta\Delta\Delta$).

In knapp 52,9 % der Fälle (9 von 17) wurde ein höchst signifikantes Niveau gegenüber den fetalen Kontrollgeweben und in 82,3 % der Fälle (14 von 17) gegenüber den adulten Kontrollen festgestellt. Drei Fälle wiesen eine hohe Signifikanz gegenüber den fetalen und adulten Kontrollgeweben auf. Als signifikant gegenüber den fetalen Rückenmarkgeweben wurden zwei Fälle eingestuft. Von den übrigen drei Fällen waren die Expressionsniveaus im Vergleich zu den Kontrollen zwar erhöht, jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 18).

Somit konnte die zuvor anhand morphologischer Kriterien und durch die semiquantitative Auswertung festgestellte Astrogliose durch die densitometrische Analyse nachgewiesen werden.

In der densitometrischen Auswertung von Vimentin ergab sich ein Expressionsniveau, das in 88,2 % der Fälle über dem der fetalen und in 94,1 % der Fälle über dem der adulten Kontrollgewebe lag. Die Signifikanzniveaus wurden wie oben beschrieben gewählt.

In 47 % der Fälle (8 von 17) wurde ein höchst signifikantes Niveau gegenüber den fetalen Rückenmarkgeweben und in 82,3 % der Fälle (14 von 17) gegenüber den adulten Kontrollen festgestellt. Drei Fälle wiesen eine hohe Signifikanz gegenüber den fetalen, ein Fall gegenüber den adulten Kontrollen auf. Signifikant erhöhte Expressionslevel im Vergleich zu den fetalen Rückenmarkgeweben ergaben sich in 23,5 % der Fälle und im Vergleich zu den adulten Kontrollgeweben in einem Fall. Die Immunreaktivitäten in den übrigen Fällen waren nicht signifikant erhöht.

Zusammengefasst kam es bezüglich Vimentin in 15 Fällen (gegenüber fetalen Kontrollen) beziehungsweise 14 Fällen (gegenüber adulten Kontrollen) zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des Expressionsniveaus.

Abbildung 18 →

*Darstellung der GFAP- und Vimentin-Immunreaktivitäts (-IR)-Level in den Myelomeningozelen (MMC)-Plakoden im Vergleich zu fetalen und adulten Kontrollen. (I) GFAP-IR in fetalen Rückenmarkskontrollen (A), in adulten Rückenmarkskontrollen (B) und in den MMC-Gewebeproben (C). Die Expressionsmuster der untersuchten MMC-Plakoden unterschieden sich insofern von den Kontrollen, als dass die GFAP-positiven Zellen in einem morphologisch aktiven Zustand mit prominenten Zellkörpern sichtbar wurden (Pfeile in C). (D) Die semiquantitativ festgestellte erhöhte Expression von GFAP in den MMC-Plakoden wurde durch die Densitometrie untermauert. Hierbei wurden die integrierten mittleren GFAP-IR für jeden einzelnen MMC-Fall und für die kumulierten fetalen (f) und adulten (a) Kontrollen aufgetragen. Signifikante Unterschiede zwischen den MMC-Plakoden und den fetalen Kontrollen werden durch *, die zwischen den MMC-Plakoden und den adulten Kontrollen durch Δ dargestellt (Signifikanzlevel $*/\Delta p \leq 0,05$, $**/\Delta\Delta p \leq 0,01$, $***/\Delta\Delta\Delta p \leq 0,001$). (E-H) Darstellung der Vimentin-IR in fetalem (E, F) und adultem (G) Rückenmark in der grauen (gray matter = GM) und weißen Substanz (white matter = WM). Die MMC-Gewebeproben wiesen eine Vimentin-IR in verästelten Zellen mit morphologischen Korrelaten von glialen Zellen auf (H, Pfeile). (I) Die durchgeführte Densitometrie verifiziert die erhöhte Vimentin-IR in den meisten MMC-Plakoden (Signifikanzlevel $*/\Delta p \leq 0,05$, $**/\Delta\Delta p \leq 0,01$, $***/\Delta\Delta\Delta p \leq 0,001$). Maßstab = 100 μm .*

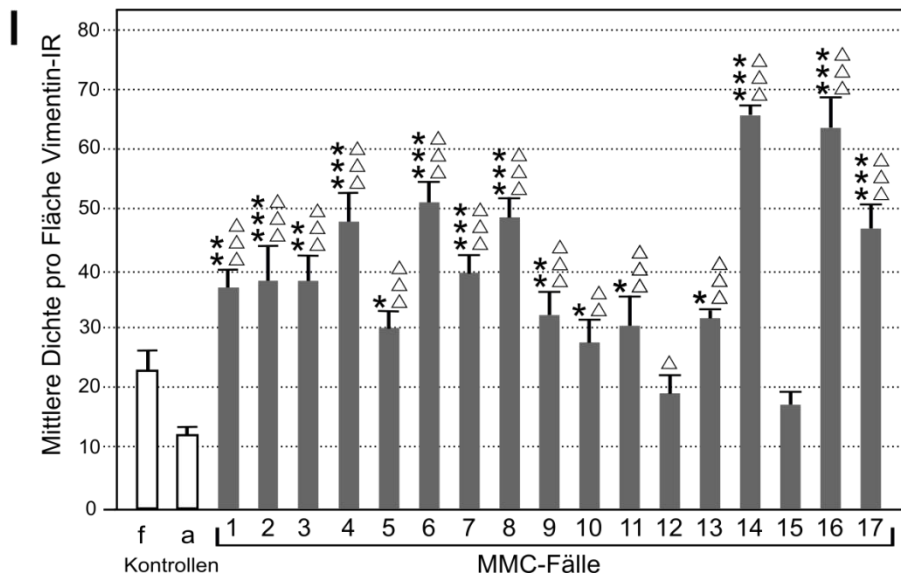
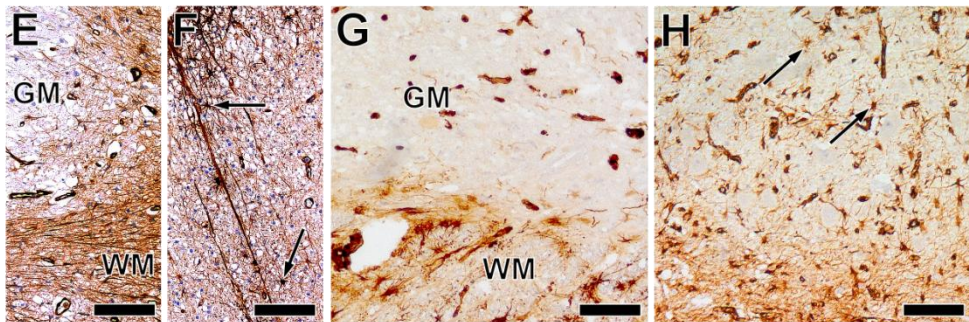
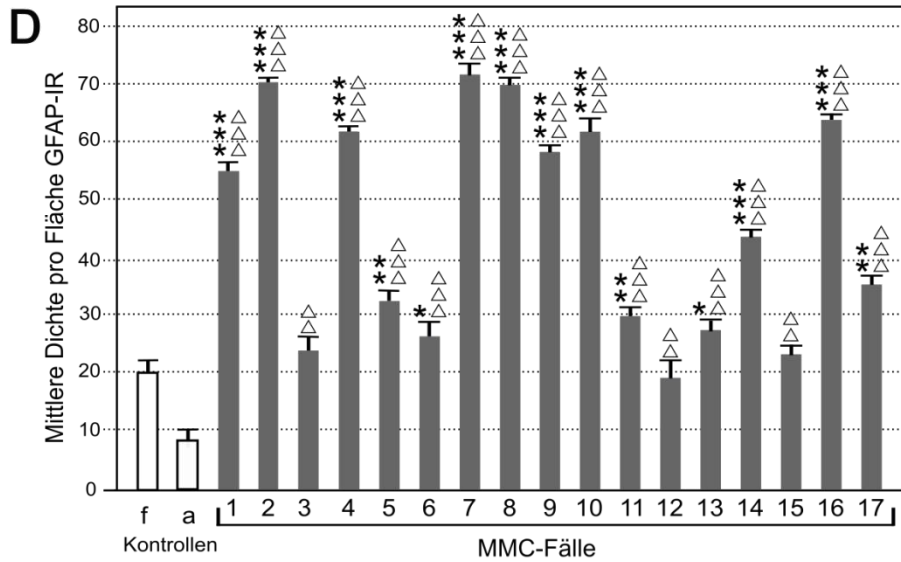
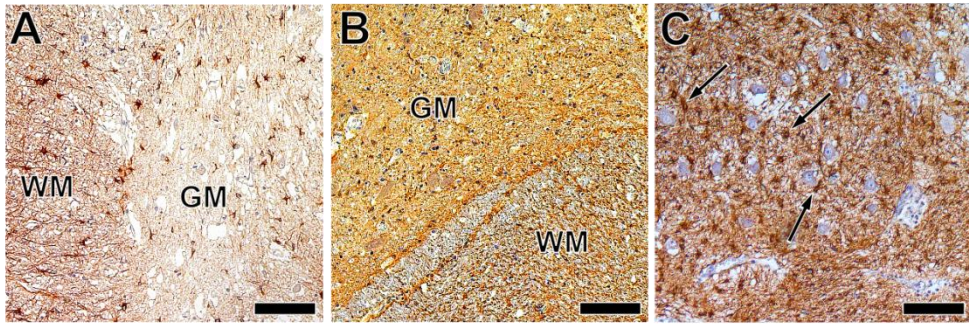


Abbildung 18

3.4 Expressionsmuster von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor: Ergebnisse der qualitativen, semiquantitativen und densitometrischen Auswertungen

Nachdem sämtliche MMC-Gewebeproben nach der Färbung mit den Standardmarkern zur histologischen Charakterisierung ausgewertet worden waren, folgten die immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern, die sich gegen die zuvor ausgewählten Zytokine richteten.

Interleukin-1-beta

Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen Interleukin-1-beta ergab in 13 von 17 Fällen eine konsistente und/oder starke Immunreaktivität in allen identifizierten Plakodenabschnitten. Das bedeutet, dass in 76,5 % der Fälle Interleukin-1-beta als proinflammatorisches Zytokin in der MMC-Plakode auf einem hohen Expressionsniveau nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 19). Bei den übrigen fünf Fällen lag eine partielle und/oder schwache Färbung vor. Die Null wurde in der semiquantitativen Analyse nicht vergeben (siehe Tabelle 14). Das heißt, dass es keine MMC-Gewebeprobe gab, in der Interleukin-1-beta nicht exprimiert wurde.

Von der Zellmorphologie her handelte es sich bei den IL-1b-positiven Zellen um unterschiedliche Zelltypen. Einerseits konnte man morphologische Eigenschaften von Neuronen und andererseits von Gliazellen erkennen. Die angefärbten neuronalen Zellen waren wahrscheinlich motorische Vorderhornzellen. Diese Zellen stellten sich bei der mikroskopischen Analyse als relativ große einzelne oder gruppiert vorkommende Zellkörper mit großem hellen Kern und deutlichem Nukleolus dar. Bei den Zellen, an deren Zelleibern sternförmig anmutende Ausläufer zu erkennen waren, handelte es sich morphologisch gesehen um Astrozyten (siehe Abbildung 19). Des Weiteren wurden eher rundliche bis ovale Zellen deutlich angefärbt, die einen großen runden Zellkern beinhalteten, weniger Ausläufer besaßen (siehe Abbildung 19) und damit morphologische Charakteristika von Oligodendrozyten aufwiesen. Außerdem konnte man viele eher kleinere Zellen erkennen, die eine Immunreaktivität nach Färbung mit Antikörpern gegen Interleukin-1-beta zeigten. Hierbei handelte es sich vermutlich um Mikrogliazellen.

Mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbungen wurde sowohl die Koexpression von Interleukin-1-beta und dem neuronalen Standardmarker NeuN als auch dem astrozytären Standardmarker GFAP und die Koexpression von Interleukin-1-beta und dem inflammatorischen Marker CD11b bestätigt (siehe Abschnitt 3.4.1).

Im Vergleich zu den relativ hohen Expressionsniveaus von Interleukin-1-beta in den MMC-Plakoden konnte bei keinem der vier adulten Rückenmarksgewebe, die als Kontrollgewebe dienten, eine Expression des Zytokins festgestellt werden, sodass diese bei der semiquantitativen Analyse alle die Bewertung Null erhielten (siehe Tabelle 14 und Abbildung 19). Ebenso wurde in sämtlichen fetalen Kontrollgeweben keine Interleukin-1-beta-Immunreaktivität nachgewiesen (siehe Tabelle 14 und Abbildung 19). Als Positivkontrolle diente entzündetes Hirngewebe, das ebenfalls semiquantitativ ausgewertet wurde und in allen Fällen eine starke und/oder konsistente Färbung aufwies, sodass alle Fälle mit einer Zwei bewertet wurden (siehe Tabelle 14).

Interleukin-1-Rezeptor

Die semiquantitativen Analysen der immunhistochemischen Interleukin-1-Rezeptor-Färbungen erbrachten, dass in 9 von 17 Fällen (52,9 %) Interleukin-1-Rezeptor konsistent und/oder stark exprimiert wurde (siehe Abbildung 20). In den anderen acht Fällen konnte eine vereinzelte Expression des Rezeptors demonstriert werden. Somit ließ sich in allen MMC-Plakoden der Rezeptor von Interleukin-1-beta auf unterschiedlichem Expressionsniveau, wie densitometrisch verifiziert, nachweisen (siehe Tabelle 14). Nach der genaueren mikroskopischen Analyse der gefärbten Schnitte ergab sich für die Expression von Interleukin-1-Rezeptor, ähnlich wie bei der Interleukin-1-beta-Expression, eine charakteristische Verteilung innerhalb der Gewebeproben. Die Zellen, die nach der Färbung besonders deutlich hervortraten, waren diejenigen, deren große Zellkörper einen großen hellen Kern mit einem deutlich sichtbaren Nukleolus beinhalteten und zahlreiche Dendritenabgänge aufwiesen. Diese Zellen besaßen also morphologische Eigenschaften von Neuronen, speziell multipolarer Neuronen, die zum Beispiel als motorische Vorderhornzellen im Rückenmark vorkommen. Des Weiteren wurden eher kleine Zellen angefärbt, deren Zellkörper eine variable Form durch die zahlreichen sternförmigen Ausläufer annahmen. Bei den beschriebenen Zellen handelt es sich demnach wahrscheinlich um Zelltypen der Makroglia. Die Färbung der Zellen beschränkte sich nicht nur auf die Somata der Zellen, sondern es hatte den Anschein, als würde Interleukin-1-Rezeptor auch in den Ausläufern exprimiert werden. Außerdem wurden in den meisten Schnitten kleine Zellen angefärbt, deren Zellkörper keine bestimmte Form aufwiesen und deren Ausläufer ebenfalls sehr variabel aussahen und somit morphologische Korrelate von Mikroglia besaßen. In den Kontrollgeweben kam es lediglich zu einer Färbung des Hintergrunds (siehe Abbildung 20).

Vergleicht man die Expressionsmuster von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor, so stellt man fest, dass Interleukin-1-beta in höherem Maße exprimiert wurde.

Eine starke, konsistente Immunreaktivität trat bezüglich Interleukin-1-beta in ca. 76,5 % der Fälle auf. Dasselbe Expressionsniveau konnte in Bezug auf Interleukin-1-Rezeptor nur in 52,9 % der Fälle festgestellt werden. Trotzdem muss man beachten, dass beide Zytokine in allen Gewebeproben der Plakoden in unterschiedlichem Ausmaß nachgewiesen werden konnten. Bezüglich der Lokalisation innerhalb des Rückenmarksgewebes, welches sich in den Plakoden befand, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Expression von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor festgestellt werden (siehe Abbildungen 19-20). Im Hinblick auf die Strukturen, die innerhalb der Zellkörper angefärbt wurden, und im Hinblick auf die Expressionslevel stellten sich die abgebildeten Neurone nahezu identisch dar.

Tabelle 14

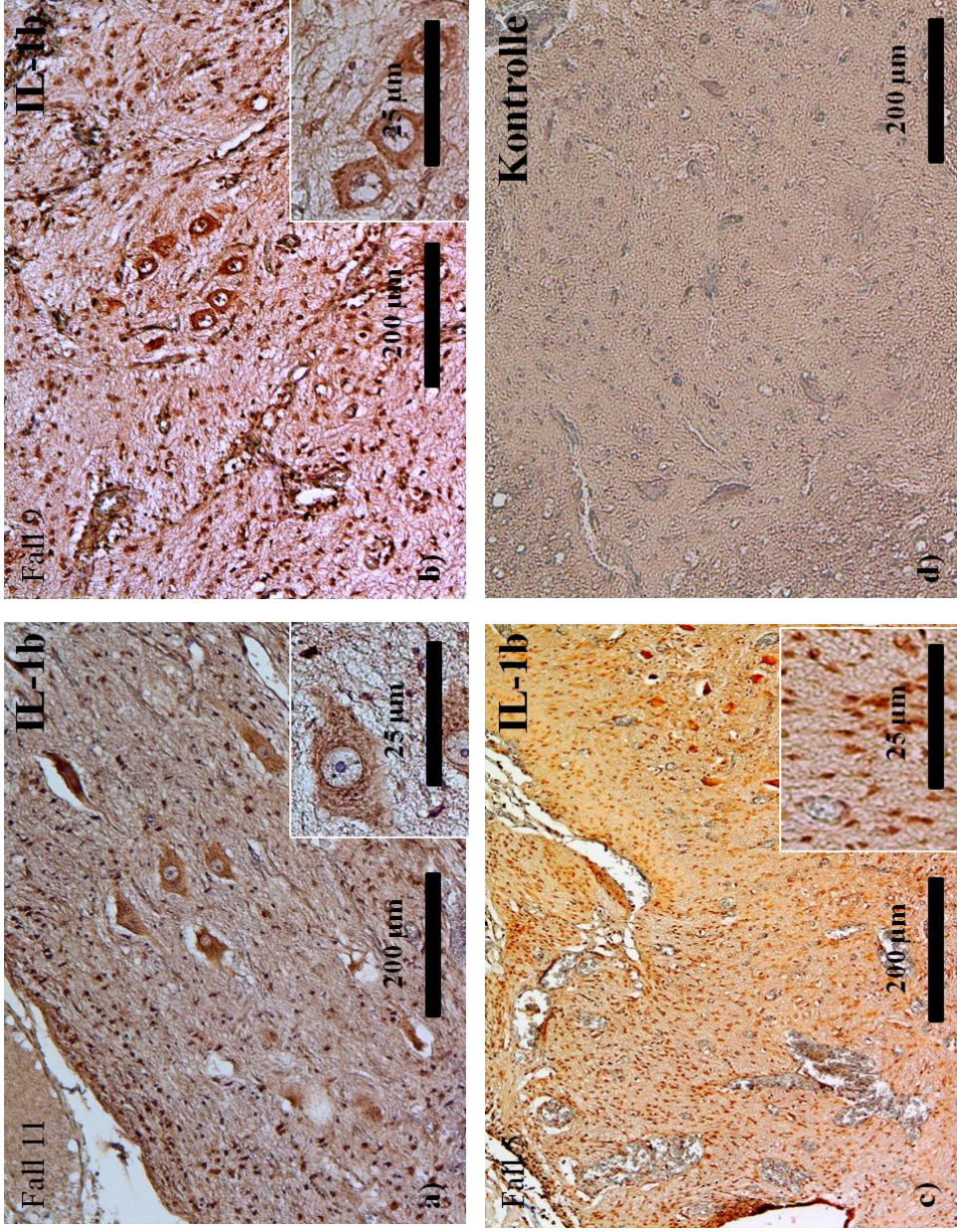
Semiquantitative Auswertung:

Immunreaktivität von IL-1b und IL-1R in den MMC-Plakoden und in den Kontrollgeweben (adultes und fetales Rückenmark und adultes Hirn).

2 = starke Immunreaktivität in allen Plakodenabschnitten; 1 = partielle Immunreaktivität (nicht in allen Plakodenabschnitten); 0 = keine Färbung/ Hintergrundfärbung.

f = fetal, a = adult, RM = Rückenmark

	IL-1beta	IL-1R
Fall 1	2	1
Fall 2	2	2
Fall 3	1	1
Fall 4	2	2
Fall 5	2	1
Fall 6	2	1
Fall 7	2	2
Fall 8	2	2
Fall 9	1	1
Fall 10	2	2
Fall 11	2	1
Fall 12	1	1
Fall 13	2	2
Fall 14	2	2
Fall 15	1	1
Fall 16	2	2
Fall 17	2	2
Negativkontrolle (fRM, aRM, n =8)	0	0
Positivkontrolle (Hirn)	2	2



Aufnahmen nach DAB-Färbung mit einem Antikörper gegen IL-1b

- a) Fall 11, 10x Vergrößerung
 - b) Fall 9, 10x Vergrößerung:
- Mittig sieht man eine Gruppe von sechs Zellen, die morphologische Eigenschaften von Neuronen aufweisen und die IL-1b exprimieren.
- c) Fall 5, 10x Vergrößerung:

Die Abbildung zeigt vor allem vor allem Gliazellen.

- d) Kontrollgewebe (adultes Rückenmark), 10x Vergrößerung.

In der rechten unteren Ecke der Abbildungen a) bis c) ist jeweils eine Ausschnittsvergrößerung dargestellt (40x Vergrößerung).

Abbildung 19

- Aufnahmen nach DAB-Färbung mit einem Antikörper gegen IL-1R
- a) Fall 11, 10x Vergrößerung
 - b) Fall 9, 10x Vergrößerung: Man sieht über die ganze Abbildung verteilt Neurone, die Interleukin-1-Rezeptor exprimieren.
 - c) Fall 5, 10x Vergrößerung: Die Abbildung zeigt viele Neurone, die IL-1R exprimieren.
 - d) Kontrollgewebe (adultes Rückenmark), 10x Vergrößerung.

In der rechten unteren Ecke der Abbildungen a) bis c) ist jeweils eine Ausschnittsvergrößerung dargestellt (40x Vergrößerung).

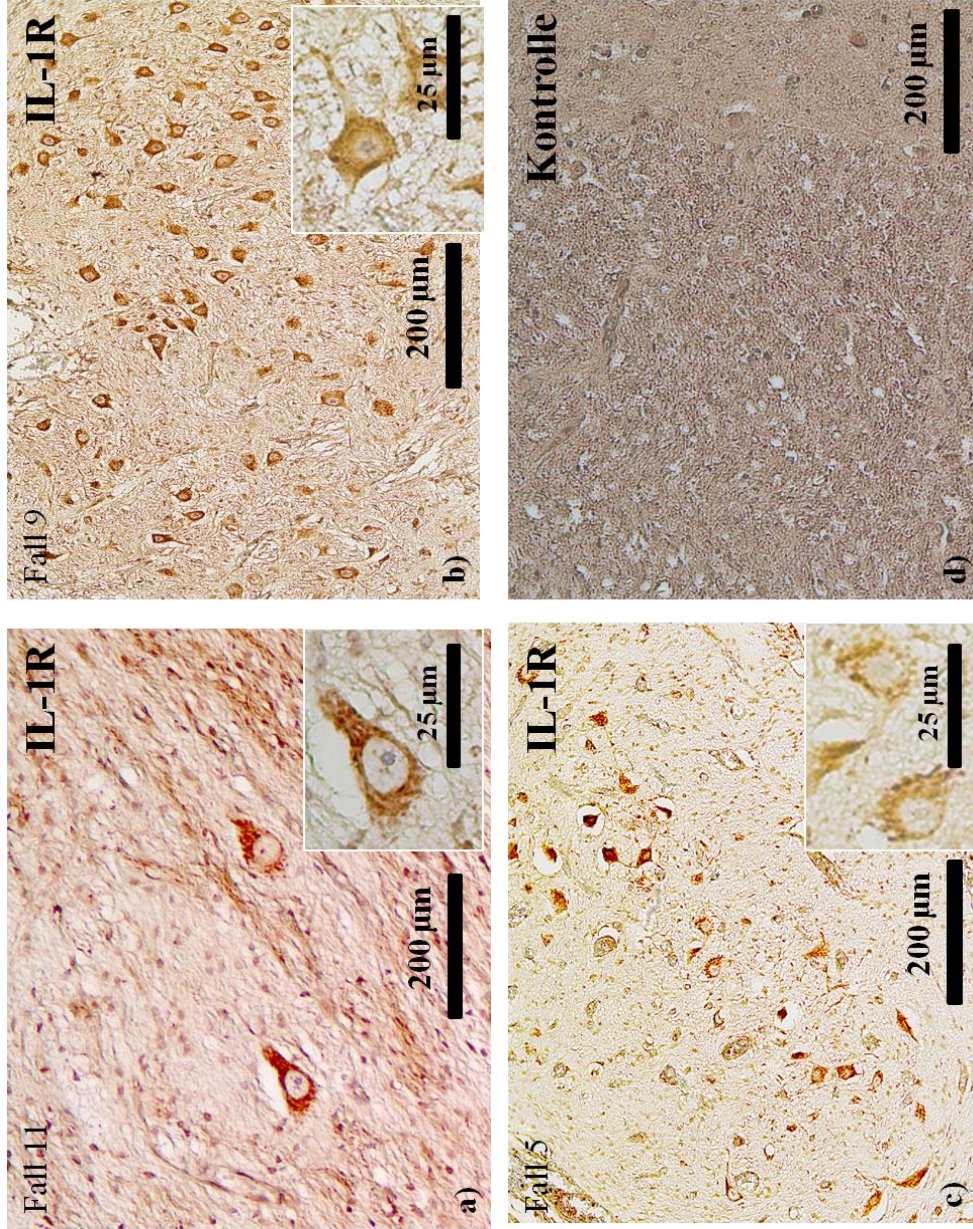


Abbildung 20

3.4.1 Zelluläre Lokalisation von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor

Mittels der mikroskopischen Auswertung der Färbungen mit dem Fluoreszenzmikroskop konnten teilweise Kolokalisationen der Zytokine und der neuronalen, astrozytären und mikroglialen Marker nachgewiesen werden. Die Abbildung 21G zeigt einen repräsentativen Fall, bei dem sowohl Interleukin-1-beta (rot) und der astrogliale Marker GFAP (grün) einzeln sowie die Kofärbung beider Marker mittels fluoreszenzmarkiertem Farbstoff nachgewiesen werden konnten. Die Abbildung 21D zeigt im Vergleich dazu eine Aufnahme nach DAB-Färbung mit Antikörpern gegen Interleukin-1-beta und im Abschnitt E die Doppelfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Interleukin-1-beta (rot) und NeuN (grün). Man kann anhand der Aufnahmen feststellen, dass Interleukin-1-beta und NeuN im Soma des Neurons koexprimiert wurden, wodurch die gelbe Färbung entstand. Die Doppelfluoreszenzfärbungen wurden mit mehreren Schnitten durchgeführt, sodass man davon ausgehen kann, dass bei den untersuchten Zytokinen eine Koexpression mit den neuronalen Markern vorlag. Des Weiteren wurden Doppelfluoreszenzfärbungen mit zwei Primärantikörpern durchgeführt, von denen sich der erste gegen Interleukin-1-Rezeptor richtete und der zweite Primärantikörper gegen den astrozytären Marker GFAP. Interleukin-1-Rezeptor lag nicht koexprimiert mit GFAP vor. Neben den Doppelfluoreszenzfärbungen der Plakoden mit Antikörpern gegen die Zytokine und die neuronalen bzw. astrozytären Marker wurden Färbungen mit einem Antikörper gegen mikrogliale Marker vorgenommen. Die Abbildungen 21H-J zeigen dies beispielhaft anhand von Interleukin-1-beta (rot) und CD11b (grün)/CD68 (grün). Im linken Teil der Abbildungen sah man deutlich, dass Interleukin-1-beta und CD11b in den Zellen koexprimiert wurden.

Tabelle 15

Auswertung der Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

+ = Koexpression bzw. Kolokalisation vorhanden; - = keine Koexpression bzw.

Kolokalisation

	GFAP	NeuN	CNPase	CD11b
IL-1b	+	+	+	+
IL-1R	-	+	-	-

Abbildung 21 →

Darstellungen der Expressionsmuster und Immunreaktivitäten(-IR) von IL-1beta- und IL-1R1.

(A, B) In den fetalen (A) und adulten (B) Rückenmarkskontrollen wurde eine schwache IL-1beta-IR detektierbar. (C, D) Die Myelomeningozelen (MMC)-Gewebe wiesen eine starke IL-1beta-IR in sternförmigen Zellen (C) und Zellen mit morphologischen Korrelaten von neuronalen Zellen auf (D). (E) Kofärbung von IL-1beta (rot) und NeuN (grün) (oben fusionierte Kanäle IL-1beta (rot)/NeuN (grün)/Kernfärbung (DAPI = blau), mittig separater Kanal NeuN-Färbung (grün), unten separater Kanal IL-1beta-Färbung (rot)). (F, G) Kofärbung von IL-1beta (rot) und GFAP (grün) (links fusionierte Kanäle, mittig und rechts separate Kanäle) (F); in (G) ist eine höhere Vergrößerung gewählt. (H) Kofärbung von IL-1beta (rot) und CD11b (grün) in geclusterten, amöbenartigen Zellen im MMC-Neuroepithel (links fusionierte Kanäle, rechts oben und rechts unten separate Kanäle). (I) Höhere Vergrößerung der IL-1beta- und CD11b-Kofärbung in einem amöbenartigen Makrophagen/einer mikroglialen Zelle (Pfeil) angrenzend an eine IL-1beta-positive Zelle mit neuronalem Aussehen.(J) Kofärbung von IL-1b (rot) und CD68 (grün) in Zellen mit morphologischen Korrelaten von Mikroglia (links fusionierte Kanäle mit Kernfärbung (DAPI), rechts oben und rechts unten separate Kanäle).(K, L) IL-1R1-IR in fetalen (K) und adulten (L) Rückenmarkskontrollen ohne oder lediglich mit schwacher Färbung in der grauen und weißen Substanz. (M) Starke IL-1R1-IR in Zellen mit neuronaler Morphologie, die im MMC-Gewebe verstreut vorliegen. (N) Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung bestätigte die Kofärbung von IL-1R1 (rot) und neuronalen Markern, in diesem Fall NeuN (grün) (oben fusionierte Kanäle, mittig und unten separate Kanäle).

Maßstäbe: A-D, K-M, 100 µm; E-J, N, 20 µm.

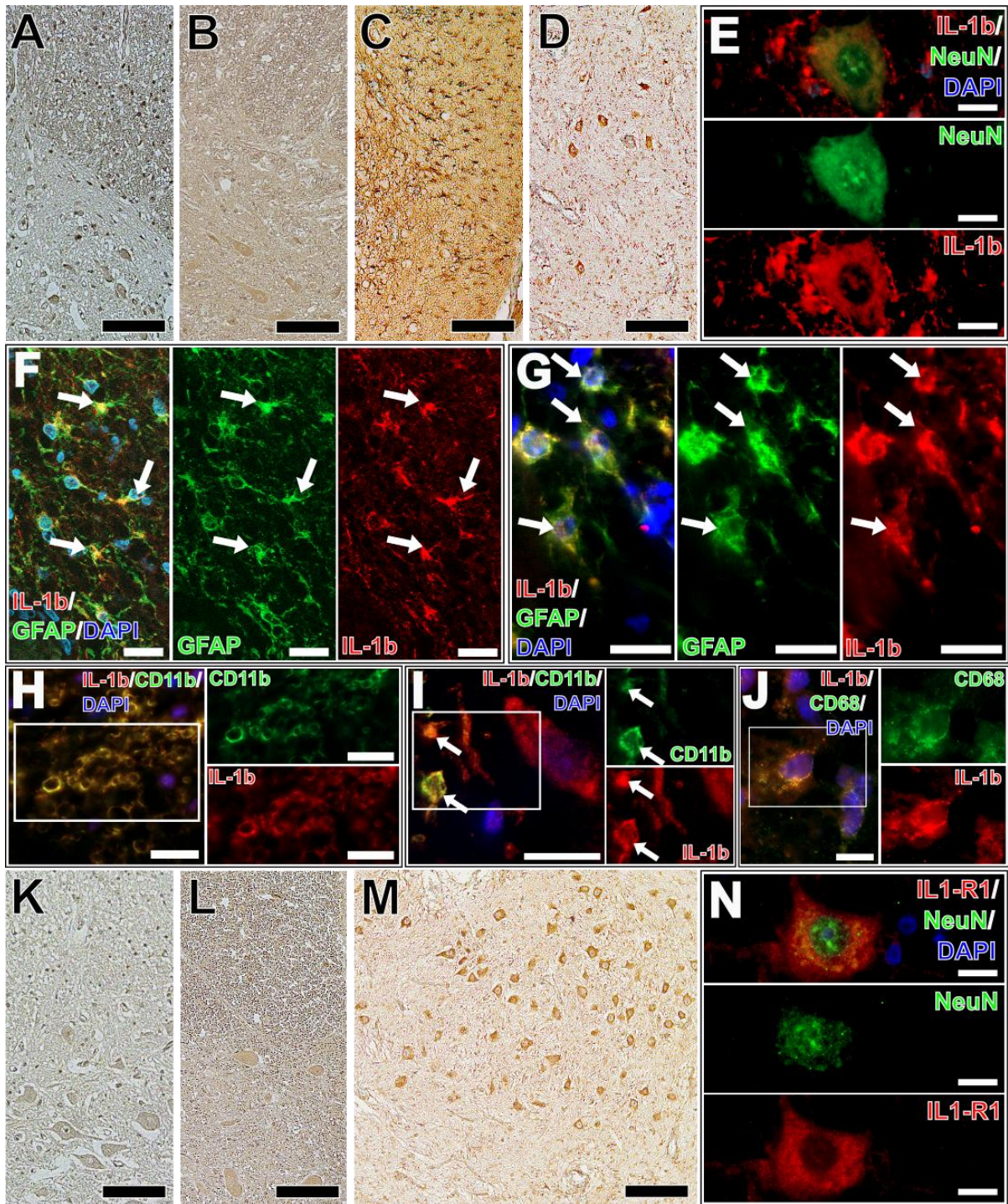


Abbildung 21

3.4.2 Densitometrische Analysen der Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor-Immunreaktivitäten

Nach der semiquantitativen Analyse der Diaminobenzidinfärbungen von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor und den Doppelfluoreszenzfärbungen mit neuronalen, astrozytären und mikroglialen Markern wurden die Ergebnisse mittels densitometrischer Analysen quantifiziert. In dem Diagramm auf Seite 80 (siehe Abbildung 22) sind die Ergebnisse der Immunreaktivitätsdichten von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor aufgetragen.

In der densitometrischen Auswertung von Interleukin-1-beta ergab sich ein Expressionsniveau, das in allen Fällen weit über dem der Kontrollgewebe lag und statistisch signifikant war. 15 Fälle (88,2 %) wiesen bezüglich der Signifikanz der densitometrischen Ergebnisse von IL-1b gegenüber den fetalen und adulten Rückenmarkskontrollen p-Werte unter 0,001 auf (höchst signifikant) und zwei Fälle (11,8 %) besaßen eine hohe Signifikanz ($p \leq 0,01$). Wenn man die Ergebnisse der semiquantitativen Analyse mit den Ergebnissen der Densitometrie verglich, so stellte man fest, dass die in der semiquantitativen Analyse festgelegten Immunreaktivitäten (siehe Tabelle 14) durch die Densitometrie verifiziert wurden. Die densitometrischen Messungen ergaben in über 76,5 % der Fälle Werte zwischen 30,8 und 56,4.

Betrachtete man die densitometrische Analyse der Diaminobenzidinfärbungen mit Antikörpern gegen Interleukin-1-Rezeptor (siehe Abbildung 22), so stellte man fest, dass das Expressionsniveau in allen Fällen weit über dem der Kontrollgewebe lag und statistisch signifikant war. In 15 Fällen (88,2 %) lagen die p-Werte unter 0,001, sodass die Werte im Vergleich zu den fetalen und adulten Kontrollen als höchst signifikant eingestuft wurden. Die übrigen zwei Fälle (11,8 %) wiesen ebenfalls gegenüber sowohl den fetalen als auch den adulten Rückenmarkskontrollen eine hohe Signifikanz auf ($p \leq 0,01$).

Vergleicht man die densitometrischen Daten von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor, so kommt man zu dem Ergebnis, dass das Expressionsniveau der Zytokine in den MMC-Proben weit über dem der Kontrollgewebe lag. Insgesamt war das Expressionsniveau von Interleukin-1-beta höher als das von Interleukin-1-Rezeptor.

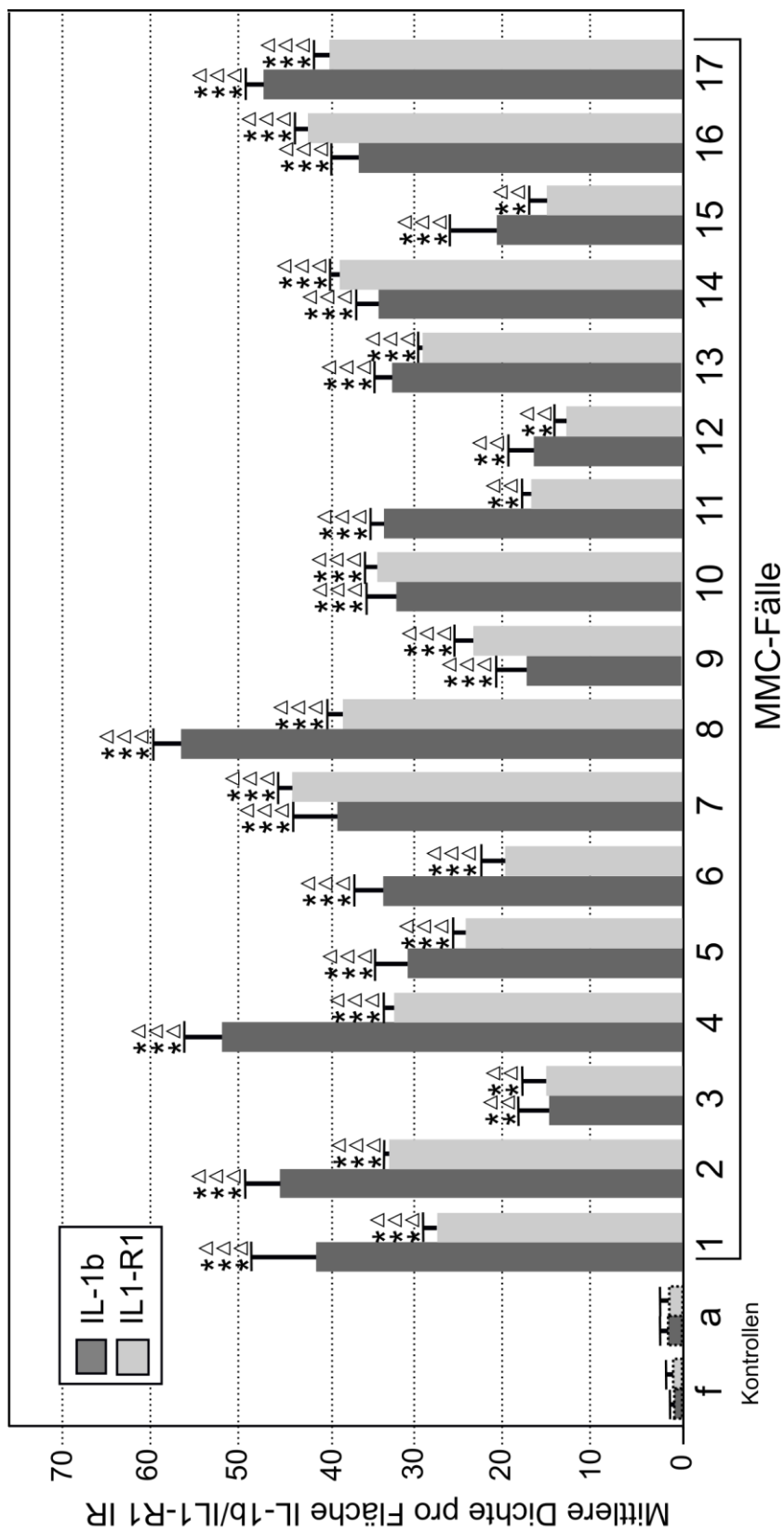


Abbildung 22

Diagramm zur quantifizierten Densitometrie der Kontrollen und aller Fälle bezüglich Interleukin-1-beta (dunkelgrau) und Interleukin-1-Rezeptor (hellgrau).

x-Achse: Auflistung der kumulierten fetalen und adulten Kontrollen und der Fälle 1-17.

y-Achse: Auftragung der mittleren Dichte pro Fläche, wobei schwarz=255 und weiß=0 ist.

Signifikanzlevel: **/ $\Delta\Delta$ $p \leq 0,01$, ***/ $\Delta\Delta\Delta$ $p \leq 0,001$. * im Vergleich zu fetalen (f) Kontrollen, Δ im Vergleich zu adulten (a) Kontrollen.

3.5 Expressionsmuster von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor: Ergebnisse der qualitativen, semiquantitativen und densitometrischen Auswertungen

Bei den neuroprotektiven Mediatoren Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor erfolgte wie zuvor bei den Standardmarkern und den proinflammatorischen Zytokinen Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor zunächst die qualitative und semiquantitative Analyse.

Erythropoetin

Die Expression von Erythropoetin konnte in 7 von 17 Fällen, also in 41,2 % der Fälle, nachgewiesen werden. Die übrigen 10 Fälle (58,8 %) wiesen keine Immunreaktivitäten auf. Von den 7 Fällen, in denen es bei der Färbung mit Antikörpern gegen Erythropoetin zu einer Immunreaktivität gekommen war, wiesen 5 Fälle eine partielle schwache Färbung (71,4 %) und 2 Fälle eine konsistente, starke Färbung auf. Bei der Analyse der adulten und fetalen Kontrollgewebe konnte keine Färbung festgestellt werden (siehe Tabelle 16).

Die Erythropoetin-Immunreaktivität wurde vor allem in Zellen sichtbar, die morphologische Merkmale von Neuronen und Gliazellen aufwiesen (siehe Abbildung 23). Hierbei handelte es sich einerseits um große Zellen, deren Zelleiber einen großen runden Zellkern mit einem eindeutig sichtbaren Nukleolus beinhalteten und zahlreiche Dendritenabgänge aufwiesen. Diese Zellmorphologie entspricht der von multipolaren neuronalen Zellen, die in dieser Form beispielsweise als motorische Vorderhornzellen im Rückenmark vorkommen. Einige der angefärbten Zellen wiesen eine variabelere Form auf, die darauf zurückzuführen sein könnte, dass sich die Ausläufer sternförmig darstellen. Die beschriebenen Zellen waren wahrscheinlich Astrozyten. Ferner kam es in kleinen rundlichen Zellen zu Immunreaktivitäten, bei denen es sich um Zellen der Abwehr, die so genannten Mikrogliazellen, handeln könnte. Bezüglich der Zelltypen, in denen Erythropoetin nachgewiesen werden konnte, gab es demnach Übereinstimmungen mit der Expression von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor. Allerdings wurde durch die mikroskopische Analyse der Fälle deutlich, dass sich die Erythropoetinexpression auf die Somata der Zellen beschränkte. Die Ausläufer der Zellen waren zwar sichtbar, wiesen aber keine Ansammlung des Farbstoffs auf.

Erythropoetin-Rezeptor

Die Auswertungen von Erythropoetin-Rezeptor zeigten, dass dieser in 88,2 % der Fälle - also in 15 von 17 Fällen - nachgewiesen werden konnte. Hierbei kam es in 35,3 % der Fälle zu einer partiellen schwachen Färbung (6 Fälle) und in den übrigen 52,9 % zu einer konsistenten, starken Immunreaktivität. In zwei Fällen (11,8 %) konnte die Expression von Erythropoetin-Rezeptor mittels der Diaminobenzidinfärbung nicht nachgewiesen werden. In diesen Fällen wurde in der semiquantitativen Analyse die Bewertung Null vergeben. Anders als bei den in Abschnitt 3.4 untersuchten Zytokinen und bei Erythropoetin kam es bei der Färbung mit Antikörpern gegen Erythropoetin-Rezeptor in allen adulten Kontrollgeweben zu einer konstitutiven Immunreaktion (siehe Tabelle 16). Die fetalen Kontrollgewebe wiesen ebenfalls eine durchgehende Färbung auf (siehe Tabelle 16). Die Abbildung 24 zeigt die Immunreaktivitäten von Erythropoetin-Rezeptor in verschiedenen MMC-Geweben.

Die Expressionslevel sowie die Art und Größe der angefärbten Zellen waren variabel, doch die Verteilung von Erythropoetin-Rezeptor innerhalb der Zellen schien ähnlich zu sein. Bei den angefärbten Zellen handelte es sich größtenteils um Zellen mit unterschiedlichen Formen. Es wurden sowohl eher rundliche Zellen mit relativ großen runden Zellkernen angefärbt als auch Zellen, deren Zelleiber auf Grund der vorhandenen Ausläufer etwas auseinander gezogen wirkten. Diese Zellen gehören wahrscheinlich zur Makroglia. Neben den eben beschriebenen Zellen wurden wahrscheinlich Zellen der Abwehr, also Mikroglia, angefärbt, die sich mikroskopisch als kleine, variabel geformte Zellen darstellten. Zusätzlich zum glialen Gewebe konnten große Zellen mit großen runden Zellkernen und deutlich sichtbaren Nukleoli identifiziert werden, die viele dendritische Fortsätze aufwiesen. Die Morphologie dieser Zellen legte die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um multipolare Neurone handelte, die im Rückenmark in Form von motorischen Vorderhornzellen vorkommen.

Verglich man die Expressionsmuster von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor, so konnte man feststellen, dass sowohl Erythropoetin als auch Erythropoetin-Rezeptor vor allem in den Somata der Neuronen vorkamen. Verglich man abschließend die Expressionsmuster der beiden im vorherigen Abschnitt untersuchten Zytokine Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor mit denen von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor, kam man zu dem Ergebnis, dass diese vier Mediatoren hauptsächlich in den Nervenzellkörpern auftraten, wobei Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor teilweise auch in den dendritischen Fortsätzen exprimiert wurden.

Tabelle 16

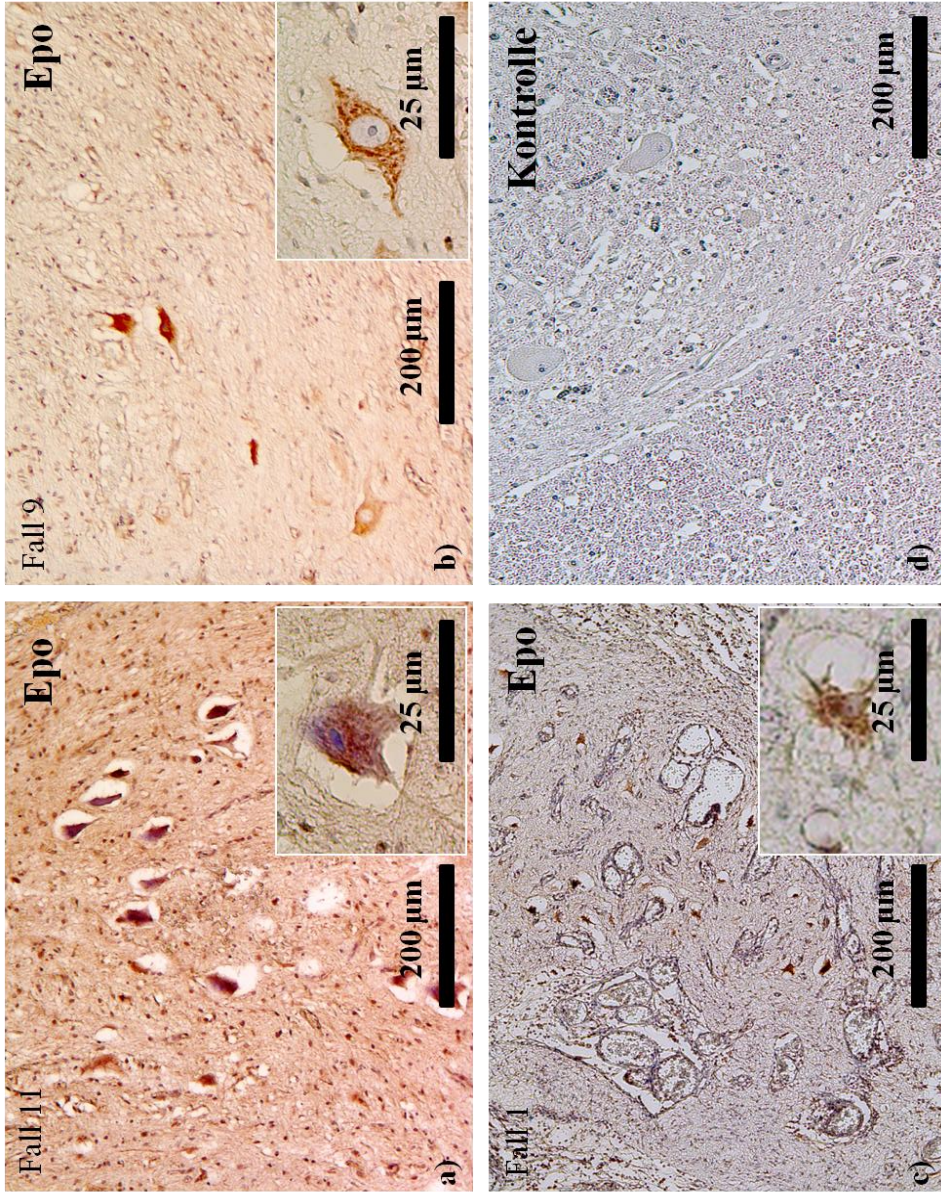
Immunreaktivität von Epo und EpoR in den Kontrollgeweben und den MMC-Plakoden.

2 = starke und konsistente Immunreaktivität; 1 = schwache, vereinzelte Immunreaktivität;

0 = keine Färbung/ Hintergrundfärbung.

RM = Rückenmark.

	Epo	EpoR
Fall 1	1	2
Fall 2	1	1
Fall 3	0	1
Fall 4	1	2
Fall 5	0	1
Fall 6	0	1
Fall 7	0	2
Fall 8	0	2
Fall 9	2	0
Fall 10	2	2
Fall 11	1	1
Fall 12	0	0
Fall 13	0	2
Fall 14	0	2
Fall 15	0	1
Fall 16	0	2
Fall 17	1	2
Kontrolle (Fetales RM, n = 4)	0	1
Kontrolle (Adultes RM, n = 4)	0	1



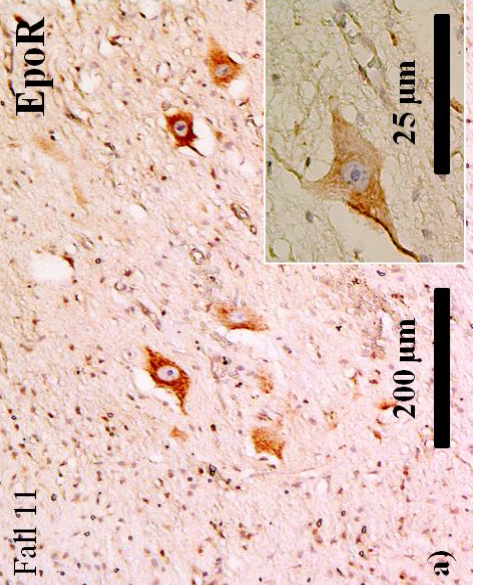
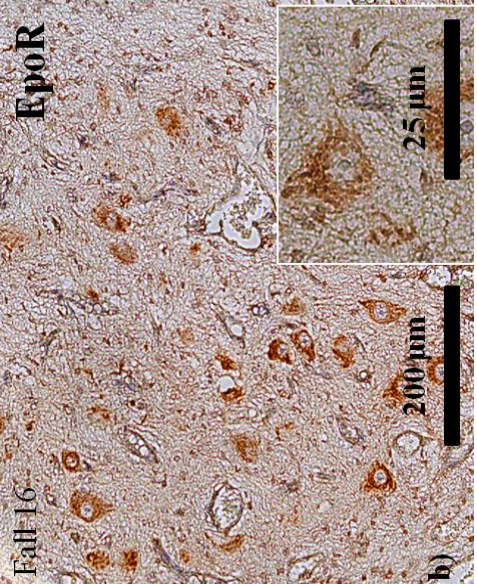
Aufnahmen nach DAB-Färbung mit einem Antikörper gegen Epo

- a) Fall 11, 10x Vergrößerung: Mittig im Bild sieht man mehrere Neurone, die Epo exprimieren.
- b) Fall 9, 10x Vergrößerung: Man sieht mehrere einzelne Neurone, die Epo exprimieren.
- c) Fall 1, 10x Vergrößerung
- d) Kontrollgewebe (adultes Rückenmark)

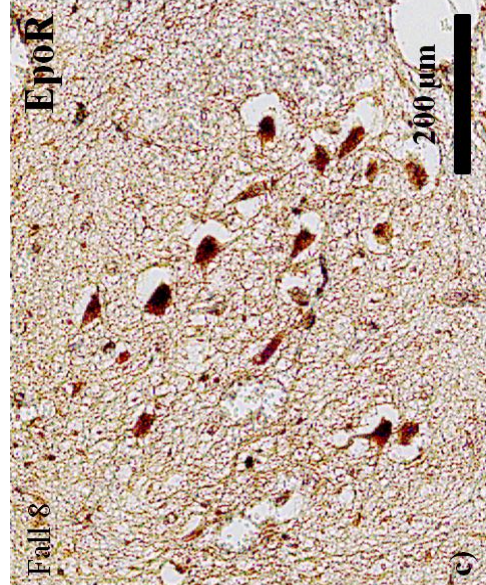
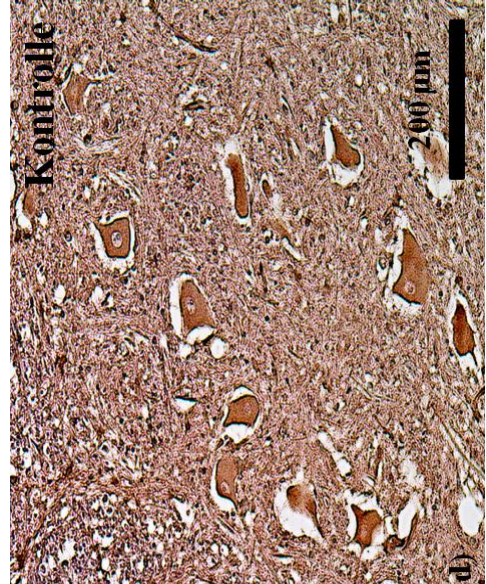
In der rechten unteren Ecke der Abbildungen a) bis d) ist jeweils eine Ausschnittsvergrößerung dargestellt (40x Vergrößerung).

Abbildung 23

Aufnahmen nach DAB-Färbung mit einem Antikörper gegen Epo-R



- a) Fall 11, 10x Vergrößerung
- b) Fall 16, 10x Vergrößerung
- c) Fall 8, 10x Vergrößerung
- d) Kontrollgewebe, 10x Vergrößerung



In der rechten unteren Ecke der Abbildungen a) und b) ist jeweils eine Ausschnittsvergrößerung dargestellt (40x Vergrößerung).

Abbildung 24

3.5.1 Zelluläre Lokalisation von Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor

Aufgrund der Tatsache, dass die semiquantitative Analyse der gefärbten Schnitte ergeben hat, dass sowohl Erythropoetin als auch Erythropoetin-Rezeptor in relativ hohem Maße im Plakodengewebe vorkamen, schlossen sich an die Diaminobenzidinfärbungen Doppelfluoreszenzfärbungen an, um festzustellen, ob Erythropoetin und dessen Rezeptor mit neuronalen, astrozytären und mikroglialen Markern koexprimiert wurden. Die Abbildung 25 zeigt die Doppelfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Erythropoetin (25D) beziehungsweise Erythropoetin-Rezeptor (25H) und gegen NeuN. Koexprimiert lag Erythropoetin mit NeuN (siehe Abbildung 25D) und dem Mikrogliamarker CD11b vor. Die Doppelfluoreszenzfärbung mit Erythropoetin als erstem Primärantikörper und GFAP als zweitem Primärantikörper ergaben keine Kollokalisierungen (siehe Tabelle 17).

In der Abbildung 25G sieht man exemplarisch die Neurone eines Falles, die nach der Diaminobenzidinfärbung Erythropoetin-Rezeptor exprimierten und in der Abbildung 25H die einzelnen Fluoreszenzfärbungen von Erythropoetin-Rezeptor und NeuN, sowie die Doppelimmunfluoreszenzfärbung (zusätzlich DAPI zur Kernfärbung). Es wurde deutlich, dass das Soma des Neurons gelblich erschien, was durch die gleichzeitige Expression von Erythropoetin-Rezeptor und NeuN zustande kam.

Die Abbildung 26A zeigt zusätzlich eine Tripleimmunfluoreszenzfärbung von Epo-R, IL-1b und NeuN, wobei die Kollokalisierung im Soma des abgebildeten Neurons deutlich sichtbar wurde.

Des Weiteren wurden die IL-1beta-Immunreaktivitäten in den MMC-Plakoden mit den EpoR-Immunreaktivitäten korreliert. Hierbei konnte eine positive Korrelation demonstriert werden ($r_s = 0,625$, $p \leq 0.007$, 2-tailed test; $R^2 = 0,49$).

Tabelle 17

Auswertung der Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

+ = Koexpression bzw. Kollokalisierung vorhanden

- = keine Koexpression bzw. Kollokalisierung

	GFAP	NeuN	CNPase	CD11b
Epo	-	+	-	+
EpoR	-	+	-	-

Abbildung 25 →

Darstellung der Epo- und EPO-R-Immunreaktivität (-IR) in den MMC-Plakoden.

(A, B) Bezüglich EPO wurde in den fetalen (A) und adulten (B) Rückenmarkskontrollen eine IR auf niedrigem Level festgestellt. (C) Doppelimmunfluoreszenzfärbungen bestätigten die Epo-IR (rot) in neuronalen Zellen bei Kofärbungen von Epo und NeuN (grün) (D; fusioniertes Bild links, separate Kanäle mittig und rechts). (E-G) Die zelluläre EPO-R-IR in Rückenmarkskontrollen (E, fetal; F, adult) wird im Vergleich zu der EPO-R-IR in den Myelomeningozelengewebe (G) demonstriert. Hierbei zeigten sich Expressionsmuster mit morphologischen Korrelaten von Neuronen (Pfeile). (H) Doppelimmunfluoreszenzfärbungen bestätigten die Kofärbung von EPO-R (rot) und NeuN (grün) in neuroepitheliale MMC-Gewebe (H, fusioniertes Bild links, separate Kanäle mittig und rechts).

Maßstäbe: A-C, E-G, 100 µm; D, H, J, 20 µm.

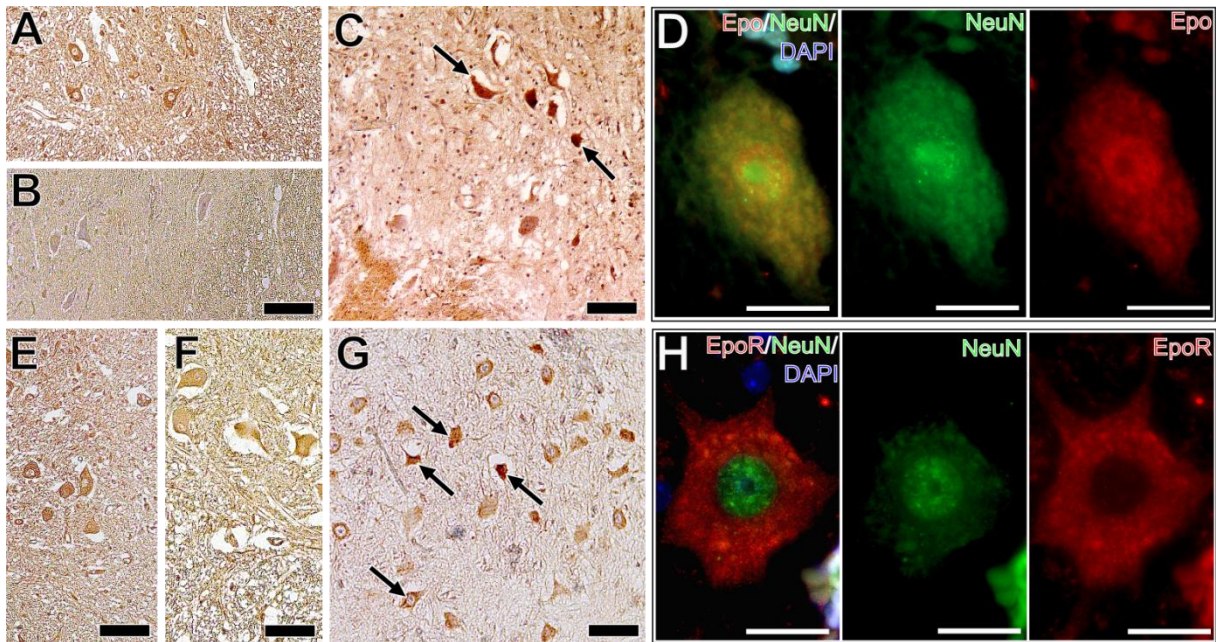


Abbildung 25

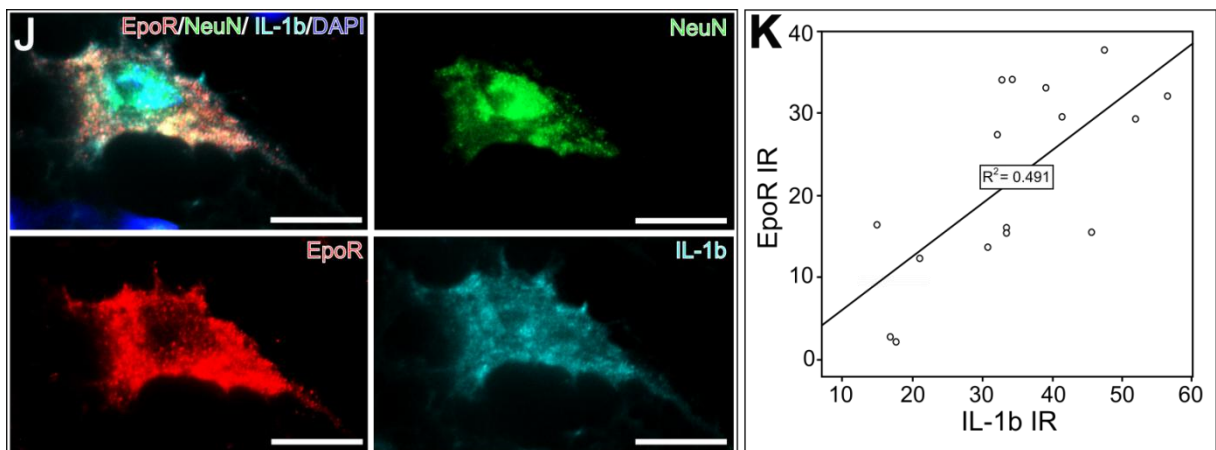


Abbildung 26

(A) Die Tripleimmunfluoreszenzfärbung von EpoR (rot), NeuN (grün) und IL-1beta (türkis) bestätigte die Kofärbung der entsprechenden Marker (oben links fusionierte Kanäle EpoR (rot)/NeuN (grün)/IL-1beta (türkis)/Kernfärbung (DAPI = blau); separate Kanäle: unten links EpoR (rot), oben rechts NeuN (grün), unten rechts IL-1beta (türkis)). (B) Die IL-1beta-IR in den MMC-Plakoden korrelierte, wie grafisch dargestellt, positiv mit den EpoR-IR ($r_s = 0,625$, $p < 0,007$, 2-tailed test; $R^2 = 0,49$). Maßstab: 20 μ m.

3.5.2 Densitometrische Analysen der Erythropoetin- und Erythropoetin-Rezeptor-Immunreaktivitäten

Nach der semiquantitativen Analyse der gefärbten Schnitte wurden die Ergebnisse mit Hilfe einer densitometrischen Untersuchung quantifiziert (siehe Abbildung 27). Wie zuvor bei den proinflammatorischen Zytokinen wurde bezüglich Erythropoetin ein t-Test durchgeführt, um die Signifikanz der densitometrisch ermittelten Werte zu bestimmen. Sieben Fälle (41,2 %) wurden sowohl im Vergleich zu den adulten als auch den fetalen Kontrollen als statistisch höchst signifikant eingestuft. Die übrigen zehn Fälle (58,8 %) waren nicht signifikant erhöht (siehe Abbildung 27).

Das gleiche Prozedere, welches im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, wurde auch bei den Schnitten angewendet, die mit Antikörpern gegen Erythropoetin-Rezeptor gefärbt wurden. Die Quantifizierung der Ergebnisse wurde ebenfalls mittels der Densitometrie vorgenommen. Die Auswertung ergab, dass in allen Kontrollgeweben Erythropoetin-Rezeptor exprimiert wurde. Höchst signifikant waren die p-Werte mit unter 0,001 gegenüber den fetalen Rückenmarkskontrollen in 52,9 % der Fälle (9 von 17 Fällen). In einem weiteren Fall (5,9 %) wurden p-Werte unter 0,01 ermittelt, sodass diese Fälle eine hohe Signifikanz aufwiesen. Als statistisch signifikant wurden drei weitere Fälle (23,5 %) eingestuft.

Im Vergleich zu den adulten Kontrollgeweben ergaben sich statistisch signifikant erhöhte Expressionslevel in 64,8 % der Fälle (höchst signifikant 7 von 17 Fällen, hoch signifikant 2 von 17 Fällen, signifikant 2 von 17 Fällen). Lediglich sechs der 17 Fälle (35,3 %) wiesen keine statistisch signifikante Erhöhung des Expressionsniveaus auf.

Abschließend konnte man die Werte der mittleren Dichte pro Fläche von Erythropoetin mit denen seines Rezeptors vergleichen (siehe Abbildung 27). Hierbei fiel auf, dass Erythropoetin-Rezeptor insgesamt umfangreicher exprimiert wurde (64,8 %/75,4 % versus 41,2 %). Außerdem lag das Expressionsniveau von Erythropoetin-Rezeptor in 70,6 % der Fälle über dem von Erythropoetin. Ferner fiel auf, dass Erythropoetin-Rezeptor zwar in mehr Fällen insgesamt exprimiert wurde, die absoluten Werte des Expressionsniveaus von Erythropoetin allerdings höher waren.

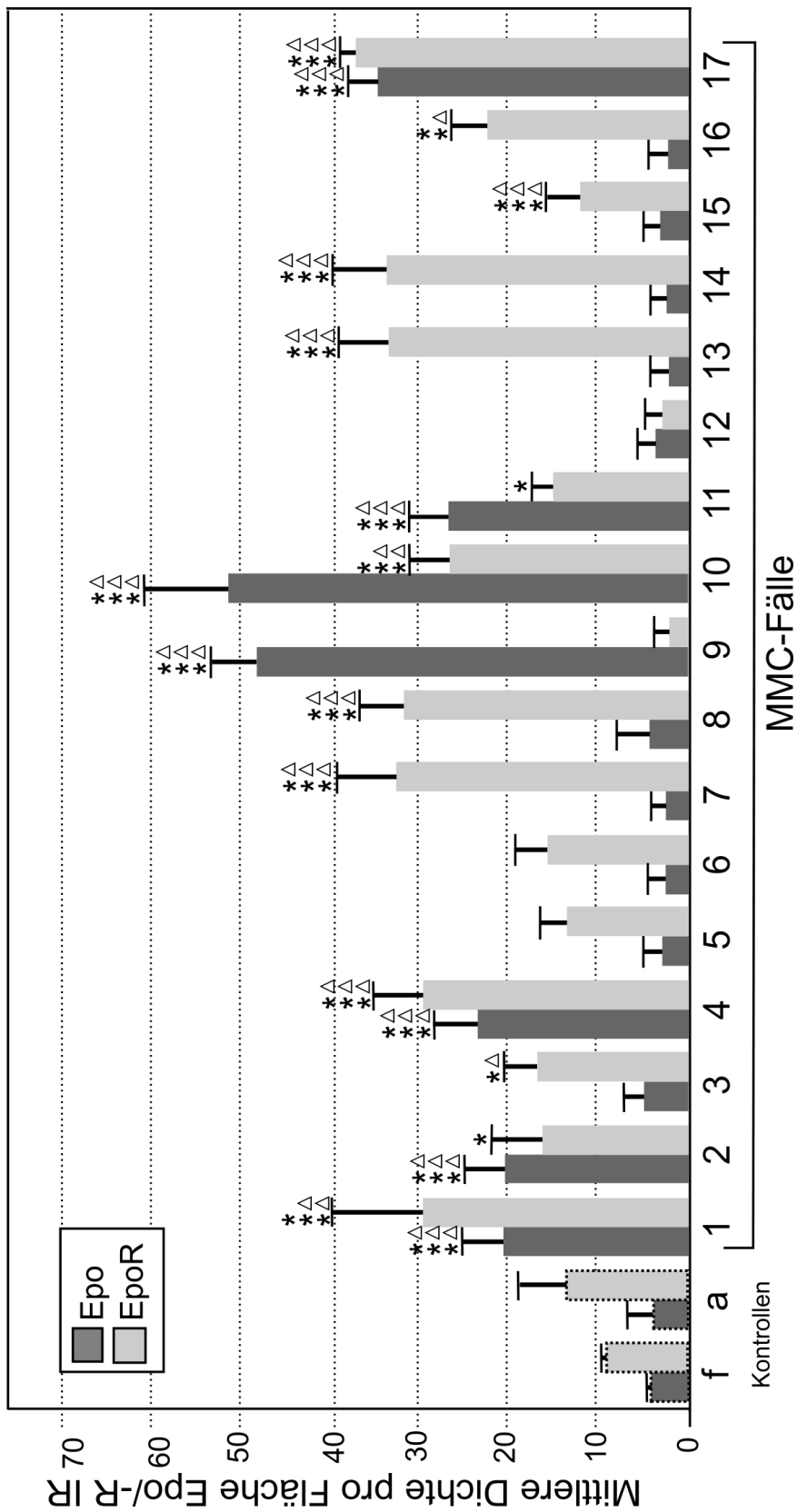


Abbildung 27

Diagramm zur quantifizierten Densitometrie der Kontrollen und aller Fälle bezüglich Erythropoetin (dunkelgrau) und Erythropoetin-Rezeptor (hellgrau).

x-Achse: Auflistung der kumulierten fetalen und adulten Kontrollen und der Fälle 1-17.

y-Achse: Auftragung der mittleren Dichte pro Fläche, wobei schwarz=255 und weiß=0 ist.

Signifikanz */ Δ $p \leq 0,05$, **/ $\Delta\Delta$ $p \leq 0,01$, ***/ $\Delta\Delta\Delta$ $p \leq 0,001$. * im Vergleich zu den fetalen (f) Kontrollen, Δ im Vergleich zu den adulten (a) Kontrollen.

3.6 Expressionsmuster von Hypoxia Inducible Factor: Ergebnisse der qualitativen, semiquantitativen und densitometrischen Auswertungen

Neben der Analyse der Immunreaktivität der proinflammatorischen und neuroprotektiven Zytokinen wurden Färbungen mit Antikörpern gegen HIF-1- und HIF-2-alpha vorgenommen. Die semiquantitative Analyse der HIF-1-Färbungen hat in 12 Fällen eine schwache und/oder lokalisierte Färbung ergeben. Die positiven Immunreaktivitäten wurden vor allem in Zellen mit morphologischen Korrelaten von Neuronen sichtbar. In den übrigen 5 Fällen konnte keine Färbung festgestellt werden. Die semiquantitative Auswertung von HIF-2-alpha zeigte, dass es in 16 von 17 Fällen zu einer positiven Immunreaktivität kam. In fast 50% der Fälle lag eine starke und konsistente Färbung vor. Ausgehend von morphologischen Kriterien, die bestimmte Zelltypen auszeichnen, wurde HIF-2-alpha vor allem in Neuronen und mikroglialen Zellen sichtbar (siehe Abbildung 28G). Die adulten und fetalen Kontrollgewebe wiesen keine Färbung auf (siehe Abbildung 28E/F). Die anschließend durchgeführten Tripleimmunfluoreszenzfärbungen zeigten Kofärbungen von Erythropoetin HIF-2-alpha mit NeuN in Zellen mit morphologischen Korrelaten von Neuronen (siehe Abbildung 28H).

Die semiquantitativen Analysen wurden durch densitometrische Untersuchungen quantifiziert. Bezüglich der Signifikanz von HIF-1-alpha wurden im Vergleich zu den fetalen und adulten Rückenmarkskontrollen zwei Fälle (11,8 %) als höchst signifikant, ein Fall als hoch signifikant und acht Fälle (47 %) als signifikant eingestuft (siehe Abbildung 28A).

Die densitometrischen Auswertungen von HIF-2-alpha ergaben eine starke Induktion in den MMC-Geweben gegenüber den Kontrollgeweben. Höchst signifikant gegenüber den fetalen und adulten Kontrollgeweben waren die Werte von sieben Fällen (41,2 %), eine hohe Signifikanz wies Fall 8 auf und als statistisch signifikant gegenüber den Kontrollgeweben wurden zwei weitere Fälle (11,8 %) eingestuft (siehe Abbildung 28A).

Abbildung 28 →

Darstellung der HIF-1a- und HIF-2a-Immunreaktivität (-IR).

(A) Beide Faktoren waren auf signifikant höherem Level in den MMC-Plakoden im Vergleich zu den fetalen und adulten Rückenmarksgewebe detektierbar. Plakoden mit signifikant erhöhten EPO-IR wiesen auch die höchsten Signifikanzen bezüglich der HIF-1a- und HIF-2a-IR auf (Fälle 1, 2, 4, 9-11, 17); Signifikanzlevel $*/\Delta p \leq 0,05$, $**/\Delta\Delta p \leq 0,01$, $***/\Delta\Delta\Delta p \leq 0,001$; * = MMC-Plakoden im Vergleich zu den fetalen Kontrollen; Δ = MMC-Plakoden im Vergleich zu den adulten Kontrollen. (B-D) Darstellung der HIF-1a-IR in fetalen (B), adulten (C) und MMC-Gewebe (D) mit morphologisch neuronalem Expressionsmuster (Pfeile in D). (E-G) Darstellung der HIF-2a-IR in fetalen (E), adulten (F) und MMC-Gewebe (G) mit Expressionsmuster wie zuvor bei der HIF-1a-IR (Pfeile in G). (H) Die durchgeführten Tripleimmunfluoreszenzfärbungen bestätigten die Kofärbung von NeuN (grün), Epo (rot) und HIF-2a (türkis) (Abbildung der fusionierten Kanäle links oben mit DAPI = blaue Kernfärbung, rechts oben NeuN (grün), links unten EPO (rot), rechts unten HIF-2a (türkis)). (I) Darstellung der Korrelationsanalysen, die eine signifikant positive Korrelation zwischen der Höhe der Ausprägung der EPO-IR und den IR-Niveaus von HIF-2a in den MMC-Plakoden ergaben ($r_s = 0,72$, $p < 0,001$, 2-seitiger Test; $R^2 = 0,689$).

Maßstäbe: B-G 100 μm , H 20 μm .

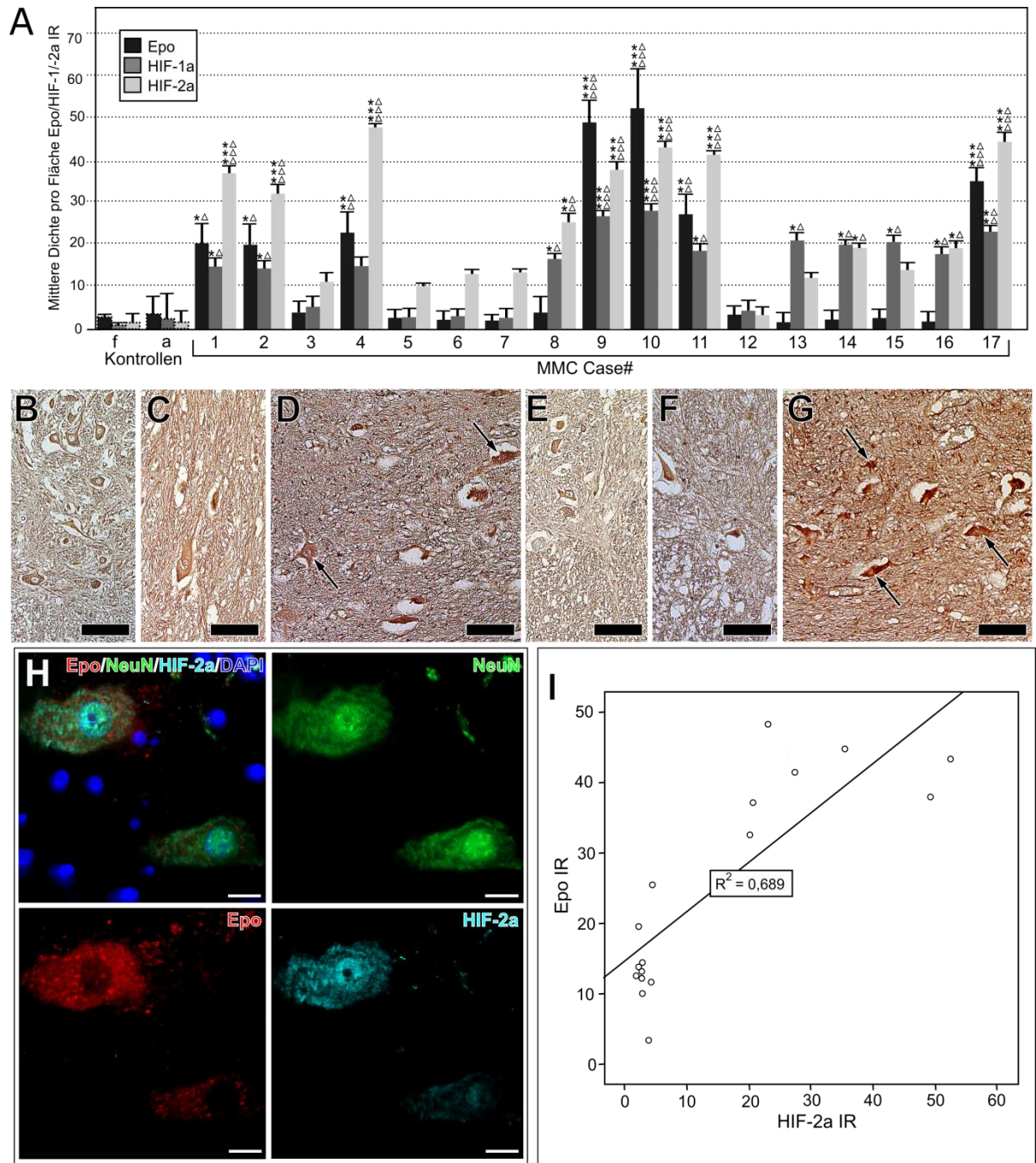


Abbildung 28

3.7 Ergebnisse PCR

Die Ergebnisse der Real-time RT-PCR stellten sich bezüglich IL-1b und IL-1R1 so wie die in Abschnitt 3.4 geschilderten Immunreaktivitäten des proinflammatorischen Zytokinrezeptorpaars dar. Die mRNA-Level von IL-1beta und IL-1R1 in den untersuchten Myelomeningozelengeweben waren gegenüber den adulten und fetalen Rückenmarkskontrollen signifikant erhöht (siehe Abbildung 29).

Die Real-time RT-PCR des neuroprotektiven EPO-R ergab eine konsistente Expression sowohl in den MMC-Plakoden als auch in den Kontrollgeweben, jedoch ohne signifikante Unterschiede (Ergebnisse nicht dargestellt; mittlere delta CT Werte: adulte Rückenmarkskontrollen 6.44 ± 1.25 , fetale Rückenmarkskontrollen 6.13 ± 2.02 , MMC-Plakoden 6.89 ± 1.47). Erythropoetin konnte nicht detektiert werden.

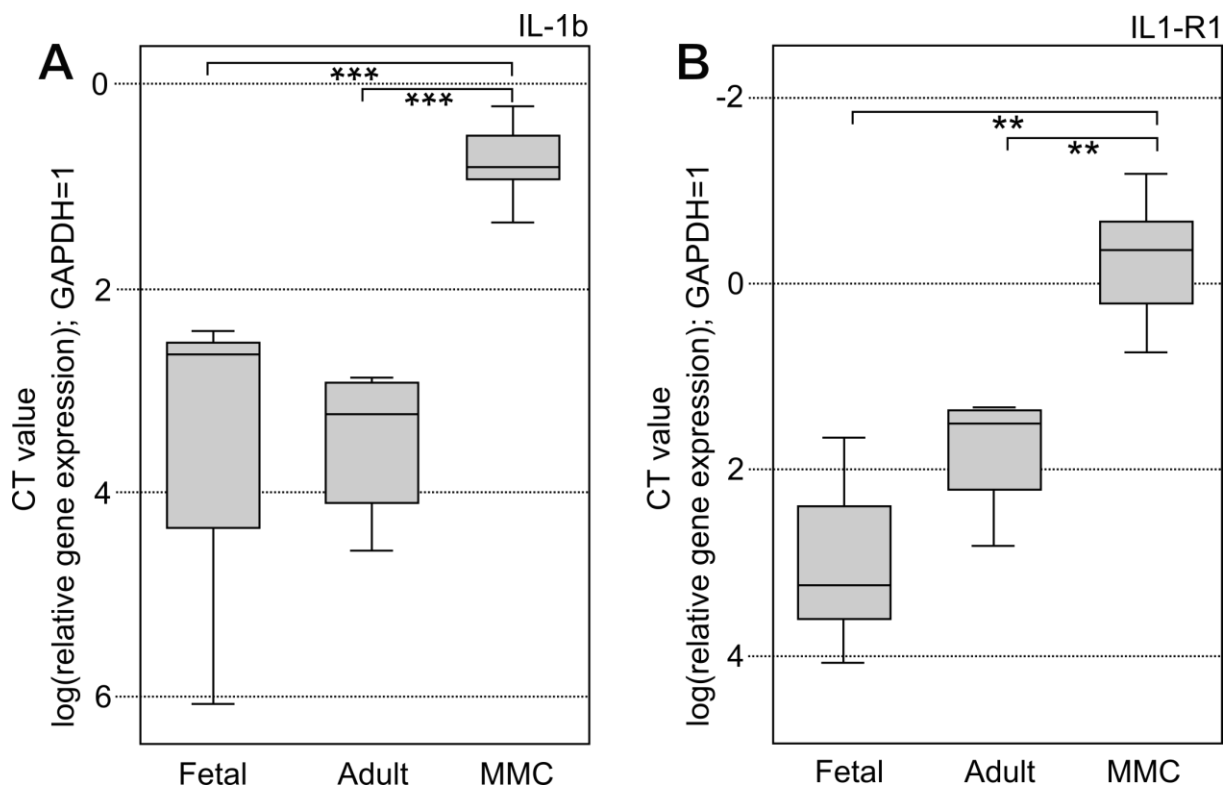


Abbildung 29

Darstellung der Real-time RT-PCR-Ergebnisse in Form von Box-Whisker-Plots.

- Relative Genexpression von IL-1b für die Kontrollen (fetal, adult), sowie die MMC-Plakoden mit Signifikanzen (***) $p \leq 0,001$.*
- Relative Genexpression von IL-1R1 für die Kontrollen (fetal, adult), sowie die MMC-Plakoden mit Signifikanzen (**) $p \leq 0,01$.*

C_T = cycle of thresholds (Schwellenwertzyklus), GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.

3.8 Klinische Daten

Parallel zu den immunhistochemischen Untersuchungen der MMC-Gewebeproben wurden der neurologische Status bei der Geburt der Patienten sowie deren klinische Verläufe analysiert. Es wurden für jeden Patientenfall Daten zu der allgemeinen Entwicklung, dem neurologischen Status, den assoziierten Krankheitsbildern und sonstigen Erkrankungen von möglichst jedem Jahr seit der Geburt zusammengetragen. Zur besseren Veranschaulichung wurden die wichtigsten klinischen Daten gesondert in zwei Tabellen aufgelistet (siehe Tabellen 18 und 19). Hierbei handelte es sich um das Geschlecht, die Lokalisation, die Größe und die Integrität der Myelomeningozele, das Alter der Patienten bei der Primäroperation, den neurologischen Status, die assoziierten Malformationen und das Vorliegen und gegebenenfalls die Operation eines Tethered-Cord-Syndroms. Außerdem wurden das Alter im Todesfall und der Zeitraum der klinischen Kontrolluntersuchungen angegeben.

Elf der 17 Patienten waren weiblich (w n=11; m n=6). Bei den 17 Patienten waren 82,4 % der Myelomeningozelen lumbal lokalisiert. Die Hälfte der lumbalen Myelomeningozelen (7 von 14) lagen auf lumbosakraler Höhe. Thorakale Myelomeningozelen kamen bei drei Patientinnen vor (17,6 %), wovon eine auf thorakolumbalen Höhe angesiedelt war. Unterteilte man die Größe der Plakode in zwei Untergruppen (groß=4x5cm-10x12cm; mittelgroß=1,5x2-3x3cm), so ergab sich bei zehn Patienten die Zuordnung der Fehlbildung zur großen Untergruppe, was 66,7 % der Patienten entsprach. Hierbei ging man von einer Gesamtzahl von 15 aus, da die Größe der Myelomeningozelen zweier Patienten nicht bekannt war. Die übrigen fünf Plakoden (33,3 %) gehörten zu der mittelgroßen Gruppe.

13 der 17 MMC-Plakoden waren rupturiert, sodass das neuronale Gewebe unbedeckt am Rücken lag. Das bedeutet, dass lediglich bei 23,5 % der Patienten eine intakte Hautoberfläche vorlag. Zusammenfassend kann man bezüglich der Myelomeningozele also festhalten, dass die meisten der untersuchten Patienten eine lumbale bzw. lumbosakral lokalisierte, große und rupturierte Plakode aufwiesen.

58,8 % der Patienten (10 von 17) wurden innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt operiert, weitere sechs Patienten innerhalb von 48 Stunden nach der Geburt und ein weiterer Patient innerhalb von 72 Stunden nach der Geburt.

Als nächstes wurde der neurologische Status der Patienten anhand der Aktenlage analysiert, wobei als entscheidende Kriterien auf der einen Seite das Ausmaß der motorischen Dysfunktionen und auf der anderen Seite die Funktion der Blase beziehungsweise des Mastdarms herangezogen wurden.

Bei den meisten Patienten (64,7 %) wurde bezüglich der motorischen Funktion mindestens eine Paraparese festgestellt. Bei sechs Patienten lag eine Paraplegie vor. Fünf dieser sechs Patienten waren an einer großen Myelomeningozele erkrankt. Blasen- und/oder Mastdarmdysfunktionen lagen bei 82,3 % der Patienten (14 von 17 Patienten) vor. Die übrigen drei Patienten wiesen eine normale Blasen- und Mastdarmfunktion auf.

Zusätzlich zum neurologischen Status wurde dokumentiert, ob die Patienten an einer der mit der Myelomeningozele assoziierten Malformationen (Shunt-pflichtiger Hydrozephalus und/oder einer Chiari-Malformation Typ II) erkrankt waren. Nur bei zwei der 17 Patienten (11,8 %) wurde keines dieser Krankheitsbilder diagnostiziert. Bei 82,3 % der Patienten musste ein Hydrozephalus mit einem Shunt versorgt werden (teilweise mehrfach revidiert im weiteren Verlauf). Unter diesen 14 Patienten befanden sich 8 Patienten, bei denen eine Chiari II-Malformation als Ursache nach Aktenlage dokumentiert wurde. Bei einem weiteren Patienten lag eine Chiari-Malformation Typ II ohne Shunt-pflichtigen Hydrozephalus vor. Dementsprechend wurde in über 52,9 % der Fälle eine Chiari II-Malformation diagnostiziert. Im weiteren klinischen Verlauf der Myelomeningozelen-Erkrankung kam es bei vielen Patienten zu einem Tethered-Cord-Syndrom. Bei den untersuchten Patienten wurde in 29,4 % der Fälle ein Tethered-Cord-Syndrom festgestellt. Bei 64,7 % der Patienten kam es nicht zu einem operationsbedürftigen Tethering und bei einer Patientin war der Zeitraum der klinischen Kontrolle zu kurz, um die Entwicklung eines Tetherings zu beurteilen. Die Patienten, bei denen ein Tethering stattgefunden hatte, welches zu einer progredienten klinischen Symptomatik geführt hatte, wurden im Alter von zwei bis zwölf Jahren einem oder mehreren Eingriffen unterzogen, bei denen das Tethering gelöst wurde. Das Durchschnittsalter, in dem diese Operationen durchgeführt wurden, lag bei 5 Jahren. 60 % der Patienten wurden zweimal operiert.

Von den 17 Patienten verstarben drei Patienten im Alter von drei Monaten, 11 Monaten beziehungsweise 14 Jahren. Zusätzlich wurde die Zeitspanne der klinischen Verlaufskontrollen festgehalten, die im Schnitt bei sechs Jahren und sieben Monaten lag.

Tabelle 18

Übersicht über die klinischen Daten aller Fälle.

w = weiblich; m = männlich; T = thorakal; L = lumbal; S = sakral;

pp = Paraplegie; n = normal; s = muskuläre Schwäche; d = Dysfunktion;

n.b. = nicht bekannt.

Fall	Geschlecht	MMC			Alter bei MMC-OP	Neurologischer Status	
		Höhe	Größe	Integrität		Tage ab Geburt	Motorische Funktion
Fall 1	w	T	8x5	Rupturiert	1	pp	d
Fall 2	w	L	8x6	Rupturiert	1	s	d
Fall 3	w	T	6x3	Intakt	2	pp	d
Fall 4	w	L	3x3	Rupturiert	1	s	d
Fall 5	w	T-L	8x6	Rupturiert	1	pp	d
Fall 6	w	L-S	1,5x2	Rupturiert	2	s	d
Fall 7	m	L	6x6	Rupturiert	1	s	d
Fall 8	w	L	4x5	Rupturiert	2	s	d
Fall 9	m	L-S	n.b.	Rupturiert	1	s	n
Fall 10	m	L-S	5,5x6	Rupturiert	3	s	d
Fall 11	m	L-S	1,5x3	Rupturiert	1	s	d
Fall 12	w	L	7x7	Intakt	2	s	n
Fall 13	w	L	3x2	Rupturiert	2	s	n
Fall 14	m	L	n.b.	Intakt	1	s	d
Fall 15	m	L-S	8x8	Rupturiert	1	pp	d
Fall 16	w	L-S	2,5x3	Rupturiert	2	pp	d
Fall 17	w	L-S	10x12	Intakt	1	pp	d

Tabelle 19

Übersicht über die klinischen Daten aller Fälle.

HC=Hydrozephalus; CII=Chiari-Malformation Typ II; TCS=Tethered-Cord- Syndrom;
 nn=nicht beurteilbar, da zu kurzer klinischer Verlauf.

Fall	Assoziierte Malformationen*	TCS		Exitus letalis	Klinische Kontrolle
			Alter bei OP (in Jahren)		
Fall 1	HC	-	-	11 Monate	11 Monate
Fall 2	HC	-	-	-	1 Jahr
Fall 3	HC, CII	ja	4, 12	-	16 Jahre
Fall 4	HC, CII	-	-	-	15 Jahre
Fall 5	HC	-	-	3 Monate	3 Monate
Fall 6	CII	ja	3	-	12 Jahre
Fall 7	-	ja	4, 8	-	13 Jahre
Fall 8	HC, CII	ja	3, 4	-	13 Jahre
Fall 9	HC, CII	ja	3	-	4 Jahre
Fall 10	HC	-	-	-	13 Jahre
Fall 11	HC	-	-	-	6 Jahre
Fall 12	HC, CII	-	-	-	2 Jahre
Fall 13	HC, CII	-	-	-	4 Jahre
Fall 14	HC	-	-	-	2 Jahre
Fall 15	HC, CII	-	-	14 Jahre	7 Jahre
Fall 16	HC, CII	-	-	-	4 Jahre
Fall 17	-	nn	-	-	1 Monat

3.9 Korrelation der klinischen Daten mit den densitometrisch objektivierten Immunreaktivitäten

Die Ergebnisse der densitometrischen Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Statistikprogramms korreliert. Die jeweiligen Pearson-Korrelationskoeffizienten kann man der Tabelle 20 entnehmen.

Die Korrelationen der densitometrisch objektivierten Immunreaktivitäten bezüglich der Zytokine Interleukin-1-beta und Erythropoetin sowie ihrer Rezeptoren mit den klinischen Daten der Myelomeningozelen-Patienten ergaben keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Eine positive oder negative Korrelation konnte in keinem der Fälle festgestellt werden, wobei ein starker positiver Zusammenhang bei dem Wert 1 und ein starker negativer Zusammenhang bei dem Wert -1 bestünde.

Tabelle 20

Darstellung des Pearson-Korrelationskoeffizienten für die einzelnen Korrelationen der densitometrischen Ergebnisse von Interleukin-1-beta, Interleukin-1-Rezeptor, Erythropoetin und Erythropoetin-Rezeptor mit den klinischen Patientendaten (Lokalisation, Größe und Integrität der Myelomeningozele; motorische Funktion und Blasen-/Mastdarmfunktion der Patienten; Vorhandensein eines Hydrozephalus, einer Chiari II-Malformation, eines Tethered-Cord-Syndroms bei den MMC-Patienten).

	IL-1b	IL-1R	EPO	EPO-R
Lokalisation der MMC	0,135	0,15	-0,196	0,214
Größe der MMC	-0,123	-0,88	-0,014	-0,225
Integrität der MMC	-0,510	-0,311	-0,281	-0,186
Motorische Funktion der MMC-Patienten	0,206	0,161	0,279	0,095
Blasen- und Mastdarmfunktion der MMC-Patienten	-0,509	-0,397	0,165	-0,485
Hydrozephalus	0,086	0,002	0,230	-0,005
Chiari II-Malformation	-0,127	-0,197	-0,203	-0,181
Tethered-Cord-Syndrom	-0,086	-0,053	-0,070	-0,144

4 Diskussion

Der vorliegenden Arbeit lag die Hypothese zugrunde, dass in der exponierten fehlgebildeten („primary hit“) neuroepithelialen Myelomeningozelenplakode durch äußere Einflüsse („second hit“) zelluläre Schadenskaskaden induziert („tertiary hit“) werden, die zu einem weiteren Verlust der potentiellen Funktionsfähigkeit dieser Gewebe führen könnten (siehe Abbildung 4, Seite 16). Daher sollte überprüft werden, ob sich in dem neuroepithelialen Plakodengewebe von Myelomeningozelen zelluläre Veränderungen und Mediatoren identifiziert lassen, die solche tertiären Schadensvorgänge tragen könnten.

Zu diesem Zweck wurde zunächst neuroepitheliales Plakodengewebe, das während der primären MMC-Operation gewonnen wurde, histopathologisch charakterisiert. Anschließend wurden immunhistochemisch spezifische zelluläre Markerexpressionsprofile dieser Gewebe erstellt. Damit wurde die Basis geschaffen, in einem nächsten Arbeitsabschnitt spezifische Mediatoren der postulierten Schadensabläufe zu identifizieren.

Als wesentliche Ergebnisse fanden sich bei der histopathologischen Aufarbeitung der HE-gefärbten neuroepithelialen MMC-Gewebe Vakuolisierungen sowie gliotische und nekrotische Veränderungen (z.B. kondensierte Zellkerne), die als histologische Korrelate von Gewebeschädigungen interpretiert werden können. Die anschließenden Untersuchungen der zellulären Markerexpressionen erbrachten eine starke Astroglie in allen neuroepithelialen MMC-Geweben. Einige Plakoden wiesen zudem inflammatorische Zellansammlungen von aktivierten Mikrogliazellen, Monozyten und Makrophagen auf.

Als spezifische Mediatoren der postulierten post-traumatischen Schadenskaskaden konnte erstmals die Induktion bestimmter proinflammatorischer (IL-1b, TNF-alpha) und neuroprotektiver (EPO) Zytokine sowie deren Rezeptoren im Plakodengewebe von Myelomeningozelen nachgewiesen werden.

Als wesentliches Element postläsioneller Schadenskaskaden zusätzlich zur Inflammation konnte in der vorgelegten Arbeit mit dem Nachweis der Erythropoetin-korrelierten Induktion von HIF-1 alpha/HIF-2 alpha zudem eine hypoxisch gesteuerte Komponente identifiziert werden.

4.1 Erste Arbeitsschritte - Methodische Aspekte und histopathologische Analyse der Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte

Der aktuelle operative Ansatz der Primärversorgung von Myelomenigozelen ist rekonstruktiv. Das heißt, dass bei der primären Operation möglichst viel Plakodengewebe erhalten wird, um daraus eine neuralrohrähnliche Struktur zu schaffen. Aufgrund dessen stehen für histopathologische oder weiterführende Untersuchungen keine „ganzen“ Plakoden zur Verfügung, sondern lediglich Plakodenfragmente mit umgebendem aberranten Gewebe unterschiedlicher Entitäten. Daher mussten die asservierten Gewebe zunächst genau analysiert und das neuroepitheliale Gewebe sicher identifiziert werden. Hierbei stellte die Orientierung auf den einzelnen Fällen teilweise eine Herausforderung dar. Entsprechend wurde jeder Paraffinschnitt nach der HE-Färbung originalgetreu abgezeichnet und die einzelnen Gewebearten markiert, sodass jede weitere Färbung anhand der Gewebeatlanten verglichen werden konnte.

Die Gewebeatlanten erwiesen sich als geeignete Methode zur Identifizierung des neuralen Plakodengewebes und neuronaler Strukturen aus einer Vielzahl anderer Gewebetypen. Sichtbar wurden neben epithelialen, teilweise großen lipomatösen und bindegewebigen Anteilen perivaskuläre Granulozytenmanschetten und peripheres und zentrales neuronales Gewebe. Es handelte sich hierbei um periphere Nerven, Nervenwurzeln und Ganglienzellansammlungen sowie um gliales Gewebe und Rückenmarkgewebe, vor allem in Form von motorischen Vorderhornzellen und stellenweisen Anschnitten des Zentralkanal. Als wesentliche Ergebnisse fanden sich bei der histopathologischen Aufarbeitung der HE-gefärbten neuroepithelialen MMC-Gewebe Vakuolisierungen sowie gliotische und nekrotische Veränderungen (zum Beispiel kondensierte Zellkerne), die als histologische Korrelate von Gewebeschädigungen interpretiert werden können (86).

George und Cummings, die in ihren strukturellen Untersuchungen an ganzen humanen MMC-Plakoden ähnliche Veränderungen fanden, interpretierten diese als Ausdruck einer sekundären, also nach der fehlerhaften Neurulation im weiteren Verlauf erworbenen Plakodenschädigung (12). In diese Beobachtungen und Interpretation reihen sich auch die Ergebnisse von Emery et al. und Hutchins et al. ein (10, 11).

In der vorgelegten Arbeit konnten lediglich Plakodenfragmente untersucht werden, wohingegen George und Cummings die Möglichkeit hatten, komplette humane Plakoden zu untersuchen und damit zusätzliche strukturelle Aspekte zu berücksichtigen (beispielsweise die dorso-ventrale Ausrichtung des Plakodenepithels und die Zahl der neuronalen Zellen).

Allerdings war die Gruppe dieser untersuchten MMC-Plakoden sehr klein und inhomogen (vier Fälle, unterschiedliche Zeitpunkte nach der Geburt). Durch die histologische Aufarbeitung der Gewebeproben der vorgelegten Arbeit konnte im Gegensatz dazu eine relativ große Gruppe identifiziert werden (n = 17), die innerhalb der ersten drei Tage nach der Geburt versorgt wurde. Damit waren die Voraussetzungen gegeben, die entsprechenden weiteren Fragestellungen fundiert untersuchen zu können.

Durch die Erhebung der klinischen Daten der eingeschlossenen MMC-Fälle wurden zudem wichtige Merkmale der untersuchten Gruppe dokumentiert. Dabei ergaben sich erwartungsgemäß komplexe Krankheitsverläufe: Durchschnittlich 81,6 % der Patienten wiesen lumbale oder lumbosakrale, große, rupturierte Zellen auf und in der Folge eine Paraparese oder Paraplegie und eine Blasen- und Mastdarmleerungsstörung. Zusätzlich hatten 82,3 % der Patienten einen Hydrozephalus, der mit einem Shunt versorgt werden musste. Bei einigen Patienten wurde im weiteren Verlauf ein Tethered-Cord-Syndrom (29,4 %) chirurgisch behandelt. Insgesamt entspricht das untersuchte Kollektiv dem typischen weitgefächerten Spektrum der offenen Dysraphien (87). Dies bedingte allerdings auch, dass Korrelationsanalysen von immunohistochemischen mit klinischen Daten zu keinen signifikanten Beziehungen führten (dafür war die Gruppe zu klein beziehungsweise zu inhomogen).

4.2 Etablierung der zellulären Plakodenmarkerprofile und Identifizierung zellulärer Träger potentieller Schadenskaskaden

Nach der histologischen Analyse wurden die identifizierten Plakodenabschnitte weiter auf zellulärer Ebene mittels immunhistochemischer Färbungen analysiert.

Angelehnt an die Studie von George und Cummings (12) wurden neuropathologisch etablierte Standardmarker verwendet, um das Neuroepithel der Myelomeningozellen zellulär genau zu charakterisieren. Um neuronale beziehungsweise neuronenassoziierte Strukturen zu identifizieren, wurden Färbungen mit Synaptophysin, NeuN und NF 200kD durchgeführt.

Synaptophysin, ein integrales Membranprotein, das vor allem in präsynaptischen Vesikeln im ZNS vorkommt und in der Pathologie dazu dient, Zellen zu identifizieren, die an der Signalweiterleitung beteiligt sind (62), wurde in der vorliegenden Arbeit in fast 90 % der Fälle in unterschiedlich starker Ausprägung nachgewiesen (siehe Abschnitt 3.3).

NeuN, ein neuronales Markerantigen, das vorwiegend im Zellkern neuronaler Zellen exprimiert wird (66), wurde eingesetzt, um sicherzustellen, dass die als Neuroepithel identifizierten MMC-Gewebe alle Neuronen aufwiesen. Ein weiterer Antikörper, der in der Arbeit zur Identifikation neuronaler Zellen eingesetzt wurde, richtete sich gegen NF 200 kD, das heißt die schweren Ketten der Intermediärfilamente von neuronalen Zellen (67).

Beide neuronalen Marker wurden in allen Plakoden der untersuchten beziehungsweise in die Studien eingeschlossenen Fälle in Nervenzellen nachweisbar. Somit waren in allen Fällen neuronale Strukturen in den Plakodengeweben enthalten. Dies war eine wichtige Voraussetzung für die weiteren Untersuchungen bezüglich der Identifikation spezifischer Mediatoren tertiärer Schadenskaskaden. Aussagen über die mögliche Funktionalität der neuronalen Zellen in dem neuroepithelialen Gewebe konnten mit dem methodischen Ansatz dieser Arbeit technisch bedingt nicht getroffen werden (siehe oben) und waren dementsprechend kein Fokus der weiteren Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Anlehnung an George und Cummings (12) auch die Expression von EMA untersucht, welches sich als epitheliales Markerantigen in Teilen des Neuroepithels nachweisen ließ (72, 73). SMA als Marker für glatte Muskelzellen (76) färbte entsprechend die Epithelien der Gefäße in der Plakode an.

Alle untersuchten neuroepithelialen Gewebe wiesen eine signifikant erhöhte GFAP-Immunreaktivitätsdichte gegenüber den Kontrollgeweben auf. Die GFAP-gefärbte Astroglia wies dabei morphologische Veränderungen auf, die mit gedrungenen Zellkörpern und verdickten Zellausläufern für eine Aktivierung sprachen (86). Parallel war Vimentin, als weiteres Intermediärfilament, signifikant stärker in den neuroepithelialen MMC-Geweben nachweisbar als in den Kontrollgeweben. Vimentin kommt in verschiedenen mesenchymalen Zelltypen, wie etwa Fibroblasten und Endothelzellen, aber auch in epithelialen Zellen vor (77). Zudem wird es als Markerantigen bezüglich proliferierenden Vorläuferzellen diskutiert (79, 80). Die in den humanen MMC-Plakoden sichtbare Astroglieose korrespondiert mit Daten, die bei experimentellen MMC-Rattenmodellen erhoben wurden: Dabei korrelierten signifikant erhöhte GFAP-Immunreaktivitäten in den Plakoden und höhere GFAP-Level in der Amnionflüssigkeit von MMC-Feten mit dem Grad der Schädigungen des Plakodengewebes (88-91). Auch Reis et al. wiesen in ihrem MMC-Mausmodell eine erhöhte astrozytäre Reaktion in dem neuroepithelialen Plakodengewebe sowie angrenzenden Rückenmarkabschnitten nach (13, 92).

Die Autoren diskutierten diese zellulären Veränderungen auch als möglich Ursache für die spätere Entwicklung eines Tethered-Cord-Syndroms, das heißt das sekundäre Anheften der rekonstruierten Rückenmarkabschnitte an den Spinalkanal mit resultierendem Zug an den nervalen Strukturen.

Im Gegensatz zu der Situation in standardisierten Tiermodellen ergaben die Korrelationsanalysen zwischen der GFAP-Dichte und den klinischen Ergebnissen in der vorgelegten Arbeit keine signifikanten Beziehungen. Das liegt zum einen an der retrospektiven Erhebung der klinischen Daten (so kann etwa nicht genau nachvollzogen werden, wie der neurologische Status erhoben wurde). Zum anderen könnte auch der Aspekt abweichender operativer Techniken der verschiedenen Operateure eine Rolle spielen: Es wurde beschrieben, dass individuelle operative Nuancen bei der MMC-Rekonstruktion durchaus mit dem Auftreten eines TCS im weiteren postoperativen Verlauf korrelieren können (93).

Ungeachtet dessen kann der Nachweis einer signifikanten Astrozytose in humanem MMC-Gewebe als Korrelat für die postulierten sekundären und tertiären Schadenskaskaden interpretiert werden: Aktivierte Astrozyten spielen eine etablierte Schlüsselrolle in sekundären Schadenskaskaden nach Rückenmarkverletzungen, da sie unter anderem eine wesentliche Quelle von inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen sind (15, 94).

Zusätzlich zu der nachweisbar signifikanten Astroglieose konnten mittels Färbungen gegen CD3, einem Markerantigen für inflammatorische Prozesse (95), in acht Fällen typische entzündliche Zellcluster in neuroepithelalem Gewebe identifiziert werden. Bestätigt wurde diese Entzündungsreaktion auch durch weiterführende Färbungen mit Antikörpern gegen CD11b und CD68 (84). Diese CD3-, CD11b-, und CD68-markierten Zellen wiesen morphologische Veränderungen auf, die typisch für aktivierte Mikrogliazellen und Monozyten sind (96).

Auch George und Cummings wiesen in ihrer kleinen histologischen Serie von humanen MMC-Makrophagen in „exponierten Arealen“ der neuroepithelialen MMC-Gewebe Mikrogliazellen nach (12). Des Weiteren beschrieb Cameron inflammatorische Reaktionen in humanem postnatalem MMC-Gewebe (97).

Wann diese entzündlichen Reaktionen induziert werden (nach der Geburt oder pränatal), kann mit dem methodischen Ansatz der vorgelegten Arbeit nicht beantwortet werden. Dafür sind weitere Analysen von fetalen Plakodengeweben zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten vor der Geburt notwendig - eine interessante Fragestellung, der in einem multizentrischen Ansatz in künftigen Projekten nachgegangen werden könnte.

4.3 Expressionsmuster von Interleukin-1-beta und Interleukin-1-Rezeptor: Identifikation spezifischer Botenstoffe von posttraumatischen Schadenskaskaden in der MMC-Plakode

Die histopathologische Aufarbeitung der MMC-Gewebe und die immunhistochemische Charakterisierung der zellulären Markerexpressionen waren das Fundament für die weiterführende immunhistochemische und molekularbiologische Analyse der sekundären Schadenskaskaden und somit der sie unterhaltenden Mediatoren. Aufgrund der nachgewiesenen Astrogliose und der entzündlichen Veränderungen fokussierten sich die Untersuchungen zunächst auf proinflammatorische Zytokine. Diese Botenstoffe werden u.a. von Astrozyten und Mikrogliazellen nach Rückenmarksschädigungen ausgeschüttet und sind wesentliche Träger der läsionsverstärkenden Mechanismen des Sekundärschadens (98-100). Entsprechend der der vorgelegten Arbeit zugrunde liegenden Hypothese des Tertiärschadens waren diese Moleküle daher von besonderem Interesse.

In allen MMC-Geweben waren Interleukin-1-beta und sein Rezeptor, ein Prototyp der proinflammatorischen Zytokine (100), sowohl auf mRNA- als auch auf immunhistologischer Ebene in unterschiedlichen Zelltypen signifikant erhöht nachweisbar. In Vorversuchen zeigte zudem TNF-alpha, ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, eine Induktionstendenz auf mRNA-Ebene und war in glialen und neuronalen Zellen signifikant erhöht im MMC-Gewebe nachweisbar (84).

Diese chemotaktischen Proteine sind in normalen adulten Geweben sehr gering oder gar nicht vorzufinden (18), was auch in den vorgelegten Untersuchungen bezüglich der Kontrollgewebe der Fall war (IL-1b/IL-1R1 waren in den adulten oder fetalen Kontrollgeweben nicht signifikant nachweisbar). Hochreguliert wird die Expression und Aktivität von Zytokinen, wenn das betreffende Gewebe in Stress versetzt wird (beispielsweise durch schnelles Wachstum, entzündliche Prozesse, Tumorwachstum, Infektionen oder nach Verletzungen) (18, 19). Im zentralen Nervensystem sind Zellen unterschiedlichster Art - nämlich Mikroglia, Neurone, Astrozyten und Endothelzellen - als Quellen der Zytokineexpression beschrieben worden (18). Zytokine fungieren hier als Mediatoren bei Infektionen und entzündlichen Geschehen, als Modulatoren bei Verletzungen peripherer Nerven, als Neuromodulatoren im ZNS und als Moleküle, die auf neurodegenerative Prozesse und Reparaturvorgänge einwirken (94).

In den MMC-Plakoden waren IL-1b- und IL-1R1-Immunreaktivitäten in neuronalen, astrozytären und mikroglialen Zellen nachweisbar. Diese Multizellularität könnte die facettenreichen Funktionen dieses Zytokin-Rezeptor/Liganden-Paars nach Rückenmarkverletzungen bezüglich neuronaler und glialer Zellen sowie Immunzellen reflektieren (99, 101-103). Nach Rückenmarkschädigungen sind IL-1b und IL-1R1 beispielsweise über die Induktion spezifischer Signaltransduktionswege in neuronale Apoptoseprozesse involviert (104). Ähnliche Mechanismen könnten auch in der tertiären Läsionskaskade im neuroektodermalen MMC Gewebe eine Rolle spielen: George und Cummings wiesen in ihrer Studie einen Verlust von neuronalen Zellen im neuroektodermalen MMC-Gewebe im Vergleich zu intaktem Rückenmarksgewebe nach (12). Die in der vorgelegten Arbeit nachgewiesene Induktion von neuronalem IL-1b/IL1-R1 bietet daher auch interessante Ansatzpunkte für zukünftige funktionelle Untersuchungen: Durch Analysen der entsprechenden zellulären Signalwege könnte überprüft werden, ob der potentielle sekundäre neuronale Zelluntergang in MMC-Plakoden durch zytokinvermittelte Apoptose mitbedingt ist.

Mit der Identifizierung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1-beta und TNF-alpha wurden damit in der vorgelegten Arbeit erstmals spezifische Botenstoffe in humanem Plakodengewebe identifiziert, die als Träger chronischer Schädigungsmechanismen im neuroepithelialen Gewebe potentiell zu einem sukzessiven Funktionsverlust führen können. Damit liefern diese Ergebnisse in Hinblick auf mögliche neue Therapiekonzepte der MMC Ansätze für weiterführende Untersuchungen. Trotz der Komplexität der offenen Dysraphien beschränkt sich die Therapie bis heute auf den primären Verschluss (prä- oder postnatal) und die symptomatische Therapie der assoziierten Problematiken (Hydrozephalus, Chiari II, Querschnittslähmungen, Blasenmastdarmstörungen) (87). In experimentellen Ansätzen konnten durch den Einsatz von Interleukin-1-beta-/Rezeptor-Antagonisten nach Rückenmarksverletzungen neurologische Verbesserungen erzielt werden (105-107). Basierend auf den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit wäre es interessant zu prüfen (unter zunächst experimentellen Bedingungen im Tierversuch), ob auch bei offenen Dysraphien durch eine Zytokin-Antagonisierung dem neurologischen Funktionsverlust entgegengewirkt werden könnte.

4.4 Erythropoetin, Erythropoetin-Rezeptor und Hypoxie-induzierbare Faktoren in der MMC-Plakode: Mögliche Ansatzpunkte für neuroprotektive Therapiestrategien

Nach den bisher diskutierten Ergebnissen, nach denen ähnliche zelluläre Schadenskaskaden, wie sie nach einem Trauma im Rückenmark auftreten, auch im Plakodengewebe induziert werden, war von Interesse, ob neben proinflammatorischen auch neuroprotektive Zytokine, wie das Erythropoietin und sein Rezeptor, in diesen Geweben nachweisbar würden. Erythropoietin und sein Rezeptor werden unter ischämischen oder neurodegenerativen Bedingungen sowie nach Gehirn- und Rückenmarksverletzungen im ZNS induziert (22, 108). Zudem erfüllt es in der Entwicklung des Rückenmarks wichtige Funktionen über die Regulation von Apoptosemustern (24) und könnte daher vielversprechende Ansatzpunkte für die weitere Therapieentwicklung liefern (siehe Abschnitt 1.3.2).

EPO-Rezeptor wird physiologischerweise konstitutiv in Motoneuronen der Vorderhörner exprimiert (109). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls sowohl in den adulten, als auch in den fetalen Rückenmarksgeweben, die als Kontrolle dienten, eine basale EPO-Expression auf mRNA- und Immunreaktivitätsebene nachweisbar. In den untersuchten MMC-Fällen war die messbare EPO-R-Immunreaktivitätsdichte des Neuroektoderms dann mit einer Häufigkeit von 75,4 % verglichen mit den fetalen Kontrollen signifikant erhöht nachweisbar. Die im Vergleich dazu auf einem geringen Expressionsniveau liegenden EPO-Immunreaktivitäten könnten dabei durch den nachgewiesenen schnellen Abbau des Erythropoetins bedingt sein (110).

Da die EPO-Expression durch die sogenannten Hypoxia-inducible Factors (speziell HIF-2 alpha), die durch hypoxische Gewebebedingungen und andere Faktoren wie beispielsweise inflammatorische Prozesse induziert werden, reguliert wird (22, 108) (siehe Abschnitt 1.3.3), wurden die entsprechenden Faktoren nach Erstellen des EPO/EPO-R-Expressionsprofils ebenfalls analysiert. Wie die vorliegende Arbeit deutlich macht, wurden die Faktoren HIF-1 alpha und HIF-2 alpha in den untersuchten Plakoden auf signifikant höherem Immunreaktivitätslevel nachweisbar und korrelierten positiv mit den EPO-Immunreaktivitäten. Zudem waren sie mit der EPO-Immunreaktivität in neuronalen Zellen kofärbt.

Damit liefert die vorgelegte Arbeit einen weiteren Baustein bezüglich der Schadenskaskaden: So wurden neben den in den vorherigen Abschnitten dargelegten entzündlichen Veränderungen auch hypoxie-assoziierte Botenstoffe als Träger möglicher tertiärer Schädigungsmechanismen identifiziert.

Nach einer Studie von Bernaudin et al. induzieren Ischämien im Bereich des zentralen Nervensystems im Gehirn zunächst eine neuronale EPO-R-Expression in der Penumbra (111). Die Hochregulierung der EPO-R-Immunreaktivität könnte hierbei auch durch andere Zytokine verursacht werden, was Nagai et al. anhand der erhöhten neuronalen EPO-R-Expression nach TNF-Stimulation in Zellkulturen demonstriert haben (112). Eine Interaktion von proinflammatorischen und neuroprotektiven Zytokinen legt auch die in der vorgelegten Arbeit nachgewiesene Kofärbung von IL-1b/IL-1R1 und EPO/EPO-R nahe. Hier wären weitere Untersuchungen bezüglich der jeweiligen Signaltransduktionswege interessant, um zu untersuchen, in welchem Maße sich diese unterschiedlichen Zytokine beeinflussen.

Der Nachweis von EPO-R-Immunreaktivitäten in MMC-Plakoden ist von besonderer Bedeutung, da rekombinantes Erythropoetin beziehungsweise nicht-hämatopoetische Analoga entwickelt wurden, die leicht zu verabreichen sind und die speziell auf das endogene protektive System abzielen, ohne die teilweise durch die Hämatogenese bedingten lebensbedrohlichen Nebenwirkungen aufzuweisen (113, 114). Ein möglicher neuroprotektiver Mechanismus, der auch in den MMC-Plakoden greifen könnte, wäre beispielsweise die von Arishima in einem Rattenmodell gezeigte neuronale Apoptosereduktion nach EPO-Applikation in den frühen und subchronischen Stadien nach traumatischer Rückenmarkschädigung (115). Zusätzlich wurde EPO eine fördernde Wirkung im Hinblick auf die neuronale Differenzierung bei Anwendung an Stammzellkulturen zugeschrieben (116, 117). Besonders unter Berücksichtigung des nachgewiesenen sekundären neuronalen Zelluntergangs und der Rückenmarkatrophy nach der Studie von George und Cummings (12) könnten beide Mechanismen von Vorteil für das neurologische Outcome bei offenen spinalen Dysraphien sein. Darüber hinaus wurde die neuroprotektive Wirkung von EPO in einer Vielzahl von weiteren experimentellen Therapieansätzen in Rückenmarkläsionsmodellen nachgewiesen (118-120). Auch die klinische Anwendbarkeit betreffend konnte eine positive Wirkung auf die Neuroregeneration nach EPO-Applikation gezeigt werden (120).

Es gibt bisher keine medikamentösen Therapiestrategien, die das chirurgische Outcome im Hinblick auf die neurologische Funktion bei MMC-Patienten verbessern könnten. Die in der vorgelegten Arbeit erstmals nachgewiesene Expression von EPO-Rezeptor in MMC-Neuroepithelien bietet prinzipiell die Möglichkeit der EPO-Applikation.

Unterstützend zur im vorherigen Abschnitt diskutierten Entzündungshemmung könnte die Gabe von Erythropoetin-Rezeptor-Agonisten eine adjuvante Therapieoption darstellen, die der Schädigung des Nervengewebes entgegengewirkt und die Reparatur bereits geschädigter Neurone unterstützen könnte.

5 Zusammenfassung

Die optimale Versorgung offener Dysraphien stellt eine multidisziplinäre Herausforderung dar. Trotz aktueller Fortschritte im Hinblick auf die pränatale Diagnose, die Präventionsmaßnahmen und die fetalen Operationstechniken gibt es derzeit keine gezielten Möglichkeiten, das neuronale Gewebe in den Plakoden neuroprotektiv zu unterstützen und damit den sukzessiven neurologischen Funktionsverlusten entgegenzuwirken. Ursächlich dafür ist die bisher ungenügende Erforschung der zellulären und molekularen Gegebenheiten in den Plakoden. Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, humanes neuroepitheliales Myelomeningozelengewebe zellulär genau zu charakterisieren und im Anschluss daran spezifische Botenstoffe der postulierten sekundären und tertiären Schadenskaskaden, die zusätzlich zum primären Entwicklungsschaden eine zunehmende Verschlechterung der neurologischen Funktion bedingen, zu identifizieren.

Für diese Untersuchungen konnte von 17 Neugeborenen neuroepitheliales MMC-Gewebe in die Analysen eingeschlossen und histologisch, immunhistochemisch und molekularbiologisch untersucht werden. Im Vergleich zu fetalen und adulten Rückenmarkskontrollen wiesen die MMC-Plakoden ausnahmslos eine signifikante Astrogliose auf. Zudem waren in einzelnen Fällen zelluläre Entzündungsreaktionen mit Mikrogliaaktivierung und Infiltraten von CD11b-, CD68- und CD3-positiven inflammatorischen Zellclustern nachweisbar. Somit bestätigten diese Analysen, dass zelluläre Veränderungen, die als wesentliche Bestandteile der sekundär induzierten Schadensabläufe nach einer traumatischen Rückenmarkschädigung etabliert sind, auch in neuroepithelialen MMC-Geweben induziert werden. Diese Zellen wurden in den weiteren Untersuchungen als mögliche Quelle proinflammatorischer Zytokine und deren Rezeptoren identifiziert: Erstmals wurden mit der vorgelegten Arbeit IL-1b und IL-1R1 auf mRNA- und Immunreaktivitätsdichte-Niveau in humanen neuroepithelialen MMC-Geweben nachgewiesen. Die Multizellularität der Expressionsmuster (Astrozyten, Mikroglia, Neurone) bietet entsprechende Ansatzpunkte für weiterführende funktionelle Analysen. In der Arbeit ist es darüber hinaus gelungen, EPO-R als möglichen Ansatzpunkt neuroprotektiver Therapieansätze zu identifizieren. Dieser Zytokin-Rezeptor wurde in neuronalen Zellen der Plakoden nachweisbar und bietet damit Ansatzpunkte für weitere therapieorientierte Untersuchungen. Als Regulator der EPO-Expression wurden dabei auch Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF-1a/HIF-2a) in den MMC-Plakoden identifiziert.

Damit wurden zusätzlich zur Entzündungsreaktion Hypoxie-vermittelte Schadenskaskaden als weiterer Aspekt der postulierten tertiären Schadenskaskaden aufgezeigt.

Wie in der Abbildung 30 zusammengefasst, liefert die vorliegende Arbeit damit zum einen konkrete, die „Second- und Third-Hit-Hypothese“ stützende Befunde (Nachweis struktureller Schäden, Identifikation von zellulären Entzündungsreaktionen und proinflammatorischen Zytokinen, sowie Hypoxie-assoziierte Botenstoffe als typische Träger von posttraumatischen Schadenskaskaden), zum anderen ergeben sich mit dem erstmaligen Nachweis der Expression von proinflammatorischen und neuroprotektiven Zytokin-Effektor/Rezeptorpaaren im neuroepithelialen MMC-Gewebe interessante Aspekte für weiterführende Untersuchungen bezüglich adjuvanter, die neurologische Funktion erhaltende bzw. unterstützende Therapieoptionen.

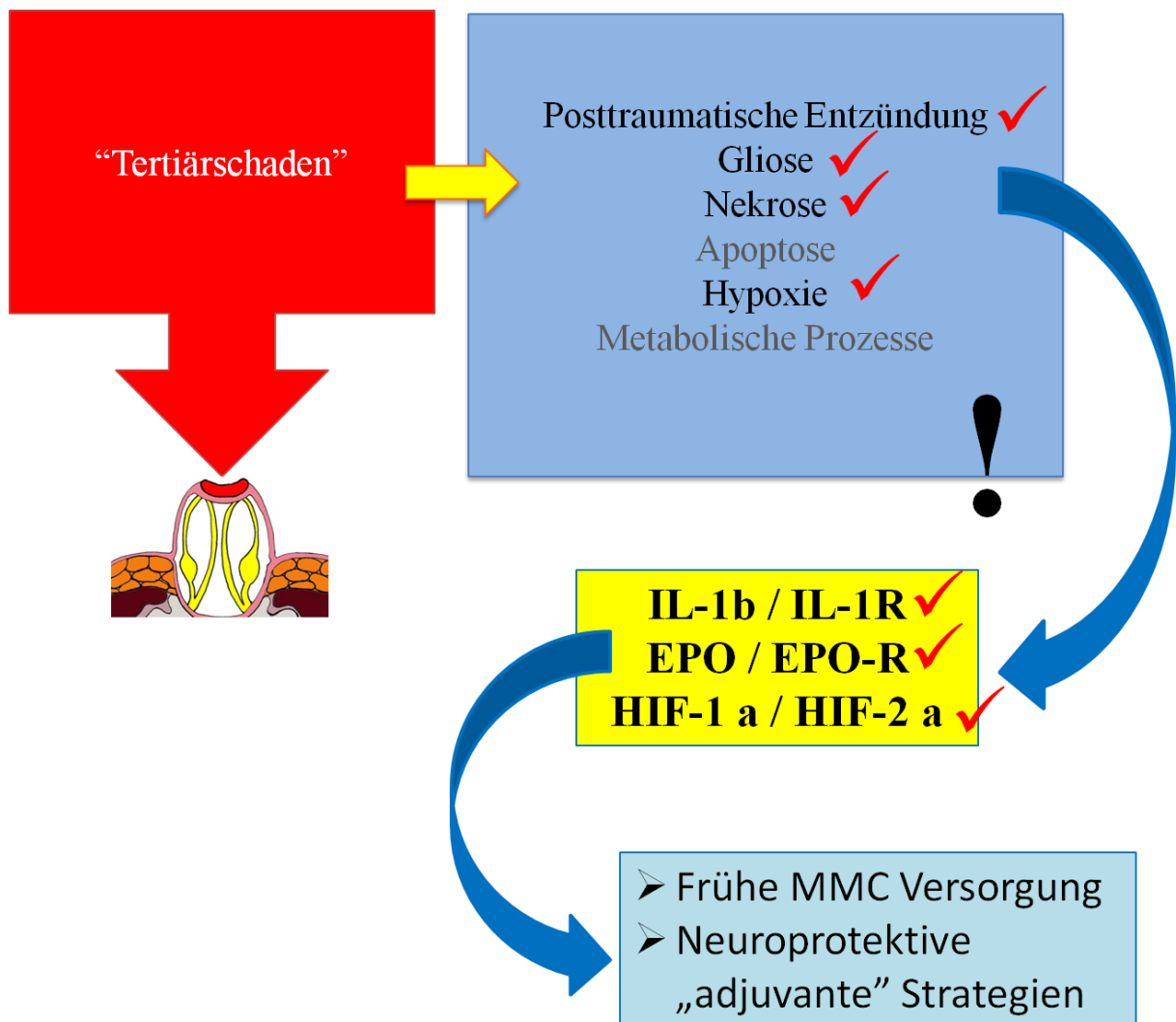


Abbildung 30

Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

6 Literaturverzeichnis

1. Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc.* 2007;2(10):2366-82.
2. Frey L, Hauser WA. Epidemiology of neural tube defects. *Epilepsia.* 2003;44 Suppl 3:4-13.
3. Salih MA, Murshid WR, Seidahmed MZ. Epidemiology, prenatal management, and prevention of neural tube defects. *Saudi medical journal.* 2014;35(12):S15-28.
4. Donkelaar HJt, Lammens M, Hori A. *Clinical neuroembryology : development and developmental disorders of the human central nervous system.* Berlin ; New York: Springer; 2006. xi, 536 p. p.
5. Özek MM, Cinalli G, Maixner WJ. *Spina bifida : management and outcome.* Milan ; New York: Springer; 2008. xxii, 532 p. p.
6. Korenromp MJ, van Gool JD, Bruinese HW, Kriek R. Early fetal leg movements in myelomeningocele. *Lancet.* 1986;1(8486):917-8.
7. Heffez DS, Aryanpur J, Hutchins GM, Freeman JM. The paralysis associated with myelomeningocele: clinical and experimental data implicating a preventable spinal cord injury. *Neurosurgery.* 1990;26(6):987-92.
8. Meuli M, Meuli-Simmen C, Hutchins GM, Seller MJ, Harrison MR, Adzick NS. The spinal cord lesion in human fetuses with myelomeningocele: implications for fetal surgery. *Journal of pediatric surgery.* 1997;32(3):448-52.
9. Stiefel D, Copp AJ, Meuli M. Fetal spina bifida in a mouse model: loss of neural function in utero. *J Neurosurg.* 2007;106(3 Suppl):213-21.
10. Hutchins GM, Meuli M, Meuli-Simmen C, Jordan MA, Heffez DS, Blakemore KJ. Acquired spinal cord injury in human fetuses with myelomeningocele. *Pediatric pathology & laboratory medicine : journal of the Society for Pediatric Pathology, affiliated with the International Paediatric Pathology Association.* 1996;16(5):701-12.
11. Emery JL, Lendon RG. The local cord lesion in neurospinal dysraphism (meningomyelocele). *The Journal of pathology.* 1973;110(1):83-96.
12. George TM, Cummings TJ. The immunohistochemical profile of the myelomeningocele placode: is the placode normal? *Pediatric neurosurgery.* 2003;39(5):234-9.

13. Reis JL, Correia-Pinto J, Monteiro MP, Costa M, Ribeiro A, Hutchins GM. Immunocytochemical characterization of astrocytosis along the spinal cord of loop-tail/curly-tail mice with myelomeningocele. *Pediatric neurosurgery*. 2008;44(4):288-95.
14. Knerlich-Lukoschus F, Juraschek M, Blomer U, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Force-dependent development of neuropathic central pain and time-related CCL2/CCR2 expression after graded spinal cord contusion injuries of the rat. *J Neurotrauma*. 2008;25(5):427-48.
15. Knerlich-Lukoschus F, von der Ropp-Brenner B, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Chemokine expression in the white matter spinal cord precursor niche after force-defined spinal cord contusion injuries in adult rats. *Glia*. 2010;58(8):916-31.
16. Knerlich-Lukoschus F, von der Ropp-Brenner B, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Spatiotemporal CCR1, CCL3(MIP-1alpha), CXCR4, CXCL12(SDF-1alpha) expression patterns in a rat spinal cord injury model of posttraumatic neuropathic pain. *Journal of neurosurgery Spine*. 2011;14(5):583-97.
17. Knerlich-Lukoschus F, Noack M, von der Ropp-Brenner B, Lucius R, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Spinal cord injuries induce changes in CB1 cannabinoid receptor and C-C chemokine expression in brain areas underlying circuitry of chronic pain conditions. *J Neurotrauma*. 2011;28(4):619-34.
18. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends in neurosciences*. 1995;18(2):83-8.
19. Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends in neurosciences*. 1995;18(3):130-6.
20. Knerlich F, Schilling L, Gorlach C, Wahl M, Ehrenreich H, Siren AL. Temporal profile of expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1beta and interleukin converting enzyme after cryogenic lesion of the rat parietal cortex. *Brain research Molecular brain research*. 1999;68(1-2):73-87.
21. Chavez JC, Baranova O, Lin J, Pichiule P. The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(37):9471-81.
22. Semenza GL, Koury ST, Nejfelt MK, Gearhart JD, Antonarakis SE. Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(19):8725-9.
23. Knabe W, Knerlich F, Washausen S, Kietzmann T, Siren AL, Brunnett G, et al. Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing midbrain. *Anatomy and embryology*. 2004;207(6):503-12.

24. Knabe W, Siren AL, Ehrenreich H, Kuhn HJ. Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing spinal cord and dorsal root ganglia. *Anatomy and embryology*. 2005;210(3):209-19.
25. Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(7):4044-9.
26. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(6):971-5.
27. Alnaeeli M, Wang L, Pikhova B, Rogers H, Li X, Noguchi CT. Erythropoietin in brain development and beyond. *Anatomy research international*. 2012;2012:953264.
28. D'Andrea AD, Zhu Y. Cloning and functional analysis of erythropoietin-, interleukin-3- and thrombopoietin-inducible genes. *Stem cells*. 1996;14 Suppl 1:82-7.
29. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*. 1998;93(3):385-95.
30. Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science*. 1999;283(5404):987-90.
31. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(12):1462-4.
32. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood*. 1988;71(2):524-7.
33. Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC, et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney international*. 1993;44(5):1149-62.
34. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci*. 1996;8(4):666-76.
35. Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, et al. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(9):3717-20.

36. Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(4):1269-74.
37. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Molecular medicine*. 2002;8(8):495-505.
38. Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Behe M, Hasselblatt M, et al. Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 2004;9(1):42-54.
39. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Knerlich F, von Ahsen N, Jacob S, Sperling S, et al. A hematopoietic growth factor, thrombopoietin, has a proapoptotic role in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(3):862-7.
40. Byts N, Siren AL. Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent. *Experimental & translational stroke medicine*. 2009;1:4.
41. Smith TG, Robbins PA, Ratcliffe PJ. The human side of hypoxia-inducible factor. *Br J Haematol*. 2008;141(3):325-34.
42. Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, et al. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest*. 2007;117(4):1068-77.
43. Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest*. 2007;117(4):862-5.
44. Dias MS, McLone DG. Hydrocephalus in the child with dysraphism. *Neurosurgery clinics of North America*. 1993;4(4):715-26.
45. Phuong LK, Schoeberl KA, Raffel C. Natural history of tethered cord in patients with meningomyelocele. *Neurosurgery*. 2002;50(5):989-93; discussion 93-5.
46. Michejda M. Intrauterine treatment of spina bifida: primate model. *Zeitschrift fur Kinderchirurgie : organ der Deutschen, der Schweizerischen und der Osterreichischen Gesellschaft fur Kinderchirurgie = Surgery in infancy and childhood*. 1984;39(4):259-61.
47. Meuli M, Meuli-Simmen C, Hutchins GM, Yingling CD, Hoffman KM, Harrison MR, et al. In utero surgery rescues neurological function at birth in sheep with spina bifida. *Nature medicine*. 1995;1(4):342-7.
48. Bruner JP, Richards WO, Tulipan NB, Arney TL. Endoscopic coverage of fetal myelomeningocele in utero. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1999;180(1 Pt 1):153-8.

49. Sutton LN, Adzick NS, Johnson MP. Fetal surgery for myelomeningocele. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2003;19(7-8):587-91.
50. Tulipan N. Intrauterine myelomeningocele repair. *Clinics in perinatology*. 2003;30(3):521-30.
51. Tulipan N, Sutton LN, Bruner JP, Cohen BM, Johnson M, Adzick NS. The effect of intrauterine myelomeningocele repair on the incidence of shunt-dependent hydrocephalus. *Pediatric neurosurgery*. 2003;38(1):27-33.
52. Bruner JP, Tulipan N, Paschall RL, Boehm FH, Walsh WF, Silva SR, et al. Fetal surgery for myelomeningocele and the incidence of shunt-dependent hydrocephalus. *Jama*. 1999;282(19):1819-25.
53. Tubbs RS, Chambers MR, Smyth MD, Bartolucci AA, Bruner JP, Tulipan N, et al. Late gestational intrauterine myelomeningocele repair does not improve lower extremity function. *Pediatric neurosurgery*. 2003;38(3):128-32.
54. Bruner JP, Tulipan N. Intrauterine repair of spina bifida. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2005;48(4):942-55.
55. Adzick NS, Thom EA, Spong CY, Brock JW, 3rd, Burrows PK, Johnson MP, et al. A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *The New England journal of medicine*. 2011;364(11):993-1004.
56. Goodrich JT. *Neurosurgical operative atlas : pediatric neurosurgery*. 2nd ed. New York: Rolling Meadows, Ill.: Thieme ; American Association of Neurosurgeons; 2008. xxii, 330 p. p.
57. McManus JFA, Mowry RW. *Staining methods; histologic and histochemical*. New York: Hoeber; 1960. viii, 423 p. p.
58. Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1981;29(11):1349-53.
59. Levitt P, Rakic P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol*. 1980;193(3):815-40.
60. Deck JH, Eng LF, Bigbee J, Woodcock SM. The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta neuropathologica*. 1978;42(3):183-90.

61. Duffy PE, Graf L, Rapport MM. Identification of glial fibrillary acidic protein by the immunoperoxidase method in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1977;36(4):645-52.
62. Wiedenmann B, Franke WW, Kuhn C, Moll R, Gould VE. Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(10):3500-4.
63. Wiedenmann B, Kuhn C, Schwechheimer K, Waldherr R, Raue F, Brandeis WE, et al. Synaptophysin identified in metastases of neuroendocrine tumors by immunocytochemistry and immunoblotting. *American journal of clinical pathology.* 1987;88(5):560-9.
64. Schwechheimer K, Wiedenmann B, Franke WW. Synaptophysin: a reliable marker for medulloblastomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1987;411(1):53-9.
65. Gould VE, Wiedenmann B, Lee I, Schwechheimer K, Dockhorn-Dworniczak B, Radosevich JA, et al. Synaptophysin expression in neuroendocrine neoplasms as determined by immunocytochemistry. *The American journal of pathology.* 1987;126(2):243-57.
66. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 1992;116(1):201-11.
67. Shaw G, Osborn M, Weber K. Reactivity of a panel of neurofilament antibodies on phosphorylated and dephosphorylated neurofilaments. *Eur J Cell Biol.* 1986;42(1):1-9.
68. Sprinkle TJ. 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Crit Rev Neurobiol.* 1989;4(3):235-301.
69. Kato H, Kogure K, Liu XH, Araki T, Itoyama Y. Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* 1996;734(1-2):203-12.
70. Roy A, Jana A, Yatish K, Freidt MB, Fung YK, Martinson JA, et al. Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(5):686-99.
71. Rojo JM, Bello R, Portoles P. T-cell receptor. *Adv Exp Med Biol.* 2008;640:1-11.
72. Sloane JP, Hughes F, Ormerod MG. An assessment of the value of epithelial membrane antigen and other epithelial markers in solving diagnostic problems in tumour histopathology. *The Histochemical journal.* 1983;15(7):645-54.
73. Sloane JP, Ormerod MG, Carter RL, Gusterson BA, Foster CS. An immunocytochemical study of the distribution of epithelial membrane antigen in normal and disordered squamous epithelium. *Diagnostic histopathology / published in association with the Pathological Society of Great Britain and Ireland.* 1982;5(1):11-7.

74. Sloane JP, Ormerod MG, Imrie SF, Coombes RC. The use of antisera to epithelial membrane antigen in detecting micrometastases in histological sections. *British journal of cancer*. 1980;42(3):392-8.
75. Delsol G, Gatter KC, Stein H, Erber WN, Pulford KA, Zinne K, et al. Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen. Implications for diagnosis of human neoplasms. *Lancet*. 1984;2(8412):1124-9.
76. Czernobilsky B, Remadi S, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin and other stromal markers in endometrial mucosa. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1993;422(4):313-7.
77. Schnitzer J, Franke WW, Schachner M. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol*. 1981;90(2):435-47.
78. Roessmann U, Velasco ME, Gambetti P, Autilio-Gambetti L. Neuronal and astrocytic differentiation in human neuroepithelial neoplasms. An immunohistochemical study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1983;42(2):113-21.
79. Yung WK, Luna M, Borit A. Vimentin and glial fibrillary acidic protein in human brain tumors. *Journal of neuro-oncology*. 1985;3(1):35-8.
80. Herpers MJ, Ramaekers FC, Aldeweireldt J, Moesker O, Slooff J. Co-expression of glial fibrillary acidic protein- and vimentin-type intermediate filaments in human astrocytomas. *Acta neuropathologica*. 1986;70(3-4):333-9.
81. Colombari R, Bonetti F, Zamboni G, Scarpa A, Marino F, Tomezzoli A, et al. Distribution of melanoma specific antibody (HMB-45) in benign and malignant melanocytic tumours. An immunohistochemical study on paraffin sections. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1988;413(1):17-24.
82. Franke WW, Schiller DL, Moll R, Winter S, Schmid E, Engelbrecht I, et al. Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *Journal of molecular biology*. 1981;153(4):933-59.
83. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982;31(1):11-24.
84. Kowitzke B, Cohrs G, Leuschner I, Koch A, Synowitz M, Mehdorn HM, et al. Cellular Profiles and Molecular Mediators of Lesion Cascades in the Placode in Human Open Spinal Neural Tube Defects. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2016.
85. Tinelli M, Monaco M, Vimercati M, Ceraminiello A, Pantosti A. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in skin and soft tissue infections, Northern Italy. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(2):250-7.

86. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 2005;50(4):427-34.
87. Akalan N. Myelomeningocele (open spina bifida) - surgical management. *Adv Tech Stand Neurosurg*. 2011(37):113-41.
88. Shen J, Zhou G, Chen H, Bi Y. Morphology of nervous lesion in the spinal cord and bladder of fetal rats with myelomeningocele at different gestational age. *Journal of pediatric surgery*. 2013;48(12):2446-52.
89. Melo-Filho AA, Weber Guimaraes Barreto M, Capelli Nassr AC, Rogerio F, Langone F, Pereira LA, et al. Corticosteroids reduce glial fibrillary acidic protein expression in response to spinal cord injury in a fetal rat model of dysraphism. *Pediatric neurosurgery*. 2009;45(3):198-204.
90. Petzold A, Stiefel D, Copp AJ. Amniotic fluid brain-specific proteins are biomarkers for spinal cord injury in experimental myelomeningocele. *J Neurochem*. 2005;95(2):594-8.
91. Danzer E, Zhang L, Radu A, Bebbington MW, Liechty KW, Adzick NS, et al. Amniotic fluid levels of glial fibrillary acidic protein in fetal rats with retinoic acid induced myelomeningocele: a potential marker for spinal cord injury. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2011;204(2):178 e1-11.
92. Reis JL, Correia-Pinto J, Monteiro MP, Hutchins GM. In utero topographic analysis of astrocytes and neuronal cells in the spinal cord of mutant mice with myelomeningocele. *J Neurosurg*. 2007;106(6 Suppl):472-9.
93. Pang D, Zovickian J, Oviedo A. Long-term outcome of total and near-total resection of spinal cord lipomas and radical reconstruction of the neural placode, part II: outcome analysis and preoperative profiling. *Neurosurgery*. 2010;66(2):253-72; discussion 72-3.
94. Bastien D, Lacroix S. Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury. *Exp Neurol*. 2014;258:62-77.
95. van Dongen JJ, Adriaansen HJ, Hooijkaas H. Immunophenotyping of leukaemias and non-Hodgkin's lymphomas. Immunological markers and their CD codes. *Neth J Med*. 1988;33(5-6):298-314.
96. Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG. Three-dimensional confocal analysis of microglia/macrophage markers of polarization in experimental brain injury. *J Vis Exp*. 2013(79).
97. Cameron AH. The spinal cord lesion in spina bifida cystica. *Lancet*. 1956;271(6935):171-4.

98. Pineau I, Lacroix S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol.* 2007;500(2):267-85.
99. Basu A, Krady JK, Levison SW. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res.* 2004;78(2):151-6.
100. Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Ohara K, Asano M, et al. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *J Neuroinflammation.* 2012;9:65.
101. Pineau I, Sun L, Bastien D, Lacroix S. Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. *Brain Behav Immun.* 2010;24(4):540-53.
102. Ye L, Huang Y, Zhao L, Li Y, Sun L, Zhou Y, et al. IL-1beta and TNF-alpha induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *J Neurochem.* 2013;125(6):897-908.
103. John GR, Lee SC, Song X, Riviaccio M, Brosnan CF. IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia.* 2005;49(2):161-76.
104. Wang XJ, Kong KM, Qi WL, Ye WL, Song PS. Interleukin-1 beta induction of neuron apoptosis depends on p38 mitogen-activated protein kinase activity after spinal cord injury. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26(8):934-42.
105. Schizas N, Andersson B, Hilborn J, Hailer NP. Interleukin-1 receptor antagonist promotes survival of ventral horn neurons and suppresses microglial activation in mouse spinal cord slice cultures. *J Neurosci Res.* 2014;92(11):1457-65.
106. Zong S, Zeng G, Wei B, Xiong C, Zhao Y. Beneficial effect of interleukin-1 receptor antagonist protein on spinal cord injury recovery in the rat. *Inflammation.* 2012;35(2):520-6.
107. Akuzawa S, Kazui T, Shi E, Yamashita K, Bashar AH, Terada H. Interleukin-1 receptor antagonist attenuates the severity of spinal cord ischemic injury in rabbits. *J Vasc Surg.* 2008;48(3):694-700.
108. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992;12(12):5447-54.
109. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konak S, Ulukus C, et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(4):2258-63.

110. Narhi LO, Arakawa T, Aoki KH, Elmore R, Rohde MF, Boone T, et al. The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. *J Biol Chem.* 1991;266(34):23022-6.
111. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(6):643-51.
112. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001;60(4):386-92.
113. Hasselblatt M, Ehrenreich H, Siren AL. The brain erythropoietin system and its potential for therapeutic exploitation in brain disease. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2006;18(2):132-8.
114. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Lippi G. Erythropoietin receptor (EpoR) agonism is used to treat a wide range of disease. *Mol Med.* 2013;19:62-4.
115. Arishima Y, Setoguchi T, Yamaura I, Yone K, Komiya S. Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976).* 2006;31(21):2432-8.
116. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2001;21(24):9733-43.
117. Marfia G, Madaschi L, Marra F, Menarini M, Bottai D, Formenti A, et al. Adult neural precursors isolated from post mortem brain yield mostly neurons: an erythropoietin-dependent process. *Neurobiol Dis.* 2011;43(1):86-98.
118. Cerri G, Montagna M, Madaschi L, Merli D, Borroni P, Baldissera F, et al. Erythropoietin effect on sensorimotor recovery after contusive spinal cord injury: an electrophysiological study in rats. *Neuroscience.* 2012;219:290-301.
119. Hong Z, Hong H, Chen H, Wang Z, Hong D. Investigation of the protective effect of erythropoietin on spinal cord injury in rats. *Exp Ther Med.* 2011;2(5):837-41.
120. Carelli S, Marfia G, Di Giulio AM, Ghilardi G, Gorio A. Erythropoietin: recent developments in the treatment of spinal cord injury. *Neurol Res Int.* 2011;2011:453179.

7 Anhang

7.1 Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL



ETHIK-KOMMISSION

Universitäts-Kinderklinik · Schwannenweg 20 · 24105 Kiel

PD Dr. med. Friederike Knerlich- Lukoschus
Institut für Neurochirurgie im Neurozentrum
UKSH, Campus Kiel
Schittenhelmstr. 10
24105 Kiel

Postadresse:-
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-53 33
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 29.1.2013

AZ.: A D 404/13 (bitte stets angeben)
Projektplan: **Histologische Charakterisierung von Neurulationsstörungen: Identifizierung von Mediatoren der sekundären Schadenskade in Myelomeningocelen-Geweben in Korrelation zum klinischen Status und Verlauf**
Anschreiben, Projektplan, Informationsblatt und Einverständniserklärung für wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material
Antragsteller: **PD Dr. med. Friederike Knerlich-Lukoschus, Klinik für Neurochirurgie, UKSH, Campus Kiel**
Datum des Antrages: **16.1.2013 (Eingang 23.1.2013)**

Sehr geehrte Frau Kollegin Knerlich-Lukoschus,

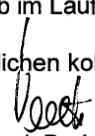
vielen Dank für Ihren obengenannten Antrag zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein.


Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als stellvertretenden Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen des Antrages der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

Nach Abschluss der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch
Stellv. Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

7.2 Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Fr. PD Dr. Friederike Knerlich-Lukoschus für die Überlassung des Themas bedanken und dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat auf dem spannenden Gebiet der pädiatrischen Neurochirurgie zu promovieren. Sie hat mich in kürzester Zeit durch ihren Enthusiasmus und ihre wissenschaftliche Denkweise für die experimentelle Forschung begeistert und mich in den letzten Jahren intensiv begleitet und unterstützt.

Weiterhin möchte ich mich bei Fr. Dr. Gesa Cohrs dafür bedanken, dass sie immer für mich da war und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Es hat mir viel Freude bereitet mit ihr zu arbeiten.

Ein spezieller Dank geht an Fr. Prof. Dr. Dr. Janka Held-Feindt für die Nutzung der Laborräume, organisatorische Hilfestellungen und die Förderung meines wissenschaftlichen Fortkommens durch Anregungen, Denkanstöße und Feedback ihrerseits.

Vielen Dank an die Mitarbeiter des neurochirurgischen Labors Fereshteh Ebrahim, Brigitte Rehmke und Jörg Krause. Sie haben mich in das wissenschaftliche Arbeiten eingeführt und mit ihrer stets freundlichen und hilfsbereiten Art eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Maximilian Mehdorn und Prof. Dr. Michael Synowitz für die Möglichkeit in ihrer Klinik zu promovieren. Zudem bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung des Projekts durch die Familie Mehdorn Stiftung.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Heinz-Hermann Hugo für die freundliche Weitergabe seines neuropathologischen Wissens.

Ganz besonders möchte ich mich sowohl bei meiner Familie dafür bedanken, dass sie mir alles beigebracht hat und mich immer bei all meinen Vorhaben emotional und finanziell unterstützt, als auch bei meinem Lebensgefährten Sebastian Drucks, der es geschafft hat, mich mit seinem unbändigen Optimismus dazu zu bringen, niemals aufzugeben und meine Ziele zu erreichen.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Bea Drucks (geb. Kowitzke)
Geburtsjahr	1987
Geburtsort	Menden (Sauerland)
Familienstand	verheiratet

Praktisches Jahr

Juli - Oktober 2017	Allgemein- und Viszeralchirurgie, imland Klinik, Eckernförde
März - Juli 2017	Klinik für Neurochirurgie, UKSH Campus Kiel
November 2016 - März 2017	Medizinische Klinik, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster

Hochschulbildung

Seit 2012	Humanmedizinstudium an der CAU zu Kiel, Examen voraussichtlich im November 2017
2006 - 2011	Zahnmedizinstudium an der CAU zu Kiel, Erlangen der Approbation

Famulaturen und Pflegepraktikum

Juli - August 2016	Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Städtisches Klinikum Braunschweig
August - September 2015	Praxis für Zahnheilkunde und Oralchirurgie, Dr.Stein, Plön
März 2015	Praxis für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Dr.Özmen, Iserlohn
September 2014	Klinik für Neurochirurgie, UKSH Campus Kiel
August 2014	Klinik für Neurologie/Neurologische Intensivmedizin, Klinikum Altenburger Land, Altenburg
März - April 2014	Praxis für Allgemeinmedizin, Dr.Farag, Iserlohn
April - Juni 2012	Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Plastische Operationen, UKSH Campus Kiel

Promotion

Seit 2015

Medizinische Dissertation:

Multimodale Charakterisierung geschlossener Dysraphien: Histologische und bildmorphologische Identifizierung potentiell begünstigender Faktoren der Tethered Cord-Entwicklung bei Myelomeningozelen-Patienten

Publikation

Juni 2016

Cellular Profiles and Molecular Mediators of Lesion Cascades in the Human Placode of Spinal Open Neural Tube Defects, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 75 (09), 827-842.

Praktische Erfahrungen

2008 - 2016

Hilfswissenschaftliche Tätigkeit im Physiologischen Institut, CAU zu Kiel

2012 - 2014

Tätigkeit als Assistenz Zahnärztin, Fr.Müller-Riecken, Kiel

2009

Hilfswissenschaftliche Tätigkeit im Anatomischen Institut, CAU zu Kiel

Kiel, den 14.08.2017

Bea Drucks (geb. Kowitzke)