

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

Einfluss einer der Tiefen Hirnstimulation vergleichbaren elektrischen Stimulation auf Zellen des zentralen Nervensystems

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität Kiel

Vorgelegt von
Henri Molkewehrum
aus Bremen

Kiel 2024

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Ann-Kristin Helmers, Klinik für Neurochirurgie

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Philipp Hüllemann, Klinik für Neurologie

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 07.11.2024

gez.: Prof. Dr. Ann-Kristin Helmers (Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildungsverzeichnis | IV |
| Tabellenverzeichnis | IV |
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Tiefe Hirnstimulation | 1 |
| 1.1.1 Ablauf der Operation | 1 |
| 1.1.2 Unerwünschte Nebenwirkungen | 2 |
| 1.1.3 Stimulationsareale | 2 |
| 1.1.4 Therapieerfolg | 3 |
| 1.1.5 Wirkmechanismus | 4 |
| 1.2 Fragestellung der Dissertation | 8 |
| 1.3 Zytokine und Chemokine | 8 |
| 1.3.1 CXCL12 | 8 |
| 1.3.2 CXCL16 | 9 |
| 1.3.3 CCL2 | 10 |
| 1.3.4 CCL20 | 10 |
| 1.3.5 IL-1 β | 10 |
| 1.3.6 IL-6 | 11 |
| 1.4 Aktueller Forschungsstand | 12 |
| 2 Materialien | 14 |
| 2.1 Zelllinien | 14 |
| 2.2 Medien und Puffer | 14 |
| 2.3 Gebrauchsfertige Reagenziensysteme | 15 |
| 2.4 Chemikalien und Enzyme | 16 |
| 2.5 Zytostatika | 16 |
| 2.6 Antikörper | 16 |
| 2.7 <i>Primer</i> | 17 |
| 2.8 Geräte und Materialien | 18 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.9 | <i>Computersoftware</i> | 19 |
| 3 | Methoden..... | 20 |
| 3.1 | Zellkultur | 20 |
| 3.2 | Trypsinieren..... | 20 |
| 3.3 | Aussaat | 20 |
| 3.4 | Ausdifferenzierung SH-SY5Y | 21 |
| 3.5 | Etablierung der Methode | 22 |
| 3.5.1 | Stimulationseinstellungen..... | 23 |
| 3.5.2 | Zellzählung..... | 24 |
| 3.5.3 | Fotos Mikroskop..... | 24 |
| 3.5.4 | TUNEL-Assay | 25 |
| 3.6 | Einfluss der Stimulation auf das Zyto-/Chemokinprofil | 26 |
| 3.6.1 | RNA-Extraktion | 26 |
| 3.6.2 | RNA-Isolation | 26 |
| 3.6.3 | cDNA-Synthese..... | 26 |
| 3.6.4 | <i>Quantitative real time Polymerase Chain Reaction (qrtPCR)</i> | 27 |
| 3.7 | Fluoreszenz-Immunzytochemie | 28 |
| 3.8 | Fluoreszenzmikroskopie..... | 29 |
| 3.9 | Statistische Analyse..... | 29 |
| 4 | Ergebnisse | 30 |
| 4.1 | Etablierung der Methode | 30 |
| 4.1.1 | Zellzählungen | 30 |
| 4.1.2 | Ausdifferenzierung der SH-SY5Y-Zellen..... | 34 |
| 4.1.3 | <i>TUNEL-Assay</i> | 36 |
| 4.2 | Einfluss der elektrischen Stimulation auf das Zyto- und Chemokinprofil | 37 |
| 4.3 | Immunzytochemie | 42 |
| 5 | Diskussion | 44 |
| 5.1 | Zusammenfassung der Ergebnisse | 44 |
| 5.2 | Bedeutung der Studie | 44 |

| | | |
|-----|--|----|
| 5.3 | Stärken der Studie | 47 |
| 5.4 | Schwächen der Studie | 47 |
| 5.5 | Ausblick | 48 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 50 |
| 6.1 | <i>Abstract</i> | 51 |
| 7 | Literaturverzeichnis..... | 52 |
| 8 | Anhang | 61 |
| 8.1 | Stimulationseinstellungen am ISIS Neurostimulator | 61 |
| 8.2 | t-Tests der Zellzählungen | 61 |
| 8.3 | Δ CT-Werte, entlogarithmierte Δ CT-Werte und t-Tests (Tabellen)..... | 63 |
| 8.4 | Publikationen..... | 66 |
| 8.5 | Danksagung | 67 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Basalganglienschleife und Pathologie beim Morbus Parkinson | 5 |
| Abbildung 2: Versuchsaufbau | 22 |
| Abbildung 3: Liniendiagramm & Fotos der SVGA-Zellzählungen | 31 |
| Abbildung 4: Liniendiagramm & Fotos der HMC3-Zellzählungen | 32 |
| Abbildung 5: Liniendiagramm der SH-SY5Y-Zellzählung | 33 |
| Abbildung 6: Ausdifferenzierung der SH-SY5Y-Zellen (NF200) | 34 |
| Abbildung 7: Ausdifferenzierung der SH-SY5Y-Zellen (Dopamin) | 35 |
| Abbildung 8: TUNEL-Assay der SVGA-, HMC3- und SH-SY5Y-Zellen | 36 |
| Abbildung 9: SVGA: Grundexpression von CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20, IL-1 β & IL-6 | 38 |
| Abbildung 10: HMC3: Grundexpression von CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20, IL-1 β & IL-6 | 39 |
| Abbildung 11: SH-SY5Y: Grundexpression von CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20, IL-1 β & IL-6 | 40 |
| Abbildung 12: n-fache Expression der Zyto- und Chemokine | 41 |
| Abbildung 13: Fluoreszenzfärbung mit CXCL12- und IL-1 β -Antikörpern | 42 |
| Abbildung 14: Stimulationseinstellungen am ISIS Neurostimulator | 61 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: In dieser Dissertation verwendete Abkürzungen | V |
| Tabelle 2: Für die Versuche verwendete Zelllinien | 14 |
| Tabelle 3: Kulturmedien und Puffersysteme | 14 |
| Tabelle 4: Reagenziensysteme | 15 |
| Tabelle 5: Chemikalien und Enzyme | 16 |
| Tabelle 6: Zytostatika | 16 |
| Tabelle 7: Antikörper | 16 |
| Tabelle 8: Primer | 17 |
| Tabelle 9: Geräte und Materialien | 18 |
| Tabelle 10: Computersoftware | 19 |
| Tabelle 11: t-Test der SVGA-Zellzählung | 61 |
| Tabelle 12: t-Test der HMC3-Zellzählung | 62 |
| Tabelle 13: t-Test der SH-SY5Y-Zellzählung | 62 |
| Tabelle 14: Δ CT-Werte der SVGA-Zelllinie | 63 |
| Tabelle 15: Entlogarithmierte Δ CT-Werte und t-Tests der SVGA-Zelllinie | 63 |
| Tabelle 16: Δ CT-Werte der HMC3-Zelllinie | 64 |
| Tabelle 17: Entlogarithmierte Δ CT-Werte und t-Tests der HMC3-Zelllinie | 64 |
| Tabelle 18: Δ CT-Werte der SH-SY5Y-Zelllinie | 64 |
| Tabelle 19: Entlogarithmierte Δ CT-Werte und t-Tests der SH-SY5Y-Zelllinie | 65 |

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: In dieser Dissertation verwendete Abkürzungen

| Abkürzung | Bedeutung |
|--------------------|---|
| ALIC | <i>Crus anterius der capsula interna</i> |
| ANT | <i>Nucleus anterior thalami</i> |
| BA25 | Brodmann Areal 25 (<i>Area subgenualis</i>) |
| BDNF | <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| CCL | CC-Chemokin-Ligand |
| CCR | CC-Chemokin-Rezeptor |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| cDNA | <i>Complementary DNA</i> |
| COVID-19 | <i>Corona Virus Disease 2019</i> |
| COX | Cyclooxygenase |
| CT | <i>Cycle threshold</i> |
| CXCL | CXC-Motiv-Chemokin-Ligand |
| CXCR | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor |
| D1-Rezeptor | Dopaminrezeptor, exzitatorisch |
| D2-Rezeptor | Dopaminrezeptor, inhibitorisch |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-Phenylindol |
| DBS | <i>Deep brain stimulation</i> = Tiefe Hirnstimulation |
| ddH ₂ O | Zweifach destilliertes Wasser |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxy-Nukleotidtriphosphate |
| EAE | Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GBM | <i>Glioblastoma multiforme</i> |
| Gp130 | Glykoprotein 130 |
| GPe | <i>Globus pallidus externus</i> |
| GPi | <i>Globus pallidus internus</i> |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| IL-R | Interleukin-Rezeptor |

| | |
|---------------|---|
| IPG | Impulsgenerator |
| IPSP | Inhibitorisches postsynaptisches Potenzial |
| JAK | Januskinase |
| L-Dopa | L-3,4-Dihydroxyphenylalanin |
| LWK 5 | 5. Lendenwirbelkörper |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MAP-Kinase | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MCP | <i>Monocyte Chemoattractant Protein</i> |
| MPTP | 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin |
| NF200 | Neurofilament 200 |
| OCD | <i>Obsessive-compulsive disorder</i> = Zwangsstörung |
| qrtPCR | <i>Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction</i> |
| PAK | P21-aktivierte Kinase |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SD | <i>Standard deviation</i> = Standardabweichung |
| SDF | <i>Stromal cell-derived factor</i> |
| SMD | <i>Mean depression score</i> |
| SR-PSOX | <i>Scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized low density lipoprotein</i> |
| STAT | <i>Signal transducers and activators of transcription</i> |
| STN | <i>Nucleus subthalamicus</i> |
| THS | Tiefe Hirnstimulation |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor α |
| TUNEL | <i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i> |
| Vim | <i>Nucleus ventralis intermedius thalami</i> |
| VMH | <i>Nucleus ventromedialis hypothalami</i> |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1 Einleitung

Im Folgenden wird zunächst das Therapiekonzept der Tiefen Hirnstimulation (THS) genauer erläutert und die Fragestellung dieser Dissertation vorgestellt. Anschließend werden die physiologischen und pathologischen Bedeutungen der untersuchten Zytokine dargestellt. Zuletzt wird der aktuelle Forschungsstand zum Einfluss der THS auf die Zyto- und Chemokinproduktion verdeutlicht.

1.1 Tiefe Hirnstimulation

Die Tiefe Hirnstimulation (THS; englisch: *deep brain stimulation* oder DBS) ist ein neurochirurgisches Verfahren zur Behandlung verschiedener Bewegungsstörungen wie Morbus Parkinson, Essentiellem Tremor oder dystonen Störungen. Sie entwickelte sich aus ablativen neurochirurgischen Verfahren, bei denen gezielt gesetzte Läsionen im Thalamus beispielsweise zu einer Verbesserung der Tremor-Symptomatik führten. Mittlerweile hat die THS die ablativen Verfahren bei der Behandlung von Bewegungsstörungen weitestgehend ersetzt (Gardner 2013). Zusätzlich wurde die Therapie 2009 zur Behandlung der *obsessive-compulsive disorder* (OCD) und 2018 zur Behandlung der Epilepsie zugelassen (Medtronic 2018). Aktuell wird die THS in verschiedenen Studien zur Behandlung therapierefraktärer Depressionen untersucht (Schlaepfer et al. 2008; Zhou et al. 2018). Seit ihrer Erstbeschreibung im Jahr 1987 in Frankreich wurde die THS weltweit bei etwa 100.000 Patient*innen durchgeführt. In Deutschland finden pro Jahr etwa 700 THS-Implantationen bei Patient*innen mit Bewegungsstörungen statt (Hogenkamp 2017).

1.1.1 Ablauf der Operation

Bei der Operation erfolgt zumeist eine beidseitige Implantation von Elektroden in die tiefen Hirnareale. Um eine hochpräzise Implantation zu ermöglichen, erfolgt der Eingriff unter Zuhilfenahme eines stereotaktischen Rahmens, in dem die Patient*innen gelagert werden. Die Operation wird entweder in Vollnarkose oder als Wacheingriff durchgeführt. Dieser ermöglicht die intraoperative Testung des Behandlungserfolgs. Nach der Positionierung der Elektroden erfolgt die Implantation eines Impulsgenerators (IPG). Dieser wird subkutan an der Brust implantiert und ist über subkutan verlegte Verlängerungskabel mit den Elektroden verbunden (Medtronic 2018). Der IPG gibt dauerhaft elektrische Impulse ab, wodurch die Neurone des jeweiligen Hirnareals entweder stimuliert oder inhibiert werden (Vgl. 1.1.5). Die behandelnden Kliniker*innen können den Impulsgeber mit einem kabellosen Handgerät steuern und somit die optimalen Stimulationseinstellungen herausfinden. Es besteht die Möglichkeit, die THS über die Anpassung und Ausrichtung der anodischen (+) oder kathodischen (-) Elektrodenkontakte zu steuern. Des Weiteren können Spannung oder Stromstärke sowie Pulsweite und Pulsfrequenz variiert werden (Herrington et al. 2016).

1.1.2 Unerwünschte Nebenwirkungen

Die Komplikationsraten unterscheiden sich je nach beobachtetem Zentrum und zeigen durch die zunehmende Erfahrung einen Rückgang in den letzten Jahren. Als Frühkomplikationen können Hirnblutungen (bei ca. 3 bis 4 % der Patient*innen) und Krampfanfälle (bei ca. 1,3 % der Patient*innen) durch das implantierte Fremdmaterial im Rahmen der Operation auftreten (Hogenkamp 2017). Die Blutungskomplikationen werden unterteilt in asymptomatische zerebrale Blutungen (0,5 %), asymptomatische intraventrikuläre Blutungen (3,4 %) und symptomatische intrazerebrale Blutungen (1,1 %). Laut einer Studie aus dem Jahr 2007 sterben etwa 0,4 % der THS-Patient*innen an den frühzeitigen Folgen einer THS-Operation, meistens durch schwerwiegende Blutungen (Voges et al. 2007). Neuere Studien zeigen – insbesondere an spezialisierten Zentren – deutlich geringere Mortalitätsraten (Fenoy und Simpson 2014).

Als Spätkomplikationen können Hautdefekte (bei 1-5 % der Patient*innen) und Infektionen sowie Embolien nach der Operation auftreten. Zusätzlich kann es je nach stimuliertem Hirnareal zu stimulationsinduzierten Nebenwirkungen wie Sprechstörungen, Sensibilitätsstörungen, Krampfanfällen, Doppelbildern oder psychiatrischen Nebenwirkungen (Depressionen, Apathie, Persönlichkeitsveränderungen) kommen. (Hogenkamp 2017). Darüber hinaus können sogenannte *idiopathic delayed-onset edemas* entstehen – idiopathische Ödeme, die einige Tage bis Wochen nach der Operation in der Region der implantierten Elektroden auftreten (Cuba et al. 2016). Die Vermutung, dass eine STN-THS (Stimulation des *Nucleus subthalamicus*) bei Parkinsonpatient*innen als langfristige Folge zu einer demenziellen Entwicklung führt, konnte in einer Metastudie hingegen nicht bestätigt werden (Volkman et al. 2010). Insbesondere die stimulationsinduzierten Nebenwirkungen stehen in engem Bezug zu den Wirkmechanismen der THS. Ein besseres Verständnis dieser könnte somit zur Entwicklung nebenwirkungsärmerer Therapiekonzepte beitragen.

1.1.3 Stimulationsareale

Je nach Erkrankung werden unterschiedliche Hirnareale stimuliert. Bei fortgeschrittenem Morbus Parkinson oder Dystonien wird zumeist der *Nucleus subthalamicus* (STN) oder der *Globus pallidus internus* (GPi) stimuliert (Medtronic 2018). Bei Essentiellem Tremor wird vorwiegend die *Zona incerta* des Subthalamus oder der *Nucleus ventralis intermedius* (Vim) des Thalamus stimuliert. Für diese drei Bewegungsstörungen ist die THS des jeweiligen Areals heutzutage ein verbreitetes und etabliertes Therapiekonzept (Lee et al. 2007).

Weniger etabliert und erforscht ist die THS bei Epilepsien und Erkrankungen aus dem psychiatrischen Formenkreis. In Studien der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass bei Zwangsstörungen (OCD) die Stimulation des *Crus anterior* der *Capsula interna* (ALIC) und bei pharmakoresistenten Epilepsien die Stimulation des *Nucleus anterior thalami* (ANT) eine Besserung der Symptomatik herbeiführen kann (Lee et al. 2007). Aufgrund dessen wurde die Stimulation des jeweiligen Hirnareals in Europa als

Therapie zugelassen, wenn keine ausreichende Symptomlinderung durch eine medikamentöse Therapie erreicht werden kann (Medtronic 2018). Für therapierefraktäre Depressionen ist die THS noch nicht zugelassen, es konnten jedoch in klinischen Studien gute Ergebnisse erzielt werden, indem die *Area subgenualis* (25. Brodman-Areal), der *Nucleus accumbens* oder das mediale Vorderhirnbündel stimuliert wurden (Bewernick et al. 2010; Schlaepfer et al. 2008).

1.1.4 Therapieerfolg

Die Wirksamkeit der THS-Therapie fällt je nach Erkrankung sehr unterschiedlich aus. Auch die Latenzzeit zwischen Beginn der elektrischen Stimulation und Linderung der Symptomatik unterscheidet sich je nach Symptom und Erkrankung. Im Folgenden sind einige Studien zu den Therapieergebnissen der THS für die in 1.1.3 beschriebenen Indikationen aufgeführt.

Bei Patient*innen mit Morbus Parkinson wurde nach Stimulationsbeginn zunächst eine Verbesserung des Tremors nach Sekunden, daraufhin eine Abnahme der Bradykinesie und Rigidity nach Minuten und zuletzt eine Verbesserung axialer Symptome nach Stunden bis Tagen festgestellt (Herrington et al. 2016). Insbesondere motorische Komplikationen wie der Tremor werden durch die THS häufig erfolgreich vermindert, das Fortschreiten der Degeneration kann hingegen nicht verlangsamt werden (Hilker et al. 2005). Eine THS-Therapie kombiniert mit einer optimalen medikamentösen Therapie ermöglicht Parkinson-Patient*innen im Durchschnitt 4 bis 5 zusätzliche Stunden pro Tag ohne Dyskinesien. Daraus resultiert eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität. Zudem kann die Medikation im Mittel um etwa 25 % reduziert werden (Deuschl et al. 2006; Weaver et al. 2009). In einer Studie zur bilateralen STN-THS konnte auch nach 5 Jahren Therapie noch eine verbesserte Motorik im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Krack et al. 2003).

Bei Dystoniepatient*innen verminderten sich zunächst die phasischen, dann die tonischen Dystonien. Hierbei erfolgt das Ansprechen auf die Therapie oft erst im Verlauf von mehreren Wochen (Herrington et al. 2016). Bei Patient*innen mit Essentiellem Tremor konnten die Symptome durchschnittlich für mehr als 6 Jahre effektiv unterdrückt werden, allerdings zeigt sich häufig eine gewisse Habituation (Paschen et al. 2019; Rehnckrona et al. 2003). Weniger belegt ist der therapeutische Nutzen der THS bei Depressionen. So kamen verschiedene Studien zu kontroversen Ergebnissen. In einer Metaanalyse konnte bei Patient*innen mit therapierefraktären Depressionen durch die THS eine Reduktion des *mean depression score* (SMD) erzielt werden. Die statistisch signifikanten Ergebnisse beschränkte sich jedoch auf bestimmte Subgruppen und vereinzelte Analysemethoden, während in vielen anderen Auswertungen keine statistische Signifikanz festgestellt werden konnte (Dougherty et al. 2015; Zhou et al. 2018).

Es wird deutlich, dass der Therapieerfolg der THS je nach Symptom und Erkrankung sehr unterschiedlich ausfällt. Die Ursachen für diese Diskrepanzen sind nicht wissenschaftlich belegt. Es wird jedoch angenommen, dass schnell eintretende Effekte durch die direkte elektrische Neurostimulation bedingt sind. Später eintretende Effekte könnten teilweise auf Veränderungen der

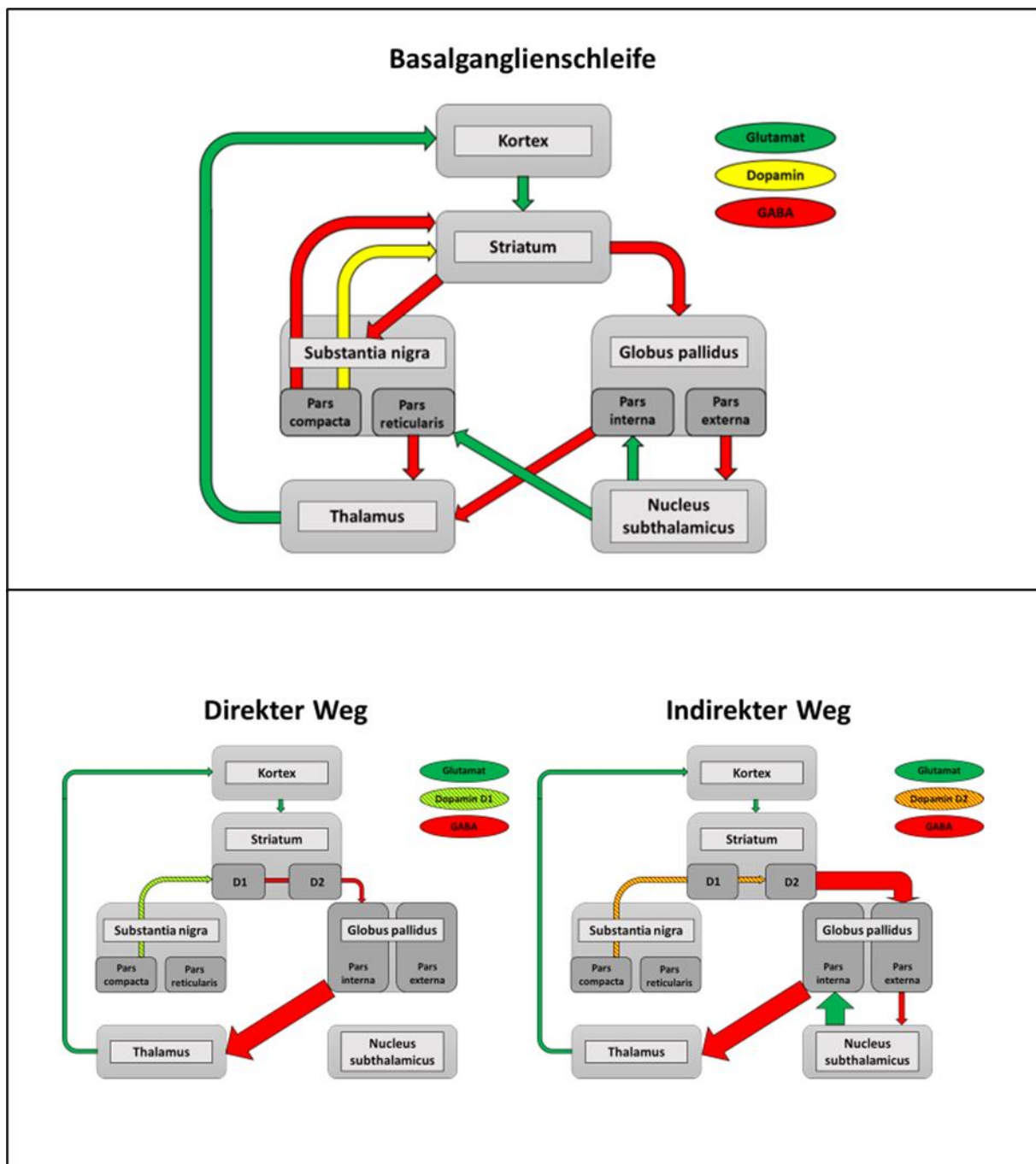
synaptischen Plastizität beruhen, da diese Prozesse eine längere Stimulationsdauer voraussetzen (Agnesi et al. 2013). Auch biochemische Veränderungen – wie die Beeinflussung inflammatorischer Vorgänge im ZNS – könnten zu den später einsetzenden Effekten beitragen.

1.1.5 Wirkmechanismus

Die Wirkweise der THS ist nicht vollständig verstanden und erscheint komplex, da sie auf verschiedenen Ebenen Einfluss auf die elektrische Weiterleitung und die neuronale Vernetzung nimmt. Da der Wirkmechanismus vom stimulierten Hirnareal und den darin vorherrschenden Neurotransmittern abhängig ist, diente die Basalganglienschleife lange als Stütze (Guridi und Lozano 1997). Anhand dieser Theorie in Kombination mit der Pathogenese des Morbus Parkinson lässt sich ein möglicher Wirkmechanismus der THS veranschaulichen. So kommt es beim Morbus Parkinson zum Absterben der dopaminergen Neurone der *Substantia nigra, pars compacta*. Daraus resultiert eine verstärkte Inhibition des Thalamus über einen direkten und einen indirekten Weg (Abbildung 1). Infolgedessen kommt es zur verminderten Rückkopplung an den Kortex und somit zur Hypokinesie (Davie 2008).

- Direkter Weg: *Substantia nigra* → Dopamin → Exzitatorische D1-Rezeptoren am Striatum → GABA → GPi → GABA → Thalamus → Glutamat → Kortex.
- Indirekter Weg: *Substantia nigra* → Dopamin → Inhibitorische D2-Rezeptoren am Striatum → GABA → GPe → GABA → STN → Glutamat → GPi → GABA → Thalamus → Glutamat → Kortex.

Abbildung 1: Basalganglienschleife und Pathologie beim Morbus Parkinson



Anhand der Basalganglienschleife (obere Abbildung, vereinfachte Darstellung) kann man sich die neuronale Vernetzung der verschiedenen Kerngebiete verdeutlichen. Das *Striatum* setzt sich aus dem *Putamen* und dem *Nucleus caudatus* zusammen und ist in dieser Abbildung zur Vereinfachung als ein gemeinsames Kerngebiet aufgeführt. Die grünen Pfeile symbolisieren den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat. Der gelbe Pfeil steht für den Neurotransmitter Dopamin, der über D1-Rezeptoren exzitatorisch und über D2-Rezeptoren inhibitorisch auf das Striatum wirkt. Die roten Pfeile symbolisieren den inhibitorischen Neurotransmitter GABA. In der unteren Abbildung ist die Situation beim Morbus Parkinson dargestellt. Die Dicke der Pfeile veranschaulicht die ausgeschüttete Transmittermenge im Vergleich zur physiologischen Situation. Beide Wege führen zu einer verminderten Erregung des Kortex durch den Thalamus und somit zu einer Hypokinesie.

Die THS wird beim Morbus Parkinson häufig am STN oder am GPi durchgeführt, die beide nach dem Modell der Basalganglienschleife überaktiv sind. Um eine Besserung der Symptomatik zu erzielen, müssten diese Kerngebiete demnach durch die THS inhibiert werden. Somit können auf Grundlage der Basalganglienschleifen-Theorie überwiegend inhibitorische Effekte der THS angenommen werden. Dennoch gibt es viele weitere Theorien und kontroverse Studien zu den genauen Wirkmechanismen.

Neuronale Inhibition: Bereits 1997 wurde beobachtet, dass die Effekte der THS denen der ablativen Chirurgie ähnelten. Daher ging man davon aus, dass es durch die Elektroden zur lokalen Inhibition im Sinne einer reversiblen Läsion der nächstgelegenen Zellen kommt (Guridi und Lozano 1997). Dieser Effekt passte auch zum vorherrschenden Modell der Basalganglienschleife (Abbildung 1). Einige experimentelle Studien unterstützten diese Theorie: Im Tiermodell führte die STN-THS in unmittelbarer Nähe der Elektrode durch einen Depolarisationsblock zu einer Suppression der neuronalen Aktivität (Benazzouz et al. 2000). Dieser entsteht vermutlich durch einen funktionalen Block durch dauerhafte Depolarisation: *In vitro* wurde nachgewiesen, dass eine hochfrequente elektrische Stimulation (>130 Hz) eine dauerhafte Depolarisation neuronaler Membranen bewirken kann. Dadurch werden spannungsabhängige Natriumkanäle inaktiviert und die Durchlässigkeit für Kaliumionen erhöht sich. Diese Effekte verhindern die Entstehung weiterer Aktionspotentiale und es kommt zur funktionellen Blockade dieser Neurone (Herrington et al. 2016).

Neuronale Aktivierung: Im Gegensatz zur Theorie der lokalen Inhibition gibt es auch Hinweise auf eine Erregung von Axonen und Dendriten in der Umgebung der implantierten Elektroden. Diese spiegelten sich im Tiermodell in einer höheren Aktionspotentialfrequenz entlang der Axone wider (Anderson et al. 2004). So deuteten Untersuchungen zur STN-THS bei Ratten in nachgeschalteten Arealen wie dem GPi auf eine neuronale Aktivierung hin (Anderson et al. 2004). Zudem führte eine Hochfrequenzstimulation des STN bei Ratten zu einer Zunahme der extrazellulären Glutamatkonzentration (Windels et al. 2003). Des Weiteren wurde bei Stimulation des Putamen eine Aktivierung GABAerger Neurone nachgewiesen (Dostrovsky et al. 2000). Diese Beobachtungen sprechen für einen exzitatorischen Effekt der THS.

Antidrome Erregung: Eine weitere Hypothese zum Wirkmechanismus besagt, dass es durch eine antidrome Erregungsweiterleitung zur Ausschüttung präsynaptischer Neurotransmitter kommen kann. Über diesen Mechanismus würde die THS je nach Ausprägung der Afferenzen des stimulierten Kerngebiets entweder inhibitorische oder exzitatorische Effekte bewirken (Herrington et al. 2016). Dies könnte die teilweise kontroversen Studienergebnisse zum Wirkmechanismus der THS erklären. Weiterhin besitzen Axone und Dendriten einen geringeren Schwellenwert als die Somata der Neurone. Dadurch können auch Somata weit entfernt von der Elektrode stark erregt werden, sofern sie axonale oder dendritische Verbindungen besitzen, die in der Nähe der Elektrode verlaufen und somit leichter erregt werden. Die Somata der Neurone werden demnach weniger durch die direkte Stimulation als über

deren axonale und dendritische Verbindungen erregt. Darüber hinaus kann auch der Myelinisierungsgrad der Axone und deren Ausrichtung zum elektrischen Feld die Erregbarkeit und somit die Wirkweise der THS beeinflussen (Herrington et al. 2016).

Veränderung der neuronalen Synchronität: Bei Patient*innen mit Bewegungsstörungen treten gehäuft abnorme Entladungsmuster der Neurone auf. Beim Gesunden treten im EEG des sensomotorischen Kortex Beta-Wellen (15-30 Hz) in Phasen von 200-600 ms auf. Beim Morbus Parkinson zeigte sich eine gesteigerte Ausbreitung und Kohärenz dieser Beta-Wellen, die während des Bewegungsversuchs persistierten (Moshel et al. 2013; Oswal et al. 2012). Einzelzellableitungen des GPi bei Patient*innen mit Morbus Parkinson und Dystonien zeigten irreguläre, hypersynchrone Entladungen. Durch STN-THS im Hochfrequenzbereich (130 Hz) konnten die Neurone des GPi desynchronisiert und die Symptome verbessert werden (Daneshzand et al. 2018). STN-Stimulation im Beta-Frequenzbereich führte hingegen zu einer Verschlechterung der Symptomatik (Chen et al. 2007). Diese Studienergebnisse deuten darauf hin, dass neben einer direkten Stimulation oder Inhibition der Neurone auch ein Einfluss auf die Synchronisierung neuronaler Netze für die Wirkweise der THS von Bedeutung ist.

Synaptische Plastizität: Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus der THS ist die Beeinflussung der synaptischen Plastizität. In Ratten konnten durch STN-THS Effekte wie Kurzzeitpotenzierung, Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression beobachtet werden (Shen et al. 2003). Durch Bildgebung mittels funktionellem MRT wurden diese Ergebnisse bestätigt (Min et al. 2014).

Neurochemische Effekte: Die meisten Studien untersuchten die kurzfristig eintretenden Effekte der THS. Es ist jedoch wenig über die langfristigen neurochemischen Effekte der THS bekannt. In einer THS-Studie an Ratten konnte eine erhöhte Freisetzung des *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) nachgewiesen werden (Hamani et al. 2012). Dieser Wachstumsfaktor besitzt neuroprotektive Eigenschaften und sein Verlust führt zur Neurodegeneration (Fritsch et al. 2010). Zudem zeigte sich in einem Stressmodell zur Simulation von Depressionen bei Ratten eine verminderte Konzentration von BDNF im Plasma und im *liquor cerebrospinalis* der Versuchstiere. Diese stieg nach Stimulation des medianen Vorderhirnbündels wieder an (Dandekar et al. 2019). Des Weiteren konnte die STN-THS (1 Stunde Hochfrequenzstimulation täglich für 3 Monate) bei parkinsonoiden Ratten neuroprotektive Effekte bewirken, indem sie die Degeneration der Neurone in der *Substantia nigra* verlangsamte (Temel et al. 2006).

1.2 Fragestellung der Dissertation

Die Ergebnisse der THS bei Bewegungsstörungen sind häufig zufriedenstellend, sodass Symptome wie der Tremor langfristig vermindert werden können und sich die Lebensqualität der betroffenen Patient*innen deutlich verbessert. Bei anderen Indikationen wie OCD oder therapierefraktären Depressionen kommt es seltener zum Therapieerfolg. Zudem können durch jede THS zahlreiche therapieinduzierte Nebenwirkungen auftreten. Daher ist ein besseres Verständnis der molekularen Wirkmechanismen für die Optimierung der THS-Therapie von großer Bedeutung.

In einigen Studien wurde gezeigt, dass die THS nicht nur eine direkte Stimulation der Neurone bewirkt, sondern auch eine langfristige Veränderung des neuronalen Netztes und eine Beeinflussung der Freisetzung neuronaler und inflammatorischer Botenstoffe verursacht (Vgl. 1.1.5 und 1.4). Bei neuroinflammatorischen Prozessen spielen insbesondere die Zytokine und Chemokine eine entscheidende Rolle. So dienen die Interleukine aus der Gruppe der Zytokine der Kommunikation der Leukozyten untereinander und sind in Signalkaskaden der Neuroinflammation eingebunden (Pranzatelli 2018). Chemokine haben chemotaktische Funktionen und locken Immunzellen mit entsprechenden membrangebundenen Rezeptoren zu Lokalisationen, an denen eine Immunreaktion stattfindet. Bei diversen neurologischen Erkrankungen können veränderte Zyto- und Chemokinspiegel beobachtet werden. Somit wird ihnen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und dem Progress jener Krankheiten zugeschrieben (Vgl. 1.3.).

Um den Einfluss der THS auf die Zyto- und Chemokinexpression weiterführend untersuchen zu können, soll in dieser Studie ein Modell validiert werden, mit dem humane Zellen (SVGA: Astrozyten, HMC3: Mikroglia und SH-SY5Y: Neuronen) analog zur THS *in vitro* elektrisch stimuliert werden können. Zudem sollen die Proliferations- und Apoptoseraten der Zellen während der Stimulation untersucht werden.

1.3 Zytokine und Chemokine

Die Experimente beschränkten sich auf 6 Zyto- und Chemokine (CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20, IL-1 β und IL-6). Diese wurden ausgewählt, da sie in den Vorexperimenten zur Etablierung der Methode eine ausreichende Expression zeigten. Im Folgenden wird anhand einiger Publikationen der aktuelle Forschungsstand zur physiologischen und pathologischen Bedeutung dieser Zyto- und Chemokine dargestellt. Dabei wird sich weitestgehend auf deren Einfluss auf das Nervensystem und inflammatorische Prozesse beschränkt.

1.3.1 CXCL12

CXCL12 (CX-Chemokin-Ligand-12, auch SDF1) ist ein Chemokin, das auf Chromosom 10 codiert ist. Es können 7 isoforme Proteine aus dem CXCL12-Gen durch alternatives *Splicing* entstehen. Die Proteinbiosynthese wird durch Lipopolysaccharide (LPS), TNF- α und IL-1 induziert und seine Wirkung

entfaltet CXCL12 durch Bindung an die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7. Es wirkt chemotaktisch auf Stammzellen, Tumorzellen und Lymphozyten, die entweder CXCR4 oder CXCR7 als Oberflächenprotein exprimieren (Burns et al. 2006). Grundsätzlich können dem CXCL12 sowohl pathologische als auch neuroprotektive Effekte zugeschrieben werden.

Insbesondere bei neuroinflammatorischen Erkrankungen wird dem CXCL12 eine pathologische Rolle zugeschrieben. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der Beeinflussung der Migration von Leukozyten über die Blut-Hirn-Schranke (McCandless et al. 2006). In einer Studie aus dem Jahr 2017 konnte bei Patient*innen mit Multipler Sklerose eine erhöhte Konzentration von CXCL12 in Astrozyten und Neuronen festgestellt werden (Chu et al. 2017). Auch in Mäusen, bei denen eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE, vergleichbar mit der humanen Multiple Sklerose) induziert wurde, konnten erhöhte CXCL12-Expressionen im *Gyrus dentatus* und *Corpus callosum* festgestellt werden (Zilkha-Falb et al. 2016). Zudem konnten bei Parkinsonpatient*innen *post mortem* erhöhte CXCL12/CXCR4-Spiegel in der *substantia nigra* nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde in einem Tiermodell bestätigt, in dem durch die Induktion eines Morbus Parkinson in Mäusen durch die Gabe von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) die CXCR4-Expression hochreguliert wurde (Shimoji et al. 2009).

Auf der anderen Seite stehen die neuroprotektiven Effekte des CXCL12. Es wird vermehrt bei ZNS-Verletzungen freigesetzt und dient der Mobilisation von Stammzellen und neuronalen Progenitorzellen zu neuronalen Läsionen und induziert dort die Neurogenese und Zellproliferation (Chu et al. 2017). Zudem wurde nachgewiesen, dass CXCL12 das Fortschreiten von Morbus Alzheimer verlangsamen könnte. Durch erhöhte CXCL12-Spiegel werde demnach bei Alzheimer-Patient*innen die Anzahl der PAK-Misslokalisationen vermindert. Infolgedessen entstehen vermehrt dendritische Fortsätze, die den generellen neuronalen Austausch verbessern und somit dem Fortschreiten der Erkrankung entgegenwirken (Raman et al. 2011). Insgesamt scheinen jedoch die pathologischen Effekte des CXCL12 – als möglicher Induktor der Neuroinflammation – bei einer Überexpression zu überwiegen.

1.3.2 CXCL16

CXCL16 (auch SR-PSOX) gehört zu den CXC-Motiv-Chemokinen und ist auf Chromosom 17 codiert. Es kommt im Körper sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form vor. Es bindet an CXCR6 und wirkt chemotaktisch auf T-Lymphozyten. Die Expression von CXCL16 wird durch TNF- α und Interferon- γ induziert (Matloubian et al. 2000). Eine Überexpression konnte bei Patient*innen mit *Glioblastoma multiforme* (GBM) nachgewiesen werden. Hierbei trägt das CXCL16 zur Zellproliferation und Anti-Apoptose und somit zum Tumorprogress bei (Hattermann et al. 2016; Lepore et al. 2018). Demnach scheint eine Überexpression von CXCL16 eher proinflammatorische und onkogenetische Effekte zu bewirken.

1.3.3 CCL2

CCL2 (CC-Chemokin-Ligand-2, auch MCP-1) ist auf Chromosom 17 codiert und gehört zu den Chemokinen. Es wird von Monozyten, Makrophagen sowie Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen produziert. Es entfaltet seine chemotaktische Wirkung auf basophile Granulozyten und Monozyten durch Bindung an die membrangebundenen Rezeptoren CCR2 und CCR4. Die Synthese von CCL2 wird durch TNF- α , LPS und IL-1 β stimuliert. Es wirkt überwiegend proinflammatorisch (Craig und Loberg 2006). Bei Patient*innen mit Multipler Sklerose, Epilepsien, neuronalen Ischämien oder schweren Depressionen konnten vermehrt hohe CCL2-Spiegel festgestellt werden (Mahajan et al. 2018). Des Weiteren konnte bei Mäusen, bei denen eine experimentelle Autoimmunenzephalitis induziert wurde, der Progress der Erkrankung durch Gabe von CCL2-Antikörpern verlangsamt werden (Kim et al. 2014). Demnach könnte CCL2 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten der Multiplen Sklerose spielen. In einer Studie an Ratten wurde die Heilung der Blut-Hirn-Schranke nach Implantation intrakortikaler Elektroden im Zusammenhang mit CCL2 untersucht. Durch Blockade der CCL2/CCR2-Signalkaskade konnte histologisch eine höhere Anzahl an Neuronen und eine stärkere Vaskularisation an der Blut-Hirn-Schranke festgestellt werden als in der Kontrollgruppe. Somit könnte eine CCL2/CCR2-Blockade die Heilung des durch die Elektroden verletzten Gewebes beschleunigen und das Risiko von Komplikationen nach der Operation minimieren (Falcone et al. 2019).

1.3.4 CCL20

CCL20 (CC-Chemokin-Ligand 20, auch MIP3a) ist ein Chemokin, das auf Chromosom 2 codiert ist (Nelson et al. 2001). Es bindet an den Rezeptor CCR6 und wirkt stark chemotaktisch auf Lymphozyten und schwächer chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten (Hieshima et al. 1997). LPS, TNF- α , Interferon- γ und IL-6 induzieren die CCL20-Synthese (Schutyser et al. 2000). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass pathogene CD4⁺ T-Zellen bei Multipler Sklerose in Abhängigkeit von der CCL20-Konzentration über Blutgefäße am Lendenwirbelkörper 5 (LWK 5) ins ZNS gelangen (Arima et al. 2012). Demnach scheint es eine Rolle bei der Diapedese pathogener Lymphozyten ins ZNS zu spielen. Falls dieser Zusammenhang belegt wird, könnten sich neue Therapieoption für die Multiple Sklerose – wie die medikamentöse Inhibition der CCL20-Konzentration durch Gabe eines CCL20-Antikörpers – offenbaren.

1.3.5 IL-1 β

IL-1 β ist auf Chromosom 2 codiert und zählt zu den Entzündungsmediatoren. Es liegt als Vorläuferprotein im Zytosol vor. Aus diesem wird in sekretorischen Lysosomen durch mehrere Reaktionsschritte das aktive IL-1 β abgespalten. Die Wirkung wird durch Bindung an IL-1-Rezeptoren vermittelt. Bindung an den IL-1R1 führt zur Signalweiterleitung, wohingegen IL-1R2 das IL-1 β ohne Signalweiterleitung bindet und so einer übermäßigen Reaktion entgegenwirkt (Dinarello 2005). Die Synthese von IL-1 β wird unter anderem durch Bindung von Substraten an *Toll-like*-Rezeptoren induziert. Es wirkt überwiegend proinflammatorisch und stimuliert neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten, sowie

Akut-Phase-Proteine, Prostaglandin E₂ und IL-6 (Dinarello 2005). Zusätzlich induziert es die Cyclooxygenase 2 (COX2) und führt somit zur Hypersensitivität im Rahmen von Entzündungsreaktionen. Zudem konnten in der bronchoalveolären Lavage von Patient*innen mit schwerwiegender COVID-19-Erkrankung erhöhte IL-1 β -Spiegel festgestellt werden (National Center for Biotechnology Information 2020a). Als proinflammatorisches Zytokin spielt es eine Rolle bei der Aufrechterhaltung von Immunreaktionen und trägt zur Krankheitsschwere bei Multipler Sklerose und weiteren neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Amyotropher Lateralsklerose bei (Cunningham 2013; Mendiola und Cardona 2018). Des Weiteren könnte es eine Rolle bei der Entstehung von Morbus Alzheimer spielen, da bei vielen Alzheimerpatient*innen eine IL-1 β -Überexpression nachgewiesen werden konnte (Griffin und Mrak 2002). Allerdings zeigte eine neuere Studie, dass IL-1 β über die Aktivierung von Mikrogliazellen den Abbau von Amyloidplaques unterstützt (Mendiola und Cardona 2018). Demzufolge könnte dem IL-1 β auch ein protektiver Effekt gegenüber Morbus Alzheimer zugeschrieben werden.

1.3.6 IL-6

IL-6 ist auf Chromosom 7 codiert. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen und dient im klinischen Alltag als Entzündungsmarker. Außerdem ist es wichtig für den Übergang der angeborenen zur erworbenen Immunabwehr, indem es die Reifung der B-Lymphozyten induziert (Jones 2005). Es bindet an 2 Rezeptoren: Den membrangebundenen IL-6R auf Hepatozyten und Leukozyten und den löslichen sIL-6R. Der IL-6/sIL-6R-Komplex bindet an membrangebundenes gp130 und aktiviert es, wodurch entweder der JAK-STAT-Signalweg oder der MAP-Kinase-Signalweg eingeleitet wird. Lösliches sgp130 inaktiviert den IL-6/sIL-6R-Komplex und wirkt somit einer übermäßigen Reaktion entgegen (Heinrich et al. 2003).

Die Funktionen von IL-6 sind vielfältig. Bei einer akuten Entzündung wird mit der Zunahme der eingewanderten neutrophilen Granulozyten die lokale Biosynthese von sIL-6R induziert. Somit entstehen vermehrt IL-6/sIL-6R-Komplexe, die membrangebundenes gp130 auf Zellen in der Umgebung aktivieren und eine Signalkaskade einleiten. Dies führt zu einer Begrenzung der Akkumulation neutrophiler Granulozyten und gleichzeitig zur Chemotaxis CD3⁺ T-Lymphozyten. Somit induziert IL-6 die erworbene Immunantwort und hemmt gleichzeitig die angeborene Immunantwort (Jones 2005). Auch im ZNS ist IL-6 ein zentraler Bestandteil vieler Signalkaskaden. Bei neurodegenerativen und psychiatrischen Erkrankungen sowie bei zerebralen Verletzungen und Infektionen ließen sich häufig erhöhte IL-6-Spiegel nachweisen (Gruol 2015). Zudem wird ein Zusammenhang mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Mellitus und juveniler Arthritis vermutet. Auch bei COVID-19-Patienten wurden – wie bei vielen anderen viralen Erkrankungen – erhöhte IL-6-Spiegel festgestellt (National Center for Biotechnology Information 2020).

1.4 Aktueller Forschungsstand

Der Einfluss der THS auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen in Zellen des ZNS wurde vorwiegend in Tierversuchen untersucht. Einige Studien zeigten hierbei einen proinflammatorischen Effekt. So konnte bei Ratten nach 21 Tagen elektrischer Stimulation des *Nucleus ventromedialis hypothalami* (VMH) eine erhöhte systemische Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α und Interferon- γ nachgewiesen werden. Das antiinflammatorische Steroidhormon Kortikosteron hingegen war in verringerter Konzentration nachweisbar als in der Kontrollgruppe (Calleja-Castillo et al. 2013). In einer weiteren Studie konnten nach Stimulation des medianen Vorderhirnbündels von Ratten erhöhte Konzentrationen von IL-1 β , IL-2, -5, -6, -7, -18, TNF- α und Interferon- γ festgestellt werden. Viele andere Zytokine wie IL-1 α , IL-4, -10, -12, -13 und -17 zeigten hierbei keine signifikanten Veränderungen (Dandekar et al. 2019).

Im Gegensatz dazu konnte in einigen Studien eine Suppression der Neuroinflammation durch die THS nachgewiesen werden. So führte die elektrische Stimulation des *Nucleus subthalamicus* in einem Parkinson-Modell bei Ratten zu einer Abnahme der Neuroinflammation. Gemessen wurde dies an einer verminderten Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 β sowie einer erhöhten Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-4 (Chen et al. 2020). In einem weiteren Tiermodell wurden die Zytokinspiegel epileptischer Ratten unter ANT-THS (Stimulation der *nuclei anteriores thalami*) untersucht. Hierbei wurden die Versuchstiere in 4 Gruppen eingeteilt. Eine ANT-THS-Gruppe (Versuchstiere mit implantierten Elektroden und elektrischer Stimulation), eine Schein-THS-Gruppe (Versuchstiere mit implantierten Elektroden, aber ohne elektrische Stimulation), eine Kainsäure-Gruppe und eine Kontrollgruppe (ohne Elektroden und ohne Kainsäure). Die ANT-THS-Gruppe, die Schein-THS-Gruppe und die Kainsäure-Gruppe erhielten eine Kainsäureinjektion, um eine Epilepsie in den Versuchstieren auszulösen. Sowohl in der Schein-THS-Gruppe als auch in der Kainsäure-Gruppe konnte nach dem Auslösen einer Epilepsie eine erhöhte Konzentration von IL-1 β , IL-6 und IL-6R, TNF- α und gp130 im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In der ANT-THS-Gruppe konnte dieser Effekt durch die elektrische Stimulation verhindert werden. Demnach scheint die ANT-THS die proinflammatorischen Prozesse in der Epileptogenese erfolgreich zu lindern (Chen et al. 2017).

In vitro Studien zur elektrischen Stimulation neuronaler Zellen liegen hingegen kaum vor. In einer Studie von 2014 wurde gezeigt, dass sich die Somata der Neurone und Astrozyten durch Gleichstrom-Stimulation verlängerten (Pelletier et al. 2014). Desweiteren führte eine elektrische Stimulation zu einer Induktion des MAP-Kinase-Signalwegs in Oligodendroglia-Progenitorzellen und zur Migration dieser Zellen in Richtung Anode (Li et al. 2015). In einer Studie von 2007 wurde das *electrotactic chamber design* etabliert – ein Modell, mit dem Zellen *in vitro* über Agarosebrücken stimuliert werden können (Song et al. 2007). In Anlehnung daran soll in dieser Studie ein angepasstes *in vitro* Modell zur THS etabliert werden (Abbildung 2). Allerdings werden im Gegensatz zu vorherigen Studien adhärente

Zellen stimuliert, die eine stärkere Vernetzung aufweisen können als Suspensionszellen. Des Weiteren wird analog zur klinischen THS hochfrequenter Wechselstrom mit einer Impulsweite von 60 μ s appliziert. In vorherigen Studien wurde häufig Gleichstrom appliziert oder eine längere Impulsweite verwendet (Holtzheimer et al. 2012; Jennings et al. 2008; Ramasubbu et al. 2018). Somit werden in dieser Studie Versuchsbedingungen geschaffen, die mit den klinischen Bedingungen der THS weitestgehend übereinstimmen, um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

2 Materialien

2.1 Zelllinien

Tabelle 2: Für die Versuche verwendete Zelllinien

| Name | Produktbezeichnung und Hersteller | Herkunft |
|---------|---|---|
| HMC3 | HMC3 (ATCC® CRL-3304™, ATCC® Manassas, Virginia, USA | Humane, embryonale Mikroglia-Zelllinie |
| SH-SY5Y | SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™), ATCC® Manassas, Virginia, USA | Sublinie der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH aus einem Knochenmarkstumor |
| SVGA | SVG p12 (ATCC® CRL-8621™), ATCC®, Manassas, Virginia, USA | Humane, fetale Astrozyten-Zelllinie; immortalisiert |

2.2 Medien und Puffer

Tabelle 3: Kulturmedien und Puffersysteme

| Name | Zusammensetzung | Hersteller |
|--------------------------------|--|---|
| Kulturmedium für HMC3 und SVGA | DMEM (<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>) | Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) |
| | 10 % FKS (Fetales Kälberserum) | Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, California, USA |
| | 1 % L-Glutamin (2 mM) | Biochrom AG, Berlin |
| | 1 % Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/ml | Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, California, USA |
| Kulturmedium für SH-SY5Y | EMEM (<i>Eagle`s Minimum Essential Medium</i>) | ATCC®, Manassas, Virginia, USA |
| | F12 | 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco®) |
| | 10 % FKS | Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, California, USA |
| | 1 % Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/ml | Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, California, USA |

| Name | Zusammensetzung | Hersteller |
|--|---|------------------|
| PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) | 136,89 mmol/l NaCl in H ₂ O pH = 7,2 | Roth, Karlsruhe |
| | 2,68 mmol/l KCl in H ₂ O pH = 7,2 | MERCK, Darmstadt |
| | 24,27 mmol/l Na ₂ HPO ₄ in H ₂ O pH = 7,2 | MERCK, Darmstadt |
| | 5,29 mmol/l KH ₂ PO ₄ in H ₂ O pH = 7,2 | MERCK, Darmstadt |

2.3 Gebrauchsfertige Reagenziensysteme

Tabelle 4: Reagenziensysteme

| Reagenziensystem | Hersteller |
|--|---|
| dNTP-Mix 10 mM (Desoxy-Nukleosidtriphosphate) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| <i>PicoPure™ RNA Isolation Kit</i> <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Conditioning Buffer</i> ▪ <i>Extraction Buffer</i> ▪ 70 % Ethanol ▪ <i>Washing Buffer 1</i> ▪ <i>Washing Buffer 2</i> ▪ <i>Elution Buffer</i> | ARCTURUS Bioscience, Mountain View, California, USA |
| <i>RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase</i> , Reaktionspuffer (5x), Konzentration: 500 U/μl | Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| <i>RQ1 RNase-Free DNase</i> (1 U/μl) DNase-Puffer (10x) DNase Stop | Promega, Madison, Wisconsin, USA |
| <i>TaqMan®-Universal PCR Master Mix</i> | Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, California, USA |
| <i>TUNEL Assay Apoptosis Detection Kit</i> (CF488A) <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>TUNEL Equilibration Buffer</i> ▪ <i>TUNEL Reaction Buffer</i> ▪ <i>TdT-Enzyme</i> | Biotium, Hayward, California, USA |

2.4 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 5: Chemikalien und Enzyme

| Produkt | Hersteller |
|---|---|
| Aceton | Avantor (J.T. Baker), Center Valley, USA |
| Agarosepulver (Agarose NEEO Ultra-Qualität) | Roth, Karlsruhe |
| <i>All-trans</i> Retinsäure R2625 | SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, USA |
| BSA (Bovines Serum Albumin) | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) | ROTH, Karlsruhe |
| Glycin | ROTH, Karlsruhe |
| Immu-Mount Kleber | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA |
| L-Glutamin 1 % (200 mM) | BIOCHROM AG, Berlin |
| Methanol | Avantor (J.T. Baker), Center Valley, USA |
| Trypanblau | MERCK, Darmstadt |
| Trypsin/EDTA (T4174) | SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, USA |

2.5 Zytostatika

Tabelle 6: Zytostatika

| Name | Konzentration | Hersteller |
|--------------------|---------------|---|
| Camptothecin C9911 | 10 µg/ml | SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, USA |

2.6 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

| Antikörper (Verdünnung, Bezeichnung) | Hersteller |
|--------------------------------------|--|
| CXCL12-Antikörper (1:100, sc-28876) | SDF-1 <i>rabbit</i> IgG, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA |
| DAPI (1:30.000) | SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, USA |
| Dopamin-Antikörper (1:350, sc-51871) | Dopamin <i>mouse</i> IgG; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA |
| IL-1β-Antikörper (1:100, sc-7884) | IL-1β <i>rabbit</i> IgG, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA |

| Antikörper (Verdünnung, Bezeichnung) | Hersteller |
|---|---|
| Isotyp-Kontrollantikörper (Verdünnung variabel, MAB002) | <i>mouse</i> IgG, R&D Systems, Minneapolis, USA |
| NF200-Antikörper (1:1.000, MAB5266) | NF200 <i>mouse</i> IgG, Chemicon International, Temecula California, USA |
| Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 (1:1.000, A21201) | <i>Anti-rabbit</i> IgG <i>goat</i> , Invitrogen Molecular Probes, Waltham, Massachusetts, USA |

2.7 Primer

Tabelle 8: Primer

| Primer (Hs-Nummer) | Funktion | Hersteller |
|-------------------------------|---|---|
| CCL2 (Hs00234140_m1) | <i>Primer</i> für die qrtPCR | Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, California, USA |
| CCL20 (Hs00171125_m1) | <i>Primer</i> für die qrtPCR | Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, California, USA |
| CXCL12 (Hs00171022_m1) | <i>Primer</i> für die qrtPCR | Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, California, USA |
| CXCL16 (Hs00222859_m1) | <i>Primer</i> für die qrtPCR | Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, California, USA |
| GAPDH (Hs-99999905_m1) | <i>Primer</i> für die qrtPCR | Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, California, USA |
| IL1- β (Hs_01555410_m1) | <i>Primer</i> für die qrtPCR | Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, California, USA |
| IL-6 (Hs_00985639_m1) | <i>Primer</i> für die qrtPCR | Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, California, USA |
| <i>Random Hexamer Primer</i> | <i>Primer</i> für die Synthese der cDNA | Amersham Bioscience, Glattbrugg, Schweiz |

2.8 Geräte und Materialien

Tabelle 9: Geräte und Materialien

| Gerät / Material | Hersteller |
|---|---|
| 6-Well-Platten | Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark |
| Autoklav | Systec, Hamburg |
| Brutschrank <i>Heracell 240</i> | Heraeus GmbH, Langenselbold |
| Digitalkamera <i>Axiocam MRm</i> | Carl Zeiss GmbH, Jena |
| Einmalpipetten | Sarstedt AG, Nümbrecht |
| Elektroden: <i>Disposable 6 Color Subdermal Needle Electrode, 12x 0,40mm, stainless steel</i> | Natus® Neurology, Pleasanton, California, USA |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße | Eppendorf AG, Hamburg |
| Fluoreszenzmikroskop <i>Axiovert 200</i> | Carl Zeiss GmbH, Jena |
| Gefrierschrank | National Lab GmbH, Mölln |
| Gefrierschrank | Kryotec, Hamburg |
| Gefrierschrank | Sanyo, Moriguchi, Japan |
| Kühlschrank | National Lab GmbH, Mölln |
| Lichtmikroskop HBO 50 | Carl Zeiss GmbH, Jena |
| Masterzykler <i>EP gradient</i> | Eppendorf AG, Hamburg |
| Messzylinder | Duran/Schott-Glas, Mainz |
| Mikroskop <i>Axiovert 40 CFL</i> | Carl Zeiss GmbH, Jena |
| Neurostimulator ISIS | Inomed Medizintechnik GmbH, Emmendingen |
| Oszilloskop Multimeter LM2001 | LIUMY, ShenZhen, China |
| Pipetten | Eppendorf AG, Hamburg |
| Pipettenspitzen | Sarstedt AG, Nümbrecht |
| <i>Quant Studio 5 real-time PCR system</i> | Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, California, USA |
| Reaktionsgefäße | Sarstedt AG, Nümbrecht |
| Sicherheitswerkbank <i>Hera Safe</i> | Heraeus GmbH, Osterode |
| Thermomixer <i>compact</i> | Eppendorf AG, Hamburg |
| Thermozykler | Eppendorf AG, Hamburg |
| Vortexer | REAX top Heidolph, Schwachbach |
| Waage EW600-2M | KERN & Sohn GmbH, Balingen |
| Wasserbad GFL 1083 | GFL, Burgwedel |

| Gerät / Material | Hersteller |
|--------------------------------|------------------------|
| Zählkammer | Neubauer-Zählkammer |
| Zentrifuge 5417 R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifuge 5702 | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifuge <i>Biofuge pico</i> | Hereaus GmbH, Osterode |

2.9 Computersoftware

Tabelle 10: Computersoftware

| Programm | Funktion | Hersteller |
|---|---|---|
| <i>AxioVision</i> | Fotoaufnahmen des Lichtmikroskops | Carl Zeiss GmbH, Jena |
| <i>IBM SPSS Statistics 25</i> | Statistische Analyse | IBM, Armonk, New York, USA |
| ISIS Neurostimulator | Elektrische Stimulation | Inomed Medizintechnik GmbH, Emmendingen |
| <i>QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.3.1</i> | Quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) | Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, California, USA |
| ZEN | Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop | Carl Zeiss GmbH, Jena |

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Für die Experimente standen 3 Zelllinien zur Verfügung: Humane Astrozyten (SVGA), humane Mikroglia (HMC3) und Neuroblastomzellen, die zu neuron-ähnlichen Zellen ausdifferenziert wurden (SH-SY5Y). Die SVGA- und HMC3-Zellen wurden in Kulturflaschen in 5 ml DMEM mit 10 % FKS, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert und ein- bis zweimal pro Woche trypsiniert. Die SH-SY5Y-Zellen wurden in Kulturflaschen in 5 ml EMEM/F12 (1:1) mit 10 % FKS, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert und einmal pro Woche trypsiniert. Bei allen 3 Zelllinien wurde zweimal pro Woche das Medium in den Kulturflaschen gewechselt und mit PBS gespült.

3.2 Trypsinieren

Da die Zellen in Kultur ein exponentielles Wachstum aufweisen, wird schnell eine zu hohe Zelldichte erreicht. Daher müssen die adhärenenten Zellen in gewissen Zeitabständen vom Boden gelöst und verdünnt werden. Hierzu wurde alle 3 bis 7 Tage Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben. Trypsin ist eine Protease und EDTA bildet Calcium-Komplexe. Durch die Proteolyse und den Verlust freier Calcium-Ionen verlieren die Adhäsionsmoleküle der Zellen ihre Wirksamkeit und die Zellen lösen sich vom Boden der Kulturflasche (Lindl 2002). Zur Trypsinierung wurde zunächst das alte Medium aspiriert und anschließend mit 5 ml PBS gespült. 600 µl Trypsin/EDTA wurde auf die Zellen pipettiert und wieder aspiriert. Anschließend wurden die Kulturflaschen 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, die abgelösten Zellen mit 2 ml DMEM bzw. EMEM/F12 resuspendiert und je nach gewünschter Zelldichte auf neue Kulturflaschen aufgeteilt.

3.3 Aussaat

Zur Aussaat wurden die Zellen zunächst mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst, mit DMEM oder EMEM/F12 resuspendiert und anschließend 5 Minuten in der *eppendorf centrifuge 5702* zentrifugiert. Daraufhin wurde das überstehende Medium bis zum Zellpellet aspiriert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 2 ml Medium (DMEM bzw. EMEM/F12) resuspendiert. 10 µl dieses zellhaltigen Mediums wurden nun mit 10 µl Trypanblau vermischt und mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt (Vgl. 3.5.2). Zuletzt wurden pro Fach einer 6-well-Platte $2 \cdot 10^5$ Zellen in jeweils 2 ml DMEM oder EMEM/F12 auf ein Deckglas ausgesät.

3.4 Ausdifferenzierung SH-SY5Y

SH-SY5Y ist eine dreifach klonierte Sublinie der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH, die 1970 aus einem humanen Knochenmarkstumor entstand (Ross et al. 1983). Um neuronale Zelleigenschaften zu generieren, erfolgte zunächst eine Ausdifferenzierung der SH-SY5Y-Zellen mit *all-trans* Retinsäure. Diese wurde 7 Tage lang durchgeführt und dabei der Anteil an FKS mit jedem Mediumwechsel reduziert:

Tag 0: Aussaat von $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Deckglas in 2 ml EMEM/F12 mit 10 % FKS in einer 6-well-Platte

Tag 3: Aspiration des Mediums, Spülen mit PBS, Hinzugabe von Stimulationsmedium 1 (EMEM/F12 mit 10 % FKS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 μ M *all-trans* Retinsäure)

Tag 5: Aspiration des Mediums, Spülen mit PBS, Hinzugabe von Stimulationsmedium 2 (EMEM/F12 mit 5 % FKS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 μ M *all-trans* Retinsäure)

Tag 7: Aspiration des Mediums, Spülen mit PBS, Hinzugabe von Stimulationsmedium 3 (EMEM/F12 mit 1 % FKS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin mit 10 μ M *all-trans* Retinsäure)

Tag 10: Aspiration des Mediums, Spülen mit PBS, Hinzugabe von FKS-freiem EMEM/F12

Tag 10 markiert das Ende der Ausdifferenzierung. Um die erfolgreiche Ausdifferenzierung der SH-SY5Y-Zelllinie zu beweisen, wurden neuronale Marker (NF200 und Dopamin) immunzytochemisch angefärbt (Vgl. 4.1.2). Hierzu wurden die Primärantikörper anti-NF200 (1:1000, *mouse* IgG) und anti-Dopamin (1:350, *mouse* IgG) verwendet. Zusätzlich wurden Negativkontrollen mit einem Isotyp-Kontrollantikörper (IgG, 1:1000 bzw. 1:350) angefertigt, um die unspezifische Bindung der Primärantikörper an die untersuchten Zellen darzustellen. Die Färbung erfolgte über einen Zeitraum von 2 Tagen:

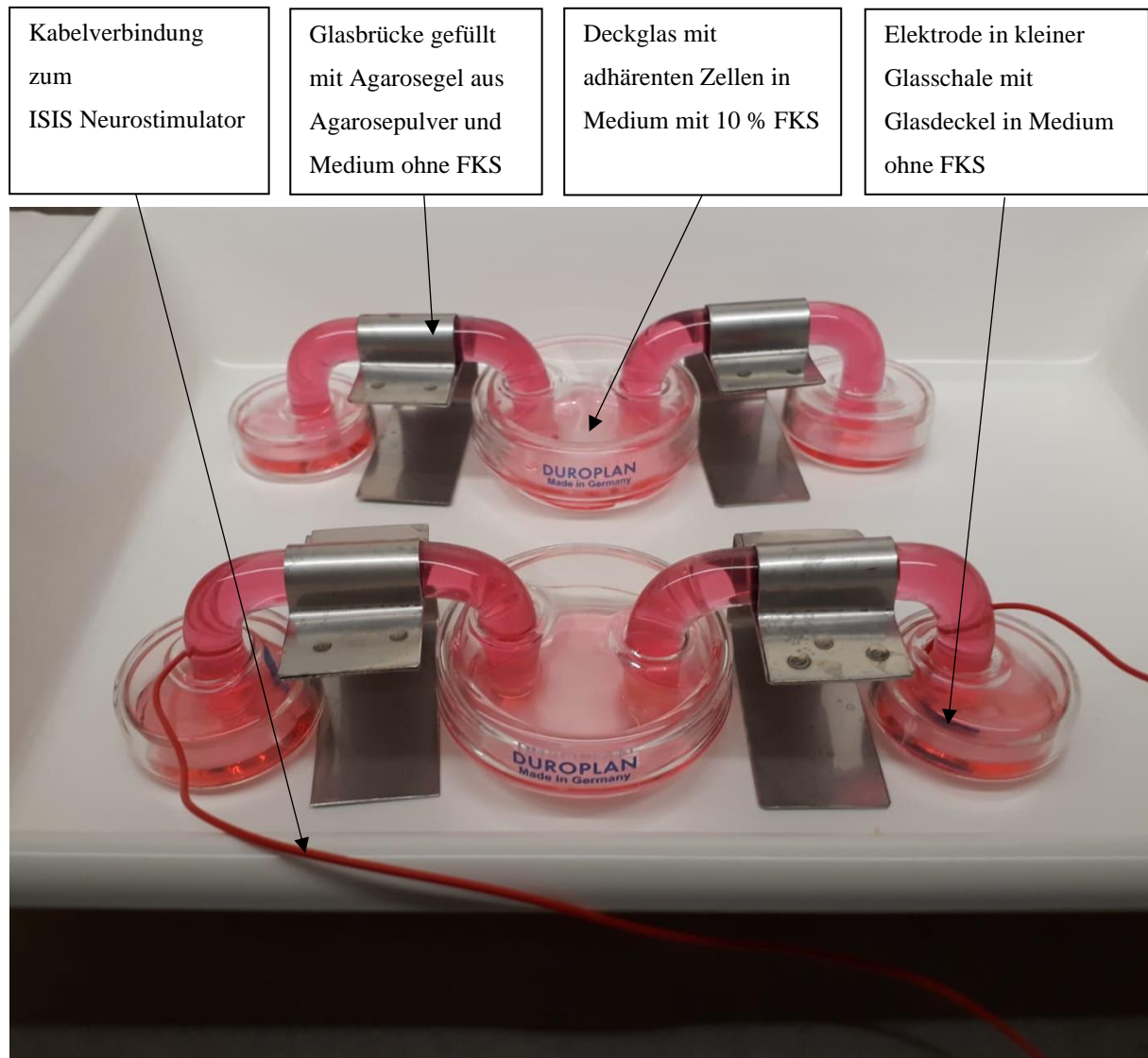
Tag 1 der Färbung: Die Deckgläser wurden dreimal mit 2 ml PBS gespült und anschließend mit 2 ml eiskaltem Aceton/Methanol-Gemisch (1:1) für 10 Minuten fixiert. Nach erneuter dreimaliger Spülung mit 2 ml PBS wurde mit 100 μ l PBS mit 0,1 % BSA und 0,2 % Glycin für 60 Minuten blockiert. Anschließend wurde der verdünnte Primärantikörper aufgetragen und über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtekammer inkubiert.

Tag 2 der Färbung: Zunächst wurden die Proben dreimal mit 2 ml PBS gespült. Anschließend wurde der Sekundärantikörper Alexa Flour 488 (1:1000, *anti-rabbit* IgG *goat*) aufgetragen. Die nun folgenden Schritte wurden alle in einer abgedunkelten Feuchtekammer durchgeführt. Zunächst wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert und mit PBS gespült. DAPI (1:30.000) wurde auf die Proben gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit 2 ml PBS und einmal mit 2 ml destilliertem H₂O gespült, um die Proben zu entsalzen. Zuletzt wurden die Deckgläser mit Immu-Mount Kleber auf Objektträgern fixiert.

3.5 Etablierung der Methode

24 Stunden nach der Aussaat (oder nach Ende der Ausdifferenzierung für die SH-SY5Y-Zellen) begann die elektrische Stimulation. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 2 abgebildet. Jeder neue Versuchsansatz wurde dabei aus biologischen Replikaten der jeweiligen Zelllinie gewonnen.

Abbildung 2: Versuchsaufbau



Der Versuchsaufbau des *in vitro* Modells zur Tiefen Hirnstimulation besteht aus zwei Glasschalen mit den darin enthaltenen Deckgläsern und den adhären Zellen in 5 ml Zellmedium mit 10 % FKS. Über Agarosegelbrücken sind diese mit zwei kleineren Glasschalen – gefüllt mit jeweils 2 ml Medium ohne FKS – verbunden. Die Endstücke der Agarosebrücken berühren dabei nicht den Boden der Glasschalen, um einen direkten Zellkontakt zu verhindern. Der vordere Versuchsaufbau ist über Elektroden mit dem Neurostimulator verbunden, der für 24 Stunden stromstärkengesteuerten Wechselstrom mit einer Pulsweite von 60 μ s und einer Frequenz von 130 Hz abgibt. Der hintere Versuchsaufbau entspricht der Kontrollprobe.

Für den Versuchsaufbau wurden zunächst Glasbrücken mit elektrisch leitfähigem Agarosegel gefüllt. Hierzu wurde DMEM (bzw. EMEM/F12) ohne FKS mit 0,5 % Agarosepulver versetzt und kurz zum Sieden gebracht. Anschließend wurden die Glasbrücken mit dem noch flüssigen Agarosegel gefüllt und auf Raumtemperatur abgekühlt, bis das Gel aushärtete. Die Deckgläser mit den adhären Zellen wurden in gläserne Probenschalen mit 5 ml DMEM 10 % FKS (bzw. EMEM/F12 10 % FKS) überführt. Diese waren über Agarosebrücken mit zwei kleinen Glasschalen – mit jeweils 2 ml DMEM (bzw. EMEM/F12) ohne FKS gefüllt – verbunden, in denen je eine Elektrode (*Disposable 6 Color Subdermal Needle Electrode, 12x 0,40mm, stainless steel*) endete. Die Elektroden wurden an den ISIS Neurostimulator angeschlossen – ein multifunktionseller Konstantstromstimulator, der speziell für die intraoperative Neurostimulation konzipiert ist und mit einer gleichnamigen Stimulationsoftware betrieben wird (Inomed Medizintechnik GmbH 2020). Als Kontrollprobe wurde der gleiche Versuchsaufbau ohne die Elektroden verwendet. Während der 24-stündigen Stimulation wurden die Proben im Brutschrank *Heracell 240* bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt gelagert.

Die Agarosebrücken und die Deckel für die Glasschalen wurden eigenständig für diesen Versuchsaufbau angefertigt. Eine indirekte Stimulation über Agarosebrücken war notwendig, da es sonst zur Ionenabspaltung direkt an den Elektroden kommen würde. Diese würden die Membranpotenziale der Zellen stören und die Ergebnisse verfälschen. Die Glasdeckel waren notwendig, um eine Verdunstung zu verhindern. Diese würde zu einer hyperosmolaren Lösung und somit zum Wasserentzug aus den Zellen führen. Um den Versuchsaufbau möglichst steril zu halten, wurden die Glasbrücken sowie die Glasschalen und deren Deckel vor jedem neuen Versuchsansatz thermisch autoklaviert.

3.5.1 Stimulationseinstellungen

Am ISIS Neurostimulator wurde eine stromstärkengesteuerte Stimulation eingestellt. Hierbei wird die eingestellte Stromstärke während der Stimulation vom Gerät auf einem konstanten Niveau gehalten. Die Stimulation erfolgte mit biphasischen Pulsen (Wechselstrom) mit einer Pulsweite von 60 µs und einer Frequenz von 130 Hz. Die eingestellte Stromstärke betrug 0,5 mA (Vgl. Abbildung 14 im Anhang). Die Gesamtimpedanz des Versuchsaufbaus lag bei 6 kΩ. Gemäß des Ohm'schen Gesetzes ergibt sich daraus eine Spannung von 3 V über dem Versuchsaufbau:

$$\text{Ohm'sches Gesetz: } U = R * I = 0,0005 \text{ A} * 6000 \Omega = 3 \text{ V}$$

U: Spannung in Volt (V)

R: Impedanz in Ohm (Ω)

I: Stromstärke in Ampere (A)

Dieser Wert liegt innerhalb des therapeutischen Bereichs der klinisch angewandten THS (Ramasubbu et al. 2018). Daher wurden diese Stimulationseinstellungen für die weiteren Versuche als Standard festgelegt.

3.5.2 Zellzählung

Um das Proliferationsverhalten der Zellen während der elektrischen Stimulation zu untersuchen, wurden Zellzählungen nach 0, nach 6, nach 12 und nach 24 Stunden Stimulation durchgeführt und mit einer Kontrollprobe verglichen (Abbildungen 3-5). Für den statistischen Vergleich der ermittelten Werte wurde der zweiseitige Zweistichproben-t-Test verwendet. Zusätzlich wurden Fotos der Zellkulturen angefertigt, um das Proliferationsverhalten zu visualisieren.

Zur Zellzählung wurden Neubauer-Zählkammern verwendet. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium der jeweiligen Proben aspiriert und mit PBS gespült. Anschließend wurde zum Ablösen der Zellen 600 µl Trypsin/EDTA hinzugegeben und bei 37 °C für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 2 ml Medium resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Diese wurden 5 Minuten bei 0,3 rcf in der *ependorf centrifuge 5702* zentrifugiert, um ein Zellpellet am Boden des Röhrchens zu erhalten. Das Zellpellet wurde anschließend mit 2 ml DMEM oder EMEM/F12 resuspendiert. 10 µl dieses zellhaltigen Mediums wurden nun mit 10 µl Trypanblau vermischt und 10 µl dieser Suspension wurden jeweils auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch defekte Zellmembranen ins Zellinnere gelangt und die Zellen blau anfärbt (Strober 2015). Auf diese Weise können tote Zellen, deren Zellmembran bereits durchlässig ist, erkannt und von der Zellzählung ausgeschlossen werden. Demnach wurden die nicht angefärbten Zellen einer Kammer mit 4 Quadranten ausgezählt und gemäß folgender Formel wurde die Zellzahl berechnet:

$$\text{Formel zur Zellzählung: } \frac{Q1+Q2+Q3+Q4}{4} * 10.000 * VF = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

Die Summe aus Q1 bis Q4 stellt die gezählten Zellen aus allen 4 Quadranten dar. Ein Quadrant der Neubauer-Kammer hat ein Volumen von 0,1 mm³. Daher muss mit dem Faktor 10.000 multipliziert werden, um die Zellzahl pro ml zu erhalten. Der Verdünnungsfaktor (VF) ergibt sich aus dem Produkt der gegebenenfalls vorgenommenen Verdünnung mit destilliertem H₂O und der 1:1 Verdünnung mit Trypanblau.

3.5.3 Fotos Mikroskop

Zur Aufnahme der Fotos der Zellkulturen wurde das Mikroskop *Axiovert 40 CFL* und die Software *AxioVision* verwendet. Hierzu wurde das 10x Objektiv und das 10x Okular am Mikroskop eingestellt. Es wurden Aufnahmen aller 3 Zelllinien nach 0, nach 12 und nach 24 Stunden elektrischer Stimulation mit der jeweiligen Kontrollprobe verglichen, um auszuschließen, dass durch die Stimulation sichtbare Veränderungen der Zellstruktur oder der Zellzahl verursacht wurden (Vgl. 4.1).

3.5.4 TUNEL-Assay

Um zu untersuchen, ob die Zellen durch die elektrische Stimulation apoptotisch werden, wurde eine Färbung mittels *TUNEL Assay Kit* durchgeführt.

Bestandteile des *TUNEL-Assay Kits*:

TdT-Enzyme: Terminal Desoxynucleotidyl Transferase Enzyme

dUTP: Desoxyuridintriphosphat, Fluoreszenz-markiert

Triton X-100: Detergens zur Permeabilisierung der Membranen lebender Zellen

Formaldehyd: Fixiert Zellen durch Quervernetzung von Aminogruppen

BSA: Rinderserumalbumin zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen

Wenn Zellen apoptotisch werden, kommt es zu Strangbrüchen der DNA durch Endonukleasen. An den Bruchenden entstehen freiliegende 3'-OH-Gruppen, an die das *TdT-Enzyme* fluoreszenz-markierte dUTPs anlagert. Somit werden fragmentierte DNA-Stränge angefärbt und können mit dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. Für eine Positivkontrolle wurden die Zellen für 24 Stunden mit 10 µg Camptothecin stimuliert. Dieses Zytostatikum hemmt das Enzym Topoisomerase 1. Dieses wirkt einer übermäßigen Verdrillung der DNA während der Replikation entgegen (Drugbank 2020). Eine Hemmung führt demnach zu einer zu starken Verdrillung der DNA und damit zu Strangbrüchen. Diese wiederum induzieren die Apoptose der Zellen.

Das *TUNEL Assay* wurde nach 24 Stunden elektrischer Stimulation durchgeführt. Als Kontrollproben dienten eine nicht stimulierte Probe sowie die Positivkontrolle mit Camptothecin. Zunächst wurden die Deckgläser zweimal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4 °C in PBS mit 4 % Formaldehyd fixiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gespült und mit PBS mit 0,2 % Triton X-100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach erneutem Spülen mit PBS wurden die Zellen mit 100 µl *TUNEL Equilibration Buffer* inkubiert. Anschließend wurde der *Equilibration Buffer* aspiriert und in einer Dunkelkammer für jede Probe 1 µl *TdT-Enzyme* zu 50 µl *TUNEL Reaction Buffer* hinzugegeben und auf die Deckgläser pipettiert. Daraufhin folgte eine lichtgeschützte Inkubation im Brutschrank bei 37 °C. Zuletzt wurden die Proben dreimal für je 5 Minuten mit PBS mit 0,1 % Triton X-100 und 5 mg/ml BSA gespült und mit Immu-Mount Kleber auf Objektträgern fixiert. Die Proben wurden dunkel im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

Die Abbildungen der Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop *Axiovert 200* bei einer Wellenlänge von 488 nm aufgenommen, da diese die optimale Wellenlänge zur Anregung des im *Kit* verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes ist (Abbildung 8).

3.6 Einfluss der Stimulation auf das Zyto-/Chemokinprofil

Im folgenden Abschnitt werden die Methoden erläutert, die nach erfolgreicher Etablierung des *in vitro* Modells zur THS durchgeführt wurden, um den Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Zyto- und Chemokinexpression zu untersuchen.

3.6.1 RNA-Extraktion

Um die RNA aus den Zellen zu lösen, wurde eine RNA-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde nach der 24-stündigen elektrischen Stimulation jeweils 100 µl *RNA-Extraction Buffer* aus dem *PicoPure™ RNA Isolation Kit* auf die beiden Deckgläser (stimulierte Probe und Kontrollprobe) gegeben. Um die RNA aus möglichst allen Zellen zu extrahieren, wurde mit der Pipette mehrfach resuspendiert. Daraufhin wurde der *RNA-Extraction Buffer* mit der darin gelösten RNA in Eppendorf Reaktionsgefäße gefüllt und für 30 Minuten bei 42 °C im Thermomixer *compact* inkubiert. Zur Aufbewahrung wurden die Proben im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert.

3.6.2 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde das *PicoPure™ RNA Isolation Kit* verwendet. Zu Beginn wurde auf jede Säule aus dem *Kit* 250 µl *Conditioning Buffer* gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zentrifuge 5417R wurde auf 20 °C Betriebstemperatur eingestellt und die Säulen wurden für 1 Minute bei 16000 g zentrifugiert. Daraufhin wurde jede RNA-Probe mit 100 µl Ethanol vermischt, auf jeweils eine Säule gegeben und für 2 Minuten bei 100 g zentrifugiert. Hierbei erfolgte die RNA-Bindung an die Filter der Säulen. Anschließend wurde für 30 Sekunden bei 16000 g zentrifugiert. Daraufhin wurden zunächst 100 µl des *Wash Buffer 1* hinzugefügt und 1 Minute bei 8000 g zentrifugiert, im Anschluss wurden 100 µl des *Wash Buffer 2* hinzugefügt und 1 Minute bei 8000 g zentrifugiert und zuletzt wurden erneut 100 µl des *Wash Buffer 2* hinzugefügt und 3 Minuten bei 16000 g zentrifugiert. Nach erfolgter RNA-Bindung wurden so die restlichen Bestandteile der Proben aus dem Filter der Säulen herausgelöst. Um nun die isolierte RNA wieder aus den Filtern herauszulösen, wurden die Filter auf neue eppendorf Reaktionsgefäße gesteckt und mit 16 µl *Elution Buffer* eluiert. Anschließend wurde für 1 Minute bei 1000 g und 2 Minuten bei 16000 g zentrifugiert. Hierbei gelangte die RNA in die Reaktionsgefäße und konnte anschließend im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert und für weitere Versuche verwendet werden.

3.6.3 cDNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA (*complementary DNA*) aus den zuvor isolierten RNA-Proben wurde der Thermozykler verwendet. Im ersten Schritt wurde die DNA in den Proben abgebaut. Hierzu wurde 1 µl RQ1 DNase 10x Reaktionspuffer und 1 µl *RQ1 RNase-free DNase* (1 u/µl) auf 7 µl des RNA-Isolates (aus 3.6.2) gegeben und anschließend ein DNA-Abbau für 15 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Zum Beenden des Abbaus wurden 2 µl EDTA zu jeder Probe hinzugegeben und für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Daraufhin wurden 2 µl *Random Hexamer Primer* zu jeder Probe hinzugefügt und es erfolgte

ein *Annealing* der *Primer* bei 70 °C für 5 Minuten. Im letzten Schritt wurden zu jeder Probe 4 µl 5x Reverse Transkriptase Reaktionspuffer, 2 µl dNTP-Mix, 1 µl ddH₂O und 1 µl *RevertAid™ H Minus Reverse Transkriptase* hinzugegeben. Dieses Enzym ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die eine umgekehrte Transkription von RNA zu cDNA katalysiert (Crick 1970). Diese lässt sich in 3 Schritte unterteilen: Das *Annealing* bei 25 °C in den ersten 10 Minuten, die *Elongation* bei 42 °C in den darauffolgenden 60 Minuten und zuletzt die Denaturierung der Reversen Transkriptase bei 70 °C in den letzten 10 Minuten. Die synthetisierten cDNAs wurden im Gefrierschrank bei -30 °C gelagert.

3.6.4 *Quantitative real time Polymerase Chain Reaction (qrtPCR)*

Ablauf: Zur Durchführung der qrtPCR wurde das *Applied Biosystems™ Quant Studio 5 real-time PCR system* verwendet. Zunächst wurden die cDNA-Proben 1:10 mit destilliertem H₂O verdünnt. Anschließend wurde ein *Mastermix* für jeden zu untersuchenden *Primer* angesetzt. Dieser enthielt jeweils 1 µl des *Primers*, 7 µl destilliertes H₂O und 10 µl *TaqMan®-Universal PCR Master Mix* pro Probe. Auf eine 96-well Platte wurden daraufhin pro well 2 µl der verdünnten cDNA-Proben pipettiert. Dabei wurde jede Probe auf zwei wells pipettiert und in der Auswertung mit den Mittelwerten der jeweiligen Proben gerechnet. Zusätzlich wurde jede Probe auf die Ausbildung von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) überprüft – ein Gen, das immer exprimiert ist und somit als Referenzwert verwendet werden kann (Panina et al. 2018). Außerdem wurde für jeden *Primer* eine Negativkontrolle ohne cDNA-Probe sowie für GAPDH zusätzlich eine Positivkontrolle angefertigt. Die PCR-Platte wurde mit einer Folie abgeklebt, für einige Sekunden zentrifugiert und anschließend im *Quant Studio 5 real-time PCR system* analysiert. Hierbei erfolgte eine Denaturierung der Proben in den ersten 10 Minuten bei 95 °C und anschließend wurden 40 Zyklen mit je 15 Sekunden bei 95 °C und je 1 Minute bei 60 °C durchlaufen (95 °C: Denaturierung, 60 °C: *Primer-Annealing* und *Elongation*).

Prinzip: Während eines Zyklus werden im Optimalfall alle enthaltenen cDNA-Fragmente durch die *taq*-Polymerase dupliziert. Somit kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der cDNA-Fragmente. Eine optimale Amplifikation findet allerdings nur etwa zwischen dem 10. und dem 35. PCR-Zyklus statt. Vor dem 10. Zyklus ist die Menge der vorhandenen cDNA-Fragmente zu gering ist und ab dem 35. bis 40. Zyklus (je nach Ausgangsmenge der cDNA-Fragmente) steigt die Substratmenge so stark an, dass es zur Hybridisierung der Fragmente kommen kann. Des Weiteren werden die Nukleotide verbraucht und zunehmend durch die Hitze zerstört (Holzapfel und Wickert 2007).

Die qrtPCR ermöglicht im Gegensatz zur herkömmlichen PCR eine Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte sowie eine Visualisierung mittels Fluoreszenzmessungen. Die Fluoreszenzintensität verhält sich hierbei proportional zur Menge der in der Probe vorhandenen PCR-Produkte. Der *Threshold*-Wert ist ein festgelegter Schwellenwert der Fluoreszenzintensität. Die Zykluszahl, bei der dieser Schwellenwert überschritten wird, entspricht dem CT-Wert (*cycle threshold*-Wert). Die CT-Werte der jeweiligen Proben werden in Form einer Excel-Tabelle dargestellt und sind für die weitere

statistische Auswertung von Bedeutung (Holzapfel und Wickert 2007). Je stärker ein Gen exprimiert wird, desto mehr Amplifikate dieses Gens befinden sich in der Probe und desto schneller wird dieser *Threshold*-Wert überschritten. Ein niedriger CT-Wert steht somit für eine hohe Ausgangssubstratmenge.

Auswertung: Zur Auswertung der qrtPCR-Ergebnisse wurde die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode verwendet. Aus den tabellarisch aufgelisteten CT-Werten, die durch das *Quant Studio 5 real-time PCR system* ermittelt wurden, wurden zunächst die ΔCT -Werte berechnet:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{Referenzgen}}$$

Anschließend wurde aus den ΔCT -Werten der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert berechnet:

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Stimulation}} - \Delta\text{CT}_{\text{Kontrolle}}$$

Da davon ausgegangen wird, dass sich die cDNA-Menge mit jedem PCR-Zyklus verdoppelt, konnte mit folgender Formel die n-fache Expression (englisch: *Ratio oder fold change*) berechnet werden:

$$\text{n-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

Die entlogarithmierten ΔCT -Werte wurden für die statistische Auswertung mittels zweiseitigem Zweistichproben-t-Test verwendet. Für die grafische Darstellung wurden die ΔCT -Werte verwendet (Abbildungen 9-11). Zusätzlich wurde eine Grafik zur n-fachen Expression erstellt (Abbildung 12).

3.7 Fluoreszenz-Immunzytochemie

Um die Einflüsse der elektrischen Stimulation zusätzlich zur qrtPCR auf Ebene der Proteinbiosynthese zu bestätigen, wurde bei signifikanten qrtPCR-Ergebnissen zusätzlich eine Fluoreszenz-Immunzytochemie durchgeführt (Abbildung 13). Die Färbung erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils einer stimulierten Probe und einer Kontrollprobe:

Tag 1: Die Deckgläser wurden dreimal mit 2 ml PBS gespült und anschließend mit 2 ml eiskaltem Aceton/Methanol-Gemisch (1:1) für 10 Minuten fixiert. Nach erneuter dreimaliger Spülung mit 2 ml PBS wurde mit 100 μl PBS mit 0,1 % BSA und 0,2 % Glycin für 60 Minuten blockiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurde der verdünnte Primärantikörper anti-CXCL12 (1:100, *rabbit IgG*) beziehungsweise anti-IL-1 β (1:100, *rabbit IgG*) aufgetragen und über Nacht bei +4 °C in einer Feuchtekammer inkubiert.

Tag 2: Zunächst wurden die Proben dreimal mit 2 ml PBS gespült. Anschließend wurde der Sekundärantikörper Alexa Flour 488 (1:1000, *anti-rabbit IgG goat*) aufgetragen. Die nun folgenden Schritte wurden alle in einer abgedunkelten Feuchtekammer durchgeführt. Zunächst wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert und mit PBS gespült. DAPI (1:30.000) wurde auf die Proben gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit 2 ml PBS und einmal mit destilliertem H₂O gespült, um die Proben zu entsalzen. Zuletzt wurden die Deckgläser mit Immu-Mount Kleber auf Objektträgern fixiert.

3.8 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurde das Fluoreszenzmikroskop *Axiovert 200* verwendet. Am Mikroskop wurde je nach Abbildung das 10x, 20x oder 40x Objektiv sowie das 10x Okular eingestellt. Die zuvor mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbten Zellstrukturen wurden bei der jeweils optimalen Wellenlänge mikroskopiert. Anschließend wurden entsprechende Aufnahmen mit der Software ZEN angefertigt und bearbeitet (Abbildungen 6, 7 und 13).

3.9 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit *IBM SPSS Statistics 25*. Zur Auswertung der Daten wurde der zweiseitige Zweistichproben-t-Test verwendet. Die Ergebnisse wurden tabellarisch aufgeführt und mithilfe von Säulen- und Liniendiagrammen grafisch dargestellt. Im Folgenden werden die statistischen Grundlagen für die Auswertung des Versuchs aufgeführt:

Nullhypothese: „es besteht kein Unterschied zwischen den elektrisch stimulierten Proben und den Kontrollproben“

Alternativhypothese: „es besteht ein Unterschied zwischen den elektrisch stimulierten Proben und den Kontrollproben“

Die Signifikanzniveaus wurden folgendermaßen festgelegt:

p-Wert < 0,05: * (Signifikanzniveau: 5 %, signifikantes Ergebnis)

p-Wert < 0,01: ** (Signifikanzniveau: 1 %, sehr signifikantes Ergebnis)

p-Wert < 0,001: *** (Signifikanzniveau: 0,1 %, hoch signifikantes Ergebnis)

Der p-Wert gibt an, wie wahrscheinlich das vorliegende Stichprobenergebnis ist, wenn die Nullhypothese wahr ist. Unterschreitet der p-Wert die festgelegten Grenzen, wird die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese wird angenommen. Das Ergebnis kann somit auf dem jeweiligen Signifikanzniveau als signifikant angenommen werden (Bortz und Döring 2015).

Standardabweichung: Die Standardabweichung (SD) wurde mittels *IBM SPSS Statistics 25* bestimmt und als Fehlerbalken in die Säulen- oder Liniendiagrammen integriert. Sie entspricht der Wurzel der korrigierten Varianz (Georgii 2009):

$$\text{Korrigierte Varianz: } s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

$$\text{Standardabweichung: } s = \sqrt{s^2}$$

s^2 : Varianz

s: Standardabweichung

x: Messwerte

\bar{x} : Mittelwert der Messwerte

n: Stichprobengröße

4 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden zunächst die Ergebnisse zur Etablierung des *in vitro* Modells zur THS vorgestellt. Anschließend wird der Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Expression ausgewählter Zyto- und Chemokine untersucht. Es wurden nur Proben für die weitere Auswertung verwendet, bei denen die elektrische Stimulation für 24 Stunden konstant gehalten wurde und keine Abweichungen im Versuchsaufbau auffielen. So wurden beispielsweise 2 Proben verworfen, bei denen es während der Stimulation zur Dislokation der Elektroden aus dem FKS-freien Medium kam.

4.1 Etablierung der Methode

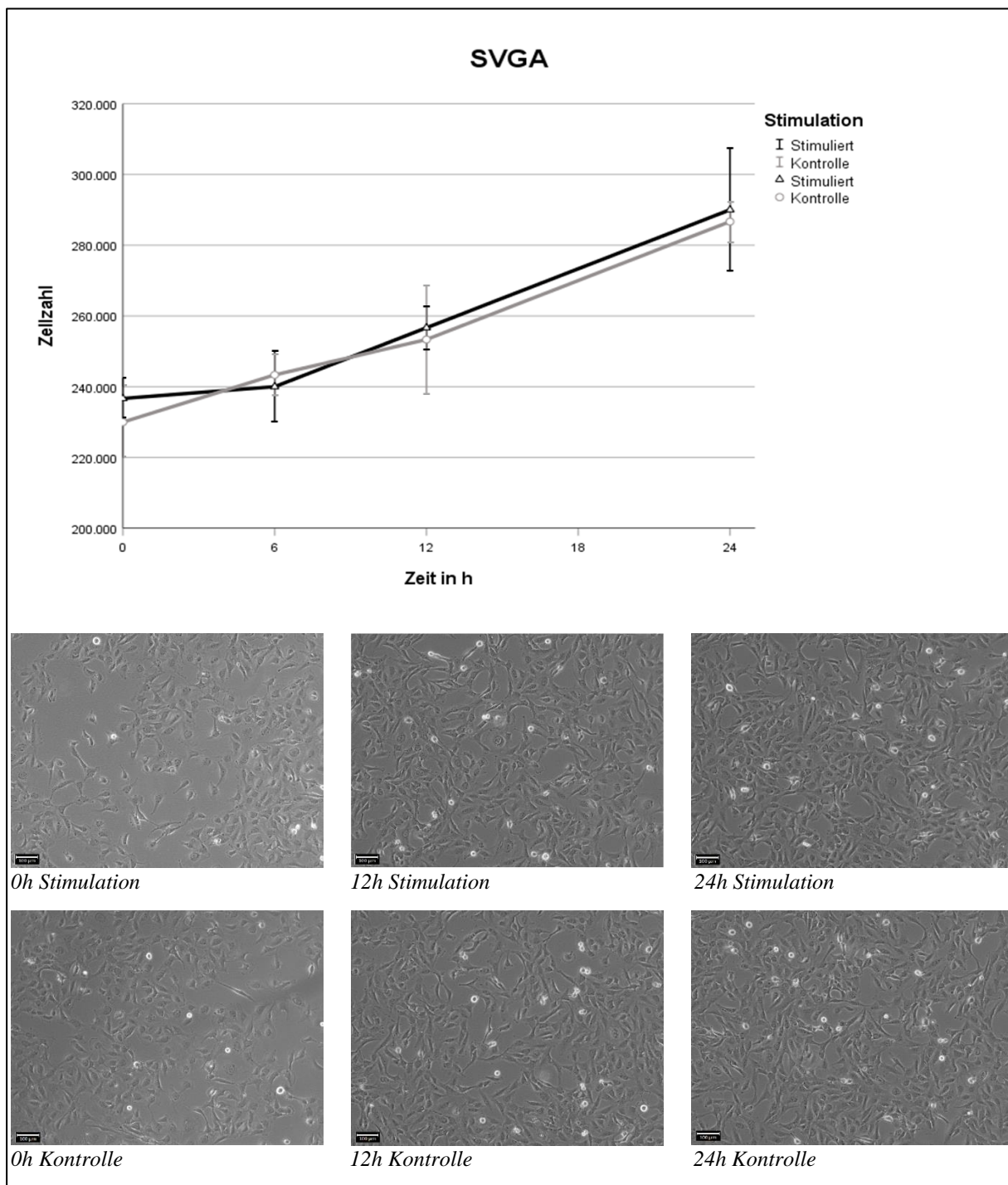
Zunächst wurde das *in vitro* Modell zur THS validiert. Der Versuchsaufbau (Abbildung 2) ermöglichte, dass die Bedingungen der Kontrollproben den Bedingungen der stimulierten Proben entsprachen und damit der Effekt von Umgebungseinflüssen möglichst gering gehalten wurde. Zudem wurde der Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Proliferations- und Apoptoseraten der Zellen mithilfe von Zellzählungen und *TUNEL-Assays* untersucht.

4.1.1 Zellzählungen

Die Zellzählungen wurden zum Stimulationsbeginn (0 Stunden), nach 6, nach 12 und nach 24 Stunden elektrischer Stimulation durchgeführt. Die Ausgangszellzahl betrug in allen Fällen 200.000 pro *well*. Zwischen Aussaat und Beginn der elektrischen Stimulation vergingen bei der SVGA- und der HMC3-Zelllinie 24 Stunden, sodass die Zellzahl zum Zeitpunkt des Stimulationsbeginns leicht variierte. Bei der SH-SY5Y-Zelllinie vergingen zwischen Aussaat und Beginn der elektrischen Stimulation 10 Tage, da zunächst die Ausdifferenzierung erfolgen musste (Vgl. 3.4).

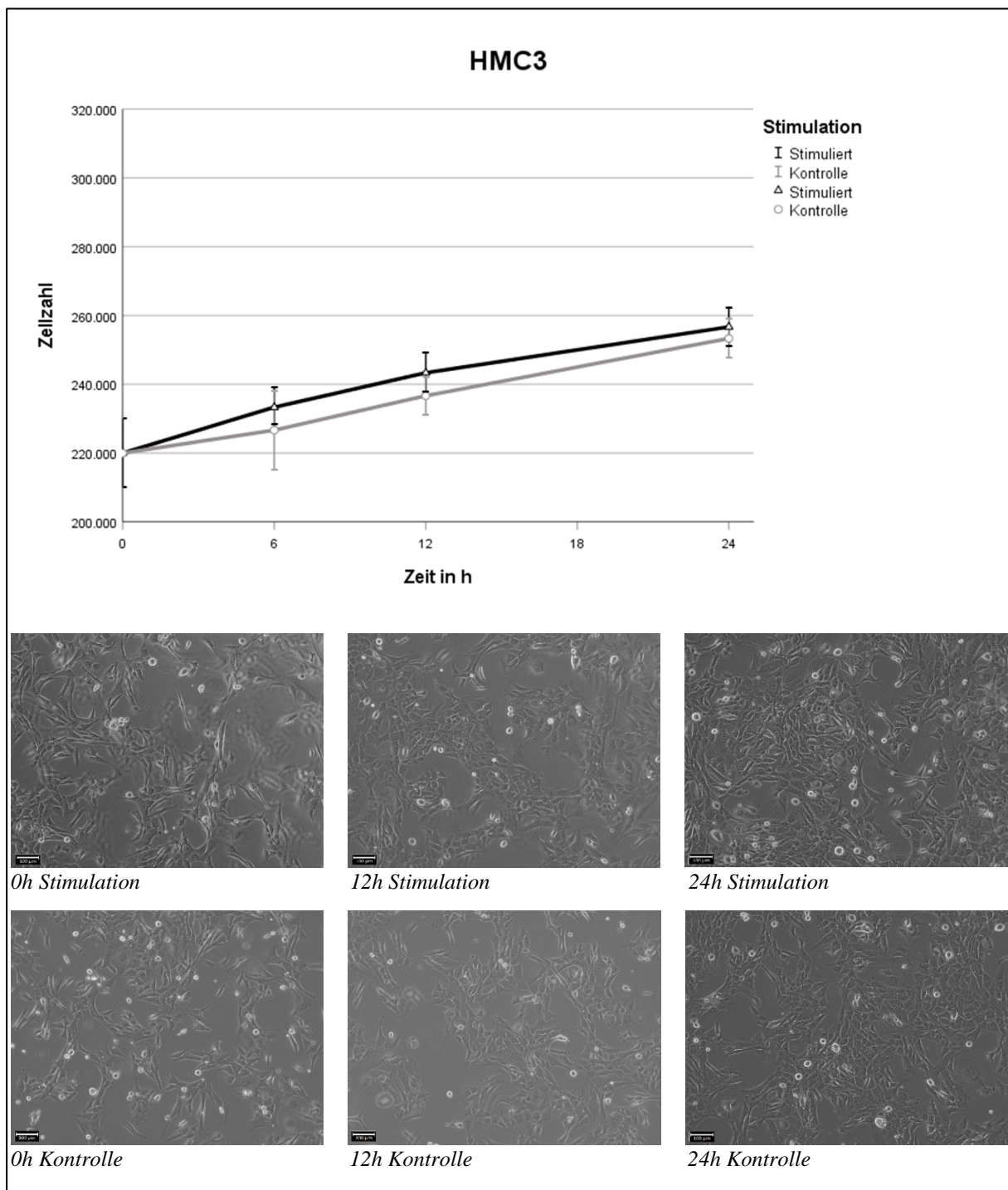
Die nachfolgenden Liniendiagramme zeigen die Mittelwerte der Zellzählungen. Die Stichprobengröße betrug $n=3$ für jeden dargestellten Mittelwert. Zur Veranschaulichung der Zellproliferation wurden bei der SVGA- und der HMC3-Zelllinie Fotos in 100-facher Vergrößerung nach 0, nach 12 und nach 24 Stunden mit dem Mikroskop *Axiovert 40 CFL* erstellt (Abbildungen 3-5).

Abbildung 3: Liniendiagramm & Fotos der SVGA-Zellzählungen



Die obere Abbildung zeigt die Mittelwerte der Zellzählungen der SVGA-Zellen nach 0, nach 6, nach 12 und nach 24 Stunden elektrischer Stimulation im Vergleich zur Kontrollprobe. Die Stichprobengröße beträgt $n=3$, die Fehlerbalken markieren ± 1 Standardabweichung. Die untere Abbildung zeigt Fotos der ausgesäten SVGA-Zellen nach 0, nach 12 und nach 24 Stunden elektrischer Stimulation im Vergleich zur Kontrollprobe (100-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken: 100 μm).

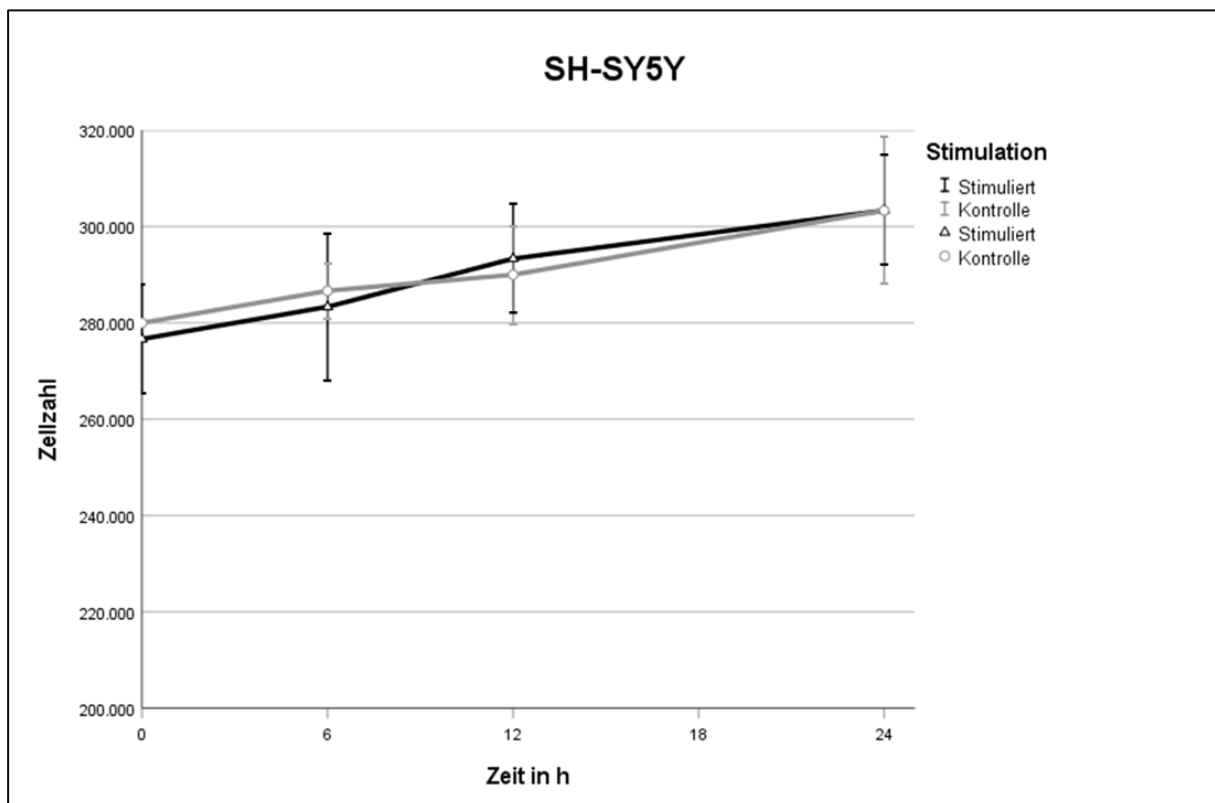
Abbildung 4: Liniendiagramm & Fotos der HMC3-Zellzählungen



Die obere Abbildung zeigt die Mittelwerte der Zellzählungen der HMC3-Zellen nach 0, nach 6, nach 12 und nach 24 Stunden elektrischer Stimulation im Vergleich zur Kontrollprobe. Die Stichprobengröße beträgt $n=3$, die Fehlerbalken markieren ± 1 Standardabweichung. Die untere Abbildung zeigt Fotos der ausgesäten HMC3-Zellen nach 0, nach 12 und nach 24 Stunden elektrischer Stimulation im Vergleich zur Kontrollprobe (100-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken: 100µm).

Sowohl bei der SVGA- als auch bei der HMC3-Zelllinie zeigte sich ein stetiges, nahezu lineares Wachstum. Innerhalb der 24 Stunden Stimulationsdauer steigerte sich die Zellzahl der stimulierten SVGA-Proben um 22,5 % zu, die der Kontrollproben um 24,6 % (Abbildung 3). Die Zahl der stimulierten HMC3-Proben steigerte sich um 16,6 %, die der Kontrollproben um 13,6 % (Abbildung 4). Für beide Zelllinien wurden die Mittelwerte der Zellzahlen mithilfe des zweiseitigen Zweistichproben-t-Tests verglichen. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Zellzahlen zwischen den stimulierten Proben und den Kontrollproben. Der p-Wert war $>0,05$ zu allen Zeitpunkten (Vgl. Tabellen 11 und 12 im Anhang). Die Fotos veranschaulichen die stetige Proliferation der Zellen. Zudem ist erkennbar, dass sowohl bei den stimulierten Proben als auch bei der Kontrollproben ein Großteil der Zellen am Deckglas adhären und über Zellkontakte miteinander vernetzt ist. Einige Zellen schwimmen hingegen im Medium und zeigen keine Adhärenz. Sie sind jedoch gleichermaßen in den stimulierten Proben und in den Kontrollproben zu finden und ihre Zahl nimmt im Verhältnis zu den adhären Zellen im Verlauf der Stimulation nicht zu. Insgesamt sind also keine mikroskopisch sichtbaren Unterschiede zwischen den stimulierten Proben und den Kontrollproben erkennbar.

Abbildung 5: Liniendiagramm der SH-SY5Y-Zellzählung

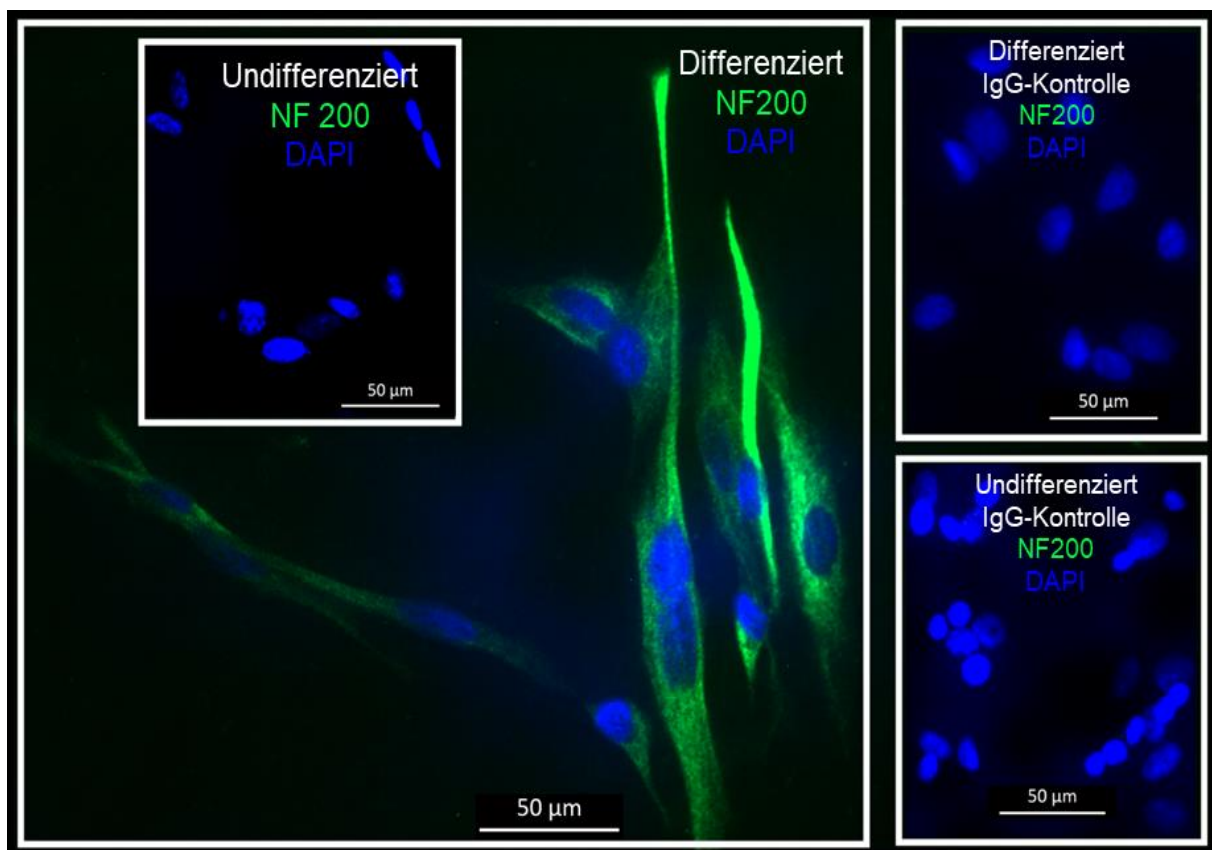


Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Zellzählungen der SH-SY5Y-Zellen nach 0, nach 6, nach 12 und nach 24 Stunden elektrischer Stimulation im Vergleich zur Kontrollprobe. Die Stichprobengröße beträgt $n=3$, die Fehlerbalken markieren ± 1 Standardabweichung.

Die stimulierten SH-SY5Y-Proben und die Kontrollproben zeigten beide ein sehr geringes, nahezu lineares Wachstum. Innerhalb der 24 Stunden Stimulationsdauer steigerte sich die Zellzahl der stimulierten Proben um 9,6 %, die der Kontrollproben um 8,3 % (Abbildung 5). Im zweiseitigen Zweistichproben-t-Test zeigte sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied der Zellzahlen. Der p-Wert war $>0,05$ zu allen Zeitpunkten (Vgl. Tabelle 13 im Anhang). Die Ausgangszellzahl war zum Stimulationsbeginn höher als bei den SVGA- und HMC3-Zellen. Diese Abweichung lässt sich durch die vorherige, zehntägige Ausdifferenzierung der SH-SY5Y-Zellen erklären, in der die Zellen insbesondere zu Beginn des Ausdifferenzierungsprozesses weiter proliferierten. Anschließend sank die Proliferationsrate, da sich die SH-SY5Y zunehmend zu postmitotischen Zellen ausdifferenzierten (Vgl. 4.1.2). Da jedoch vermutlich ein Teil der Zellen undifferenziert und proliferationsfähig blieb, zeigte sich dennoch eine geringe Zunahme der Zellzahl während der Stimulation.

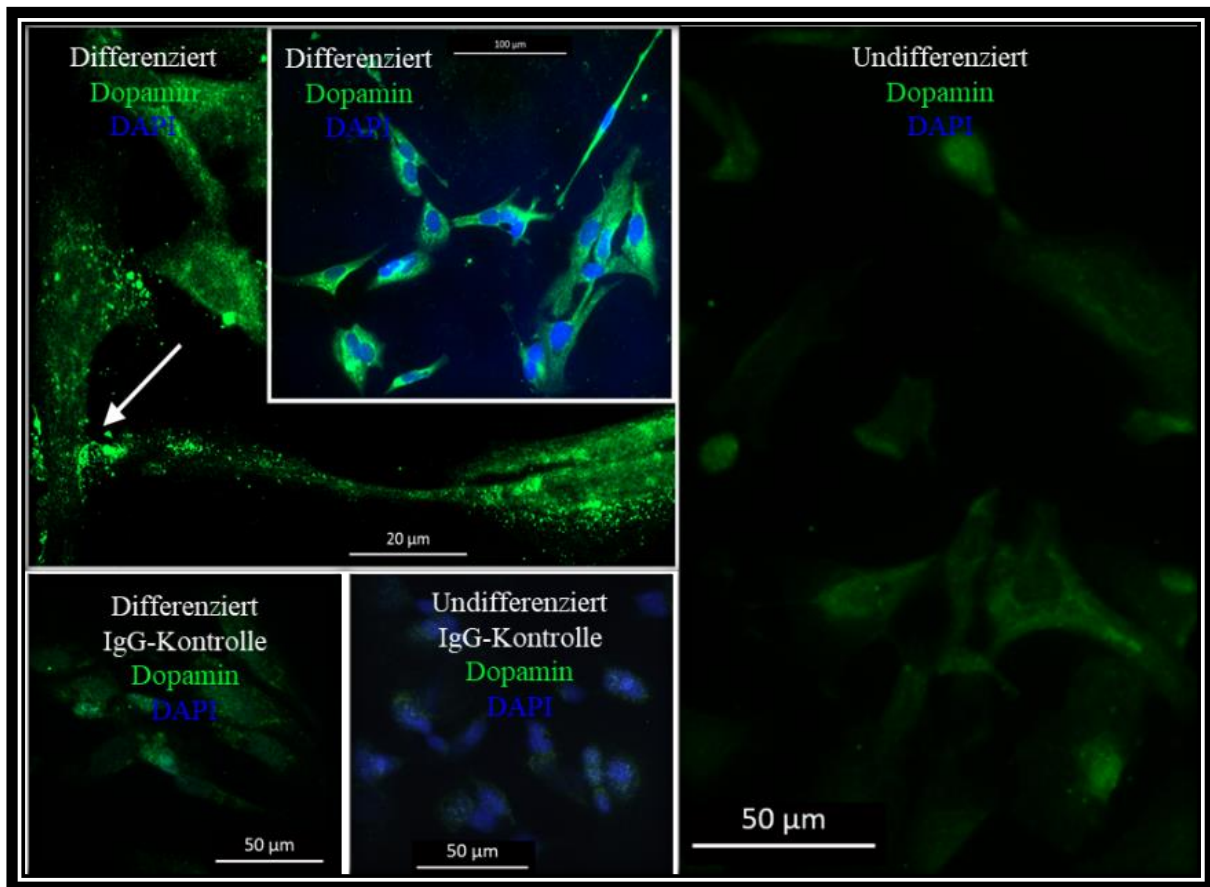
4.1.2 Ausdifferenzierung der SH-SY5Y-Zellen

Abbildung 6: Ausdifferenzierung der SH-SY5Y-Zellen (NF200)



Die Abbildung zeigt die Anfärbung des neuronalen Markers Neurofilament 200 (NF200) bei differenzierten und undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. Die Expression von NF200 dient als Hinweis auf eine erfolgreiche Ausdifferenzierung. Die IgG-Kontrolle zeigt die unspezifische Bindung des Primärantikörpers und dient somit als Negativkontrolle. Grün: NF200, Blau: DAPI. Maßstabsbalken: 50 µm.

Abbildung 7: Ausdifferenzierung der SH-SY5Y-Zellen (Dopamin)



Die Abbildung zeigt die Anfärbung des neuronalen Markers Dopamin bei differenzierten und undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. Die gesteigerte Expression von Dopamin dient hierbei als Hinweis auf eine erfolgreiche Ausdifferenzierung. Die IgG-Kontrolle zeigt die unspezifische Bindung des Primärantikörpers und dient somit als Negativkontrolle. Der Pfeil markiert einen Bereich im Zytosol, in dem besonders viel Dopamin angefärbt wurde. Grün: Dopamin, Blau: DAPI. Maßstabsbalken: 50 µm (20 µm oben links und 100 µm oben in der Mitte).

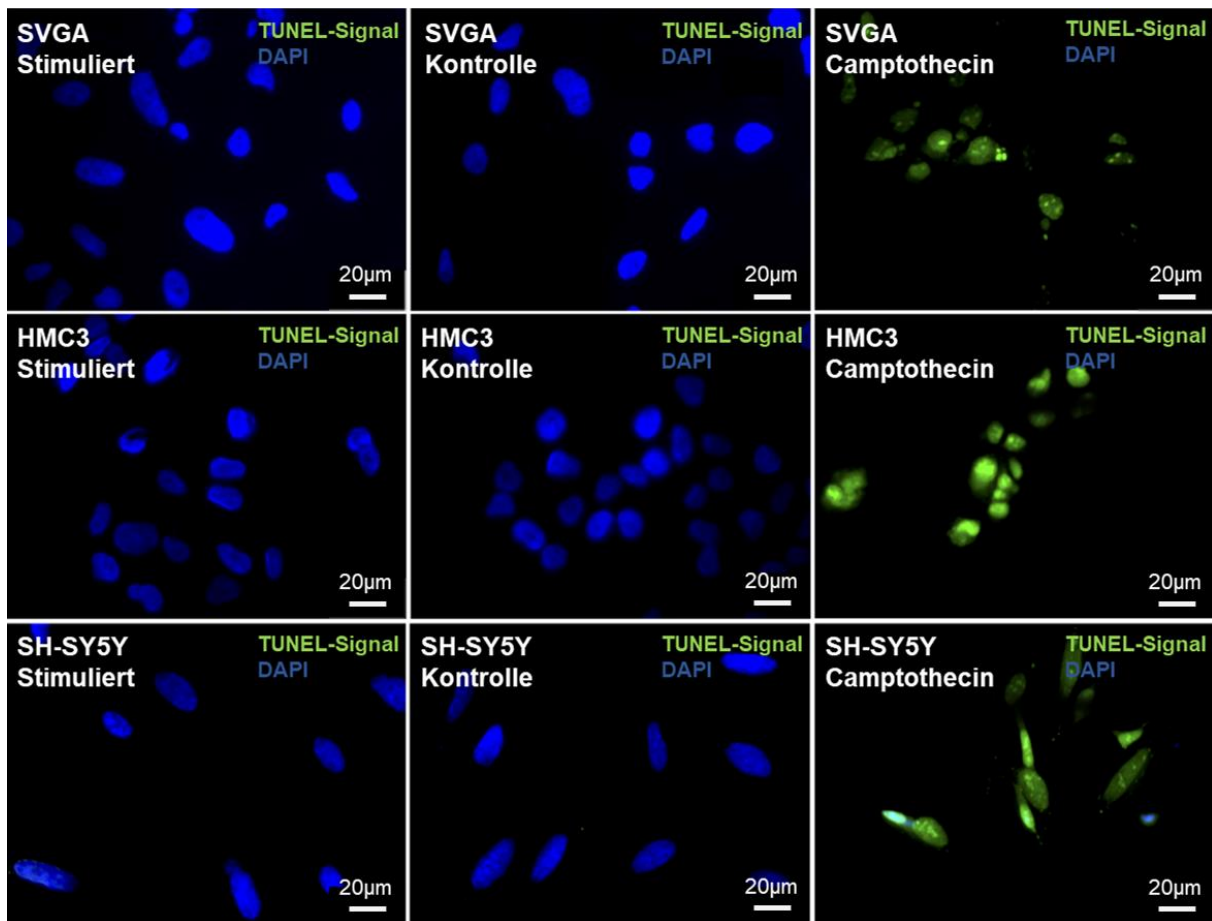
Die SH-SY5Y-Zellen wurden durch die Stimulation mit *all-trans* Retinsäure zu postmitotischen neuron-ähnlichen Zellen ausdifferenziert. Um die erfolgreiche Ausdifferenzierung zu belegen, wurde eine immunzytochemische Anfärbung der neuronalen Marker NF200 und Dopamin durchgeführt (Abbildungen 6 und 7). Eine verstärkte Expression dieser Marker deutet dabei auf eine erfolgreiche Ausdifferenzierung hin (Cho und Tiffany-Castiglioni 2004; Lopes et al. 2017). Der detaillierte Ablauf der Färbung ist in 3.4 beschrieben.

Die intensive Grünfärbung im Zytosol der differenzierten Zellen in Abbildung 6 zeigt den hohen Gehalt an NF200. In den undifferenzierten Proben hingegen ließen sich nur die Zellkerne mit DAPI anfärben. Das grüne Fluoreszenzsignal blieb aus, es konnte also kein NF200 in den undifferenzierten Kontrollproben nachgewiesen werden. Die Färbungen mit den IgG-Kontrollantikörpern zeigten, dass zudem keine unspezifische Bindung der Primärantikörper an die untersuchten Zellen erfolgte.

In Abbildung 7 ist in den ausdifferenzierten Zellen ein hoher Gehalt an Dopamin sichtbar. In den undifferenzierten Proben hingegen ist das grüne Fluoreszenzsignal deutlich schwächer ausgeprägt. Es konnte also nur eine geringe Menge Dopamin in den undifferenzierten Zellen nachgewiesen werden. Die Färbungen mit den IgG-Kontrollantikörpern zeigten ebenfalls eine leichte Grünfärbung, die auf eine gering ausgeprägte, unspezifische Bindung der Primärantikörper an die untersuchten Zellen hindeutet. Die Untersuchungen verdeutlichen, dass die Stimulation mit *all-trans* Retinsäure zu einer erhöhten Expression von NF200 und Dopamin führte. Als neuronale Marker deuten sie auf eine erfolgreiche Ausdifferenzierung der SH-SY5Y-Zellen hin. Somit konnten die ausdifferenzierten Zellen für die weiteren Untersuchungen als neuron-ähnliche Zellen betrachtet werden.

4.1.3 TUNEL-Assay

Abbildung 8: TUNEL-Assay der SVGA-, HMC3- und SH-SY5Y-Zellen



Die Abbildungen zeigen die drei Zelllinien (SVGA, HMC3 und SH-SY5Y) jeweils nach 24 Stunden elektrischer Stimulation, nach 24 Stunden ohne Stimulation (Kontrolle) und nach 24 Stunden Stimulation mit dem Zytostatikum Camptothecin. Die mit Camptothecin stimulierten Proben dienten hierbei als Positivkontrollen. Die Färbung wurde mittels TUNEL-Assay durchgeführt. Anschließend wurde mit DAPI gegengefärbt. Das blaue Fluoreszenzsignal zeigt Zellkerne, die mit DAPI angefärbt wurden. Das grüne Fluoreszenzsignal zeigt durch das TdT-Enzym markierte DNA-Fragmente als Hinweis auf einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod. Maßstabsbalken: 20 µm

Um einen Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Apoptoseraten der Zellen zu untersuchen, wurde ein *TUNEL-Assay* durchgeführt (Abbildung 8). Das blaue Fluoreszenzsignal (DAPI) markiert hierbei die Zellkerne, das grüne Fluoreszenzsignal markiert DNA-Strangbrüche und färbt somit apoptotische und nekrotische Zellen an. Die Positivkontrolle (Stimulation mit Camptothecin) wies bei allen 3 Zelllinien deutlich erkennbare grüne Fluoreszenzsignale auf. Die DNA lag hier also in fragmentierter Form vor. Zudem waren die Zellkerne nur blass angefärbt. Beide Aspekte deuten auf einen Zelltod hin. Die elektrisch stimulierten Zellen und die Kontrollen wiesen eine intensive Blaufärbung der Zellkerne auf und zeigten nur ein sehr geringes oder gar kein grünes Fluoreszenzsignal. Somit lag die DNA in diesen Proben unfragmentiert vor und die Zellkerne schienen vollständig erhalten zu sein.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse lässt sich annehmen, dass die Apoptoserate sowohl bei den elektrisch stimulierten Proben als auch bei den Kontrollproben sehr gering war und nicht erkennbar durch die elektrische Stimulation beeinflusst wurde. In der Gesamtheit konnte für alle drei Zelllinien ein relevanter Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Proliferations- und die Apoptoserate ausgeschlossen werden. Zudem wurden keine optischen Unterschiede zwischen den stimulierten Proben und den Kontrollproben beobachtet. Somit konnte das *in vitro* Modell erfolgreich etabliert und für die weiteren Versuche herangezogen werden.

4.2 Einfluss der elektrischen Stimulation auf das Zyto- und Chemokinprofil

In diesem Abschnitt geht es um den Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Expression bestimmter Zyto- und Chemokine. Nach der 24-stündigen elektrischen Stimulation wurde zunächst eine RNA-Extraktion durchgeführt. Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNAs überführt. Im letzten Schritt wurde eine *quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)* durchgeführt. Hierbei wurden die Proben aller 3 Zelllinien hinsichtlich der Expression von CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20, IL-1 β und IL-6 untersucht. Die Grundexpression dieser Zyto- und Chemokine wurde anhand der Δ CT-Werte grafisch dargestellt (Abbildungen 9-11). Als Referenzgen (entspricht Δ CT = 0) wurde GAPDH verwendet. Eine Abnahme des Δ CT-Werts um den Wert 3,33 entspricht hierbei einer Verzehnfachung der in der Probe vorhandenen Genmenge, da es in jedem PCR-Zyklus zu einer Duplikation der vorhandenen cDNA kommt (Vgl. 3.6.4). Anschließend wurden die Δ CT-Werte der stimulierten Proben mit den Δ CT-Werten der Kontrollproben in ein Verhältnis gesetzt. Gemäß den Formeln:

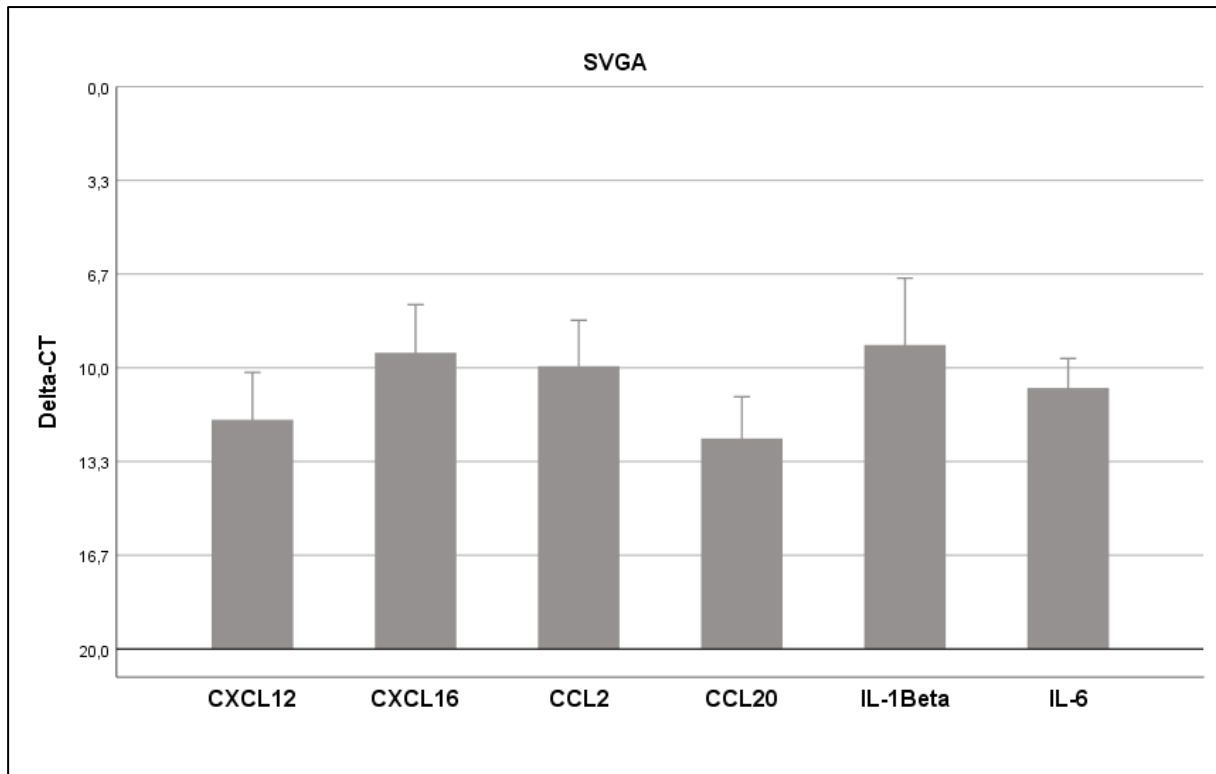
$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Stimulation}} - \Delta\text{CT}_{\text{Kontrolle}}$$

$$\text{n-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

wurde die n-fache Expression berechnet und grafisch dargestellt (Abbildung 12). Zusätzlich wurde bei signifikanten Unterschieden eine immunzytochemische Anfärbung des jeweiligen Zyto- oder Chemokins vorgenommen (Abbildung 13).

In den folgenden drei Abbildungen sind die Grundexpressionen der Zyto- und Chemokine aller drei Zelllinien dargestellt. Diese ermittelten sich aus den Δ CT-Werten der jeweiligen Kontrollproben.

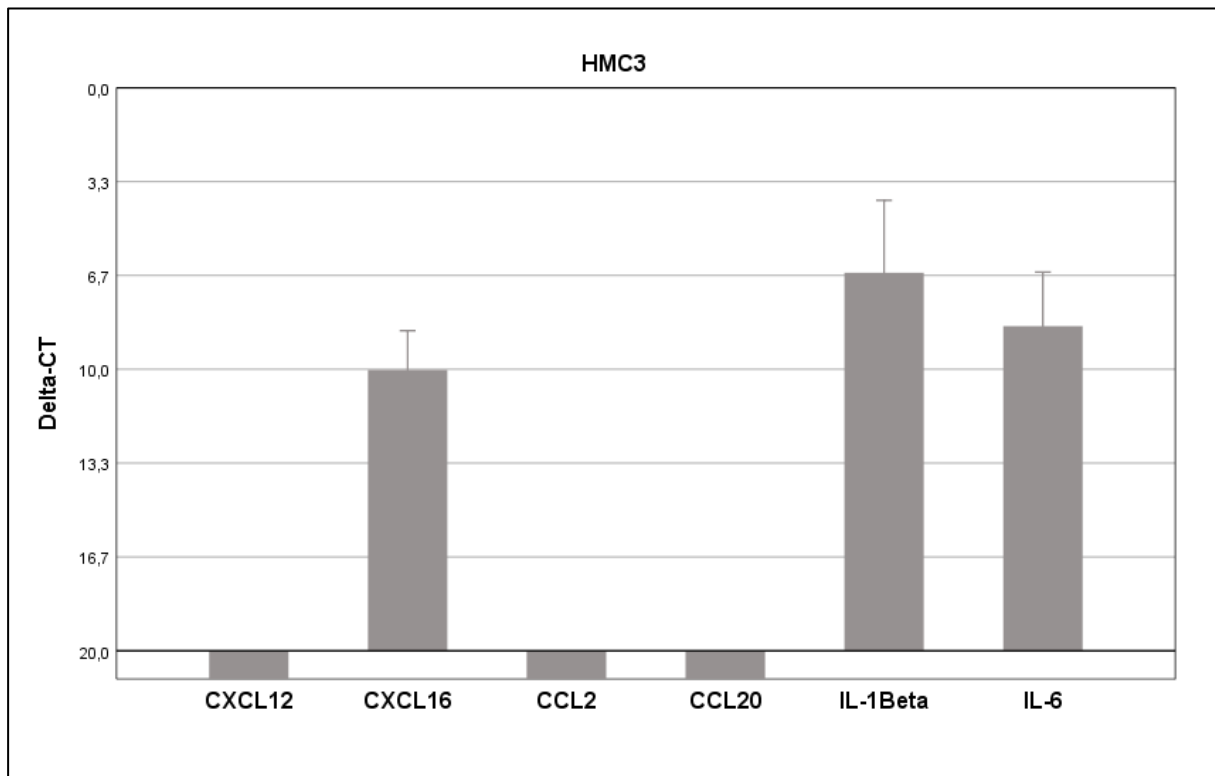
Abbildung 9: SVGA: Grundexpression von CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20, IL-1 β & IL-6



Dargestellt ist die Grundexpression von CXCL12 (n=7), CXCL16 (n=6), CCL2 (n=7), CCL20 (n=6), IL-1 β (n=7) und IL-6 (n=5) der SVGA-Zelllinie. Auf der y-Achse sind die Δ CT-Werte mit umgekehrter Skalierung aufgetragen. Ein Δ CT von 20 entspricht hierbei der minimalen Nachweisgrenze des Gens, ein Δ CT von 0 würde bedeuten, dass die Expression des untersuchten Gens der Expression des Referenzgens (GAPDH) entspräche. Die Balken stellen die Mittelwerte der aus der qrtPCR ermittelten Δ CT-Werte dar. Die Fehlerbalken markieren \pm 1 Standardabweichung.

In den SVGA-Zellen war IL-1 β von den untersuchten Zyto- und Chemokinen am stärksten exprimiert (Δ CT=9,19; SD=2,38). Gefolgt von CXCL16 (Δ CT=9,47; SD=1,71), CCL2 (Δ CT=9,94; SD=1,63), IL-6 (Δ CT=10,72; SD=1,05), CXCL12 (Δ CT=11,85; SD=1,69) und CCL20 (Δ CT=12,51; SD=1,49). Somit waren alle untersuchten Zyto- und Chemokine in den SVGA-Zellen in einer nachweisbaren Menge exprimiert und konnten für den Vergleich zwischen elektrisch stimulierten Proben und Kontrollproben herangezogen werden.

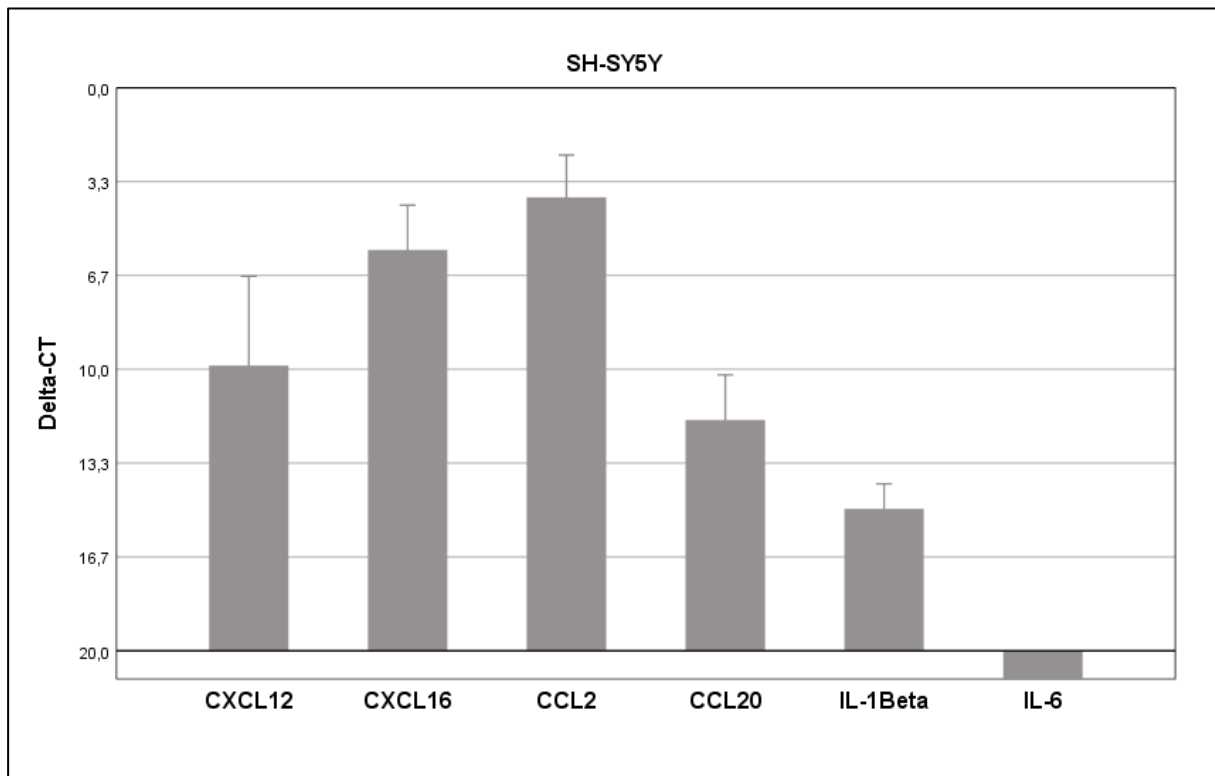
Abbildung 10: HMC3: Grundexpression von CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20, IL-1 β & IL-6



Dargestellt ist die Grundexpression von CXCL12 (n=3), CXCL16 (n=8), CCL2 (n=3), CCL20 (n=3), IL-1 β (n=5) und IL-6 (n=7) der HMC3-Zelllinie. Auf der y-Achse sind die Δ CT-Werte mit umgekehrter Skalierung aufgetragen. Ein Δ CT von 20 entspricht hierbei der minimalen Nachweisgrenze des Gens, ein Δ CT von 0 würde bedeuten, dass die Expression des untersuchten Gens der Expression des Referenzgens (GAPDH) entspräche. Die Balken stellen die Mittelwerte der aus der qrtPCR ermittelten Δ CT-Werte dar. Die Fehlerbalken markieren \pm 1 Standardabweichung.

In den HMC3-Zellen war von den untersuchten Zyto- und Chemokinen ebenfalls IL-1 β am stärksten exprimiert (Δ CT=6,57; SD=2,57). Gefolgt von IL-6 (Δ CT=8,47; SD=1,92) und CXCL16 (Δ CT=10,03; SD=1,40). CXCL12, CCL2 und CCL20 konnten bei n=3 Versuchen nicht nachgewiesen werden und wurden in den darauffolgenden Versuchsansätzen nicht mehr berücksichtigt. Es besteht dennoch die Möglichkeit, dass diese Chemokine in den HMC3-Zellen in geringem Ausmaß exprimiert sind. In diesen Untersuchungen führte die in den Proben vorhandene cDNA-Menge dieser Gene jedoch nicht zu einer Überschreitung des Schwellenwertes für die qrtPCR. Demnach wurden nur CXCL16, IL-1 β und IL-6 für den Vergleich zwischen elektrisch stimulierten Proben und Kontrollproben herangezogen.

Abbildung 11: SH-SY5Y: Grundexpression von CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20, IL-1 β & IL-6

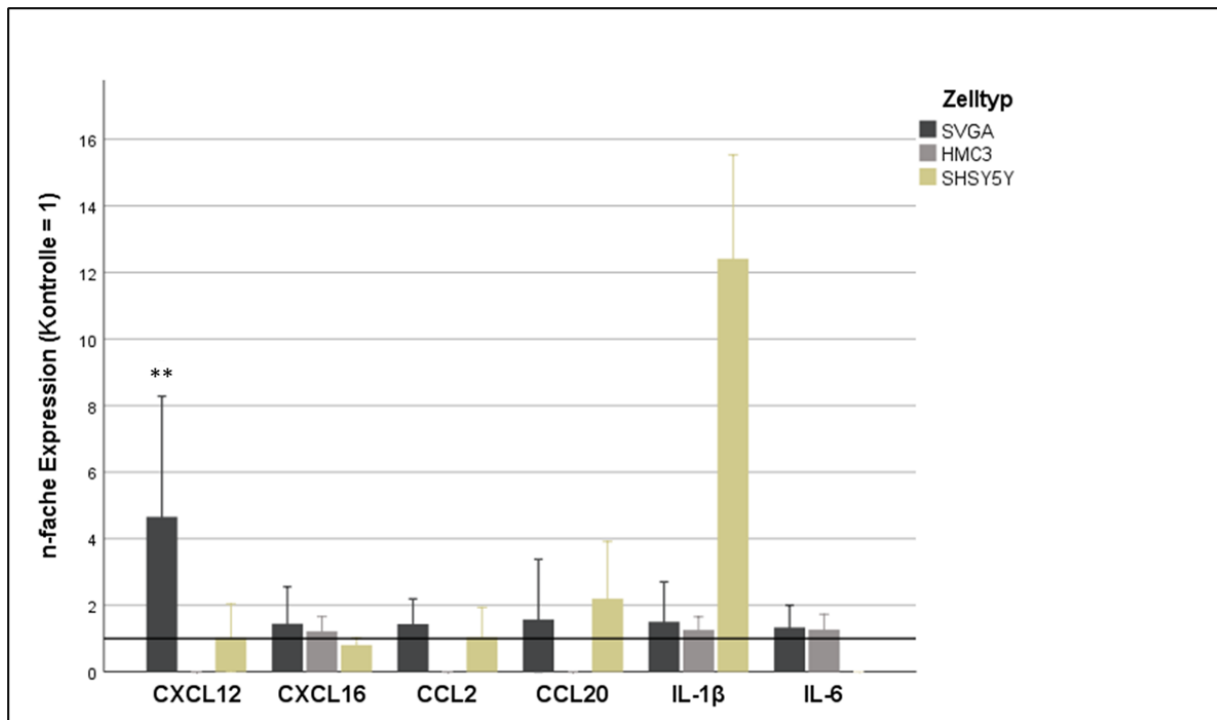


Dargestellt ist die Grundexpression von CXCL12 (n=3), CXCL16 (n=3), CCL2 (n=6), CCL20 (n=5), IL-1 β (n=3) und IL-6 (n=3) der SH-SY5Y-Zelllinie. Auf der y-Achse sind die Δ CT-Werte mit umgekehrter Skalierung aufgetragen. Ein Δ CT von 20 entspricht hierbei der minimalen Nachweisgrenze des Gens, ein Δ CT von 0 würde bedeuten, dass die Expression des untersuchten Gens der Expression des Referenzgens (GAPDH) entspräche. Die Balken stellen die Mittelwerte der aus der qrtPCR ermittelten Δ CT-Werte dar. Die Fehlerbalken markieren ± 1 Standardabweichung.

In den SH-SY5Y-Zellen war CCL2 von den untersuchten Zyto- und Chemokinen am stärksten exprimiert (Δ CT = 3,90; SD=1,50). Gefolgt von CXCL16 (Δ CT=5,76; SD=1,59), CXCL12 (9,87; SD=3,17), CCL20 (Δ CT=11,80; SD=1,60) und IL-1 β (Δ CT=14,96; SD=0,89). IL-6 konnte in n=3 Versuchen den Schwellenwert der qrtPCR nicht überschreiten und wurde daher in den darauffolgenden Versuchsansätzen nicht mehr berücksichtigt. CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20 und IL-1 β wurden somit für den Vergleich zwischen elektrisch stimulierten Proben und Kontrollproben herangezogen.

Es wird deutlich, dass die Grundexpression der untersuchten Zytokine sich in den verschiedenen Zelllinien stark unterscheidet. Eine differenzierte Betrachtung des Einflusses der elektrischen Stimulation auf jeden einzelnen Zelltyp ist daher von besonderer Bedeutung.

Abbildung 12: n-fache Expression der Zyto- und Chemokine



Dargestellt ist die n-fache Expression der Zytokine (CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20, IL-1Beta und IL-6) der elektrisch stimulierten Proben im Vergleich zu den Kontrollproben. Jede Farbe steht für eine Zelllinie. Die horizontale Linie $f(x)=1$ fungiert als Referenzachse und stellt die Mittelwerte der jeweiligen Kontrollproben dar. Somit wird das Verhältnis der Expression in den stimulierten Proben im Vergleich zur Grundexpression in den Kontrollproben dargestellt. Fehlerbalken: ± 1 Standardabweichung; Signifikanz: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

In Abbildung 12 ist die n-fache Expression der Zyto- und Chemokine der elektrisch stimulierten Proben im Vergleich zu den Kontrollproben für alle 3 Zelllinien dargestellt. Zwischen den stimulierten SVGA-Zellen und den Kontroll-SVGA-Zellen konnten in der qPCR keine signifikanten Expressionsunterschiede von CXCL16 ($n=6$), CCL2 ($n=7$), CCL20 ($n=6$), IL-1 β ($n=7$) und IL-6 ($n=5$) nachgewiesen werden. Das CXCL12-Gen wurde hingegen in den elektrisch stimulierten Proben in einer signifikant größeren Menge nachgewiesen als in den Kontrollproben ($n=7$; $p=0,006$; $\Delta CT_{\text{Stimuliert}}$: 10,09; $\Delta CT_{\text{Kontrolle}}$: 11,85, Signifikanzniveau: 1 %, Vgl. Tabelle 15 im Anhang). Die n-fache Expression für CXCL12 betrug 4,65. Somit war das CXCL12-Gen in den stimulierten Proben durchschnittlich 4,65-fach stärker exprimiert als in den Kontrollproben. Bei den HMC3-Zellen konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede von CXCL16 ($n=8$), IL-1 β ($n=5$) und IL-6 ($n=7$) nachgewiesen werden (Vgl. Tabelle 17 im Anhang). Die elektrische Stimulation führte demnach weder zu einer signifikanten Induktion noch zu einer Repression dieser Gene. Bei den SH-SY5Y-Zellen konnte ebenfalls kein signifikanter Expressionsunterschied von CXCL12 ($n=3$), CXCL16 ($n=3$), CCL2 ($n=6$), CCL20 ($n=5$) und IL-1 β ($n=3$) nachgewiesen werden (Vgl. Tabelle 19 im Anhang). Obwohl sich keine statistisch signifikante Induktion von IL-1 β in den SH-SY5Y-Zellen zeigte, ist eine klare Tendenz erkennbar ($n=3$, $p=0,12$). Die n-fache Expression für IL-1 β betrug 12,41. Somit war das IL-1 β -Gen in den stimulierten

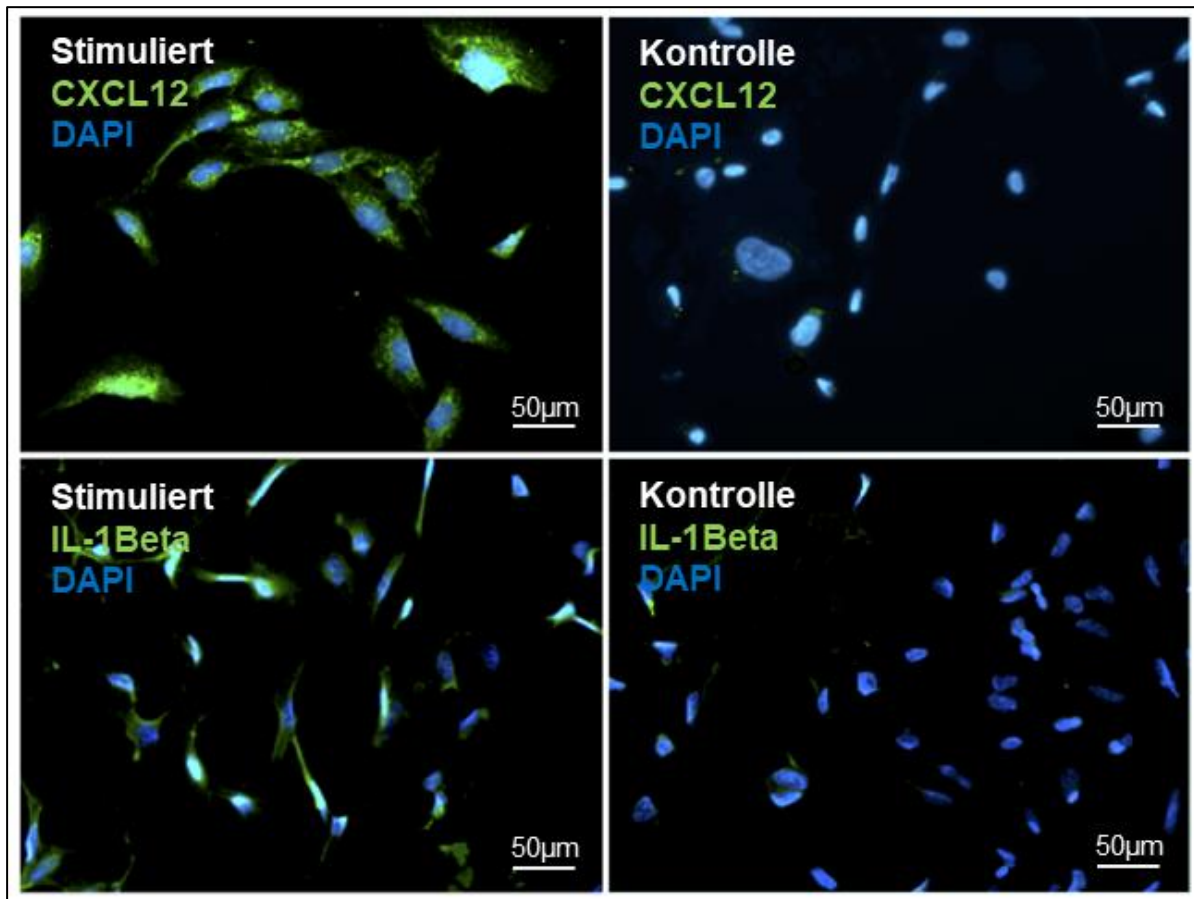
Proben 12,41-fach stärker exprimiert als in den Kontrollproben. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Grundexpression von IL-1 β in der SH-SY5Y-Zelllinie generell gering ausfiel.

Zusammenfassend konnte eine signifikante Induktion des CXCL12-Gens in den stimulierten SVGA-Zellen und eine deutliche, aber nicht signifikante Induktion des IL-1 β -Gens in den stimulierten SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die elektrische Stimulation von Zellen des ZNS – zum Beispiel im Rahmen einer Tiefen Hirnstimulation – einen direkten Einfluss auf die Expression dieses Zyto- beziehungsweise Chemokins haben kann.

4.3 Immunzytochemie

Um die qrtPCR-Ergebnisse zu visualisieren und auf der Ebene der Proteinbiosynthes zu verifizieren, wurden anschließend immunzytochemische Färbungen mit CXCL12- und IL-1 β -Antikörpern durchgeführt.

Abbildung 13: Fluoreszenzfärbung mit CXCL12- und IL-1 β -Antikörpern



Die oberen beiden Abbildungen zeigen eine elektrisch stimulierte SVGA-Probe und eine SVGA-Kontrollprobe. Sie wurden mit einem fluoreszenzmarkierten CXCL12-Antikörper (SDF-1 *rabbit* IgG, grün) angefärbt und mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die unteren beiden Abbildungen zeigen eine elektrisch stimulierte SH-SY5Y-Probe und eine SH-SY5Y-Kontrolle. Diese beiden Proben wurden mit einem fluoreszenzmarkierten IL-1 β -Antikörper (IL-1 β *rabbit* IgG, grün) angefärbt und mit DAPI (blau) gegengefärbt. Maßstabsbalken: 50 μ m.

Es ist deutlich erkennbar, dass die stimulierten Proben eine intensivere Grünfärbung aufweisen als die Kontrollproben. Der induktive Effekt der elektrischen Stimulation auf die Expression von CXCL12 in SVGA-Zellen und IL-1 β in SH-SY5Y-Zellen konnte somit durch die immunzytochemische Färbung erfolgreich veranschaulicht und auf Ebene der Proteinbiosynthese bestätigt werden. Eine genaue Quantifizierung der Induktion lässt sich aus den immunzytochemischen Färbungen jedoch nicht ableiten. Weiterhin unterscheiden sich die Zellkerne nicht in ihrer Größe, Form oder Farbtintensität. Andere Auffälligkeiten der Zellen sind ebenfalls nicht erkennbar.

In der Gesamtheit konnte das *in vitro* Modell zur THS erfolgreich etabliert und validiert werden. Zusätzlich konnte mithilfe dieses Modells eine signifikante Induktion von CXCL12 in SVGA-Zellen nachgewiesen werden. Zudem wurde eine nicht-signifikante, aber deutlich erkennbare Induktion von IL-1 β in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen. Der Wirkmechanismus, über den der elektrische Stromfluss einen Einfluss auf die Expression dieser Zyto- und Chemokine ausübte, konnte mit dieser Studie nicht ergründet werden. Dennoch zeichnet sich ab, dass die THS einen Einfluss auf die Expression von Zytokinen und Chemokinen ausübt und somit in inflammatorische Abläufe eingreift. Diese Erkenntnis ist von großer Bedeutung für das detaillierte Verständnis von Wirkung und Nebenwirkungen der THS.

5 Diskussion

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Ergebnisse der Studie zusammengefasst und mit vorherigen Studien verglichen. Zudem werden die Stärken und Schwächen der Studie herausgestellt und die Bedeutung für die zukünftige Forschung erläutert.

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Tiefe Hirnstimulation (THS) ist ein etabliertes Therapieverfahren für Patient*innen, die unter Bewegungsstörungen wie Morbus Parkinson, Essentiellem Tremor oder Dystonien leiden. Zudem findet sie Anwendung bei pharmakoresistenten Epilepsien und Zwangsstörungen und wird aktuell als mögliche Therapieoption für weitere neurologische und psychiatrische Indikationen in klinischen Studien getestet. Neben den direkten elektrischen Einflüssen der THS wird auch ein Einfluss auf die Expression inflammatorischer Zyto- und Chemokine vermutet. Um diesen Effekt weiterführend zu analysieren, wurde in dieser Studie ein *in vitro* Modell zur elektrischen Stimulation von Zellen des ZNS (SVGA, HMC3 und SH-SY5Y) entwickelt. Die Zellen wurden mit Wechselstrom einer kurzen Impulsweite (60 μ s) und hoher Frequenz (130 Hz) stimuliert und anschließend mittels qrtPCR hinsichtlich ihrer Expression bestimmter Zyto- und Chemokine (CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20, IL-1 β und IL-6) untersucht. Ein Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Proliferations- oder Apotoseraten der Zellen konnte zuvor ausgeschlossen werden.

Für CXCL16, CCL2, CCL20, und IL-6 wurde keine signifikante Induktion oder Repression in den 3 untersuchten Zelllinien nachgewiesen. Jedoch zeigten sich signifikante Induktionen der CXCL12-Expression in den SVGA-Zellen und eine deutlich erkennbare, aber nicht-signifikante Induktion der IL-1 β -Expression in den SH-SY5Y-Zellen nach 24-stündiger elektrischer Stimulation (Vgl. 4.2). Immunzytochemische Fluoreszenzfärbungen mit CXCL12- und IL-1 β -Antikörpern bestätigten diese Ergebnisse (Vgl. 4.3).

5.2 Bedeutung der Studie

Analog zu diesen Ergebnissen konnte in einer tierexperimentellen Studie nach elektrischer Stimulation des *Nucleus ventromedialis hypothalami* (VMH) bei Ratten ebenfalls eine erhöhte IL-1 β -Konzentration nachgewiesen werden. Als Ursache wurde eine kompensatorische Erhöhung proinflammatorischer Zytokine durch die Abnahme systemischer Kortikosteroide diskutiert, indem diese die Lymphozytenproliferation und die Transkription von Zytokinen beeinflussen (Calleja-Castillo et al. 2013). Ein solcher Mechanismus konnte in dieser Studie jedoch ausgeschlossen werden, da es sich um Zellen in Monokultur handelte und eine hormonelle Beeinflussung der Expression durch Kortikosteroide *de facto* nicht möglich war. Eine direkte Beeinflussung der Expression durch den elektrischen Strom war somit wahrscheinlicher.

Diese Erkenntnis zeigt die Bedeutung des Einflusses neuroinflammatorischer Prozesse als möglicher Wirkmechanismus der THS, da sowohl CXCL12 als auch IL-1 β zahlreiche physiologische und pathologische Funktionen im ZNS zugeschrieben werden (Vgl. auch 1.3). So wirkt CXCL12 in seiner physiologischen Funktion chemotaktisch auf CXCR4+ T-Zellen, um diese zu Inflammationsherden zu locken (Nanki und Lipsky 2000). Auch an differenzierten Neuronen finden sich CXCR4-Rezeptoren, mit denen CXCL12 interagiert (Ehtesham et al. 2013). Pathologische Effekte zeigt CXCL12 insbesondere bei neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen. So konnte in einer Studie bei Mäusen mit experimenteller Autoimmun-Enzephalitis (EAE, analog zu humaner Multipler Sklerose) ein Einfluss von CXCL12 auf die Aktivierung von Mikrogliazellen nachgewiesen werden (Nanki und Lipsky 2000). Darüber hinaus wurde bei Parkinsonpatient*innen *post mortem* eine Korrelation zwischen CXCL12 und α -Synuclein festgestellt. Dieses Protein spielt eine Rolle bei der vesikalen Dopaminfreisetzung und ist als Vorstufe des nicht-Amyloid- β -Proteins mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert (Li et al. 2019). Weiterhin zeigte sich in einem Schlaganfall-Modell für Ratten eine beschleunigte funktionale Regeneration der Versuchstiere durch eine Inhibition der CXCL12-Wirkung durch Gabe des CXCR4-Antagonisten AMD3100 (Ruscher et al. 2013).

Im Gegensatz zu diesen proinflammatorischen Funktionen deuten einige Studienergebnisse auf einen neuroprotektiven Effekt von CXCL12 hin. So lockt es neuronale Progenitorzellen chemotaktisch zu Inflammationsarealen und Läsionen und induziert dort die Neurogenese (Chu et al. 2017). Des Weiteren führte eine Inhibition von CXCR4 bei Mäusen mit EAE zu einer Leukozyteninfiltration in die weiße Hirnsubstanz. Daraus wurde geschlussfolgert, dass CXCL12 durch Bindung an CXCR4 eine Leukozytenmigration über die Blut-Hirn-Schranke verhindern könnte (McCandless et al. 2006). Auf der anderen Seite zeigte sich in einer neueren Kohortenstudie zur Multiplen Sklerose, dass erhöhte CXCL12-Spiegel an der Blut-Hirn-Schranke die Leukozytenmigration erleichterten und mit der Krankheitsschwere korrelierten (McCandless et al. 2008).

Insgesamt werden dem CXCL12 somit überwiegend neuroinflammatorische, aber auch einige neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben. Die Beeinflussung inflammatorischer Prozesse und der Zusammenhang mit neurodegenerativen, aber auch vaskulären und Autoimmunerkrankungen stehen hierbei im Vordergrund. Ein Anstieg der astrozytären CXCL12-Expression durch eine THS-Therapie könnte also einerseits neuroprotektive Effekte bewirken, könnte aber auch die Entstehung oder den Progress neurologischer Erkrankungen begünstigen, die im Zusammenhang mit erhöhten CXCL12-Spiegeln stehen. Falls die pathologischen Effekte einer möglichen CXCL12-Induktion Symptome hervorrufen, wäre auch eine THS-begleitende Antikörpertherapie denkbar, um assoziierte Krankheitsverläufe zu verlangsamen und deren Symptome zu lindern. Aufgrund der vielfältigen Funktionen von CXCL12, auch außerhalb des ZNS, muss man hierbei jedoch mit einem ausgeprägten Nebenwirkungsprofil rechnen.

IL-1 β besitzt proinflammatorische und pyrogene Eigenschaften und steht im Zusammenhang mit einer Reihe von ZNS-Erkrankungen. So konnte es bei Multipler Sklerose in erhöhter Konzentration im *liquor cerebrospinalis* nachgewiesen werden und korrelierte mit der Anzahl kortikaler Läsionen (Mendiola und Cardona 2018). Zudem führte eine extreme Sekretion von IL-1 β durch Mikrogliazellen zum Untergang von Neuronen in Rattenmodellen für Morbus Parkinson (Mao et al. 2017). Weiterhin konnte bei Patient*innen mit Morbus Alzheimer eine erhöhte Konzentration von IL-1 β im *liquor cerebrospinalis* und in Mikrogliazellen in der Umgebung von Amyloidplaques nachgewiesen werden (Heneka et al. 2015). Im Gegensatz dazu zeigte eine aktuellere Studie, dass IL-1 β über die Aktivierung von Mikrogliazellen den Abbau von Amyloidplaques unterstützt (Mendiola und Cardona 2018). Dem IL-1 β können somit einige neuroprotektive, insbesondere aber proinflammatorische und neurodegenerative Effekte zugeschrieben werden.

Es stellt sich heraus, dass sowohl CXCL12 als auch IL-1 β überwiegend proinflammatorische Effekte aufweisen und häufig mit ZNS-Erkrankungen assoziiert sind. Ihre genaue Funktion im Zusammenhang mit den assoziierten Erkrankungen ist zwar bislang nicht vollständig bekannt, dennoch könnte eine Induktion dieser beiden Botenstoffe durch die THS eher unerwünschte Nebenwirkungen verursachen als zur erwünschten Symptomlinderung beizutragen. Beispielsweise wäre ein Effekt auf das Auftreten sogenannter *late-onset* Ödeme denkbar. Diese Ödeme entstehen im Hirngewebe an den Implantationsregionen der Elektroden einige Tage bis Wochen nach der Operation. Es wird angenommen, dass ihre Entstehung durch die Irritation des Hirngewebes durch das implantierte Fremdmaterial verursacht wird. Doch ein Einfluss der elektrischen Stimulation auf das Inflammationsgeschehen über Zyto- und Chemokinveränderungen könnte die Entstehung von *late-onset* Ödemen zusätzlich begünstigen, da zum Zeitpunkt ihres Auftretens häufig schon elektrisch stimuliert wird und die THS das Zyto- und Chemokinprofil bereits beeinflusst haben könnte (Cuba et al. 2016). Als alleinige Ursache ist dieser Effekt jedoch unwahrscheinlich, da die *late-onset* Ödeme auch nach der Operation auftreten können, wenn noch kein Strom appliziert wurde (Schoen et al. 2017).

Der Wirkmechanismus, über den die THS die Zyto- und Chemokinexpression beeinflusst, konnte in dieser Studie nicht geklärt werden, jedoch konnte (*in vitro*) eine Veränderung der Zellzahl durch erhöhte Apoptose- oder Proliferationsraten als Ursache hierfür ausgeschlossen werden. Der Mechanismus beruht also vermutlich auf einer erhöhten Genaktivität und der damit verbundenen gesteigerten Proteinbiosynthese. Ein möglicher Mechanismus für diesen Effekt wäre die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren durch die THS. Eine weitere Möglichkeit wäre die Beeinflussung von *Enhancern* und *Silencern* an der humanen DNA. Sie dienen als Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren an der Promotor-DNA. Sowohl eine Aktivierung von *Enhancern* als auch eine Hemmung von *Silencern* würde zu einer erhöhten Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Promotorregionen des jeweiligen Gens führen. Infolgedessen würde dieses Gen vermehrt transkribiert werden und anschließend eine gesteigerte Proteinbiosynthese erfolgen (Doni Jayavelu et al. 2020; Malin et al. 2013).

Ebenso könnte das auf die Zellen einwirkende elektrische Feld eine Veränderung der Membranpotentiale hervorrufen und über diesen Mechanismus die Zyto- und Chemokinexpression beeinflussen. In einer Studie konnte an größeren Inflammationsherden wie Wunden ein geringes elektrisches Feld nachgewiesen werden (Song et al. 2007). Somit wäre eine Interaktion zwischen elektrischen Feldern und Chemotaxis sowie Zyto- und Chemokinausschüttungen denkbar. Des Weiteren könnte die elektrische Stimulation in den umliegenden Zellen Schäden verursachen und einen lokalen Inflamationsprozess induzieren, der wiederum zu einer erhöhten Zyto- und Chemokinexpression führt.

5.3 Stärken der Studie

Im Vergleich zu tierexperimentellen Studien konnte in dieser Studie durch die Verwendung humaner Zelllinien (SVGA, HMC3 und SH-SY5Y) eine bessere Vergleichbarkeit mit Patient*innen gewährleistet werden. Da die Zellen in Monokultur stimuliert wurden, konnte zudem der spezifische Einfluss auf den jeweiligen Zelltyp untersucht werden. So stellte sich heraus, dass die 3 untersuchten Zelllinien hinsichtlich ihrer Zyto- und Chemokinexpression unterschiedlich auf die elektrische Stimulation reagierten. Der Versuchsaufbau war an das *electrotactic chamber design* (Song et al. 2007) angelehnt. Da die Zellen vor Stimulationsbeginn in *6-wells* auf Deckgläsern kultiviert wurden, kam es zu einer weitgehend homogenen Ausbreitung der Zellen über die gesamte Oberfläche des Deckglases. Die anschließende elektrische Stimulation erfolgte indirekt über Agarosebrücken. Dadurch konnten Ionenverschiebungen oder mechanische Verletzungen der Zellkulturen durch die Elektroden verhindert werden. Darüber hinaus verhinderte die Adhäsionskraft zwischen den Deckgläsern und dem Boden der gläsernen Probenschalen einen direkten Kontakt zwischen den Agarosebrücken und den Zellkulturen. Dieser hätte möglicherweise zum Absterben der Zellen geführt und die Ergebnisse verfälscht. Um eine Verdunstung des Mediums und eine Kontamination der Proben zu verhindern, wurden speziell angefertigte Glasdeckel für den Versuchsaufbau verwendet (Abbildung 2).

Bei einem Großteil der *in vitro* Studien zur THS wurde für die elektrische Stimulation monophasischer Gleichstrom verwendet. (Jennings et al. 2008; Pelletier et al. 2014; Song et al. 2007). Für die klinisch angewandte THS gewinnt jedoch die Applikation von Wechselstrom zunehmend an Bedeutung. In einer randomisierten Blindstudie stellte sich heraus, dass der Einfluss biphasischer Impulse bei Patient*innen mit Morbus Parkinson oder Essentiellem Tremor einige Vorteile gegenüber der konventionellen THS-Therapie bietet (Akbar et al. 2016). Aus diesem Grund konzentrierte sich diese Studie auf die Verwendung von Wechselstrom (Vgl 3.5.1).

5.4 Schwächen der Studie

Trotz der erfolgreichen Etablierung des *in vitro* Modells und des Nachweises einer signifikanten Induktion von CXCL12 in SVGA-Zellen kann die Methode in einigen Aspekten noch optimiert werden. Schon während der Etablierung der Methode zeigte sich, dass die Ergebnisse hochsensibel auf kleinste Veränderungen der Versuchsbedingungen (Zelldichte, Vernetzung der Zellen, Einstellungen am

Neurostimulator, Stimulationsdauer) reagieren. Daher wurden stets standardisierte Versuchsbedingungen für die einzelnen Versuchsdurchläufe verwendet. Dennoch zeigten die Ergebnisse der qrtPCR teilweise recht starke Schwankungen und somit hohe Standardabweichungen, die vermutlich durch minimale, nicht erkennbare Unterschiede im Versuchsaufbau oder in der Versuchsdurchführung verursacht wurden. Durch eine größere Anzahl der Versuchsdurchläufe könnte dieser Effekt ausgeglichen werden. Zusätzlich könnten dadurch möglicherweise weitere statistisch signifikante Ergebnisse erzielt werden.

Die Einstellungen am Neurostimulator waren in dieser Studie stets konstant (Biphasische Stimulation; Zielstromstärke: 0,5 mA; Frequenz: 130 Hz; Impulsweite 60ms; Stimulationsdauer: 24 h). Durch eine Variation der Stimulationseinstellungen könnten gegebenenfalls weitere Auswirkungen auf die Expression bestimmter Botenstoffe erzielt werden. Beispielsweise kann durch eine höhere Zielstromstärke am Neurostimulator ein stärkerer Effekt angenommen werden. Auch eine längere Stimulationsdauer könnte zusätzliche Ergebnisse liefern, da die Regulation der Genexpression und die mRNA-Synthese nach 24 Stunden möglicherweise noch nicht vollständig abgeschlossen sind. Besonders unter Berücksichtigung der Latenzzeiten zwischen Stimulationsbeginn und Symptomlinderung (Vgl. 1.1.4), könnten einige Effekte der THS auf später einsetzenden Expressionsunterschieden beruhen. Aber auch strukturelle neuronale Veränderungen oder die Beeinflussung biochemischer Prozesse durch die THS wären als Ursache hierfür denkbar.

5.5 Ausblick

Das etablierte *in vitro* Modell kann zukünftig für weitere experimentelle Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses elektrischer Stimulation auf Zellpopulationen verwendet werden. Im Hinblick auf die Forschungen zur THS können weitere Zytokine und Mediatoren, die bei neuroinflammatorischen Prozessen eine Rolle spielen, mit diesem Modell untersucht werden. Auch eine Veränderung der Stimulationseinstellungen am Neurostimulator oder eine längere Stimulationsdauer könnte zu neuen Erkenntnissen führen. Als eine Erweiterung wäre ein Versuchsaufbau mit Kokulturen oder Organoiden denkbar – diese stellen ein ZNS-ähnliches zelluläres Netzwerk dar und besitzen teilweise sogar die Fähigkeit zur Vaskularisation (Cakir et al. 2019). Bislang wurden diese Modelle insbesondere in Studien zu Epilepsien und Morbus Alzheimer verwendet (Antill-O'Brien et al. 2019; Choi et al. 2014). In einer weiteren Studie konnte in Kokulturen aus Neuronen und Gliazellen, die aus embryonalen Stammzellen differenziert wurden, eine Induktion von BDNF infolge einer Gleichstromstimulation nachgewiesen werden (Latchoumane et al. 2018).

In der Klinik wird nach der Implantation der Elektroden in vielen Fällen erst mit einer Latenz von einigen Tagen bis 4 Wochen stimuliert, damit durch die Operation entstandene Mikroläsionen verheilen können (Wagle Shukla et al. 2017). Demnach könnte auch ein Versuchsansatz, bei dem die Stimulation der Zellen erst bis zu 4 Wochen nach dem Aufbau des Versuchs beginnt, durchgeführt werden. Hierbei

ist allerdings zu beachten, dass insbesondere die SVGA- und HMC3-Zellen stark proliferieren und somit in sehr geringer Dichte ausgesät werden müssen. Des Weiteren handelt es sich bei den verwendeten Zellen um humane ZNS-Zellen, die weitestgehend physiologischen Astrozyten, Mikrogliazellen und Neuronen entsprechen. Somit diene diese Studie in erster Linie der Bestimmung des grundsätzlichen Einflusses elektrischer Stimulation auf die Zyto- und Chemokinexpression dieser Zellen. Um detaillierte Aussagen über daraus resultierende Therapieeffekte der THS zu treffen, müsste zusätzlich der Einfluss der elektrischen Stimulation auf pathologisch veränderte ZNS-Zellen untersucht werden. Dennoch ist der Einfluss auf physiologische ZNS-Zellen – auch für die Klinik – von großer Bedeutung, da bei jeder THS auch gesunde ZNS-Zellen mitstimuliert werden. Zuletzt ist zu beachten, dass die *in vitro* nachgewiesenen Effekte nicht mit den Effekten *in vivo* übereinstimmen müssen, da die experimentellen Bedingungen stark von den physiologischen Bedingungen im lebenden Organismus abweichen. So könnten Differenzen der Zelldichte, der Zellkommunikation oder der elektrischen Leitfähigkeit der Umgebung (Extrazellulärer Raum *versus* Kulturmedium) bestehen. Demnach sollten in fernerer Zukunft klinische Studien erfolgen, um zu überprüfen, ob sich der *in vitro* festgestellte Effekt *in vivo* bestätigen lässt.

Diese Studie bekräftigt die Annahme, dass die Wirkmechanismen der THS sehr vielseitig und komplex sind. Ebenso komplex sind die Funktionen der Zytokine und Chemokine, von denen viele sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte herbeiführen können. Langfristig ist es von großer Bedeutung, die Beeinflussung dieser Zyto- und Chemokine durch die THS zu ergründen, um mögliche Therapieansätze durch Antagonisten oder Analoga dieser Botenstoffe etablieren zu können. Beispielsweise ist der IL-1 β -Antikörper Canakinumab als Therapie für die Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrome zugelassen – eine Gruppe genetischer Erkrankungen, die unter anderem zur Autoinflammation des ZNS führen (Toker und Hashkes 2010). Somit wäre eine die THS begleitende Therapie mit Canakinumab denkbar, falls sich der neuroinflammatorische Effekt der THS durch IL-1 β in Zukunft bestätigen sollte. Auch eine Inhibition der CXCL12/CXCR4-Achse mit AMD3000 wäre denkbar. Studien zu diesem Antikörper laufen aktuell jedoch eher in der onkologischen Forschung (Daniel et al. 2020).

Abschließend lässt sich feststellen, dass diese Studie einen Beitrag zum Verständnis des komplexen Wirkmechanismus der Tiefen Hirnstimulation geleistet hat, indem die Beeinflussung der Expression inflammatorischer Botenstoffe aufgezeigt wurde. Es sollten weitere Untersuchungen hinsichtlich dieses Effekts durchgeführt werden, um ein allumfassendes Profil des Therapiekonzepts der THS zu gewinnen und dessen vielfältigen Nebenwirkungen entgegenwirken zu können.

6 Zusammenfassung

Zielsetzung: Die Tiefe Hirnstimulation (THS) ist ein neurochirurgisches Therapieverfahren für verschiedene Bewegungsstörungen, Epilepsien und Zwangsstörungen. Obwohl die therapeutischen Ergebnisse häufig zufriedenstellend sind, ist der genaue Wirkmechanismus nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass der Effekt teilweise auf einer Beeinflussung inflammatorischer Prozesse im zentralen Nervensystem beruhen könnte. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, etablierten wir in dieser Studie ein *in vitro* Modell zur Tiefen Hirnstimulation und analysierten den Einfluss elektrischer Stimulation auf verschiedene Zelle des zentralen Nervensystems.

Methoden: In Anlehnung an die Therapiebedingungen bei THS-Patient*innen, entwickelten wir ein Modell, um SVGA- (Astrozyten), HMC3- (Mikroglia) und SH-SY5Y-Zellen (differenzierte Neurone) elektrisch zu stimulieren. Um einen Einfluss auf die Proliferationsrate auszuschließen, wurden Zellzählungen während der Stimulation durchgeführt und mit Kontrollproben verglichen. Zudem wurde eine Färbung mittels TUNEL-Assay angefertigt, um einen Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Apoptoserate auszuschließen. Weiterführend stimulierten wir die benannten Zelllinien mit dem ISIS Neurostimulator für 24 Stunden mit einer Stromstärke von 0,5 mA und analysierten den Effekt auf die Expression bestimmter Zytokine und Chemokine (CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20, IL-1 β , IL-6) mittels *quantitative real-time Polymerase Chain Reaction* (qPCR). Signifikante Expressionsunterschiede wurden anschließend durch eine immunzytochemische Färbung auf Proteinebene bestätigt.

Ergebnisse: Das *in vitro* Modell zur Tiefen Hirnstimulation konnte erfolgreich etabliert werden. Die elektrische Stimulation führte zu einer signifikanten Induktion der CXCL12-Expression in den SVGA-Zellen und zu einer deutlich erkennbaren, aber nicht-signifikanten IL-1 β -Expression in den SH-SY5Y-Zellen. Dieser Effekt konnte durch eine immunzytochemische Färbung mit CXCL12- und IL-1 β -Antikörpern verifiziert werden. Ein Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Proliferations- und Apoptoseraten der Zellen wurde dabei nicht festgestellt.

Fazit: Der Wirkmechanismus der Tiefen Hirnstimulation scheint sehr komplex und ihr Einfluss auf die Expression von Zyto- und Chemokinen sollte weiterführend untersucht werden. Das etablierte Modell und die gewonnenen Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis dieser Effekte bei und können somit dabei helfen, das Therapiekonzept der THS langfristig zu optimieren.

6.1 Abstract

Objective: Deep brain stimulation (DBS) is a neurosurgical therapy for movement disorders, epilepsy and obsessive-compulsive disorder. Even if the therapeutic results are mostly satisfactory, the mechanism of action is not completely understood. Possibly the effect of DBS is partly based on an influence of neuroinflammation in the surrounding brain cells. Thus, in this study we established an in vivo adapted in vitro model of DBS and analyzed the influence of an electric stimulation on different cells of the central nervous system.

Methods: According to conditions used in DBS patients, we established an in vitro model to electrically stimulate SVGA- (Astrocytes), HMC3- (Microglia) and SH-SY5Y-cells (differentiated Neurons). To exclude an influence on apoptosis or proliferation rates, cells were stained by TUNEL-Assay and proliferation rates were determined by cell counting compared to control samples, respectively. Additionally, we stimulated brain cells with 0,5 mA for 24 hours and measured the expression of different cytokines and chemokines (CXCL12, CXCL16, CCL2, CCL20, IL-1 β , IL-6) by quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) and verified significant expression differences by fluorescence staining.

Results: The in vivo adapted in vitro DBS-model was established successfully. An influence on cell proliferation and apoptosis rates was not observed. The expressions of CXCL12 in SVGA-cells was significantly induced. Further, the expression of IL-1 β in SH-SY5Y-cells was induced, but not significantly. Both results were successfully confirmed by fluorescence staining.

Conclusion: The mechanism of action of DBS seems to be very complex and its influence on the expression of cytokines and chemokines should be further explored. The establishment of this DBS-model could lead to a better understanding of these effects.

7 Literaturverzeichnis

- Agnesi, F.; Johnson, M. D.; Vitek, J. L. (2013): *Deep brain stimulation: How does it work?* Handb Clin Neurol, 116, 39–54
- Akbar, U.; Raike, R. S.; Hack, N.; Hess, C. W.; Skinner, J.; Martinez-Ramirez, D.; DeJesus, S.; Okun, M. S. (2016): *Randomized, blinded pilot testing of nonconventional stimulation patterns and shapes in Parkinson's disease and essential tremor: Evidence for further evaluating narrow and biphasic pulses.* Neuromodulation, 19, 343–356
- Anderson, T.; Hu, B.; Pittman, Q.; Kiss, Z. H. T. (2004): *Mechanisms of deep brain stimulation: An intracellular study in rat thalamus.* J Physiol, 559, 301–313
- Antill-O'Brien, N.; Bourke, J.; O'Connell, C. D. (2019): *Layer-by-layer: The case for 3D bioprinting neurons to create patient-specific epilepsy models.* Materials (Basel), 12
- Arima, Y.; Harada, M.; Kamimura, D.; Park, J.-H.; Kawano, F.; Yull, F. E.; Kawamoto, T.; Iwakura, Y.; Betz, U. A. K.; Márquez, G.; Blackwell, T. S.; Ohira, Y.; Hirano, T.; Murakami, M. (2012): *Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier.* Cell, 148, 447–457
- Benazzouz, A.; Gao, D. M.; Ni, Z. G.; Piallat, B.; Bouali-Benazzouz, R.; Benabid, A. L. (2000): *Effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on the neuronal activities of the substantia nigra pars reticulata and ventrolateral nucleus of the thalamus in the rat.* Neuroscience, 99, 289–295
- Bewernick, B. H.; Hurlemann, R.; Matusch, A.; Kayser, S.; Grubert, C.; Hadrysiewicz, B.; Axmacher, N.; Lemke, M.; Cooper-Mahkorn, D.; Cohen, M. X.; Brockmann, H.; Lenartz, D.; Sturm, V.; Schlaepfer, T. E. (2010): *Nucleus accumbens deep brain stimulation decreases ratings of depression and anxiety in treatment-resistant depression.* Biol Psychiatry, 67, 110–116
- Bortz, J.; Döring, N. (2015): *Forschungsmethoden und Evaluation: Für Human- und Sozialwissenschaftler.* Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin
- Burns, J. M.; Summers, B. C.; Wang, Y.; Melikian, A.; Berahovich, R.; Miao, Z.; Penfold, M. E. T.; Sunshine, M. J.; Littman, D. R.; Kuo, C. J.; Wei, K.; McMaster, B. E.; Wright, K.; Howard, M. C.; Schall, T. J. (2006): *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development.* J Exp Med, 203, 2201–2213
- Cakir, B.; Xiang, Y.; Tanaka, Y.; Kural, M. H.; Parent, M.; Kang, Y.-J.; Chapeton, K.; Patterson, B.; Yuan, Y.; He, C.-S.; Raredon, M. S. B.; Dengelegi, J.; Kim, K.-Y.; Sun, P.; Zhong, M.; Lee, S.; Patra, P.; Hyder, F.; Niklason, L. E.; Lee, S.-H.; Yoon, Y.-S.; Park, I.-H. (2019): *Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system.* Nat Methods, 16, 1169–1175
- Calleja-Castillo, J. M.; La Cruz-Aguilera, D. L. de; Manjarrez, J.; Velasco-Velázquez, M. A.; Morales-Espinoza, G.; Moreno-Aguilar, J.; Hernández, M. E.; Aguirre-Cruz, L.; Pavón, L. (2013): *Chronic deep brain stimulation of the hypothalamic nucleus in wistar rats alters*

- circulatory levels of corticosterone and proinflammatory cytokines*. Clin Dev Immunol, 2013, 698634
- Chen, Y.-C.; Zhu, G.-Y.; Wang, X.; Shi, L.; Jiang, Y.; Zhang, X.; Zhang, J.-G. (2017): *Deep brain stimulation of the anterior nucleus of the thalamus reverses the gene expression of cytokines and their receptors as well as neuronal degeneration in epileptic rats*. Brain Res, 1657, 304–311
- Chen, Y.; Zhu, G.; Liu, D.; Zhang, X.; Liu, Y.; Yuan, T.; Du, T.; Zhang, J. (2020): *Subthalamic nucleus deep brain stimulation suppresses neuroinflammation by Fractalkine pathway in Parkinson's disease rat model*. Brain Behav Immun, 90, 16–25
- Chen, C. C.; Litvak, V.; Gilbertson, T.; Kühn, A.; Lu, C. S.; Lee, S. T.; Tsai, C. H.; Tisch, S.; Limousin, P.; Hariz, M.; Brown, P. (2007): *Excessive synchronization of basal ganglia neurons at 20 Hz slows movement in Parkinson's disease*. Exp Neurol, 205, 214–221
- Cho, T.; Tiffany-Castiglioni, E. (2004): *Neurofilament 200 as an indicator of differences between mipafox and paraoxon sensitivity in Sy5Y neuroblastoma cells*. J Toxicol Environ Health A, 67, 987–1000
- Choi, S. H.; Kim, Y. H.; Hebisch, M.; Sliwinski, C.; Lee, S.; D'Avanzo, C.; Chen, H.; Hooli, B.; Asselin, C.; Muffat, J.; Klee, J. B.; Zhang, C.; Wainger, B. J.; Peitz, M.; Kovacs, D. M.; Woolf, C. J.; Wagner, S. L.; Tanzi, R. E.; Kim, D. Y. (2014): *A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease*. Nature, 515, 274–278
- Chu, T.; Shields, L. B. E.; Zhang, Y. P.; Feng, S.-Q.; Shields, C. B.; Cai, J. (2017): *CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis in the central nervous system: Therapeutic targets for remyelination in demyelinating diseases*. Neuroscientist, 23, 627–648
- Craig, M. J.; Loberg, R. D. (2006): *CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) in cancer bone metastases*. Cancer Metastasis Rev, 25, 611–619
- Crick, F. (1970): *Central dogma of molecular biology*. Nature, 227, 561–563
- Cuba, C. M. K. E. de; Albanese, A.; Antonini, A.; Cossu, G.; Deuschl, G.; Eleopra, R.; Galati, A.; Hoffmann, C. F. E.; Knudsen, K.; Landi, A.; Lanotte, M. M. R.; Marcante, A.; Mosch, A.; Pilleri, M.; Reich, M. M.; Ricchi, V.; Rinaldo, S.; Romito, L. M.; Saba, F. S.; Sacristan, H. E.; Schuurman, P. R.; Trezza, A.; van den Munckhof, P.; Volkmann, J.; Zibetti, M.; Contarino, M. F. (2016): *Idiopathic delayed-onset edema surrounding deep brain stimulation leads: Insights from a case series and systematic literature review*. Parkinsonism Relat Disord, 32, 108–115
- Cunningham, C. (2013): *Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation*. Glia, 61, 71–90
- Dandekar, M. P.; Saxena, A.; Scaini, G.; Shin, J. H.; Migut, A.; Giridharan, V. V.; Zhou, Y.; Barichello, T.; Soares, J. C.; Quevedo, J.; Fenoy, A. J. (2019): *Medial forebrain bundle deep brain stimulation reverses anhedonic-like behavior in a chronic model of depression: Importance of BDNF and inflammatory cytokines*. Mol Neurobiol, 56, 4364–4380

- Daneshzand, M.; Faezipour, M.; Barkana, B. D. (2018): *Robust desynchronization of Parkinson's disease pathological oscillations by frequency modulation of delayed feedback deep brain stimulation*. PLoS One, 13, e0207761
- Daniel, S. K.; Seo, Y. D.; Pillarisetty, V. G. (2020): *The CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis as a mechanism of immune resistance in gastrointestinal malignancies*. Semin Cancer Biol, 65, 176–188
- Davie, C. A. (2008): *A review of Parkinson's disease*. Br Med Bull, 86, 109–127
- Deuschl, G.; Schade-Brittinger, C.; Krack, P.; Volkmann, J.; Schäfer, H.; Bötzel, K.; Daniels, C.; Deutschländer, A.; Dillmann, U.; Eisner, W.; Gruber, D.; Hamel, W.; Herzog, J.; Hilker, R.; Klebe, S.; Kloss, M.; Koy, J.; Krause, M.; Kupsch, A.; Lorenz, D.; Lorenzl, S.; Mehdorn, H. M.; Moringlane, J. R.; Oertel, W.; Pinski, M. O.; Reichmann, H.; Reuss, A.; Schneider, G.-H.; Schnitzler, A.; Steude, U.; Sturm, V.; Timmermann, L.; Tronnier, V.; Trottenberg, T.; Wojtecki, L.; Wolf, E.; Poewe, W.; Voges, J. (2006): *A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease*. N Engl J Med, 355, 896–908
- Dinarello, C. A. (2005): *Blocking IL-1 in systemic inflammation*. J Exp Med, 201, 1355–1359
- Doni Jayavelu, N.; Jajodia, A.; Mishra, A.; Hawkins, R. D. (2020): *Candidate silencer elements for the human and mouse genomes*. Nat Commun, 11, 1061
- Dostrovsky, J. O.; Levy, R.; Wu, J. P.; Hutchison, W. D.; Tasker, R. R.; Lozano, A. M. (2000): *Microstimulation-induced inhibition of neuronal firing in human globus pallidus*. J Neurophysiol, 84, 570–574
- Dougherty, D. D.; Rezai, A. R.; Carpenter, L. L.; Howland, R. H.; Bhati, M. T.; O'Reardon, J. P.; Eskandar, E. N.; Baltuch, G. H.; Machado, A. D.; Kondziolka, D.; Cusin, C.; Evans, K. C.; Price, L. H.; Jacobs, K.; Pandya, M.; Denko, T.; Tyrka, A. R.; Brelje, T.; Deckersbach, T.; Kubu, C.; Malone, D. A. (2015): *A randomized sham-controlled trial of deep brain stimulation of the ventral capsule/ventral striatum for chronic treatment-resistant depression*. Biol Psychiatry, 78, 240–248
- Drugbank (2020): *Camptothecin*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB04690>
- Ehteshami, M.; Min, E.; Issar, N. M.; Kasl, R. A.; Khan, I. S.; Thompson, R. C. (2013): *The role of the CXCR4 cell surface chemokine receptor in glioma biology*. J Neurooncol, 113, 153–162
- Falcone, J. D.; Sohal, H. S.; Kyriakides, T. R.; Bellamkonda, R. V. (2019): *The impact of modulating the blood-brain barrier on the electrophysiological and histological outcomes of intracortical electrodes*. J Neural Eng, 16, 46005
- Fenoy, A. J.; Simpson, R. K. (2014): *Risks of common complications in deep brain stimulation surgery: Management and avoidance*. J Neurosurg, 120, 132–139
- Fritsch, B.; Reis, J.; Martinowich, K.; Schambra, H. M.; Ji, Y.; Cohen, L. G.; Lu, B. (2010): *Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: Potential implications for motor learning*. Neuron, 66, 198–204

- Gardner, J. (2013): *A history of deep brain stimulation: Technological innovation and the role of clinical assessment tools*. Soc Stud Sci, 43, 707–728
- Georgii, H.-O. (2009): *Stochastik*. Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Griffin, W. S. T.; Mrak, R. E. (2002): *Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease*. J Leukoc Biol, 72, 233–238
- Gruol, D. L. (2015): *IL-6 regulation of synaptic function in the CNS*. Neuropharmacology, 96, 42–54
- Guridi, J.; Lozano, A. M. (1997): *A brief history of pallidotomy*. Neurosurgery, 41, 1169-80; discussion 1180-3
- Hamani, C.; Machado, D. C.; Hipólido, D. C.; Dubiela, F. P.; Suchecki, D.; Macedo, C. E.; Tescarollo, F.; Martins, U.; Covolan, L.; Nobrega, J. N. (2012): *Deep brain stimulation reverses anhedonic-like behavior in a chronic model of depression: Role of serotonin and brain derived neurotrophic factor*. Biol Psychiatry, 71, 30–35
- Hattermann, K.; Bartsch, K.; Gebhardt, H. H.; Mehdorn, H. M.; Synowitz, M.; Schmitt, A. D.; Mentlein, R.; Held-Feindt, J. (2016): *"Inverse signaling" of the transmembrane chemokine CXCL16 contributes to proliferative and anti-apoptotic effects in cultured human meningioma cells*. Cell Commun Signal, 14, 26
- Heinrich, P. C.; Behrmann, I.; Haan, S.; Hermanns, H. M.; Müller-Newen, G.; Schaper, F. (2003): *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 374, 1–20
- Heneka, M. T.; Carson, M. J.; El Khoury, J.; Landreth, G. E.; Brosseron, F.; Feinstein, D. L.; Jacobs, A. H.; Wyss-Coray, T.; Vitorica, J.; Ransohoff, R. M.; Herrup, K.; Frautschy, S. A.; Finsen, B.; Brown, G. C.; Verkhratsky, A.; Yamanaka, K.; Koistinaho, J.; Latz, E.; Halle, A.; Petzold, G. C.; Town, T.; Morgan, D.; Shinohara, M. L.; Perry, V. H.; Holmes, C.; Bazan, N. G.; Brooks, D. J.; Hunot, S.; Joseph, B.; Deigendesch, N.; Garaschuk, O.; Boddeke, E.; Dinarello, C. A.; Breitner, J. C.; Cole, G. M.; Golenbock, D. T.; Kummer, M. P. (2015): *Neuroinflammation in Alzheimer's disease*. Lancet Neurol, 14, 388–405
- Herrington, T. M.; Cheng, J. J.; Eskandar, E. N. (2016): *Mechanisms of deep brain stimulation*. J Neurophysiol, 115, 19–38
- Hieshima, K.; Imai, T.; Opdenakker, G.; van Damme, J.; Kusuda, J.; Tei, H.; Sakaki, Y.; Takatsuki, K.; Miura, R.; Yoshie, O.; Nomiyama, H. (1997): *Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2*. J Biol Chem, 272, 5846–5853
- Hilker, R.; Portman, A. T.; Voges, J.; Staal, M. J.; Burghaus, L.; van Laar, T.; Koulousakis, A.; Maguire, R. P.; Pruim, J.; Jong, B. M. de; Herholz, K.; Sturm, V.; Heiss, W.-D.; Leenders, K. L. (2005): *Disease progression continues in patients with advanced Parkinson's disease and effective subthalamic nucleus stimulation*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 76, 1217–1221

- Hogenkamp T (2017): *Tiefe Hirnstimulation: Stand der Wissenschaft und Perspektiven*.
https://www.dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/reden_stellungnahmen/2017/170407_stellungnahme_sgkf_tiefe_hirnstimulation.pdf
- Holtzheimer, P. E.; Kelley, M. E.; Gross, R. E.; Filkowski, M. M.; Garlow, S. J.; Barrocas, A.; Wint, D.; Craighead, M. C.; Kozarsky, J.; Chismar, R.; Moreines, J. L.; Mewes, K.; Posse, P. R.; Gutman, D. A.; Mayberg, H. S. (2012): *Subcallosal cingulate deep brain stimulation for treatment-resistant unipolar and bipolar depression*. Arch Gen Psychiatry, 69, 150–158
- Holzapfel, B.; Wickert, L. (2007): *Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)*. Methoden und Anwendungsgebiete. Biol. Unserer Zeit, 37, 120–126
- Inomed Medizintechnik GmbH (2020): *ISIS Neurostimulator*.
<https://www.inomed.de/produkte/intraoperatives-neuromonitoring/isis-neurostimulator-1/>
- Jennings, J.; Chen, D.; Feldman, D. (2008): *Transcriptional response of dermal fibroblasts in direct current electric fields*. Bioelectromagnetics, 29, 394–405
- Jones, S. A. (2005): *Directing transition from innate to acquired immunity: Defining a role for IL-6*. J Immunol, 175, 3463–3468
- Kim, R. Y.; Hoffman, A. S.; Itoh, N.; Ao, Y.; Spence, R.; Sofroniew, M. V.; Voskuhl, R. R. (2014): *Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 274, 53–61
- Krack, P.; Batir, A.; van Blercom, N.; Chabardes, S.; Fraix, V.; Ardouin, C.; Koudsie, A.; Limousin, P. D.; Benazzouz, A.; LeBas, J. F.; Benabid, A.-L.; Pollak, P. (2003): *Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease*. N Engl J Med, 349, 1925–1934
- Latchoumane, C.-F. V.; Jackson, L.; Sendi, M. S. E.; Tehrani, K. F.; Mortensen, L. J.; Stice, S. L.; Ghovanloo, M.; Karumbaiah, L. (2018): *Chronic electrical stimulation promotes the excitability and plasticity of ESC-derived neurons following glutamate-induced inhibition in vitro*. Sci Rep, 8, 10957
- Lee, J. Y. K.; Deogaonkar, M.; Rezai, A. (2007): *Deep brain stimulation of globus pallidus internus for dystonia*. Parkinsonism Relat Disord, 13, 261–265
- Lepore, F.; D'Alessandro, G.; Antonangeli, F.; Santoro, A.; Esposito, V.; Limatola, C.; Trettel, F. (2018): *CXCL16/CXCR6 axis drives microglia/macrophages phenotype in physiological conditions and plays a crucial role in glioma*. Front Immunol, 9, 2750
- Li, Y.; Wang, X.; Yao, L. (2015): *Directional migration and transcriptional analysis of oligodendrocyte precursors subjected to stimulation of electrical signal*. Am J Physiol Cell Physiol, 309, C532–40
- Li, Y.; Niu, M.; Zhao, A.; Kang, W.; Chen, Z.; Luo, N.; Zhou, L.; Zhu, X.; Lu, L.; Liu, J. (2019): *CXCL12 is involved in α -synuclein-triggered neuroinflammation of Parkinson's disease*. J Neuroinflammation, 16, 263

- Lindl, T. (2002): *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg
- Lopes, F. M.; da Motta, L. L.; Bastiani, M. A. de; Pfaffenseller, B.; Aguiar, B. W.; Souza, L. F. de; Zanatta, G.; Vargas, D. M.; Schönhofen, P.; Londero, G. F.; Medeiros, L. M. de; Freire, V. N.; Dafre, A. L.; Castro, M. A. A.; Parsons, R. B.; Klamt, F. (2017): *RA differentiation enhances dopaminergic features, changes redox parameters, and increases dopamine transporter dependency in 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells*. *Neurotox Res*, 31, 545–559
- Mahajan, G. J.; Vallender, E. J.; Garrett, M. R.; Challagundla, L.; Overholser, J. C.; Jurjus, G.; Dieter, L.; Syed, M.; Romero, D. G.; Benghuzzi, H.; Stockmeier, C. A. (2018): *Altered neuro-inflammatory gene expression in hippocampus in major depressive disorder*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 82, 177–186
- Malin, J.; Aniba, M. R.; Hannenhalli, S. (2013): *Enhancer networks revealed by correlated DNase hypersensitivity states of enhancers*. *Nucleic Acids Res*, 41, 6828–6838
- Mao, Z.; Liu, C.; Ji, S.; Yang, Q.; Ye, H.; Han, H.; Xue, Z. (2017): *The NLRP3 inflammasome is involved in the pathogenesis of Parkinson's disease in rats*. *Neurochem Res*, 42, 1104–1115
- Matloubian, M.; David, A.; Engel, S.; Ryan, J. E.; Cyster, J. G. (2000): *A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo*. *Nat Immunol*, 1, 298–304
- McCandless, E. E.; Wang, Q.; Woerner, B. M.; Harper, J. M.; Klein, R. S. (2006): *CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol*, 177, 8053–8064
- McCandless, E. E.; Piccio, L.; Woerner, B. M.; Schmidt, R. E.; Rubin, J. B.; Cross, A. H.; Klein, R. S. (2008): *Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis*. *Am J Pathol*, 172, 799–808
- Medtronic (2018): *Tiefe Hirnstimulation*. <https://www.medtronic.com/de-de/fachkreise/therapien-prozeduren/neurologie-schmerztherapie/tiefe-hirnstimulation.html>
- Mendiola, A. S.; Cardona, A. E. (2018): *The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases*. *J Neural Transm (Vienna)*, 125, 781–795
- Min, H.-K.; Ross, E. K.; Lee, K. H.; Dennis, K.; Han, S. R.; Jeong, J. H.; Marsh, M. P.; Striemer, B.; Felmlee, J. P.; Lujan, J. L.; Goerss, S.; Duffy, P. S.; Blaha, C.; Chang, S.-Y.; Bennet, K. E. (2014): *Subthalamic nucleus deep brain stimulation induces motor network BOLD activation: Use of a high precision MRI guided stereotactic system for nonhuman primates*. *Brain Stimul*, 7, 603–607
- Moshel, S.; Shamir, R. R.; Raz, A.; Noriega, F. R. de; Eitan, R.; Bergman, H.; Israel, Z. (2013): *Subthalamic nucleus long-range synchronization-an independent hallmark of human Parkinson's disease*. *Front Syst Neurosci*, 7, 79

- Nanki, T.; Lipsky, P. E. (2000): *Cutting edge: Stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4+ T cell activation*. J Immunol, 164, 5010–5014
- National Center for Biotechnology Information (2020a): *IL1B interleukin 1 beta [Homo sapiens (human)]*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3553>
- National Center for Biotechnology Information (2020b): *IL6 interleukin 6 [Homo sapiens (human)]*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3569>
- Nelson, R. T.; Boyd, J.; Gladue, R. P.; Paradis, T.; Thomas, R.; Cunningham, A. C.; Lira, P.; Brissette, W. H.; Hayes, L.; Hames, L. M.; Neote, K. S.; McColl, S. R. (2001): *Genomic organization of the CC chemokine mip-3alpha/CCL20/larc/exodus/SCYA20, showing gene structure, splice variants, and chromosome localization*. Genomics, 73, 28–37
- Oswal, A.; Litvak, V.; Sauleau, P.; Brown, P. (2012): *Beta reactivity, prospective facilitation of executive processing, and its dependence on dopaminergic therapy in Parkinson's disease*. J Neurosci, 32, 9909–9916
- Panina, Y.; Germond, A.; Masui, S.; Watanabe, T. M. (2018): *Validation of common housekeeping genes as reference for qPCR gene expression analysis during iPS reprogramming process*. Sci Rep, 8, 8716
- Paschen, S.; Forstenpointner, J.; Becktepe, J.; Heinzl, S.; Hellriegel, H.; Witt, K.; Helmers, A.-K.; Deuschl, G. (2019): *Long-term efficacy of deep brain stimulation for essential tremor: An observer-blinded study*. Neurology, 92, e1378-e1386
- Pelletier, S. J.; Lagacé, M.; St-Amour, I.; Arsenault, D.; Cisbani, G.; Chabrat, A.; Fecteau, S.; Lévesque, M.; Cicchetti, F. (2014): *The morphological and molecular changes of brain cells exposed to direct current electric field stimulation*. Int J Neuropsychopharmacol, 18
- Pranzatelli, M. R. (2018): *Advances in biomarker-guided therapy for pediatric- and adult-onset neuroinflammatory disorders: Targeting chemokines/cytokines*. Front Immunol, 9, 557
- Raman, D.; Milatovic, S.-Z.; Milatovic, D.; Splittgerber, R.; Fan, G.-H.; Richmond, A. (2011): *Chemokines, macrophage inflammatory protein-2 and stromal cell-derived factor-1a, suppress amyloid β -induced neurotoxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 256, 300–313
- Ramasubbu, R.; Lang, S.; Kiss, Z. H. T. (2018): *Dosing of electrical parameters in deep brain stimulation (DBS) for intractable depression: A review of clinical studies*. Front Psychiatry, 9, 302
- Rehncrona, S.; Johnels, B.; Widner, H.; Törnqvist, A.-L.; Hariz, M.; Sydow, O. (2003): *Long-term efficacy of thalamic deep brain stimulation for tremor: Double-blind assessments*. Mov Disord, 18, 163–170
- Ross, R. A.; Spengler, B. A.; Biedler, J. L. (1983): *Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells*. J Natl Cancer Inst, 71, 741–747

- Ruscher, K.; Kuric, E.; Liu, Y.; Walter, H. L.; Issazadeh-Navikas, S.; Englund, E.; Wieloch, T. (2013): *Inhibition of CXCL12 signaling attenuates the postischemic immune response and improves functional recovery after stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 33, 1225–1234
- Schlaepfer, T. E.; Cohen, M. X.; Frick, C.; Kosel, M.; Brodesser, D.; Axmacher, N.; Joe, A. Y.; Kreft, M.; Lenartz, D.; Sturm, V. (2008): *Deep brain stimulation to reward circuitry alleviates anhedonia in refractory major depression*. Neuropsychopharmacology, 33, 368–377
- Schoen, N. B.; Jermakowicz, W. J.; Luca, C. C.; Jagid, J. R. (2017): *Acute symptomatic peri-lead edema 33 hours after deep brain stimulation surgery: A case report*. J Med Case Rep, 11, 103
- Schutysse, E.; Struyf, S.; Menten, P.; Lenaerts, J. P.; Conings, R.; Put, W.; Wuyts, A.; Proost, P.; van Damme, J. (2000): *Regulated production and molecular diversity of human liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3 alpha from normal and transformed cells*. J Immunol, 165, 4470–4477
- Shen, K.-Z.; Zhu, Z.-T.; Munhall, A.; Johnson, S. W. (2003): *Synaptic plasticity in rat subthalamic nucleus induced by high-frequency stimulation*. Synapse, 50, 314–319
- Shimoi, M.; Pagan, F.; Heaton, E. B.; Mocchetti, I. (2009): *CXCR4 and CXCL12 expression is increased in the nigro-striatal system of Parkinson's disease*. Neurotox Res, 16, 318–328
- Song, B.; Gu, Y.; Pu, J.; Reid, B.; Zhao, Z.; Zhao, M. (2007): *Application of direct current electric fields to cells and tissues in vitro and modulation of wound electric field in vivo*. Nat Protoc, 2, 1479–1489
- Strober, W. (2015): *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr Protoc Immunol, 111, A3.B.1-A3.B.3
- Temel, Y.; Visser-Vandewalle, V.; Kaplan, S.; Kozan, R.; Daemen, M. A. R. C.; Blokland, A.; Schmitz, C.; Steinbusch, H. W. M. (2006): *Protection of nigral cell death by bilateral subthalamic nucleus stimulation*. Brain Res, 1120, 100–105
- Toker, O.; Hashkes, P. J. (2010): *Critical appraisal of canakinumab in the treatment of adults and children with cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS)*. Biologics, 4, 131–138
- Voges, J.; Hilker, R.; Bötzel, K.; Kiening, K. L.; Kloss, M.; Kupsch, A.; Schnitzler, A.; Schneider, G.-H.; Steude, U.; Deuschl, G.; Pinski, M. O. (2007): *Thirty days complication rate following surgery performed for deep-brain-stimulation*. Mov Disord, 22, 1486–1489
- Volkmann, J.; Daniels, C.; Witt, K. (2010): *Neuropsychiatric effects of subthalamic neurostimulation in Parkinson disease*. Nat Rev Neurol, 6, 487–498
- Wagle Shukla, A.; Zeilman, P.; Fernandez, H.; Bajwa, J. A.; Mehanna, R. (2017): *DBS programming: An evolving approach for patients with Parkinson's disease*. Parkinsons Dis, 2017, 8492619
- Weaver, F. M.; Follett, K.; Stern, M.; Hur, K.; Harris, C.; Marks, W. J.; Rothlind, J.; Sagher, O.; Reda, D.; Moy, C. S.; Pahwa, R.; Burchiel, K.; Hogarth, P.; Lai, E. C.; Duda, J. E.; Holloway, K.; Samii, A.; Horn, S.; Bronstein, J.; Stoner, G.; Heemskerk, J.; Huang, G. D. (2009): *Bilateral deep brain*

stimulation vs best medical therapy for patients with advanced Parkinson disease: A randomized controlled trial. JAMA, 301, 63–73

Windels, F.; Bruet, N.; Poupard, A.; Feuerstein, C.; Bertrand, A.; Savasta, M. (2003): *Influence of the frequency parameter on extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid in substantia nigra and globus pallidus during electrical stimulation of subthalamic nucleus in rats.* J Neurosci Res, 72, 259–267

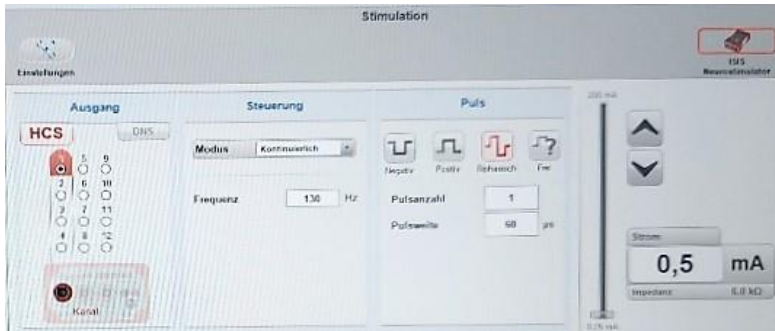
Zhou, C.; Zhang, H.; Qin, Y.; Tian, T.; Xu, B.; Chen, J.; Zhou, X.; Zeng, L.; Fang, L.; Qi, X.; Lian, B.; Wang, H.; Hu, Z.; Xie, P. (2018): *A systematic review and meta-analysis of deep brain stimulation in treatment-resistant depression.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 82, 224–232

Zilkha-Falb, R.; Kaushansky, N.; Kawakami, N.; Ben-Nun, A. (2016): *Post-CNS-inflammation expression of CXCL12 promotes the endogenous myelin/neuronal repair capacity following spontaneous recovery from multiple sclerosis-like disease.* J Neuroinflammation, 13, 7

8 Anhang

8.1 Stimulationseinstellungen am ISIS Neurostimulator

Abbildung 14: Stimulationseinstellungen am ISIS Neurostimulator



Auf dem Foto sind die Stimulationseinstellungen des ISIS Neurostimulators abgebildet. Es erfolgte eine biphasische Stimulation (Wechselstrom) mit einer Pulsweite von 60 µs, einer Frequenz von 130 Hz und einer Stromstärke von 0,5 mA. Die Gesamtimpedanz des Versuchsaufbaus betrug 6 kΩ.

8.2 t-Tests der Zellzählungen

Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der zweiseitigen Zweistichproben-t-Tests, in denen die Zellzahlen der elektrisch stimulierten Proben mit denen der Kontrollproben verglichen wurden (Vgl. 4.1.1). Ein p-Wert >0,05 (Signifikanz, zweiseitig) bedeutet, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellzahlen zum jeweiligen Zeitpunkt vorlag.

Tabelle 11: t-Test der SVGA-Zellzählung

| | | T-Test für die Mittelwertgleichheit | | | | |
|--------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------|-----------------|--------------------|------------------------------|
| | | T | df | Sig. (2-seitig) | Mittlere Differenz | Standardfehler der Differenz |
| Zellzahl.0h | Varianzen sind gleich | 1,000 | 4 | ,374 | 6667 | 6667 |
| | Varianzen sind nicht gleich | 1,000 | 3,200 | ,387 | 6667 | 6667 |
| Zellzahl.6h | Varianzen sind gleich | -,500 | 4 | ,643 | -3333 | 6667 |
| | Varianzen sind nicht gleich | -,500 | 3,200 | ,649 | -3333 | 6667 |
| Zellzahl.12h | Varianzen sind gleich | ,354 | 4 | ,742 | 3333 | 9428 |
| | Varianzen sind nicht gleich | ,354 | 2,560 | ,751 | 3333 | 9428 |
| Zellzahl.24h | Varianzen sind gleich | ,316 | 4 | ,768 | 3333 | 10541 |
| | Varianzen sind nicht gleich | ,316 | 2,439 | ,777 | 3333 | 10541 |

Tabelle 12: t-Test der HMC3-Zellzählung

| | | Levene-Test der Varianzgleichheit | | T-Test für die Mittelwertgleichheit | | | | |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------|-----------------|--------------------|------------------------------|
| | | F | Signifikanz | T | df | Sig. (2-seitig) | Mittlere Differenz | Standardfehler der Differenz |
| Zellzahl.0h | Varianzen sind gleich | ,000 | 1,000 | ,000 | 4 | 1,000 | ,000 | 8165 |
| | Varianzen sind nicht gleich | | | ,000 | 4,000 | 1,000 | ,000 | 8165 |
| Zellzahl.6h | Varianzen sind gleich | ,308 | ,609 | ,378 | 4 | ,725 | 3333 | 8819 |
| | Varianzen sind nicht gleich | | | ,378 | 3,920 | ,725 | 3333 | 8819 |
| Zellzahl.12h | Varianzen sind gleich | ,400 | ,561 | ,500 | 4 | ,643 | 3333 | 6667 |
| | Varianzen sind nicht gleich | | | ,500 | 3,200 | ,649 | 3333 | 6667 |
| Zellzahl.24h | Varianzen sind gleich | ,000 | 1,000 | ,707 | 4 | ,519 | 3333 | 4714 |
| | Varianzen sind nicht gleich | | | ,707 | 4,000 | ,519 | 3333 | 4714 |

Tabelle 13: t-Test der SH-SY5Y-Zellzählung

| | | Levene-Test der Varianzgleichheit | | T-Test für die Mittelwertgleichheit | | | | |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------|-----------------|--------------------|------------------------------|
| | | F | Signifikanz | T | df | Sig. (2-seitig) | Mittlere Differenz | Standardfehler der Differenz |
| Zellzahl.Aussaat | Varianzen sind gleich | 16,00 | ,016 | -,500 | 4 | ,643 | -3333 | 6667 |
| | Varianzen sind nicht gleich | | | -,500 | 2,000 | ,667 | -3333 | 6667 |
| Zellzahl.6h | Varianzen sind gleich | 2,571 | ,184 | -,354 | 4 | ,742 | -3333 | 9428 |
| | Varianzen sind nicht gleich | | | -,354 | 2,560 | ,751 | -3333 | 9428 |
| Zellzahl.12h | Varianzen sind gleich | ,308 | ,609 | ,378 | 4 | ,725 | 3333 | 8819 |
| | Varianzen sind nicht gleich | | | ,378 | 3,920 | ,725 | 3333 | 8819 |
| Zellzahl.24h | Varianzen sind gleich | ,235 | ,653 | ,000 | 4 | 1,000 | ,0000 | 11055 |
| | Varianzen sind nicht gleich | | | ,000 | 3,723 | 1,000 | ,0000 | 11055 |

8.3 ΔCT-Werte, entlogarithmierte ΔCT-Werte und t-Tests (Tabellen)

Die folgenden Tabellen zeigen die ΔCT-Werte und die entlogarithmierten ΔCT-Werte der jeweiligen Versuchsansätze. Sie stellen die Grundlage für die statistische Auswertung dar. In den grau hinterlegten Zeilen sind die p-Werte der zweiseitigen Zweistichproben-t-Tests angegeben, die die Mittelwerte der stimulierten Proben mit den Mittelwerten der Kontrollproben des jeweiligen Zyto- oder Chemokins vergleichen. Ein p-Wert <0,05 bedeutet dabei, dass der Unterschied statistisch signifikant ist.

Tabelle 14: ΔCT-Werte der SVGA-Zelllinie

| DeltaCT CXCL12 | | DeltaCT CXCL16 | | DeltaCT CCL2 | |
|----------------|-----------|----------------|-----------|--------------|-----------|
| Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle |
| 10,047 | 13,152 | 10,482 | 11,999 | 11,535 | 11,733 |
| 9,428 | 10,872 | | | 10,061 | 11,248 |
| 9,486 | 12,3 | 7,904 | 9,306 | 8,892 | 8,095 |
| 8,963 | 9,316 | 10,138 | 10,288 | 7,494 | 8,384 |
| | | | | | |
| 11,528 | 11,646 | 10,643 | 9,391 | 9,274 | 10,415 |
| 11,274 | 14,533 | 9,028 | 6,751 | 9,644 | 8,275 |
| 9,924 | 11,121 | 8,544 | 9,066 | 10,757 | 11,431 |

| DeltaCT CCL20 | | DeltaCT IL-1β | | DeltaCT IL-6 | |
|---------------|-----------|---------------|-----------|--------------|-----------|
| Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle |
| 13,192 | 13,556 | 9,261 | 11,082 | 10,284 | 11,056 |
| 11,852 | 14,201 | | | | |
| 13,497 | 12,068 | 9,884 | 11,022 | 10,55 | 10,96 |
| 12,876 | 13,575 | 11,616 | 12,238 | 11,912 | 12,023 |
| | | 8,964 | 6,132 | 9,29 | 10,402 |
| 10,74 | 10,517 | 5,747 | 6,706 | | |
| 13,349 | 11,172 | 9,698 | 7,732 | 10,552 | 9,154 |
| | | 9,515 | 9,408 | | |

Tabelle 15: Entlogarithmierte ΔCT-Werte und t-Tests der SVGA-Zelllinie

| entlog. DeltaCT CXCL12 | | entlog. DeltaCT CXCL16 | | entlog. DeltaCT CCL2 | |
|------------------------|-------------|------------------------|-------------|----------------------|-------------|
| Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle |
| 0,000945261 | 0,000109864 | 0,000699203 | 0,00024431 | 0,000336992 | 0,000293775 |
| 0,001451741 | 0,000533583 | | | 0,000936132 | 0,000411164 |
| 0,001394535 | 0,000198304 | 0,004175023 | 0,001579846 | 0,002104948 | 0,003657313 |
| 0,002003864 | 0,001568934 | 0,000887479 | 0,000799841 | 0,005547294 | 0,002993398 |
| | | | | | |
| 0,000338631 | 0,000312036 | 0,000625371 | 0,001489455 | 0,00161528 | 0,000732441 |
| 0,00040382 | 4,21824E-05 | 0,001915584 | 0,009284243 | 0,001249875 | 0,003228322 |
| 0,001029386 | 0,000448999 | 0,002679167 | 0,001865787 | 0,000577857 | 0,000362181 |
| 0,005702228 | | 0,634180802 | | 0,869542406 | |

| entlog. DeltaCT CCL20 | | entlog. DeltaCT IL-1β | | entlog. DeltaCT IL-6 | |
|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|----------------------|-------------|
| Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle |
| 0,000106859 | 8,30304E-05 | 0,001629901 | 0,000461302 | 0,000802061 | 0,000469691 |
| 0,000270516 | 5,30974E-05 | | | | |
| 8,64964E-05 | 0,0002329 | 0,001058326 | 0,000480892 | 0,000667012 | 0,000502009 |
| 0,000133026 | 8,19441E-05 | 0,000318593 | 0,000207012 | 0,000259496 | 0,000240279 |
| | | 0,002002475 | 0,014258836 | 0,001597465 | 0,000739071 |
| 0,000584706 | 0,000682445 | 0,01862004 | 0,009578397 | | |
| 9,58408E-05 | 0,000433404 | 0,001203957 | 0,004703662 | 0,000666088 | 0,001755381 |
| | | 0,001366783 | 0,001472007 | | |
| 0,562306023 | | 0,777897051 | | 0,866872812 | |

Tabelle 16: ΔCT-Werte der HMC3-Zelllinie

| DeltaCT CXCL16 | | DeltaCT IL-1Beta | | DeltaCT IL-6 | |
|----------------|-----------|------------------|-----------|--------------|-----------|
| Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle |
| 8,125 | 7,233 | 3,664 | 4,171 | 5,693 | 4,69 |
| 8,654 | 9,351 | 5,036 | 5,198 | 7,617 | 8,312 |
| 9,268 | 9,773 | 5,426 | 4,762 | 7,929 | 7,837 |
| 8,575 | 9,56 | 8,659 | 9,271 | | |
| 11,398 | 11,511 | | | 7,81 | 8,455 |
| 11,121 | 11,277 | | | 9,006 | 9,71 |
| 11,123 | 11,162 | | | 9,691 | 9,723 |
| 10,413 | 10,346 | 8,783 | 9,453 | 9,84 | 10,547 |

Tabelle 17: Entlogarithmierte ΔCT-Werte und t-Tests der HMC3-Zelllinie

| entlog. DeltaCT CXCL16 | | entlog. DeltaCT IL-1Beta | | entlog. DeltaCT IL-6 | |
|------------------------|-------------|--------------------------|-------------|----------------------|-------------|
| Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle |
| 0,003582047 | 0,006647373 | 0,078890752 | 0,055514175 | 0,019330195 | 0,038740866 |
| 0,002482484 | 0,001531329 | 0,030479858 | 0,027242445 | 0,005093948 | 0,003146579 |
| 0,001622012 | 0,001142967 | 0,023260082 | 0,036854894 | 0,004103299 | 0,004373488 |
| 0,002622212 | 0,001324809 | 0,002473895 | 0,001618642 | | |
| 0,000370561 | 0,000342644 | | | 0,004456108 | 0,002849649 |
| 0,000448999 | 0,000402981 | | | 0,001945019 | 0,001193985 |
| 0,000448377 | 0,000436419 | | | 0,001209813 | 0,001183274 |
| 0,000733457 | 0,000768323 | 0,002270145 | 0,001426801 | 0,001091101 | 0,0006684 |
| 0,94096573 | | 0,644882576 | | 0,489243366 | |

Tabelle 18: ΔCT-Werte der SH-SY5Y-Zelllinie

| DeltaCT CXCL12 | | DeltaCT CXCL16 | | DeltaCT CCL2 | |
|----------------|-----------|----------------|-----------|--------------|-----------|
| Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle |
| | | | | 3,415 | 3,062 |
| | | | | 2,081 | 2,428 |
| | | | | | |
| 12,301 | 13,377 | 7,581 | 7,435 | 5,344 | 4,191 |
| 10,52 | 7,223 | 5,094 | 4,269 | 1,616 | 2,407 |
| 9,199 | 8,995 | 5,652 | 5,576 | 5,779 | 5,48 |
| | | | | 4,362 | 5,805 |

| DeltaCT CCL20 | | DeltaCT IL-1Beta | |
|---------------|-----------|------------------|-----------|
| Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle |
| 9,993 | 9,702 | 10,339 | 13,968 |
| 9,446 | 11,282 | 12,01 | 15,229 |
| | | 11,727 | 15,685 |
| 13,251 | 11,617 | | |
| 11,339 | 12,31 | | |
| 11,992 | 14,099 | | |

Tabelle 19: Entlogarithmierte ACT-Werte und t-Tests der SH-SY5Y-Zelllinie

| entlog. DeltaCT CXCL12 | | entlog. DeltaCT CXCL16 | | entlog. DeltaCT CCL2 | |
|------------------------|-------------|------------------------|-------------|----------------------|-------------|
| Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle |
| | | | | 0,093752437 | 0,119741902 |
| | | | | 0,236350529 | 0,185822873 |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 0,000198166 | 9,39987E-05 | 0,005222658 | 0,005778857 | 0,024620434 | 0,054749895 |
| 0,000681027 | 0,006693609 | 0,029278795 | 0,051868412 | 0,326238737 | 0,18854751 |
| 0,001701473 | 0,001959906 | 0,019887421 | 0,02096316 | 0,018211581 | 0,022405551 |
| | | | | 0,048630324 | 0,017886315 |
| 0,408471481 | | 0,381827978 | | 0,351254643 | |

| entlog. DeltaCT CCL20 | | entlog. DeltaCT IL-1Beta | |
|-----------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| Stimuliert | Kontrolle | Stimuliert | Kontrolle |
| 0,000981312 | 0,001200624 | 0,00077206 | 6,24041E-05 |
| 0,001433741 | 0,000401587 | 0,000242454 | 2,60384E-05 |
| | | 0,000294999 | 1,89821E-05 |
| 0,000102577 | 0,000318372 | | |
| | | | |
| 0,00038603 | 0,000196934 | | |
| 0,000245498 | 5,69873E-05 | | |
| 0,441088775 | | 0,123262719 | |

8.4 Publikationen

Molkewehrum, H.; Kubelt, C.; Synowitz, M.; Held-Feindt, J.; Helmers, A.-K. (2021) *Influence of DBS-like electric stimulation on inflammatory mediators in vitro*. European Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery XXIV (ESSFN 2021): ePoster #23349.

Kubelt, C.; Molkewehrum, H.; Lucius, R.; Synowitz, M.; Held-Feindt, J.; Helmers, A.-K. (2022): *Influence of simulated deep brain stimulation on the expression of inflammatory mediators by human central nervous system cells in vitro*, Neuromolecular Med, 24(2), 169-182.

8.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Helmers, Frau Prof. Dr. Dr. Held-Feindt und Frau Dr. Kubelt für die großartige Betreuung und die intensive Einarbeitung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Rehmke und Frau Ebrahim für die tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Synowitz und dem gesamten Institut für Neurochirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel.

Zuletzt danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meiner Freundin für die persönliche und soziale Unterstützung.