Identifizierung differentiell exprimierter Gene nach zentraler und peripherer Nervenläsion mittels differential display Polymerase Kettenreaktion (ddPCR)

von
Jan Liman

Identifizierung differentiell exprimierter Gene nach zentraler und peripherer Nervenläsion mittels differential display PCR (ddPCR)

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Jan Liman

aus

Holzminden

Berichter: Herr Professor
Dr. med. W. Nacimiento

Herr Universitätsprofessor
Dr. rer. nat. Dr. med. habil H. Korr

Tag der mündlichen Prüfung: 10.Oktober 2003

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Ich möchte meine Dissertation meinen Eltern widmen, die mich bei all meinen Entscheidungen unterstützt haben.
Ich verdanke ihnen sehr viel.

1 Inhaltsverzeichnis

1 INHALTSVERZEICHNIS 1

2 ZUSAMMENFASSUNG 4

3 EINLEITUNG 5

3.1 Pathophysiologische Grundlagen der Querschnittlähmung 5

3.2 Klinischer Hintergrund 7

3.3 Experimentelle Paraplegiologie 7

3.4 Genexpressionsanalyse 8

3.5 Fragestellung 10

4 MATERIAL UND METHODIK 11

4.1 Versuchstiere 11

4.2 Versuchsmodell 11
4.2.1 Zentrales Läsionsmodell 12
4.2.2 Peripheres Läsionsmodell 13

4.3 Operationen 14
4.3.1 Facialis Axotomie 14
4.3.2 Spinale Hemisektion 14

4.4 Postoperativer Verlauf 14

4.5 Perfusion und Organentnahme 15
4.5.1 Isolation des Gewebes 15

4.6 RNA-Extraktion 16

4.7 Reverse Transkription 18

4.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR) 19
4.8.1 Komponenten der PCR 20

4.9 Differential Display PCR (ddPCR) 21
4.9.1 Polyacrylamidgel 25

4.10 Aufreinigung der Banden 27

4.11 Reamplifikation PCR 28

4.12 DNA-Klonierung 28

4.13 Amplifikation der Klone: 32

4.14 Sequenzierung der DNA 34

5 ERGEBNISSE 36

5.1 Etablierung des Versuchaufbaus 36

5.2 Differentiell exprimierte Gene 37
5.2.1 Sequenzen 38

5.3 Gelbeispiele 64

6 DISKUSSION 65

6.1 Transkriptionsfaktoren 65
6.1.1 C-MAF 66
6.1.2 cFos 67
6.1.3 Jun B Transkriptionsfaktor 67

6.2 Homeobox Gene 68
6.2.1 Hox 1; Hox 3; Hox 4.4; ISL-1 68

6.3 Proteinmetabolismus 68
6.3.1 EF 2 69
6.3.2 Stearyl CoA Desaturase 1 (SCD 1) 69
6.3.3 Chaperonin 10/ Hitzeschockprotein 60 70

6.4 Signaltransduktion 70
6.4.1 Phospholipase A- 2 71
6.4.2 Na-/K-ATPase 71
6.4.3 Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 5b 72

6.5 Rezeptoren 73
6.5.1 T- Zell Rezeptor 73

6.6 Zytoskelettproteine 74
6.6.1 Vimentin 74

6.7 ddPCR als Screening Methode 75
6.7.1 Sensitivität 76
6.7.2 Spezifität 77
6.7.3 Wertung der Ergebnisse 78
6.7.4 Ausblick 78

7 LITERATURVERZEICHNIS 80

2 Zusammenfassung

Im zentralen Nervensystem kommt es nach einer Schädigung, beispielsweise durch einen Schlaganfall oder ein Trauma, im Gegensatz zum peripheren Nervensystem nicht zu einer ausreichenden Regeneration. Die molekularen Mechanismen der unzureichenden Regeneration im zentralen Nervensystem sind bislang nur unvollständig verstanden. Weltweit sind viele Forschergruppen auf der Suche nach sogenannten Schlüsselgenen, die ursächlich für die fehlende oder verantwortlich für eine erfolgreiche Regeneration sind.

In dieser Studie wurde die Methode der *differential display Polymerase Kettenreaktion (ddPCR)* etabliert und benutzt, um Einblicke in diese molekularen Mechanismen, die der axonalen Regeneration zu Grunde liegen, zu erlangen. Mit Hilfe dieser Methode wurde die Genexpression axotomierter mit der intakter Neurone verglichen. Zu diesem Zweck wurden als peripheres Nervenläsionsmodell die Axone der Neurone des Nervus facialis (N. facialis) einseitig durchtrennt und eine spinale Hemisektion des Rückenmarks zur Axotomie der zentralen Neurone des Nucleus ruber (Ncl. ruber) und des Clarke'schen Kerns durchgeführt. Der Fazialiskern, der Ncl. ruber, sowie der Clarke'sche Kern wurden im Seitenvergleich isoliert und die Boten-RNA (mRNA), als Ausdruck der Proteinproduktion der Zelle, isoliert. Im Folgenden wurden die verschiedenen Expressionsmuster im Seitenvergleich mit Hilfe der *ddPCR* analysiert. Differentiell exprimierte Gene wurden isoliert und nach Amplifikation sequenziert. Ihre Sequenzen wurden mit bekannten Gensequenzen der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verglichen.

Insgesamt sind 109 Fragmente isoliert worden, von denen 72 keine Ähnlichkeit mit bekannten Gensequenzen hatten. 37 der isolierten Genfragmente wiesen Homologien zu bekannten Genen auf. Sie kodieren für Proteine aus verschiedenen Gruppen, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren, Signalmoleküle, Homeobox-Gene, Rezeptoren und Proteine, die in den Lipid- und Proteinstoffwechsel eingreifen.

Die Methode der *ddPCR* wurde in dieser Studie als Screeningverfahren zur schnellen Ermittlung unterschiedlich exprimierter Gene eingesetzt. Ziel war es, neben der Etablierung und kritischen Bewertung der Methode durch die Entdeckung bisher nicht im Zusammenhang mit neuronaler Re- oder Degeneration bekannter Gene, neue Aspekte aufzuzeigen und Ansatzpunkte auf diesem Gebiet zu ermöglichen. Dabei bildet das Verfahren der *ddPCR* eine Grundlage für weitergehende Untersuchungen, die neben der Verifizierung insbesondere die weitergehende Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung übernehmen sollten.

3 Einleitung

3.1 Pathophysiologische Grundlagen der Querschnittlähmung

Seit langem ist bekannt, dass es nach Verletzungen des Zentralen Nervensystems (ZNS), beispielsweise nach einem Schlaganfall, einem Schädel- Hirntrauma, oder einer Rückenmarksverletzung, nicht zu einer Regeneration der beschädigten Axone kommt. Abhängig von Lokalisation und Ausmaß der Verletzung entstehen motorische, sensible und vegetative Ausfälle, die oft keine signifikante Besserungstendenz zeigen und deshalb mit großen Beeinträchtigungen der Lebensqualität für diese Patienten verbunden sind. Im Gegensatz dazu weisen periphere Nerven durchaus ein Regenerationspotential auf, so dass es nach Verletzungen unter günstigen Bedingungen zu einer restitutio ad integrum kommt und diese Patienten keine oder nur geringfügige Behinderungen ihres täglichen Lebens hinnehmen müssen.

Wo aber liegt der Unterschied zwischen dem sich regenerierenden Peripheren Nervensystem (PNS) auf der einen und den erfolglosen Bemühungen zum Reparieren im Zentralen Nervensystem (ZNS) auf der anderen Seite?

Obwohl das Phänomen der Nervenregeneration bereits detailliert untersucht und beschrieben ist, sind die molekularen Grundlagen dieses Prozesses noch weitgehend unbekannt [1, 2]. Die unterschiedliche Regeneration peripherer und zentraler Neurone kann, zumindest teilweise, auf verschiedene genetische Programme zurückgeführt werden, die in den jeweiligen Zellen initiiert werden. Diese Programme definieren die Reaktion der jeweiligen Zelle auf Reize, wie sie unter anderem nach einer Verletzung über verschiedene Botenstoffe (Mediatoren) übermittelt werden. Es können Gene induziert oder inhibiert werden. Schlüsselmoleküle spielen hierbei wahrscheinlich eine entscheidende Rolle für unterschiedliche Reaktionen peripherer und zentraler Neurone. Es wurde bereits darüber hinaus für verschiedene Gewebe gezeigt, dass sich die Art und Zahl der transkribierten Information im Laufe der Entwicklung einer Zelle verändert und maßgeblich zu ihrer spezifischen Ausdifferenzierung beiträgt [3, 4]. Diese Vorgänge sind molekularanalytisch sehr komplex. Es ist wahrscheinlich, dass Prozesse wie neuronale Plastizität und Regenerationsvermögen nicht nur auf der Modulierung von konstitutionellen Transkriptionsmerkmalen beruhen, sondern auch auf einer Vielzahl von bisher nicht mit Regeneration und Plastizität in Zusammenhang gebrachten Genen zurückgeführt werden können.

Eine traumatische Läsion des ZNS führt nicht nur initial zu einer lokalen Nekrose, sondern auch durch die Eröffnung der Blut-Hirnschranke zu einer Einwanderung von Entzündungszellen aus dem Blut mit konsekutiver lokaler Entzündungsreaktion. Neben den aus dem Blut eingewanderten Makrophagen ist auch das hirneigene Gliagewebe an der

Unterhaltung der Entzündung beteiligt [5-7]. Diese Zellen sind auch für die Sezernierung z.T. zytotoxischer Stoffe verantwortlich, welche eine zusätzliche Gewebeschädigung nach sich ziehen und somit auch einer Regeneration der Neurone im Wege stehen [8].

Axone distal einer Läsion unterliegen der sogenannten Wallerschen Degeneration. Die Markscheide zerfällt[9]. Im Gegensatz zu den Schwannschen Zellen des PNS bilden die Oligodendrozyten im ZNS jedoch keine Zellsäulen aus, die der regenerierenden Nervenfaser als Leitstruktur dient (im PNS sog. Bünger-Bänder). Neue Regenerationsimpulse und Bemühungen, die ursprüngliche Innervation wieder herzustellen, kommen dabei aus den Zellkernen der betroffenen Neurone. Dabei hängt der Erfolg oder Misserfolg der Regeneration auch davon ab, ob ein Neuron die molekularen Programme für die Expression regenerationsfördernder Gene dauerhaft aktiviert oder nicht [10, 11].

In diesem Zusammenhang scheint das Phänomen des retrograden axonalen Transportes eine entscheidende Rolle zu spielen. Informationen aus Regionen distal des Nervenzellkörpers werden in Form von Signalmolekülen vom Axon zum Zellkern transportiert. Dieser Mechanismus ist wichtig für die Nervenzelle, da sie ihren Zellstoffwechsel auf diese Weise an Veränderungen ihrer Umgebung anpassen und so beispielsweise regeneratorische Programme als Antwort auf axonale Läsionen einleiten kann. Ein Beispiel für eine solche Signalsubstanz ist der Nerve Growth Factor (NGF). Dieser führt lokal zu Axonwachstum und Synapsenaussprossung. Nach Axonverletzungen konnte ein vermehrter retrograder Transport nachgewiesen werden, der zu einer Aktivierung regeneratorischer Programme im Zellkern führt [12]. Dabei scheinen zwei Transportmechanismen wesentlich beteiligt zu sein: Zum einen wird NGF nach Aktivierung eines Rezeptors an der Oberfläche des Nervens zusammen mit diesem in einem Vesikel Richtung Zellkörper transportiert, zum anderen existiert aber auch eine schnellere Möglichkeit des retrograden Transports, für die eine wellenartige retrograde Erregung an der Plasmamembran befindlicher Rezeptoren verantwortlich sein soll [13].

Experimentelle Untersuchungen konnten darstellen, dass die Antwort der Zelle auf einen bestimmten schädigenden Reiz in peripheren und zentralen Neuronen Unterschiede aufweisen. So findet in den zentralen Neuronen des Ncl. ruber durchaus 1 bis 2 Wochen nach Axotomie und länger ein Syntheseprogramm statt, welches auf Regeneration ausgelegt ist und dem der peripherer Nervenzellen entspricht. Vor allem wachstumsassoziierte Proteine wie das Phosphoprotein GAP 43, dem regeneratorische Eigenschaften zugeschrieben werden, sowie Aktin- und Tubulinfilamente aus der Gruppe der Zytoskelettproteine konnten sowohl in axotomierten peripheren als auch in zentralen Neuronen in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden. Anschließend kommt es aber im Gegensatz zum peripheren Nervensystem zu einer Reduktion der Proteinsynthese, zeitgleich mit dem Beginn der Atrophie der Neurone [14]. Diese Regenerationsversuche, die im PNS erfolgreich sind und zu einer vollständigen Restitution der Funktion führen, verlaufen derweil im ZNS frustran und werden nach einiger Zeit eingestellt [15].

Eine wichtige Rolle spielt auch die Ausbildung des Narbengewebes im Bereich der Verletzung. Es wird von Astrozyten und durch sie sezernierte Matrixeiweiße gebildet, für die zum Teil eine wachstumsinhibierende Wirkung [16-19], aber auch regenerationsfördernde Wirkungen gezeigt werden konnte [20]. Dies verdeutlicht, dass man nicht pauschal von der Narbe als einer grundsätzlichen Barriere sprechen kann, zumal gezeigt werden konnte, dass Axone auch spontan in das Narbengewebe einsprossen können [21].

3.2 Klinischer Hintergrund

Trotz intensiver Forschung ist eine kausale Behandlung traumatischer Rückenmarksschädigungen auch heute noch nicht möglich. In den letzten Jahren konnte dank einer stark verbesserten Akutversorgung und konsequentem Intensivmanagement die Überlebensrate der Querschnittpatienten sehr verbessert werden, so dass ein Großteil dieser Patienten überleben. Die Akutbehandlung beinhaltet nach Sicherung der Vitalfunktion die Dekompressionsoperation am Ort der Verletzung und eine Stabilisierung der Wirbelsäule. Mit hochdosierten Kortikoidgaben wird die Entzündungsreaktion und das Ödem am Ort des Traumas eingedämmt. Dieses Vorgehen wird mittlerweile auch durch Studien belegt, welche einen positiven Effekt auf die Erholung der neurologischen Funktionen zeigen konnten (NASCIS 2+3). Diese Maßnahmen und das meist niedrige Durchschnittsalter der Patienten führt jedoch zu einer hohen Zahl an Patienten, die mit den Problemen der verbleibenden Funktionsstörungen den Rest ihres Lebens konfrontiert sind.

Ebenso wichtig ist die sehr komplexe Akutpflege und –rehabilitation, damit sich krankheitsbedingte Funktionsstörungen nicht zur kostenintensiven Dauerstörung und Folgeerkrankung perpetuieren. Pflege- und Rehabilitationsziele müssen engmaschig aufeinander abgestimmt werden, um zumindest teilweise eine Steh-, Geh-, Greiffunktion oder auch die Blasen- und Mastdarmfunktion wieder zu erlangen. Dabei wird das gesamte Spektrum von der Elektro- über die Physiotherapie auf neurophysiologischer Basis, sowie der Ergotherapie bis hin zur psychotherapeutischen Stützung eingesetzt. Dank der großen medizinischen Bemühungen sind die motorischen Funktionen und die Lebensqualität der Patienten in den letzten Jahren stark verbessert worden.

3.3 Experimentelle Paraplegiologie

Die experimentelle Paraplegiologie versucht, die Ursachen des fehlenden Regenerationsvermögens des ZNS zu erforschen und die Unterschiede zwischen PNS und ZNS bei Regenerationsvorgängen mit morphologischen und molekularbiologischen Methoden aufzuzeigen. In den letzten Jahren gab es zunehmend Versuche, tierexperimentell die Regenerationsprogramme der Neurone, mit dem Ziel der gerichteten Reinnervation der Neurone distal der Läsion, auf molekularbiologischer Ebene zu beeinflussen. Dabei stützten

sich die Versuche auf den im Tierexperiment gewonnenen Erkenntnissen. Verschiedene Strategien werden zur Zeit überprüft und weisen z.T. vielversprechende Ergebnisse auf:

- Die Applikation neurotropher Faktoren (Nerve Growth Factor; NT3) zeigte in Versuchen mit Ratten eine Proliferation von Oligodendrozyten mit anschließender Myelinisierung der regenerierenden Axone. Hier richtet sich das Augenmerk besonders auf die Transplantation genetisch modifizierter Zellen mit der Fähigkeit solche neurotrophen Faktoren zu sezernieren [11, 14, 22-24].
- Die Hemmung von myelinassoziierten Wachstumsinhibitoren (Nogo-Moleküle) via spezifischer Antikörperapplikation, auch in Verbindung mit der Gabe von neurotrophen Faktoren, zeigte im Tierversuch ein Wachstum der durchtrennten Axone und die Reinnervation distal der Läsion, die anhand von Reflexanalysen überprüft werden konnte [22, 23, 25, 26].
- Durch spezifische Antikörper und Pharmaka gegen Moleküle im Narbenbereich, wie das Kollagen IV, wird versucht, die Regenerationsbarrieren im Bereich der Läsionsnarbe zu überbrücken und eine Reinnervation distal der Narbe zu ermöglichen [27].
- Transplantationen von peripherem Nervengewebe, wie Gliazellen aus dem N. olfactorius oder Schwannschen Zellen, die als Regenerationshilfe dienen könnten, werden zur Zeit an verschiedenen Zentren getestet [28, 29].
- Transplantationen von embryonalem oder fetalem Nervengewebe fördert die regeneratorischen Eigenschaften. Es ist aber im Tierversuch noch nicht gelungen, längerstreckige Aussprossungen zu erzielen [22, 30-34].
- Durch die Implantation von zuvor aktivierten Makrophagen konnte im Rattenmodel eine partielle Regeneration der motorischen Funktion erreicht werden [35].

Bisher hat jedoch die isolierte Anwendung der oben angeführten Methoden nur zu limitierter Regeneration geführt. Vielversprechender ist wahrscheinlich eine Kombination aus verschiedenen Ansätzen mit dem Ziel, in Zukunft eine klinisch anwendbare Methode zu finden.

Zur Zeit sind die Kenntnisse über die molekularen Vorgänge im Nervengewebe nicht umfassend genug, als dass eine klinische Anwendung am Menschen zum jetzigen Zeitpunkt möglich und ethisch vertretbar wäre. Es ist daher erforderlich, weiterhin die molekularen Veränderungen im Nerven zunächst tierexperimentell und anschließend auch in menschlichem Gewebe zu analysieren, um in Zukunft von einem genaueren Verständnis dieser Vorgänge ausgehend eine optimale Behandlungsmethode zu entwickeln.

3.4 Genexpressionsanalyse

Da die Analyse differentiell exprimierter Gene in sehr vielen Bereichen der modernen Grundlagenforschung immer wichtiger wird, sind gerade in der jüngsten Vergangenheit eine Vielzahl von neuen innovativen Untersuchungsmethoden entwickelt worden.

Diese verschiedenen Techniken, die zum Vergleich unterschiedlicher RNA-Populationen benutzt werden, haben bei aller Verschiedenheit denselben Ursprung: Die Methode der differentiellen Hybridisierung oder des differentiellen Screenings.

Man kann sagen, dass differentielles Screening das Ermitteln der „messenger RNA“ (mRNA) von zufällig ausgewählten Klonen aus der gesamten RNA, die Unterschiede in ihrer Konzentration aufweisen, umfasst. Die Produktion der mRNA einer Zelle kann dabei als Ausdruck der Zellaktivität und der Zellfunktion angesehen werden, da im Verlauf der Proteinbiosynthese in der Zelle die verschiedenen Proteine anhand der „Kodierung“ der mRNA produziert werden. Eine Weiterentwicklung des differentiellen Screenings ist die subtraktive Hybridisierung. Bei dieser Arbeitsweise werden die Klone vor dem differentiellen Screening vorselektiert. Dieser Schritt bedeutet eine wesentliche Arbeitsersparnis. Mittlerweile existieren eine Vielzahl von Protokollen für diese Technik, die bereits seit längerem erfolgreich angewendet werden.

1992 wurde eine neue, heute unter dem Namen *differential display PCR (ddPCR)* bekannte Methode zum differentiellen Screening von Klonen vorgestellt [36, 37].

Die Grundzüge der *ddPCR* sind kurz so zusammenzufassen:

a) Durch unspezifisch bindende Startermoleküle (Primer) werden durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) im Optimalfall alle cDNA-Fragmente vervielfacht.

b) Die zu vergleichenden cDNA- Fragmente werden Seite an Seite auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und durch elektrische Spannung entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Das so erhaltene Bandmuster wird als Fingerprint bezeichnet.

c) Fragmente, die ein unterschiedliches Signal zeigen, werden aus dem Gel ausgeschnitten und weiter untersucht.

Verschiedene Forschungsgruppen entwickelten dieses Verfahren in den letzten Jahren weiter und verwendeten es erfolgreich zur Erforschung verschiedener komplexer biologischer Probleme auf dem Gebiet des Tumorwachstums, der Endokrinologie, sowie bei der Neuropathie und Infarktforschung [38-40].

In den letzten Jahren ist eine weitere neue Methode, der sogenannte Microarray, zur systematischen Genanalyse entwickelt worden. Hierbei handelt es sich im Prinzip um viele vorgefertigte cDNA-Proben, die an bestimmten bekannten Positionen auf einem Filterpapier fixiert sind. Das zu untersuchende Subset wird vor Auftragen auf diesen Filter mit einem fluoreszierenden Antikörper oder mit einer radioaktiven Substanz markiert und anschließend auf dem Filter inkubiert. Die jeweils komplementären cDNA-Fragmente lagern sich aneinander an und ergeben bei der Auswertung ein Signal. Eine Weiterentwicklung dieser Arraytechnologie sind die „Genchips“, die statt der kompletten cDNA lediglich für die jeweilige cDNA spezifische Sequenzen auf ihrer Oberfläche aufgebracht haben. An diese lagern sich die komplementären Sequenzen der zu untersuchenden cDNA an. Die Auswertung erfolgt analog zum Microarrayverfahren.

3.5 Fragestellung

Trotz einer Vielzahl von potentiell erfolgsversprechenden Ergebnissen im Bereich der Rückenmarksforschung ist das Verständnis über die molekularen Grundlagen, die der fehlenden Regeneration zu Grunde liegen, noch sehr gering.

Um aber detaillierte Kenntnisse über die ablaufenden Pathomechanismen nach einem ZNS-Trauma für etwaige spätere Therapiemöglichkeiten zu erlangen, ist es notwendig, die grundlegenden molekularen Unterschiede zwischen dem sich regenerierenden peripheren Nervensystem und dem zentralen Nervensystem aufzudecken. Ein möglicher Ansatz ist der Vergleich der Genexpressionsänderungen in regenerierenden mit nicht regenerierenden Neuronen nach Axonverletzung.

Die Frage nach den Schlüsselmolekülen der Regeneration ist dabei wahrscheinlich nicht trivial zu beantworten. Angesichts der vielen bisher noch unbekannten Faktoren in diesem Zusammenhang ist es sinnvoll, das Augenmerk nicht nur auf Moleküle zu richten, die aus anderen Organsystemen bekannt sind, sondern vielmehr die Möglichkeit zu nutzen, bisher nicht beschriebene Gene zu finden und in Betracht zu ziehen.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Anwendung der Methode der *ddPCR* als Screeningverfahren für differentiell exprimierte Gene nach axonaler Verletzung.

In dieser Arbeit soll versucht werden, die folgenden Fragen zu beantworten:

1) Lassen sich neue oder noch nicht im Zusammenhang mit Regeneration beschriebene Gene auf neuronaler Ebene identifizieren?

2) In wieweit unterscheiden sich die Gene, die im ZNS und im PNS nach einer Axonverletzung exprimiert werden?

3) Ist das Verfahren der *ddPCR* als Screeningmethode in diesem Zusammenhang geeignet?

4 MATERIAL UND METHODIK

4.1 Versuchstiere

Alle Experimente fanden mit Genehmigung der Bezirksregierung Köln (50.203.2 AC 23,21/00) und unter Aufsicht des Veterinäramtes der Stadt Aachen statt. Versuchstiere waren weibliche Sprague-Dawley Ratten (SPRD), die im Institut für Versuchstierkunde der RWTH Aachen unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen (SPF) gezüchtet und anschließend unter konventionellem Keimstatus paarweise in Makrolon Typ 3 - Käfigen gehalten wurden (Einstreu: Entstaubtes Weichholzgranulat). Sie wogen bei Versuchsbeginn 200-250g und wurden mit Trockenfutterpellets (Alleindiät RM 204, Fa. Eggersmann, Rinteln) und zweifach ozoniertem, entkeimten, auf pH 4-5 angesäuertem Wasser (Tränkflasche: Makrolon) ad libitum versorgt. Die Temperatur in den Versuchsräumen betrug 20+/- 2 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60+/- 10 % und einem dauerhaften Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 Stunden. In dieser Studie dienten insgesamt 20 Ratten als Versuchstiere. Bei ihnen wurde eine spinale Hemisektion entweder zervikal- oder thorakal durchgeführt. Anschließend wurden sie nach einer Überlebenszeit von 7 Tagen getötet, da viele der molekularen Reaktionen kurz nach der Verletzung initiiert werden und ihr Expressionshöhepunkt ungefähr bei einer Woche nach Verletzung liegt [41].

4.2 Versuchsmodell

Der Auswahl des richtigen Kerngebietes kommt dabei eine besondere Rolle zu. Folgende Anforderungen sind an ein entsprechendes Kerngebiet zu stellen:

- Durch die gesetzte Läsion müssen die Neurone im Zielkerngebiet axotomiert werden, um die Auswirkungen des Traumas auf die RNA-Produktion überprüfen zu können.
- Es sollte in ausreichend großer anatomischer Entfernung vom Ort des Traumas liegen, um Verunreinigungen des entnommenen Gewebes mit Entzündungszellen und Blut aus der näheren Umgebung der Läsionsstelle zu verhindern.
- Die Region des Kernes sollte anatomisch zirkumskript und im präparierten Gewebe einfach auszumachen sein, um sicherzustellen, dass bei der ddPCR möglichst viele Banden aus der neuronalen RNA stammen, das Bandenmuster am Ende also möglichst einfach erscheint und nicht durch Banden aus glialer RNA unübersichtlich wird.

- Die anatomischen Verhältnisse sollten so sein, dass eine klare Trennung der verletzten und der unverletzten Seite möglich ist. Des Weiteren sollten kreuzende Bahnen möglichst fehlen, um eine Beeinflussung der Gegenseite zu verhindern.

4.2.1 Zentrales Läsionsmodell

In den Experimenten kam das Hemisektionsmodell des Rückenmarks der Ratte zur Anwendung. Durch die komplette laterale Durchtrennung einer Seite des Rückenmarkes ist gewährleistet, dass einseitig alle aszendierenden und deszendierenden Bahnen durchtrennt sind. Die Anatomie des Rückenmarkes bietet aufgrund des spiegelbildlichen Aufbaus die Möglichkeit des direkten Seitenvergleichs zwischen geschädigter und intakter Seite (vgl. Abb.1) [42, 43]. Der Nachteil der Beeinflussung der nicht operierten Seite durch kreuzende Fasern von der operierten Seite [44] kann durch Kontrollgruppen mit nicht-operierten Tieren überprüft werden.

4.2.1.1 Ncl. ruber

Der Ncl. ruber nimmt auf jeder Seite des Mittelhirns einen Teil der oberen Haube ein. Er ist gemeinsam mit den Basalganglien und dem Kleinhirn verantwortlich für die Kontrolle von Muskeltonus, Körperhaltung und Gangbild. Er dient dabei als eine Art Relaisstation für Signale vom Kleinhirn zum Thalamus, die von dort zur Großhirnrinde weiter geleitet werden sowie für Signale, die den umgekehrten Weg nehmen: zum Kleinhirn, aber auch zum Rückenmark.

Als Kernregion für die Erforschung der Regenerationsvorgänge im ZNS bietet sich der Ncl. ruber in zweierlei Hinsicht an. Zum einen liegt er bei dem verwendeten Hemisektionsmodell außerhalb der direkten Entzündungsreaktion. Zum anderen ist er besonders geeignet, da er zwar Efferenzen zum Olivenkern und der zentralen Haubenbahn hat, aber auch den Tractus rubrospinalis bildet, welcher motorische Efferenzen vom Ncl. ruber in das Rückenmark leitet. Die Fasern des Tractus rubrospinalis haben erregende (exitatorisch) Wirkung auf α- und γ-Motorneurone vorwiegend der Beugemuskeln (Flexoren). Er beginnt im Ncl. ruber und kreuzt im Mittelhirn auf die Gegenseite. Aufgrund der oben beschriebenem Lokalisation im Mittelhirn und dem Verlauf der Faserverbindungen wurde bei der Operation ein hochzervikales Schnittniveau (C 2) gewählt.

4.2.1.2 Nucleus Dorsalis Clarke

Der Clarke'sche Kern (Ncl. dorsalis Clarke) befindet sich im mittleren Bereich der Hinterhörner des Rückenmarks auf zervikalem und thorakalem Niveau. Er erscheint im Rückenmarksschnitt recht prominent und ist deshalb gut zu erkennen. In ihm enden die Bahnen der propriozeptiven Sensibilität aus der Muskulatur, also der Neurone, die die Informationen über den Spannungs- und Dehnungsgrad der Muskeln weiterleiten. Vom Ncl. dorsalis Clarke werden diese über Bahnen zum Kleinhirn weitergeleitet. Aufgrund der oben

beschriebenem Lokalisation im Rückenmark und des Verlaufs der Faserverbindungen wurde bei der Operation ein tiefthorakales Schnittniveau (Th 9) gewählt.

4.2.2 Peripheres Läsionsmodell

Als Modell für die Verletzung des peripheren Nervensystems wurde das sogenannte Facialismodell benützt. Bei diesem etablierten Modell werden die Axone des Nervus facialis (N. facialis) einseitig an der Austrittsstelle aus dem Schädel durchtrennt, während die Fasern der Gegenseite intakt belassen werden (vgl. Abb.1). Der N. facialis führt die motorischen Fasern für die mimische Muskulatur jeweils einer Gesichtshälfte. Das ihm zugehörige Kerngebiet liegt im unteren Teil der Brücke (Pons) und ist wegen seiner Nähe zum großzelligen Kerngebiet des N. abducens leicht anatomisch zu lokalisieren.

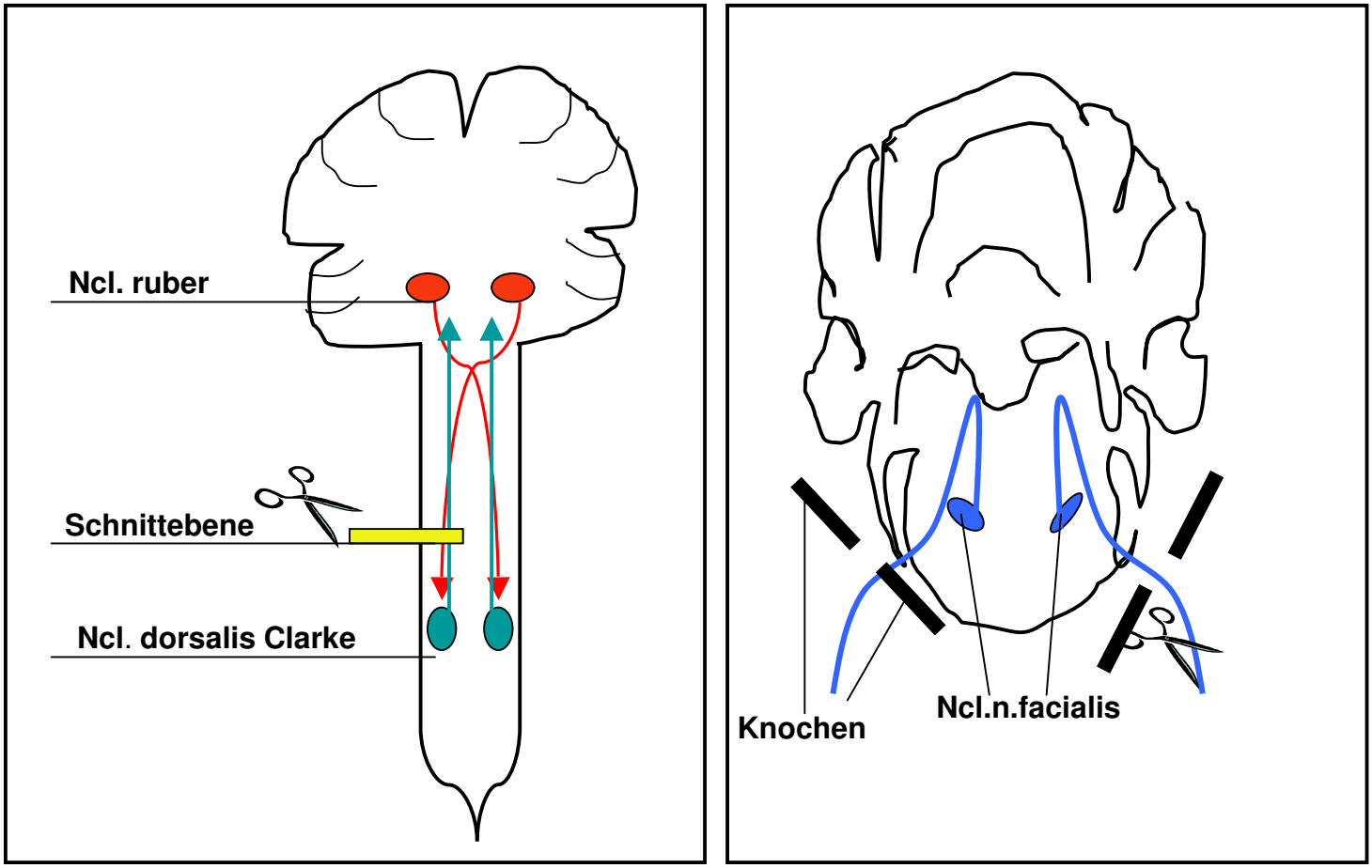


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Läsionsmodelle

4.3 Operationen

Die Versuchstiere wurden für die Operationen durch eine einmalige intraperitoneale Chloralhydratinjektion von 350 mg/kg Körpergewicht narkotisiert. Anhand des Wegfalls der Schmerz- und Kornealreflexe wurde die Tiefe der Narkose ermittelt.

4.3.1 Facialis-Axotomie

Zunächst erfolgte ein 1 cm langer Hautschnitt entlang des rechten Kieferwinkels der Ratte. Anschließend wurde der N. facialis freipräpariert und direkt an seinem Austrittsort am Foramen stylomastoideum mit einer Schere durchtrennt. Nach Blutstillung wurde die Wunde genäht und desinfiziert.

4.3.2 Spinale Hemisektion

4.3.2.1 Hemisektion auf Höhe zervikal 2 (C 2)

Bei der Operation erfolgte zunächst ein 2 cm langer Hautschnitt entlang der zervikalen Processi spinosi. Anschließend wurde die dorsale Seite der Wirbelkörper freipräpariert und der Wirbelkörper C2 für die zervikale Hemisektion aufgesucht. Mit einer Laminektomie und der Durchtrennung der Dura mater wurde der freie Zugang zum Rückenmark ermöglicht. Dieses wurde mit einem geraden (Nr. 11) und einem gebogenem Skalpell (Nr. 12) linksseitig durchtrennt, und nach Blutstillung wurde die Operationswunde entlang der anatomischen Schichten (Muskel, Faszie, Haut) genäht und desinfiziert. Die Aufwachphase fand unter einer Rotlichtlampe statt, um eine Auskühlung der Tiere zu vermeiden.

4.3.2.2 Hemisektion auf Höhe thorakal 9 (Th 9)

Zuerst wurde ein 2 cm langer Hautschnitt entlang der thorakalen Processi spinosi durchgeführt. Die dorsale Seite der Wirbelkörper wurde freipräpariert und der thorakale Wirbelkörper 9 für die Hemisektion aufgesucht. Nach einer Laminektomie und der Durchtrennung der Dura mater erhielt man Zugang zum Rückenmark, welches ebenfalls mit einem geraden (Nr. 11) und einem gebogenem (NR. 12) Skalpell linksseitig durchtrennt wurde. Die Wundversorgung erfolgte wie unter 4.3.2.1 beschrieben.

4.4 Postoperativer Verlauf

Einen Tag post OP wurde die Operationswunde in Hinblick auf die Qualität der Naht und Infektion der Operationswunde untersucht. Während des gesamten Überlebenszeitraumes wurden die Ratten auf vegetative und motorische Ausfälle (Blasenfunktion, Lähmung der linken hinteren Extremität) kontrolliert. Der Erfolg der Operation konnte klinisch bei der

Fazialis Axotomie durch den Wegfall der Schnurhaarfunktion rechtsseitig bzw. nach Hemisektion durch eine einseitige Extremitätenlähmung überprüft werden.

An Komplikationen traten nur in Einzelfällen Wundheilungsstörungen auf, Mutilationen, damit sind selbstbeigebrachte Verstümmelungen im Bereich der Operationswunde beispielsweise durch Nagen oder Kratzen gemeint, wurden bei keinem der Tiere beobachtet.

4.5 Perfusion und Organentnahme

Nach sieben Tagen Überlebenszeit wurden die Versuchstiere mit Chloralhydrat terminal anästhesiert (640 mg/kg Körpergewicht) und transkardial mit 100 ml steriler 0,9% Kochsalzlösung perfundiert, wodurch ein Herz-Kreislaufstillstand herbeigeführt wurde. Das Rückenmark und das Gehirn wurde nun von dorsal freigelegt und in toto entnommen. Die gewonnenen Präparate wurden sofort auf Trockeneis eingefroren und bei –80°C gelagert. Bei allen Präparaten wurde unabhängig vom Verwendungszweck die Operationsstelle geschnitten und nach Thioninfärbung lichtmikroskopisch die Qualität der Operation beurteilt.

4.5.1 Isolation des Gewebes

Um die mRNA für die *differential display PCR* aus dem Gewebe zu isolieren, wurden die entnommenen Gehirne unter RNase freien Bedingungen (Einmalhandschuhe; Instrumente und Arbeitsflächen mit einem RNase-Inhibitor gereinigt; Verwendung von sterilen Gefäßen und Werkzeugen) in die Schneidvorrichtung des Kryostaten (SLEE, Mainz) eingebettet (Einbettmedium, Leica). Das so vorbereitete Material wurde nun, unter genauer Berücksichtigung der Parallelität der Schnittflächen, von oral nach kaudal bei -10°C in 20 µm Schnitten bis zum Erreichen der jeweiligen Zielregion (Ncl. N. facialis; Ncl. dorsalis Clarke; Ncl. ruber) geschnitten. Die Schnittebene wurde durch Färben einiger exemplarischer Schnitte mit Thionin, lichtmikroskopischer Betrachtung und Vergleich mit einem Neuroanatomieatlas der Ratte [45] ermittelt. Nach Erreichen der jeweiligen Ebene wurde das entsprechende Kerngebiet beidseitig (operierte und nicht- operierte Seite) mit einer sterilen Kanüle (16 G) ausgestanzt. Die so gewonnenen Stanzzylinder wurden in je ein steriles Eppendorf Reaktionstube überführt, nach Läsionsseite gekennzeichnet und bei –80°C gelagert.

Von dem verbliebenen Gehirn wurden einige Kontrollschnitte angefertigt , erneut mit Thionin gefärbt und unter dem Lichtmikroskop ermittelt, ob das Kerngebiet auf beiden Seiten vollständig ausgestanzt worden war. Die für die *in situ Hybridisierung* vorgesehenen Gehirne

und Rückenmarksproben wurden wie unter 3.4.1 beschrieben eingebettet und geschnitten. Die Schnittebene beim Nucleus dorsalis Clarke lag auf Höhe von Th12 bis L2 . Anschließend wurden die Schnitte auf vorher silanisierte Objektträger unter streng RNase- freien Bedingungen aufgenommen und bei –80°C gelagert.

4.6 RNA-Extraktion

Da die verwendeten Gewebemengen sehr klein waren, erfolgte die RNA- Extraktion nach einer Modifikation des Protokolls von Chomczynski und Sacchi [46]. Weiterhin wurden aus diesem Grund teilweise Gewebeproben der gleichen Rückenmarksseite von mehreren Tieren „gepoolt“.

Die ausgestanzten Gewebezylinder wurden unter RNase-freien Arbeitsbedingungen mit einem Glas-Teflon-Mörser in TriStar-Reagenz (Peqlab) homogenisiert und zusätzliche tRNA (Roche) hinzugefügt. Durch diesem Schritt erhöht man die gesamt RNA-Menge, was bei sehr kleinen RNA- Ausgangskonzentrationen zu einer Maximierung der durch die Reaktion gewonnenen RNA führt. Die RNA wurde mit TriStar-Reagenz und Chloroform inkubiert und durch Zentrifugation eine Phasentrennung erreicht. In der Unterphase befand sich das Phenol-Chloroform Gemisch mit gelösten Proteinen und DNA. Die Mittelphase enthielt hauptsächlich Proteine, während in der wässrigen Oberphase die RNA gelöst war. Um eine Proteinverunreinigung zu vermeide, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionstube überführt. Es wurde noch ein weiteres Mal mit TriStar® Inkubiert und wieder der Überstand abgenommen, um die vorhandene RNA möglichst komplett zu extrahieren. Die RNA wurde im Gemisch homogenisiert und mit Isopropanol präzipitiert. Der Isopropanol wurde abdekantiert und das RNA- Pellet zweimal mit eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen, um überschüssige Salze zu entfernen. Der Alkohol wurde abgegossen und das RNA-Pellet an der Luft getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurde es in Wasser aufgenommen, das zur Inaktivierung der RNasen mit 0,1% Diethylpyrocarbonat versetzt worden war (DEPC -Wasser). Die so gewonnene RNA konnte bei –20°C gelagert werden. Die Extraktionsmethode sowie die benutzten Reagenzien sind in *Tabelle 4.a* zusammengefasst.

Tabelle 4.a Extraktionsrezept

Reagenz	Konzentration	Volumen	Kommentar	Bezugsquelle
TriStar®		500µl	Das Gewebe mit einem Mörser im TriStar homogenisieren	Peqlab
t-RNA	10 mg/ml	10µl		
TriStar®		500µl	Anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren	Peqlab
Chloroform($CHCl_3$)		200µl	Gut mischen, und für 10 min inkubieren lassen	
🔄 10-15min	12.000g; RT		Überstand in neues Reaktionstube überführen	
TriStar®		100µl	Vortexen; 5min bei RT inkubieren	Peqlab
🔄 10min	12.000;RT		Überstand in neues Reaktionstube überführen	
Isopropanol		500µl	15 min bei RT inkubieren	
🔄 10min	12.000g; RT		Überstand abgießen	
Ethanol (-20°C)	70%	1ml	Vortexen	
🔄 5min	12.000g; 4°C		Vorsichtig abgießen	
Ethanol (-20°C)	70%	1ml	Vortexen	
🔄 5min	12.000g;4°C		Vorsichtig abgießen und Pellet trocknen lassen	
DEPC-H_2O		10µl		

🔄 *: Zentrifugation*

Zur Bestimmung des RNA-Gehaltes sowie eventueller Verunreinigungen wurde die RNA im Photometer (LKB Ultrospec Plus Spectrometer; Pharmcia) bei 230, 260 und 320 nm gemessen. Dazu wurde die RNA 1:100 verdünnt.

Die RNA-Menge ermittelte sich aus: $\frac{(X(260nm)) * 5}{1000} = Y\ \mu g/\mu l$

Die von uns ermittelten RNA Mengen lagen, je nach Tier, im Bereich zwischen 0,4 und 0,9 µg/µl.

4.7 Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in DNA heißt *reverse Transkription* (RT). Bei der Reaktion bedient man sich eines rekombinant hergestellten Enzyms (reverse Transkriptase), welches die Eigenschaft besitzt, RNA in DNA umzuschreiben.

Bei der *reversen Transkription* von mRNA (Messenger RNA) bedient man sich eines oligo (dThymidin) Startermoleküls (oligo dT Primer), das an den 3' poly Adenosin Teil (poly A) der mRNA bindet. Zusätzlich enthält ein solcher Primer typischerweise eine weitere willkürliche Base, um die in cDNA umgeschriebene RNA-Menge zu limitieren. Damit erhöht man die Spezifität der anschließenden ddPCR. Es ergibt sich für den Primer also die Formel: $T_{12}M$, wobei M entweder Guanosin (G), Adenosin (A), oder Cytidin (C) sein kann. Es dient der reversen Transkriptase als Ansatzpunkt für die Bildung der komplementären DNA entlang der RNA-Matrize (Template RNA). Der RNA-Strang muss für diese Reaktion in gestreckter (denaturierter) Form vorliegen. Man erreicht dies durch Erhitzen des Gemisches auf 70°C und schnelles Abkühlen auf Eis. Bei dieser Reaktion muss darauf geachtet werden, dass die Versuchsbedingungen RNase- frei sind. Zum zusätzlichen Schutz der RNA verwendet man einen RNase- Inhibitor (z.B. RNA-sin®). In *Tabelle 4.b* ist das für die Versuche RT-Protokoll aufgeführt.

Tabelle 4.b RT-Protokoll

Reagenz	Konzentration	Volumen	Kommentar	Bezugsquelle
RNA	2µg	6µl		
T11A (Primer)	50 pmol/µl	3,75µl		MWG
RNA-sin®	40 U/µl	2µl	Für 10min auf 70°C erhitzen; direkt auf Eis stellen und auf Eis weiterpipettieren	Roche
AMV Puffer	5x	6µl		Peqlab
dNTP	2mmol	7µl		Peqlab
MgCl	50mmol	1µl		Peqlab
DEPC-H_20		3,25µl		
RNA-sin®	40 U/µl	2µl		Roche
AMV-RT	30 U/µl	1µl		Peqlab

∑= 32µl

Im Thermocycler (Biometra) erfolgte die reverse Transkription nach folgendem Programm (s *Tabelle 4.c)*:

Tabelle 4.c Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	42°C	60min	-
2	94°C	5min	-
3	4°C	∞	-

4.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)* ist eine 1984 von Kary Mullis entwickelte molekularbiologische Methode, die eine sehr schnelle Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA-Strängen ermöglicht [47]. Zwei Oligonukleotide werden jeweils komplementär zu einer kurzen Sequenz in einem Strang des gewünschten DNA-Segments synthetisiert, wobei sich die zu amplifizierende Sequenz genau zwischen den beiden Oligonukleotiden befindet und flankierend zur amplifizierenden Sequenz positioniert. Diese synthetischen Oligonukleotide dienen als Startermolekül (Primer) für die in-vitro-Replikation des DNA-Segmentes.

Isolierte Matrizen-DNA (Template) wird zur Denaturierung auf 92 bis 95°C erhitzt und dann in Gegenwart eines großen Überschusses des Primers auf 40 bis 65°C abgekühlt. Hierbei erfolgt die Hybridisierung des Primers mit der komplementären DNA (Annealing). Das hitzestabile Enzym Taq-DNA-Polymerase verlängert unter Verwendung der vier verschiedenen Desoxynucleosidtriphosphate den komplementären Strang bei 72°C (Extension). Die 3'-Hydroxylenden der Primer dienen hierbei als Ausgangspunkt für die Neusynthese. Dieser Vorgang wird zyklisch wiederholt, so dass der Genabschnitt exponentiell vervielfältigt wird. Man erhält auf diese Weise ca. 10^6 Kopien nach 25 Zyklen. Diese DNA-Menge lässt sich leicht isolieren und klonieren. Das Prinzip der PCR ist in *Abbildung 2* schematisch dargestellt.

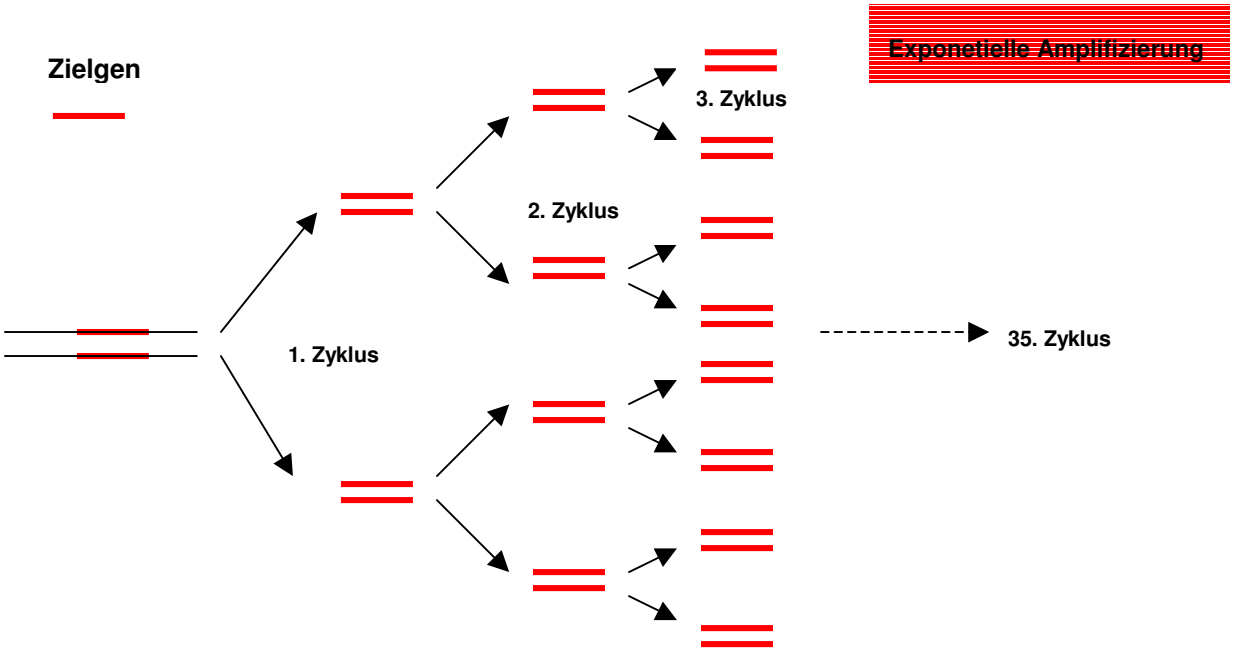


Abbildung 2: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

4.8.1 Komponenten der PCR

Oligonukleotide

Oligonukleotide sollten zwischen 17 und 30 Basenpaaren (bp) lang sein. Sie dürfen in sich keine Symmetrie besitzen, keine Primer-Dimere bilden und sollten ein ausgewogenes Basenverhältnis haben und spezifisch für die zu amplifizierende Gensequenz sein. Nach Saiki sollte die Primer-Konzentration in einem Bereich von 0,1 bis 1µM liegen und in einem 10^6- bis10^7-fachen Überschuss im Vergleich zum Template eingesetzt werden [48].

Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs)

Alle vier verschiedenen Basen müssen im gleichen Verhältnis vorliegen, da es sonst zu einem Fehleinbau durch die DNA-Polymerase kommt. Die Konzentration der dNTPs sollte bei 200 µM liegen, da die Aktivität der Taq-Polymerase sonst sinkt [49].

Reaktionspuffer

Die optimale $MgCl_2$-Konzentration für die jeweiligen Primerpaare zu ermitteln, ist besonders wichtig, da durch seine positive Ladung das negativ geladene Phosphatrückrat der

einzelsträngigen DNA stabilisiert wird [50]. Alle übrigen Pufferkomponenten wie KCl Tris-Cl und Triton spielen eher eine untergeordnete Rolle, und Konzentrationsschwankungen haben auf das Reaktionsergebnis weniger Einfluss.

Template

Beim Template kommt es vorrangig auf Reinheit und Konzentration an. Verunreinigungen durch Harnstoff, Natrium Acetat, Alkohol oder Agarosegelresten vermindern die Effizienz der PCR. Die Konzentration des Templates sollte normalerweise im Bereich von etwa 100 ng liegen. Bei höheren Konzentrationen soll es zu Rehybridisierungen des Templates kommen, wodurch eine Anlagerung des Primers verhindert wird.

Taq- Polymerase

Im Unterschied zu früher verwendeten Polymerasen, ist die heute verwendete, aus dem thermophilen Bakterium Thermus aquaticus gewonnene Taq- Polymerase hitzestabil und übersteht die häufigen Temperaturschwankungen während der PCR relativ problemlos. Es ist bekannt, dass sie keine Korrekturlesefähigkeit besitzt und somit eine Fehlerrate von 2×10^{-4} Nukleotiden pro Zyklus aufweist. Mittlerweile sind jedoch auch Taq-Polymerasen mit Korrekturlesefähigkeit im Handel erhältlich. Auch bei der Taq- Polymerase spielt die Konzentration eine Rolle, da eine Erhöhung dieser bis zu einem bestimmten Punkt die Effizienz der PCR zu steigern vermag, aber die Amplifikation von nichtspezifischen PCR-Produkten auf Kosten der Templatevervielfältigung ebenso steigt.

Im Allgemeinen wird von einer Taq-Konzentration von 0,5-1 U/12,5 µl Reaktionsansatz als optimal ausgegangen. Das in diesen Versuchen benutzte PCR-Protokoll ist in *Tabelle 4.j* zusammengefasst.

4.9 Differential display PCR (ddPCR)

Die *differential display Polymerase-Kettenreaktion (ddPCR)* ist eine von Liang und Pardee entwickelte Methode, um Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen verschiedenen Zelltypen zu untersuchen [36]. Das Prinzip beruht darauf, die durch die reverse Transkription erhaltene cDNA an ihrem 5’ Hydroxylende wieder den bei der reversen Transkription verwendeten oligo (dT) Primer zu anzulagern, an ihrem 3’ Hydroxylende aber einen willkürlichen Primer einzusetzen. Verbunden mit einer niedrigen Anlagerungstemperatur (Annealing Temperature) bindet dieser willkürliche Primer sehr unspezifisch und erlaubt somit viele verschiedene cDNA-Fragmente zu vervielfältigen. Im Einzelnen besteht dieser Primer typischerweise aus 13Thymidin-Basen, gefolgt von einer der vier verschiedenen Basen am 5’-Ende des Primers. Die in den Anfängen der *ddPCR* verwendeten zweibasigen

Primer finden heute keine Verwendung mehr. Sie waren historisch bedingt, da die ursprünglich geklonte marine Thymidin-Kinase lediglich 11 Aminosäuren in ihrem Poly-A-Schwanz enthielt und einbasige Primer sich nicht an das 3'-Ende anlagern konnten. Nachdem man eine weitere Base am 3' Ende hinzugefügt hatte, zeigte sich, dass diese Art von Primern sogar besser war als die bisherigen. Der entscheidende Vorteil ist die geringere Anzahl der PCR-Zyklen, die benötigt werden, da mit jedem zusätzlichen Zyklus auch die Hintergrundintensität durch ungerichtete Vervielfältigung von DNA Fragmenten erhöht wird.

Durch Kombination von mehreren willkürlichen Primern (s.Abb.) wird es somit ermöglicht, einen großen Teil der cDNA unselektiv zu vervielfältigen. Die so erhaltenen Proben werden je zweimal (Duplos) auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Mittels einer angelegten Spannung erfolgt die Auftrennung der einzelnen Fragmente nach ihrer Größe. Durch die unterschiedlichen Laufweiten der cDNA ist es möglich, aus verschieden behandelten Zellen die differentiellen Exprimierungen anhand des Bandenvergleichs zu ermitteln. Als „differntiell exprimiert" wurden nur solche Banden gewertet, bei denen das gesamte Duplo die selbe Regulation aufwies. Proben, bei denen nur je eine Bande einen Unterschied im Vergleich zur Kontrollseite zeigte, wurden nicht als „differentiell exprimiert" eingestuft. So gewonnene differentiell exprimierte Fragmente können aus dem Gel ausgeschnitten und weiterverarbeitet werden.

Die Banden können auf verschiedene Art und Weise sichtbar gemacht werden. Bei dieser Arbeit wurde die Methode von radioaktiv (^{35}S) markierten dATPs verwendet. Diese werden von der Taq-Polymerase während der PCR in den DNA-Strang eingebaut und schwärzen später einen auf das fertige Gel aufgelegten Röntgenfilm. Eine schematische Darstellung dieses Prinzips findet sich in *Abbildung 3*. Die Reaktion im Einzelnen erfolgte im Isotopen-Labor und es wurde die sog. „hot start" Methode angewandt, um die Taq-Polymerase zu schonen und eine höhere Anfangsspezifität zu erreichen [51]. Eine Übersicht über das in diesen Versuchen verwendeten Rezeptes, die einzelnen Temperaturschritte des Thermocyclers und der benutzten Primer findet sich in den *Tabellen 4.d-f*.

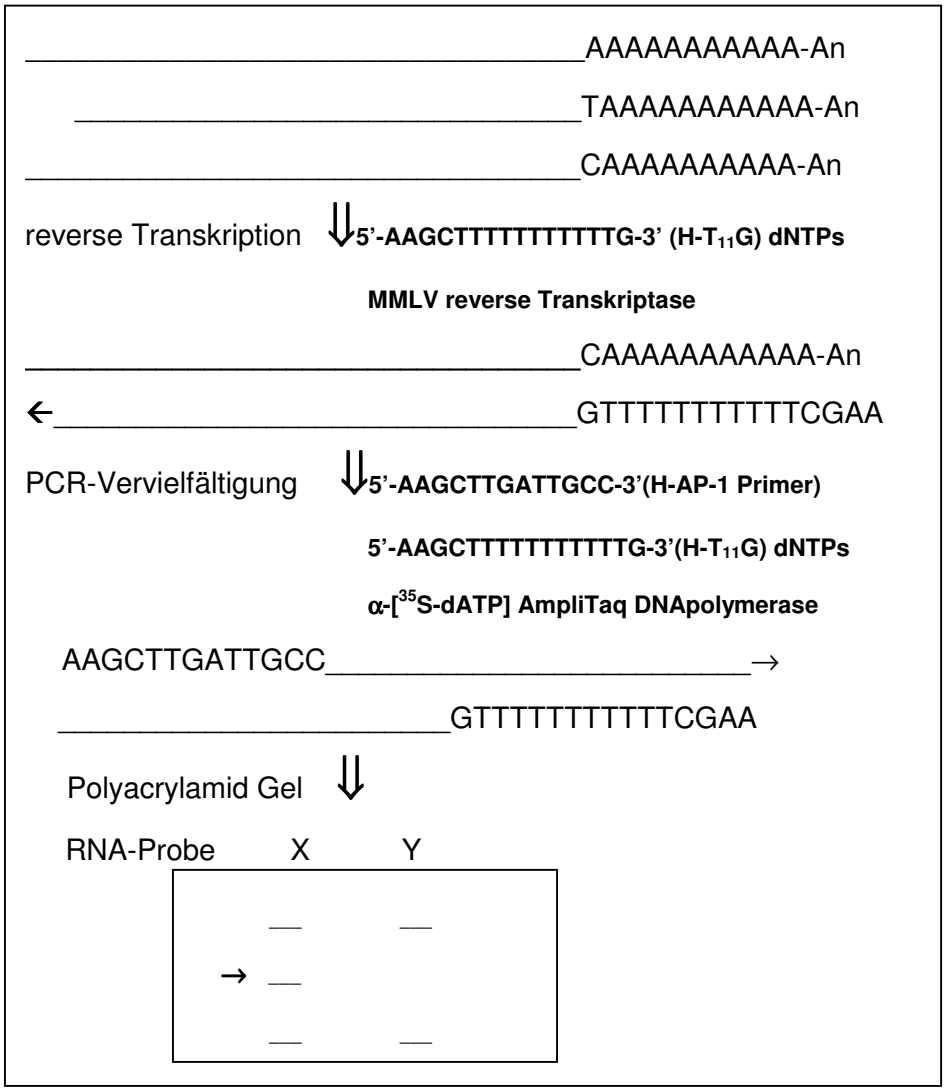


Abbildung 3: Schematische Darstellung der RT und des ddPCR- Prinzips

Tabelle 4.d ddPCR Rezept

Reagenz	Konzentration	Volumen	Bezugsquelle
Puffer	10 x	1,25 µl	Sigma
dNTP (nicht radioaktiv)	0,2 mM	1,25 µl	MWG
$MgCl_2$	50 mmol	1–3 mmol/Ansatz	Sigma
T11A		1,25 µl	MWG
Arbitrary Primer	2 pmol	1,25 µl	MWG
cDNA		~ 0,5 µl	
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,1 µl	Sigma
^{35}S-dATPs	1000 Ci/mmol	0,5 µl	Amershan
DEPS-H_2O		~ 5,5 µl (bis 12,5 µl)	_____

Σ=12,5 µl

Tabelle 4.e ddPCR Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	2 min	____
2	91°C	10 min (+1min/Zyklus)	48x
3	40°C	20 sek	
4	72°C	40 sek	Rücksprung zu Schritt „2“
5	72°C	5 min	

Tabelle 4.f Verwendete Primer

Oligo dT- Primer:	
HT11A	AAGCTTTTTTTTTTTA
Willkürliche Primer:	
HAP 25	5'- AAGCTTTCCTGGA-3'
HAP 26	5'- AAGCTTGCCATGG-3'
HAP 27	5'- AAGCTTCTCTGG-3'
HAP 28	5'- AAGCTTACGATGC-3'
HAP 29	5'- AAGCTTAGCAG-3'
HAP 30	5'- AAGCTTCGTACGT-3'
HAP 31	5'- AAGCTTGGTGAAC-3'
HAP 32	5'- AAGCTTCCTGCAA-3'

4.9.1 Polyacrylamidgel

Für die Auftrennung der bei der ddPCR gewonnenen Fragmente wurden Polyacrylamidgele verwendet, da sie im Gegensatz zu Agarosegelen hochauflösender sind und somit eine bessere Differenzierung auch bei geringen Größenunterschieden der cDNA-Fragmente erlauben [52].

Es wurden zwei verschiedene Gelarten verwendet:

Ein 6% Polyarcylamidgel (PAA) mit 2,5% TBE-Puffer und ein PAA-Gel mit TBE-Pufferkonzentrationsgefälle (0,5% auf 2,5%). Das letztere Gel hat den Vorteil, dass es eine noch bessere Auftrennung der cDNA-Fragmente erlaubt. Die genaue Zusammensetzung ist aus *Tabelle 4.g* und *4.h* ersichtlich. Die angelegte Spannung betrug 300 mA bei 3000 V und 60 W. Die Laufzeit variierte zwischen 2,5 und 3,5 h.

Tabelle 4.g PAA-Gel 2,5% TBE-Pufferkonzentration

Reagenz	Konzentration	Volumen	Bezugsquelle
Harnstoff	100%	46 g	Sigma
PAA	40%	15 ml	
TBE	10 x	25 ml	
Aqua dest.		~ 50 ml	
Temed		100µl	Sigma
APS		100µl	Sigma

∑=100 ml

Tabelle 4.h PAA-Gel 0,5% TBE-Pufferkonzentration

Reagenz	Konzentration	Volumen	Bezugsquelle
Harnstoff	100%	46 g	Sigma
PAA	40%	15 ml	
TBE	10 x	5 ml	
Aqua dest		~ 60 ml	
Temed		100 µl	Sigma
APS		100 µl	Sigma

∑=100 ml

Im Anschluss daran wurde das Gel mit einer beheizten Vakuum-Trockenmaschine getrocknet. Nach dem vollständigen Durchtrocknen wurde das Gel in dünne Kunststofffolien gehüllt, um das Festkleben von Gelresten am Röntgenfilm zu verhindern. Das so präparierte Gel wurde zusammen mit einem Röntgenfilm für ein bis zwei Tage in einer Röntgenkassette inkubiert. Der Röntgenfilm wurde mithilfe einer Entwicklungsmaschine (Cronex T6 Processor; DuPont) entwickelt.

4.10 Aufreinigung der Banden

Eindeutig differentiell exprimierte Banden (differentielle Expression in beiden Duplos; vgl. Abb.5) wurden aus dem ddPCR-Gel herausgeschnittenen, und für die Weiteruntersuchung der DNA mussten sie aus dem Gel eluiert werden. Dazu wurden die Banden in einzelnen Reaktionsgefäßen mit DEPC-Wasser aufgenommen, auf Siedetemperatur erhitzt, um das Gel mit der DNA im Wasser zu lösen. Das Gemisch wurde dann abzentrifugiert, um die Festbestandteile von der in der Flüssigphase enthaltenen DNA zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit reinem Ethanol, Glykogen und Natrium Acetat bei –80°C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand über dem Pellet verworfen. Das Pellet wurde nun mit Ethanol (85%) gewaschen und in DEPC-Wasser aufgenommen. Eine tabellarische Übersicht über diesen Versuch findet sich in Tab. 4.i.

Tabelle 4.i Bandenaufreinigung

Reagenz	Konzentration	Volumen	Kommentar	Bezugsquelle
DEPC-H_2O		10 µl	Zu den ausgeschnittenen Banden zugeben und 15 min auf Siedetemperatur erhitzen	
↻ 5 min	RT; 5000g		Den Überstand in ein neues Tube überführen	
Ethanol	100%	450 µl	hinzufügen	Merck
Glykogen	20 mmol	2,5 µl	hinzufügen	Roche
Natrium Acetat	3 mol	10 µl	Hinzufügen; dann bei –80°C für 30 min fällen	Sigma
↻ 15 min	12.000 g ; 4°C		Überstand abgießen und verwerfen	
Ethanol (-20°C)	85%	200 µl		
↻ 5-10min			Überstand abgießen	
DEPC-H_2O		10 µl	hinzufügen	

4.11 Reamplifikation-PCR

Da die aus dem Gel eluierten DNA-Menge häufig sehr gering ist, wurde sie mit Hilfe einer Reamplifikations-PCR vervielfacht. Unter Verwendung der in der *ddPCR* verwendeten Primer erfolgte die Reaktion nach folgendem Schema: (s. *Tabelle 4.j* und *4.k*)

Tabelle 4.j PCR-Rezept

Reagenz	Konzentration	Volumen	Bezugsquelle
Puffer	10 x	1,25 µl	Sigma
$MgCl_2$	50 mmol	1 µl	Sigma
dNTP	2 mmol	1,25 µl	MWG
T11A-Primer		1,25 µl	MWG
Primer (wie bei der ddPCR verwandt)		1,25 µl	MWG
H_2O		6,4 µl	
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,1 µl	Sigma

Σ= 12,5 µl

Tabelle 4.k Thermocycler-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	2 min	-
2	91°C	20 sec	
3	40°C	15 sec	
4	72°C	40 sec	25x zu Schritt 2
5	4°C	∞	

4.12 DNA-Klonierung

Klonierung bedeutet identische Kopien anfertigen. Um DNA zu amplifizieren, macht man sich die Eigenschaft einiger Bakterien zunutze, ringförmige DNA (Plasmide), unabhängig von ihrem eigenen Genom, vervielfältigen zu können. Die ausgewählte DNA wird in ein Plasmid eingebracht (ligiert) und mit ihm in einem Bakterium (meist E. coli) amplifiziert.

Die Klonierung erfordert einige allgemeine Verfahrenstechniken:

- Das Plasmid muss an genau festgelegten Stellen von Endonukleasen (Restriktions-Endonukleasen) geschnitten werden.
- Die zwei DNA-Fragmente müssen durch eine DNA-Ligase kovalent verknüpft werden.
- Das Plasmid muss in eine Wirtszelle übertragen werden.
- Diejenigen Wirtszellen, die die DNA tragen, müssen von denen, die sie nicht tragen, abgetrennt werden.
- Man muss von einem Bakterienklon ausgehen.

Restriktionsenzyme erkennen kurze (meist vier bis sechs Basenpaare) Sequenzen und schneiden die DNA an diesen Stellen (Restriktionsstellen). Dabei gibt es die Möglichkeit, dass das Enzym an beiden Enden nur gepaarte Basen zurücklässt (blunt ends) oder an jedem Ende zwei bis vier ungepaarte Basen zurückbleiben (sticky ends). Die Größe der durch Spaltung erzeugten Fragmente hängt von der Lage und der Häufigkeit ab, mit der eine bestimmte Restriktionsschnittstelle in einem DNA-Molekül auftritt.

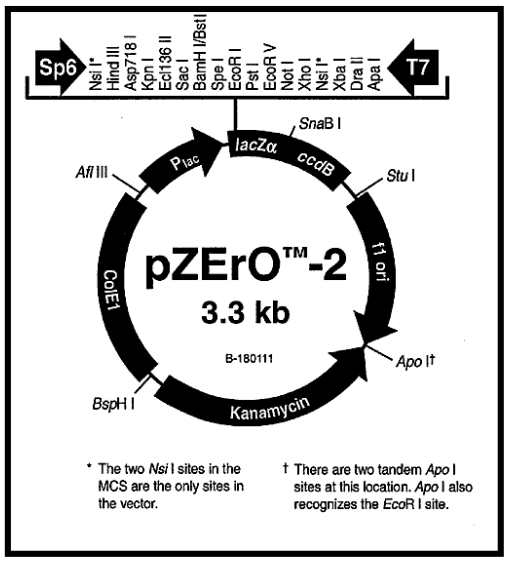


Abbildung 4 Vector pZero-2 (Invitrogen®)

Um die gewählte DNA an der Schnittstelle in ein Plasmid einzubauen, müssen die Enden des Fragments mit denselben Enzymen behandelt werden, mit denen auch das Plasmid geschnitten wurde, oder die Enden geglättet werden (polishing). Man bedient sich dazu einer PFu-Polymerase, die Basen an die Enden des DNA-Stranges anhängt und ihr somit blunt ends verleiht. Es besteht die Möglichkeit je nach Vector mit geglätteten oder nicht geglätteten Enden zu arbeiten. Die so vorbereitete Probe wird in einer weiteren Reaktion in die Plasmide ligiert und ist nun fähig, von Wirtszellen aufgenommen zu werden. Wichtig für die spätere Analyse des zu untersuchenden DNA-Fragments (Insert) sind Ansatzstellen für die Sequenzierungsprimer (im Bild mit Sp6 und T7 gekennzeichnet). Sie initiieren die in Kapitel 4.13 beschriebene Sequenzierungsreaktion in der jeweiligen Leserichtung (Pfeilrichtung in Abb.4).

Ein wichtiges Kennzeichen der einzelnen Plasmide ist die Kopienzahl, die ein Plasmid in einer Wirtszelle erreicht. Plasmide mit einer niedrigen Kopienzahl unterliegen einer eher stringenten Kontrolle der DNA-Replikation, die Replikation ist also eng an die Replikation des Wirtschromosoms gekoppelt. Plasmide mit einer hohen Kopienzahl werden als relaxiert kontrollierte Plasmide bezeichnet. Ihre Replikation ist von der des Wirtschromosoms

unabhängig. Im Allgemeinen sind stringent kontrollierte Plasmide eher groß, während relaxiert kontrollierte Plasmide klein sind. Eine weitere wichtige Eigenschaft von Plasmiden ist die genetisch determinierte Antibiotikaresistenz. Diese, auf der DNA-Ringstruktur enthaltenen Informationen, ermöglichen eine Selektion der Bakterienkolonien, indem man die Bakterien auf einem antibiotikahaltigen Nährboden ausplattiert. So kann man sicher sein, dass nur Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, auf der Platte wachsen, man folglich keine „leeren" Kolonien gezüchtet hat. Des Weiteren enthalten immer mehr Plasmidarten sogenannte „letale Gene", wie z.B. das *ccd-Gen*. Bei diesen Genen macht man sich das Prinzip der „Insertionsinaktivierung" zunutze. Die Schnittstelle für das einzufügende DNA-Fragment liegt hierbei in einer solchen Gensequenz. Wird das Fragment nun in das Plasmid ligiert, ist dieses „letale Gen" unterbrochen und folglich nicht mehr aktiv. Das bedeutet, dass nur Bakterien überleben können, die ein Plasmid aufgenommen haben, welches zudem noch das zu klonierende DNA-Fragment enthält.

Die Reaktionen erfolgten nach folgendem Schema (vgl. *Tabellen 4.l-o*):

Tabelle 4.l Polishing-Rezept

Reagenz	Konzentration	Volumen	Marke
DNA		8 µl	
dNTP	2 mmol	1 µl	MWG
Pfu Polymerasepuffer	10 x	1 µl	Promega
Pfu-DNA-Polymerase	3 U/µl	1 µl	Promega

∑=11 µl

Tabelle 4.m Thermocycler-Programm

Temperatur	Zeit	Rücksprünge
72°C	30 min	-
4°C	∞	-

Tabelle 4.n Ligation

Reagenz	Konzentration	Volumen	Kommentar	Bezugsquelle
geschnittner Vector (Pzero-1)	185 ng/µl	0,2 µl		Invitrogen
Puffer mit ATP	10 x	1 µl		NEB
Ansatz (gepolished)		5 µl		
H_2O		2,8 µl		
Ligase		1 µl	Auf Eis pipettieren	NEB

Σ= 10 µl

Tabelle 4.o Thermocycler-Programm

Temperatur	Zeit	Rücksprünge
16°C	3 h	-

Transformation:

Generell unterscheidet man zwischen einer chemischen und einer elektrischen Transformation. Während man sich bei der elektrischen Transformation einer elektrischen Spannung bedient, um die Bakterienwand durchlässig für die Plasmide zu machen, geschieht dies bei der chemischen Transformation mit Hilfe von Temperaturänderungen.

Bei der Transformation werden die vorher ligierten Proben in Bakterien (E.coli Top. F10'; Invitrogen) eingebracht, um sie zu amplifizieren. Die kompetenten Zellen sind empfindlich. Es ist daher wichtig, sehr schonend mit den Zellen umzugehen, also streng auf Eis zu arbeiten, zu starke Erschütterungen und vor allem den Luftkontakt zu vermeiden. Dazu wurden die bei –80°C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und je 5 µl des Ligationsansatzes hinzupipettiert. Es wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben zur Plasmidaufnahme für 30 sek auf 42°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Als Nährmedium wurde 450 µl SOC-Medium (20 mM Glukose; 2% Peptone; 0,5% Hefe; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; pH 7,5) hinzugefügt. Die Zellvermehrung fand für 60 min im Schüttelbad bei 37°C statt. So transformierte Zellen konnten für 1 bis 2 Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Selektion der transformierten Zellen:

Die Zellen wurden auf einem antibiotikahaltigen (Zeozin®) mit IPTG (Isopropylthiogalactosid) versetzten Nährboden (SOB) (2% Peptone; 0,5% Hefe; 10mM NaCl; 2,5 mM KCl; pH 7,5) ausplattiert und wuchsen bei 37°C im Wärmeschrank für 24 h. IPTG aktiviert im pZero-1® Vector das für die Zelle letale ccdB-Gen. Pro Transformationsansatz wurde je ein Nähragar mit 50 µl und ein Nähragar mit 100 µl ausplattiert. Durch die Antibiotikabeigabe konnte sichergestellt werden, dass nur Zellen wuchsen, die das Plasmid aufgenommen hatten, da dieses ein Resistenzgen gegen Zeozin enthielt. Die gewachsenen Zellkolonien wurden zu einem Teil in je ein Reagenzgefäß aufgenommen und in einem PCR-Ansatz gelöst (vgl. *Tabelle 4.p*). Die so gewonnenen Plasmide wurden in einer Screening-PCR amplifiziert und auf einem Agarosegel zur Kontrolle und Größenbestimmung aufgetragen.

Tabelle 4.p Sreening-PCR

Reagenz	Konzentration	Volumen	Bezugsquelle
Puffer	10 x	1,25 µl	Sigma
dNTP	2 mmol	1,25 µl	
$MgCl_2$	50 mmol	0,75 µl	Sigma
T 7-Primer	10 pmol	1,25 µl	
SP 6-Primer	10 pmol	1,25 µl	
H_2O		6,5 µl	
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,25 µl	Sigma

∑=12,5 µl

Thermocyclerprogramm siehe *Tabelle 4.k.*

4.13 Amplifikation der Klone:

Bakterienkolonien, bei denen die Screening-PCR, nach Auftrennung mit Hilfe eines Agarosegels, Fragmente in der zu erwartenden Größe gezeigt hatte, wurden mit Hilfe einer Midi-Präparation ein weiteres Mal selektiv amplifiziert, um anschließend die Plasmide zu eluieren. Dazu wurden die jeweiligen Kolonien vom Nährboden in je 20 ml SOB-Medium mit 1: 2000 Zeozin® überführt und für 12 h bei 37°C inkubiert. Von einem Teil (200 µl) des

Ansatzes wurde ein Glycerolstock angelegt (200 µl 98% Glycerol+400 µl Ansatz), der in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt wurde.

Der Rest wurde nach folgendem Präparationsrezept weiterbehandelt (*Tab. 4.q*):

Tabelle 4.q Amplifikation

Schritt	Reagenz	Konzentration	Volumen	Kommentar
1	↻ 10 min	4°C; 4000 U/min		Überstand abdekantieren
2	Puffer 1*		2 ml	5 min bei RT inkubieren
3	Puffer 2*		2 ml	Vorsichtig mischen; 5 min bei RT inkubieren
4	Puffer 3*		2 ml	Vorsichtig mischen
5	↻ 30 min	4°C; 5000 U/min		Mittelphase abnehmen und in ein neues Reaktionstube überführen
6	Isopropanol	100%	0,8 Volumenanteile	15 min bei 4°C fällen
7	↻ 20 min	4°C; 8000U/min		Überstand abdekantieren
8	Ethanol	70%	1 ml	
9	↻ 15 min	4°C, 8000 U/min		Überstand abdekantieren und Pellet trocknen

*)

Puffer 1:	2mM Tris HCl; pH 8 10 mM EDTA; pH 8 200 µg/ml RNase (10 mg/ml)	Resuspension des Pellets und Aufschließen der Zellen
Puffer 2:	0,1 M NaOH 0,1% SDS	Proteindenaturierung
Puffer 3:	3 M KAc; pH 5	Fällen der Plasmid DNA

Das Pellet wurde in 100 µl H_2O aufgenommen und bei –20°C gelagert.

Photometrisch wurde bei 230, 260 und 320 nm der DNA-Gehalt nach der in Abschnitt 4.6. beschriebenen Formel ermittelt.

4.14 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach der von Fred Sanger und Alan Coulson entwickelten Methode, deren Prinzip auf einer enzymatischen Synthese der DNA-Stränge beruht, die an einem modifizierten und markierten Nukleotid abbricht [53]. Dabei werden mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase, welches eine reine 3'-5' Aktivität besitzt, verschachtelte Fragmente synthetisiert. Diese entstehen durch den Einbau eines Didesoxynucleosidtriphosphates (ddNTP), dem an seiner 3'-Position der Desoxyribose die Hydroxylgruppe fehlt, die für die Verlängerung des DNA-Stranges notwendig ist. Die vier ddNTPs (A-,G,-T- und C-Form) werden in einer geringen Konzentration zu den normalen dNTPs zugefügt, so dass sie nur selten in ein neues DNA-Molekül eingebaut werden. Alle vier Ansätze ergeben dann eine ineinander verschachtelte Fragmentreihe. Die verwendeten ddNTPs waren mit vier verschiedenen Floureszensfarbstoffen markiert, und die Proben wurden mit Hilfe eines automatischen Sequenzer-Gerätes (ABI) analysiert. Da die Fluoreszensfarbstoffe lichtempfindlich sind und im Licht ihre Aktivität verlieren, ist es wichtig, die gesamte Sequenzierungsreaktion möglichst ohne Lichteinfall stattfinden zu lassen. Die Reaktion erfolgte nach dem in *Tabelle 4.r* und *4.s* angegebenen Protokoll.

Tabelle 4.r Sequenzier-PCR

Reagenz	Konzentration	Volumen	Bezugsquelle
Aufgereinigtes Plasmid	2 µg		
Primer (Sp6/T7)	3 pmol/µl	1 µl	MWG
Sequenzier-Mix		4 µl	ABI
H_2O		6,5 µl	

Tabelle 4.s PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Rücksprünge
1	94°C	20 sek.	-
2	96°C	15 sek.	
3	50 °C	10 sek.	
4	60 °C	4 min.	28x zu Schritt 2
5	4°C	∞	-

Anschließend wurde das Reaktiongemisch gefällt, aufgereinigt und denaturiert (s. *Tabelle 4.t*), damit die zu sequenzierenden DNA-Stränge einzeln vorliegen und so von der automatischen Sequenzermaschine gelesen werden können.

Tabelle 4.t Fällung

Reagenz	Konzentration	Volumen	Kommentar	Bezugsquelle
Ethanol	100%	50 µl	Zu dem PCR-Ansatz hinzufügen	Merck
Amoniumacetat	5 M	1,2 µl	Zu dem PCR-Ansatz hinzufügen und für 1 h bei 4°C fällen lassen	Merck
↻ 20 min	14000 g; 4°C		Überstand abpipettieren	
Ethanol	70 %	100 µl	Zum Pellet hinzufügen	Merck
↻ 5 min	12000 g; 4°C		Überstand abpipettieren und nochmals mit Ethanol 70% waschen,.anschließend Pellet trocknen lassen	
TSA		25 µl	Pellet aufnehmen	ABI

Die Proben wurden für 3 min bei 95°C denaturiert und die Basenfolge im Sequenzer ermittelt. Die so erhaltenen Basensequenzen wurden in die Gendatenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) eingegeben und mit bekannten Sequenzen verglichen.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung des Versuchaufbaus

Die Gewinnung des Gewebes für die RNA-Extraktion ist ein wesentlicher Schritt, um verlässliche und gute Ergebnisse im weiteren Verlauf der Experimente zu erhalten.

Die zunächst ausgemachte Kernregion des Ncl. dorsalis Clarke erfüllte diese Anforderung jedoch nur teilweise. Der Ncl. dorsalis Clarke befindet sich im medialen Teil der Hinterhörner im zervikalen- und thorakalen Rückenmark. Die Kernregion ist gut umschrieben und ausreichend weit vom Läsionsort entfernt. Es zeigte sich jedoch, dass die Isolation des Kernes im Rückenmark der Ratte recht schwierig ist. Durch die geringe Größe des Kernes verschiebt sich das Verhältnis von neuronalem zu glialem Gewebe, so dass man bei der Gewebeentnahme auch verhältnismäßig viel umliegendes Gliagewebe erhalten kann. Das kann bei der Isolation des Gewebes zu einer Vermischung der neuronalen Ziel-RNA mit glialer RNA führen. Die Detektion einer differentiellen Expression auf neuronaler Ebene wird hierdurch erschwert. Weiter liegen die Kerngebiete der ipsi- und kontralateralen Seite anatomisch dicht beieinander, so dass beim Stanzvorgang leicht die Mittellinie überschritten werden kann und ein Vergleich zwischen läsionierter und nicht läsionierter Seite in diesem Falle nicht gegeben wäre. Diese Erkenntnisse führten zur Kernregion des Ncl. ruber. Er erfüllt alle Anforderungen und ist im Gegensatz zum Clarke-Kern größer, mit einer höheren Dichte an Neuronen versehen und im Hirnstamm ebenfalls weit von der eigentlichen Läsionsstelle entfernt. Zudem liegen die Kerne der jeweiligen Seite weniger dicht an der Mittellinie, so dass eine gezielte Isolierung jeweils einer Seite möglich ist.

5.2 Differentiell exprimierte Gene

Im Folgenden sind die differentiell exprimierten Gene nach Funktionsgruppen eingeteilt, wobei Einzelgene der Gruppe *Verschiedenes* zugeordnet wurden (vgl. Tab.5.a).

Tabelle 5.a: Diferentiell exprimierte Gene

	Ncl.dorsalis Clarke; Ncl. ruber	**Ncl. N. facialis**
Transkriptionsfaktoren	MORF c-Fos	c-maf Deaconess transcription factor NF1(L4) NF1-X1 Jun B X TIP 5
Homeobox Gene	ISL-1 Homeobox	HOX-1 HOX- 3 HOX- 4.4
Signal Transduktion	Phospholipase A2 Na+/K+-ATP'ase (ß-1 Subunit)	Proteinphosphatase-1 binding protein GRO STAT 5b
Rezeptoren	Androgen Rezeptor T-cell receptor	
Metabolismus	Rat phosphoribosylpyrophosphate synthetase Brain Enriched Hyaluronan Binding Protein tRNA synthase Guanin Nukleotid- Releasíng Protein (MSS 4)	EF-1 EF-2 Stearyl CoA Desaturase- 1 (SCD-1) Ribosomal protein S3 Ribosomal protein L7 Pyruvat-Kinase
Zytoskelett Proteine	Vimentin	Myosin light chain (non muscular)
Verschiedene	Chaperonin Oxysterol binding protein Synuclein β Tubby-like protein (tulp1)	GAP-Junction protein PMF 31
Unbekannt	62 Sequenzen	48 Sequenzen

5.2.1 Sequenzen

5.2.1.1 Transkriptionsfaktor c-MAF

Die Sequenz des *Transkriptionsfaktors c- maf* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 94% Übereinstimmung mit *Homo sapiens short form transcription factor C-MAF (c-maf)* bei einer Stranglänge von 158bp (Accession NumberAF055376.1). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 3359-3515 (s. *Tab 5.b*).

Tabelle 5.b: Zahlen (10-150): Basennummerierung; obere Zeile: Eigenes Ergebnis; untere Zeile Genbanksequenz

10 20 30 40 50 60
GCTTTTGGTC ATTGTCAAAT GTGGAATGCT ATGGGTTTCT AGCATATAXT TTAATTCTAG
GCTTTTGGTC ATTGTCAAAT GTGGAATGCT CTGGGTTTCT AGTATATAAT TTAATTCTAG
10 20 30 40 50 60
70 80 90 100 110 120
TTTTTATAAX CTGTTAGCCC AGTTAAAATG TATGCTACAG GTAAAGGAAT GTTATAGATA
TGTTTATAAT CTGTTAGCCC AGTTAAAATG TATGCTACAG ATAAAGGAAT GTTATAGATA
70 80 90 100 110 120
130 140 150
AAATTTGAAA GAGTTAGGTT TGTGTAGCTG TAGATTTT
AA--TTTGAAA GAGTTAGGTC TGTTTAGCTG TAGATTTT
130 140 150

5.2.1.2 New England Deaconess transcription factor

Die Sequenz des *New England Deaconess Transkriptionsfaktors* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 100% mit *Rattus norvegicus New England Deaconess Transcription Factor* bei einer Fragmentlänge von 513bp (Accession number UO9229). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 678-1190 (s. *Tab 5.c*).

Tabelle 5.c: s. Tab.5.b

```
      10         20         30         40         50         60
GGGCTGCAGC TGGCAGAGGT CTTTGGAGTG CTTTCTGAAC TCACACAGCC CTGCTGGAGG
GGGCTGCAGC TGGCAGAGGT CTTTGGAGTG CTTTCTGAAC TCACACAGCC CTGCTGGAGG
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100        110        120
GGGTCCTGCA GAGACGTCAC TGAGTGAAGG ACTGGTCCTT GTTGTTGCCC TTGCACAGGC
GGGTCCTGCA GAGACGTCAC TGAGTGAAGG ACTGGTCCTT GTTGTTGCCC TTGCACAGGC
      70         80         90        100        110        120
     130        140        150        160        170        180
AGAACACCTT GGCCCAGCTC TCCATTCAGC CAGAGCTGCA TCCGGATGAA GGGTTCTCGG
AGAACACCTT GGCCCAGCTC TCCATTCAGC CAGAGCTGCA TCCGGATGAA GGGTTCTCGG
     130        140        150        160        170        180
     190        200        210        220        230        240
CCTTTCTGGG TCAGTTTGCT CCATGGTTTT GGCCTTGAGA GCATGTCGCT GACGCTGCCC
CCTTTCTGGG TCAGTTTGCT CCATGGTTTT GGCCTTGAGA GCATGTCGCT GACGCTGCCC
     190        200        210        220        230        240
     250        260        270        280        290        300
TGGGACAGGC CCAGTACCTT CTCCCCAAAG ATCCTCTGGC AAATGCCATT TTTGGCCAAC
TGGGACAGGC CCAGTACCTT CTCCCCAAAG ATCCTCTGGC AAATGCCATT TTTGGCCAAC
     250        260        270        280        290        300
     310        320        330        340        350        360
TTCTCTTTGA CCTGCCGAGT GAGCTCGATG GTGTCCACTT CCTGATACAT GTAGACCTCA
TTCTCTTTGA CCTGCCGAGT GAGCTCGATG GTGTCCACTT CCTGATACAT GTAGACCTCA
     310        320        330        340        350        360
     370        380        390        400        410        420
TACTGCTCAG GAGTCAGCGG GGGCACGGAA GGCTTGGCCG GCTTTGCCAT GGGCACAATT
TACTGCTCAG GAGTCAGCGG GGGCACGGAA GGCTTGGCCG GCTTTGCCAT GGGCACAATT
     370        380        390        400        410        420
     430        440        450        460        470        480
GGGGAAGAGG GCAGTGGGCT ATTCTGGGGT GTCTCACTGC GGCTGGCTCC AGTGAGGCTC
GGGGAAGAGG GCAGTGGGCT ATTCTGGGGT GTCTCACTGC GGCTGGCTCC AGTGAGGCTC
     430        440        450        460        470        480
     490        500        510
AGCTCTGAGC TCTGGGAGTA TGGGGACTCA GCG
AGCTCTGAGC TCTGGGAGTA TGGGGACTCA GCG
     490        500        510
```

5.2.1.3 Transkriptionfaktor NF1

Die Sequenz des *Transkriptionfaktors NF1* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 87% mit *Rattus norvegicus Transcripton Factor NF 1* bei einer Fragmentlänge von 413bp (Accession number X84210). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 180-587 (s. *Tab 5.d*).

Tabelle 5.d: s.Tab. 5.b

```
      10          20          30          40          50          60
ATTCTCCGCT CTGTCTCACC CAGGATGAGT TTCATCCTTT CATTGAAGCA CTTCTGCCCC
ATTCTCCGCT CTGTCTCACC CAGGATGAGT TTCATCCTTT CATTGAAGCA CTTCTGCCCC
      10          20          30          40          50          60
      70          80          90         100         110         120
ATGTCCGCGC NTTCGCCTAC ACATGGNTCA ACCTGCAGGC CCGAAAGCGG TAACANTTCA
ATGTCCGCGC CTTCGCCTAC ACATGG TTCA ACCTGCAGGC CCGAAAGCGG AAATACTTCA
      70          80          90         100         110         120
     130         140         150         160         170         180
NNAAGCATGA NAAGCGCATG TCGAAAGATG AGGAGAGGGC TGCGAAGGAT GACNCNGCTA
AAAAGCATGA GAAGCGCATG TCGAAAGAAG AGGAGAGGGC TGTGAAGGAT GA--ACTGCTA
     130         140         150         160         170         180
     190         200         210         220         230         240
AGCGANAAGC CTGANGTCAT NGCNCAANTG GNCTTCCCGA CTTCTGGNCA NGTTACNGAA
AGTGAGAAGC  CTGAGGTCA- AGCAAAAGTG GGCTTCCCGA CTTCTGGCCA AGTTACGGAA
     190         200         210         220         230         240
     250         260         270         280         290         300
AGATATACGA CCNGAGT—CC GATAGGATTA AGACTCTTAC AGTTACAGGG AANAAACCTC
AGATATCCGA CCCGAGTACC GAGAGGATTT TG--TTCTTAC AGTTACAGGG AAAAAACCTC
     250         260         270         280         290         300
     310         320         330         340         350         360
CATGCTGTGT TCTTTCCAAC CNACACCAGA TTGGCANTGA TGCAGANAAT NGACTGCCTC
CATGCTGTGT TCTTTCCAAC CCAGACCAGA AAGGCAA-GA TGCGGAGAAT TGACTGCCTC
     310         320         330         340         350         360
     370         380         390         400         410
CNNCAGGCAG TATNAAGTAT GGAGGTTGGA CCTNNNNATG NTGATCTTGN TCA
CGCCAGGCAG -ATAAAGTAT GGAGGTTGGA CCTCG TCATG  GTGATCTTGT TCA
     370         380         390         400         410
```

5.2.1.4 Transkriptionfaktor NF1-XI

Die Sequenz des *Transkriptionfaktors NF1-XI* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 99% mit *Rattus norvegicus Transcription Factor NF 1-X1* bei einer Fragmentlänge von 401bp (Accession number AB012235). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 31-431 (s. *Tab 5.e*).

Tabelle 5.e: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
CGCCCAGCGA TGTACTCCCC GTACTGCCTC ACCCAGGATG AGTTCCACCC GTTCATCGAG
CGCCCAGCGA TGTACTCCCC GTACTGCCTC ACCCAGGATG AGTTCCACCC GTTCATCGAG
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100        110        120
GCGCTGCTGC CTCACGTCCG AGCCTTCTCC TACACCTGGT TCAACCTGCA GGCGCGGAAG
GCGCTGCTGC CTCACGTCCG AGCCTTCTCC TACACCTGGT TCAACCTGCA GGCGCGGAAG
      70         80         90        100        110        120
     130        140        150        160        170        180
CGCAAGTACT TCAAGAAGCA CAAGAAGCGG ATGTCAAAGG ACGAGGAGCG CGCAGTGAAG
CGCAAGTACT TCAAGAAGCA CGAGAAGCGG ATGTCAAAGG ACGAGGAGCG CGCAGTGAAG
     130        140        150        160        170        180
     190        200        210        220        230        240
GACGAGCTGC TGGGCGAGAA GCCTGAGATC AAGCAGAAGT GGGCATCCCG GCTGTTGGCC
GACGAGCTGC TGGGCGAGAA GCCTGAGATC AAGCAGAAGT GGGCATCCCG GCTGTTGGCC
     190        200        210        220        230        240
     250        260        270        280        290        300
AAGCTGCGCA AAGACATCTG GCCCGAGTTC CGCGAGGACT TTGTGCTAAC CATCACGGGC
AAGCTGCGCA AAGACATCCG GCCCGAGTTC CGCGAGGACT TTGTGCTAAC CATCACGGGC
     250        260        270        280        290        300
     310        320        330        340        350        360
AAGAAGCCCC CCTGCTGCGT GCTCTCCAAC CCCGACCAGA AGGGCAAGAT CCGGCGGATT
AAGAAGCCCC CCTGCTGCGT GCTCTCCAAC CCCGACCAGA AGGGCAAGAT CCGGCGGATT
     310        320        330        340        350        360
     370        380        390        400
GACTGCCTGC GCCAGGCTGA CAAGGTGTGG CGGCTGGACC T
GACTGCCTGC GCCAGGCTGA CAAGGTGTGG CGGCTGGACC T
     370        380        390        400
```

5.2.1.5 pJun-B Gen

Die Sequenz des *pJun-B Gens* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 95% Übereinstimmung mit *Rattus norvegicus pJun* Gen mRNA bei einer Stranglänge von 369bp (Accession Number X54686) . Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 2026-2392 (s. *Tab 5.f*).

Tabelle 5.f: s. Tab 5.b

```
      10          20          30          40          50
TAGGAGACCG GCAGCACTCG ACAGCCCCGC GTTCTCAGCC TTGAGTGTCT
TAGGAGGCCG GCAGCACTTG ACAGCCCCGC GTTCTCAGCC TTGAGTGTCT
      10          20          30          40          50
      60          70          80          90          100
TCACCTTGTC CTCCAGGCGC GCGATGCGCT CCAGCTTCCG CTTCCGGCAC
TCACCTTGTC CTCCAGGCGC GCGATGCGCT CCAGCTTCCG CTTCCGGCAT
      60          70          80          90          100
     110          120         130         140         150
TTGGTGGCCG CCAGCCTGTT CCGCAGCCGC TTTCGCTCCA CTTTGATGCG
TTGGTGGCCG CCAGCCTGTT CCGCAGCCGC TTTCGCTCCA CTTTGATGCG
      110         120         130         140         150
     160          170         180         190         200
CTCCTGGTCT TCCATGTTGA TGGGGGACAC AGGCGGCGTG GCGTCGCGGC
CTCCTGGTCT TCCATGTTGA TGGGGGACAC AGGCGGCGTG GCGTCGCGGC
      160         170         180         190         200
     210          220         230         240         250
TGCGTGCCTC CGGTACGGTC TGCGGTTCCT CTTTAAAGGC  GGAAGCGCCA
TGCGTGCCTC CGGTACGGTC TGCGGTTCCT CTTTAAAGGC GGAAGCGCCA
     210          220         230         240         250

     260          270         280         290         300
CGACTCAAAC CCAGCTGTTG CCGGGTGGCC GCCCGCAAAG GGTGGTGCAT
CGGCTCAAGC CCAGCTGXTG CCGGGTGGCC GCCCGCAAAG GGTGGTGCAT
     260          270         280         290         300
     310          320         330         340         350
GTNGGAAGTA  ACTGATGGTG GCCGTCCGGT TATGAACTCC  CAATCCCNAA
GTGGGAGGTA GCTGATGGTG GCCGTXCGGG TATGAGCTCC CAGTCCCGAC
     310          320         330          340         350

     360
GGCGGTCCCG GAACCTCCA
GGCGGTCCCG GAACCTCCA
    360
```

5.2.1.6 Thyreoid Transkriptionsfaktor 1(TTF 1) interagierendes Protein 5 (TIP 5)

Die Sequenz des *TIP 5* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 96% mit *TIP 5 (Maus; Muskel)* bei ein Fragmentlänge von 81bp (Accession number AJ 309544). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 5929-6009 (s. *Tab 5.g*).

Tabelle 5.g: s. Tab 5.b

```
      10          20          30          40          50          60
ACTATAGAAC CCTCAAGCT - TGCATCAAGC TTGGTACCGA GCTCGGATCC ACTAGTAACG
ACTATAGAAT  ACTCAAGCTA TGCATCAAGC TTGGTACCGA GCTCGGATCC ACTAGTAACG
      10          20          30          40          50          60
      70          80
GCCGCCAGTG TGCTGGAATT C
GCCGCCAGTG TGCTGGAATT C
      70          80
```

5.2.1.7 Monocytic Leukemia Zincfinger Related Protein (MORF)

Die Sequenzanalyse einer differentiell exprimierten Bande aus der operierten Seite ergab eine Übereinstimmung von 93% mit der Sequenz *MORF related Gene* aus der NCBI-Gendatenbank. Die Fragmentlänge betrug 232 bp (Accession Number: BC 003894). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 1487-1717 (s. *Tab 5.h*).

Tabelle 5.h: s. Tab 5.b

```
      10          20          30          40          50          60
AATGGTGCTT AAAGAGCCCA ACCTTTGCAA GTCATCCATG TTGTTCCTTA GGCATTTTAT
AATGGTGCTT AAAGAGCCCA TCCTTTGCAA GTCATCCATG TCATTCCTTA GGCATCTTAT
      10          20          30          40          50          60
      70          80          90          100         110         120
CTTTGCTCAA TTGTTAAAGA ATGNTTTNTT GTTTTCATGG TTTTTGTATT TGTGTCTAAT
CTTTGCTCAA CTGTTAAAGA ATGGTGGCTT GTTTTCATGGG TTTTGTATT TGTGTCTAAT
      70          80          90          100         110         120
      130         140         150         160         170         180
GCACGTTTTA ACATGATAGA CGCAATGCAT CGTGTAGCTA CAGTTTTATG GAAAAGTCAA
GCACGTTTTA ACATGATAGA CGCAATGCAT CGTGTAGCTG CAGTTTTATG GAAAAGTCAA
      130         140         150         160         170         180

      190         200         210         220         230
TCTTGTAGGA NGTTGTTTTT CATGATCTTC AATAAATTTA TTCTTTAAAT TTC
TCTTGTAGGA XGTTGTTTTT CAXGATCTTC AATAAATTTT TTCTTTAAAT TTC
      190         200         210         220         230
```

5.2.1.8 C-Fos

Die Sequenz des *C-Fos* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 88% mit *cFos (Ratte)* bei einer Fragmentlänge von 285bp (Accession number X06769).Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 1707-1987 (s. *Tab 5.i*).

Tabelle 5.i: s. Tab 5.b

```
      10          20          30          40          50          60
TATAAATATC TGAGAATCCA NCTTAATAAA TAAATTAAAA ACACAATAAA ACGTTTNCAT
TATAAATATC TGAGAATCCA TCTTAATAAA TAAATTGAAA ACACAATAAA ACGTTTTCAT
      10          20          30          40          50          60
      70          80          90          100         110         120
GGAAAACTGT TAATGTCAGA ACATTCAGAC CACCTCAACA ATGCATGATC AGTAACATTA
GGAAAACTGT TAATGTCAGA ACATTCAGAC CACCTCAACA ATGCATGATC AGTTACATGA
      70          80          90          100         110         120
     130         140         150         160         170         180
CAATGAACAT TGATGTTTGA ANAAAAACTA CAGTACATGG ATATAGCTAT TTATTTCTAT
CAATGAACAT GGACGCT---  -GAAGAGCTA CAGTACGTGG ATATAGCGAT TTATTTCTAT
     130         140         150         160         170         180


     190         200         210         220         230         240
CTACCAGAAA ATAAAGTCGT ATCTTTCCTT AGTATAATAT TGGTCNTTTC T-AATCCGAA
CTACCGGAAA ATAAAGTTCT ATCTTTTCTT AGTTTAATAT TGGTCATTTC TAAATTGGAA
     190         200         210         220         230         240


     250         260         270         280
CACCCTATTG CCAGAAACAC CGTAGTTATG GTTAAAATCC GCTGC
CACACTATTG CCAGGAACAC AGTAGGTATT GTTAAAATCA GCTGC
     250         260         270         280
```

5.2.1.9 Hox- 1

Die Sequenz des *Hox-1 Gens (Sprague- Dawley- Ratte)* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 92% Übereinstimmung bei einer Stranglänge von 113bp (Accession Number S76296) . Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 1-111 (s. *Tab 5.j*).

Tabelle 5.j: s. Tab 5.b

```
        10          20          30          40          50          60
CTTCATTCTC CGGTTCTGAA ACCAGATCTT GACCTGCCGC  TCGGCCAAGC AGAGGTGAGC
CTTCATTCTC CGGTTCTGGA ACCAGATCTT GACCTGGCGC   TCGGACAAGC AGAGGTGAGC
        10          20          30          40          50          60
        70          80          90          100         110
GATCTCGATX  CGGCGGCGCC  GGGCGTCAGG TATXGGTTAA AGTGGAATTC
GGXXGTCAGG CGGCGGCGCC  GATCTCGATG  TATCGGTTAA AGTGGAATTC
        70          80          90          100         110
```

5.2.1.10 Hox-3

Die Sequenz des *Hox-3 Gens (Sprague- Dawley- Ratte)* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 94% Übereinstimmung bei einer Stranglänge von 104bp (Accession Number S76303) . Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 55-158 (s. *Tab 5.k*).

Tabelle 5.k: s. Tab 5.b

```
        10          20          30          40          50
AGATTTTGAC CTGCCGCTCA GTGAGATTGA GAACACGGXC CACCTCTGAC
AGATTTTGAC CTGCCGCTCA GTGAGATTGA GAACACGGGC CACCTCGTAC
        10          20          30          40          50
        60          70          80          90          100
CGATCCCTAG TTAAATACAT ATTGAAGAGA AACTCCTTCT CTAGCTCCAG C
CGATCCCTAG TTAAATACAT ATTGAAGAGA AACTCCTTCT CCAGTTCCAG C
        60          70          80          90          100
```

5.2.1.11 Hox 4.4

Die Sequenz des *Hox 4.4* Gens wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 98% mit *Hox 4.4 (Maus; Muskel)* bei ein Fragmentlänge von 69bp (Accession number X62669). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 8572-8504 (s. *Tab 5.l*).

Tabelle 5.l: s. Tab 5.b

```
        10          20          30          40          50          60
TTTGTTCAGA TCAGCATTTA TTTGTAGGAA GCGGTAACAT TTACAACTGG TCCTCAGGCA GGAATATGG


TTTGTTCAGA TCAGCATTTA TTTGTTGGAA GCGGTAACAT TTACAACTGG TCCTCAGGCA GGAATATGG
        10          20          30          40          50          60
```

5.2.1.12 ISL-1 Homeobox Gen

Die Sequenz des ISL-1 Homeobox Gens wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 89% mit *Rattus norvegicus ISL-1 Gen* bei ein Fragmentlänge von 288bp (Accession number NM_017339). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 606-889 (s. *Tab 5.m*).

Tabelle 5.m: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
CTCAGTACTT TCCAGGGCGG CTGGTAACTT TGCACCTCAA CTGGGTTAGC CTGTAAACCA
CTCAGTACTT TCCAGGGCGG CTGGTAACTT TGCACCTCAA CTGGGTTAGC CTGTAAACCA
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100        110        120
CCATCATGTC TCTCCGGACT ANCAGCCACC ATGGGANTTC CTGTCATCCC CTGGATANTA
CCATCATGTC TCTCCGGACT AGCAGCCACC ATGGGAGTTC CTGTCATCCC CTGGATATTA
      70         80         90        100        110        120
     130        140        150        160        170        180
ATTTTGTCGT TGGGTTGCTG CTGCTGGANC TGCTTCATCA TGANNCTGCG TTTCTTGTCC
GTTTTGTCGT TGGGTTGCTG CTGCTGGAGC TGCTTCATCA TGATGCTGCG TTTCTTGTCC
     130        140        150        160        170        180


     190        200        210        220        230        240
TTGCACCTCN NGTTTTNAAA CCACACACAC CCGNATCACN CAGGGACNGA GGCCGGTCNT
TTGCACCTCT T G TTTTGAAA CCAGAC- ----C CGGATGACTC GGGGACTGAG GCCGGTCA----
     190        200        210        220        230        240
     250        260        270        280
CTCCACTAGT NGCTCCTACA TGAACNCATC TNGCNGANGG TNGGCTGC
CTCCACTAGT TGCTCCTTCA TGAGCGCATC TGGCCGAGGG TTGGCTGC
     250        260        270        280
```

5.2.1.13 Phosphatase 1 Binding Protein PTG

Die Sequenz des *Phosphatase 1 Binding Protein* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 95% mit *Phosphatase 1 Binding Protein (Maus; Muskel)* bei einer Fragmentlänge von 66bp (Accession number U89924). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 1097-1162 (s. *Tab 5.n*).

Tabelle 5.n: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
GCTATGCATC AAGCTTGGTA CCG TTCTCGG ATCCACTAGT NACGGCCGCC AGTGTGCTGG AATTCT
GCTATGCATC AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT AACGGCCGCC AGTGTGCTGG AATTCT
      10         20         30         40         50         60
```

5.2.1.14 Wachstums Reguliertes Onkogen (GRO)

Die Sequenz des *Wachstums Reguliertem Onkogen (GRO)* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 97% mit Rattus norvegicus mRNA für *GRO* bei ein Fragmentlänge von 531bp (Accession Number D 11444). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 365-895 (s. *Tab 5.o*).

Tabelle 5.o: s. Tab 5.b

```
      10          20          30          40          50          60
TGGTGAACGC TGGCTTCTGA CAACACTAGT TTTACACATT TTACGATTTC TATTGAGGGT
TGGTGAACGC TGGCTTCTGA CAACACTAGT TTTACACATT TTACGATTTC TATTGAGGGT
      10          20          30          40          50          60
      70          80          90         100         110         120
CCTATTTATT TTATGTATTT ATTTATTCCA CCAAGTGTGT GGTTTTTATT TTACATTAAT
CCTATTTATT TTATGTATTT ATTTATTCCA CCAAGTGTGT GGTTTTTATT TTACATTAAT
      70          80          90         100         110         120
      130         140         150         160         170         180
ATTTAACGAT GTGGATGCGT TTCATCGATG GTCGTTCAAT TCCAATTGTG CAGTTTAAAG
ATTTAACGAT GTGGATGCGT TTCATCGATG GTCGTTCAAT TCCAATTGTG CAGTTTAAAG
      130         140         150         160         170         180
      190         200         210         220         230         240
ATGGTAGGCG TTAAATATCT CGTTAAATTA ATATTTATTG GGAGACCATT AAGTGTCAAC
ATGGTAGGCG TTAAATATCT CGTTAAATTA ATATTTATTG GGAGACCATT AAGTGTCAAC
      190         200         210         220         230         240
      250         260         270         280         290         300
CACTGTGCTA GAAGGTGTTG AGCGGGAAGA AGGGCGG- AG AGATGAGAGT CTGGGATCGT
CACTGTGCTA GAAGGTGTTG AGCGGGAAGA AGGGCGGCAG AGATGAGAGT CTGGGATCGT
      250         260         270         280         290         300
      310         320         330         340         350         360
GTTTTGTGTT AGGGTGAGGA AATGTGTGAG AGGCTATGTT TGTATGTNTT GAAAAGAATG
GTTTTGTGTT AGGGTGAGGA AATGTGTGAG AGGCTATGTT TGTATGTT TT GAAAAGAATG
      310         320         330         340         350         360
      370         380         390         400         410         420
TTATTTATTG AAAGTTGTCT TTCATATNTT ATGGTCAACA TTGATGTGTT GAANCTTCCC
TTATTTATTG AAAGTTGTCT TTCATAT T TT ATGGTCAACA TTGATGTGTT GAAGCTTCCC
      370         380         390         400         410         420
      430         440         450         460         470         480
TTGGACATTT TATGTCTAGT NTGTNGGGCA CAATGCCCTT TTATATTCTT TAACCAATGC
TTGGACATTT TATGTCTAGT  TTGTAGGGCA CAATGCCCTT TTATATTCTT TAACCAATGC
      430         440         450         460         470         480
      490         500         510         520         530
TCCTTCTCGT CTCAGGACAG ACAAGTTCC NAGGACNGTT ACANNTGAAA TA
TCCTTCTCGT CTCAGGACAG AGAAGTTCC AAGGACT GTT ACAAATGAAA TA
      490         500         510         520         530
```

5.2.1.15 Phospholipase A2

Die Sequenz der *Phospholipase A 2* wurde aus einer Bande der operierten Seite einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 96% Übereinstimmung mit *Rattus norvegicus Phospholipase A 2* bei einer Stranglänge von 185 bp (Accession Number: U 38376.1). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 2459-2642 (s. *Tab 5.p*).

Tabelle 5.p: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
AAAATGCTCA GGTAAAAATG TGAGGAATGT TTAAAATACA GTATATAGCC CTATGCTTAT
AAAATGCTCA GGTAAAAATG TGAGGAATGT TTAAAATACA GTATATAGCC CTATGCTTAT
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100        110        120
GTXCAAAAAA TTCATACTGT CAGAAACTGT TGCCATGTTA TTGCATAATC AACACCATTT
GTACAAAAAA TTCATACTGT CAGAAACTGT TGCCAAGXTA TTGCATAATC AACACCATTT
      70         80         90        100        110        120
     130        140        150        160        170        180
TCACCTAACA CNCGCCTCCG TCNCCAXCAA CTCTGAGTAG CAGTCAGTCT CTTGTGCATC GTAAG
TCACCTAACA CACGCCTCCG TCCCCAGCAA CTCTGAGTAG CAGTCAGTCT CTTGTGCATA GTAAG
     130        140        150        160        170        180
```

5.2.1.16 Na/ K- ATPase

Die Sequenz der *Na/ K- ATPase* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 91% Übereinstimmung mit *Rat brain Na- ,K- ATPase beta subunit protein* mRNA bei einer Stranglänge von 49bp (Accession Number M14137). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 434-482 (s. *Tab 5.q*).

Tabelle 5.q: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40
GAACCCAAGG AGCGGGGAGA GTCCAANCNT GAACGAGGAG AGCGCNAGG
GAACCCAAGG AGCGGGGAGA GTTCAATCAT  GAACGAGGAG AGCGCAAGG
      10         20         30         40
```

5.2.1.17 STAT 5b

Die Sequenz des *STAT 5b Gens* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 93% Übereinstimmung mit *STAT 5b Gen (Maus; Muskel)* mRNA bei einer Stranglänge von 58bp (Accession Number AF 234171) . Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 13913-1385(s. *Tab 5.r*).

Tabelle 5.r: s. Tab 5.b

```
      10          20          30          40          50
AACCTGGGTC CTCTGGAAGA GCAGCCAGTG CTCGTAACCA GTGAGCCATC TCTCCAGC
AACCTGGGTC CTTTGGAAGA GCAGCCAGTG CTCTTAACCA CTGAGCCATC TCTTCAGC
      10          20          30          40          50
```

5.2.1.18 Androgen Rezeptor

Die Sequenz des *Androgen Rezeptor Gens* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 99% Übereinstimmung mit *Rat Androgen Rezeptor* mRNA bei einer Stranglänge von 257bp (Accession Number M 23264). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 2586-2841 (s. *Tab 5.s*).

Tabelle 5.s: s. Tab 5.b

```
      10          20          30          40          50          60
ATTGCAAGAG AGCTGCATCA ATTCACTTTT GACCTGCTAA TCAAGTCCCA TATGGTGAGC
ATTGCAAGAG AGCTGCATCA ATTCACTTTT GACCTGCTAA TCAAGTCCCA TATGGTGAGC
      10          20          30          40          50          60
      70          80          90          100         110         120
GTGGACTTTC CTGAAATGAT GGCAGAGATC ATCTCTGTGC AAGTGCCCAA GATCCTTTCT
GTGGACTTTC CTGAAATGAT GGCAGAGATC ATCTCTGTGC AAGTGCCCAA GATCCTTTCT
      70          80          90          100         110         120
      130         140         150         160         170         180
GGGAAAGTCA AGCCCATCTA TTTCCACACA CAGTGAAGAT TTGGAAACCC TAATACCCAA
GGGAAAGTCA AGCCCATCTA TTTCCACACA CAGTGAAGAT TTGGAAACCC TAATACCCAA
      130         140         150         160         170         180
      190         200         210         220         230         240
ACCCACCTTG TTCCCTTTTC AGATGTCTTC TGCCTGTTAT ATAACTCTGC ACTACTTCTC
ACCCACCTTG TTCCCTTTTC AGATGTCTTC TGCCTGTTAT ATAACTCTGC ACTACTTCTC
      190         200         210         220         230         240
      250
TTGCAGTGCC TTGGGGG
-TGCAGTGCC TTGGGGG
      250
```

5.2.1.19 T-Zell Rezeptor

Die Sequenz des *T-Zell Rezeptor Gens* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 88% Übereinstimmung mit *T-Zell Rezeptor (Maus; Muskel)* mRNA bei einer Stranglänge von 140bp (Accession Number AE008685). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 109315-109454 (s. *Tab 5.t*).

Tabelle 5.t: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
CTTCATAGAT NAAGTCTCAG ATCTGGTCAT ACTNTTATGA CTTTCCTCAG GGCTCTAGGT
CTTCATAGAT GGAGTCTCAG ATCTGGCTAT ACCTTAATGA ATTTCCTCAG GGCTCCAGGT
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100        110        120
ATAAACACTG GCCATGCTCC TATGCAGCCC ATGCTATCAT CCTTTGTACT GTTTAAAGCC
ATAAACACTC GCCAGGCTCC TGTTCAGCCC ATGCTAACAT CCTTTGTACT GTTTAAAGCC
      70         80         90        100        110        120
     130        140
TGNGTCAAAG TTCTTATGTA
AGGGTCAAAG TTCTTATGTA
     130        140
```

5.2.1.20 Elongationsfaktor 1 (EF1)

Die Sequenz des *Elongationsfaktors 1 (EF1)* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 99% Übereinstimmung mit *Rat transcription factor EF1(A)* bei einer Stranglänge von 529bp (Accession Number: M95792) Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 123-650 (s. *Tab 5.u*).

Tabelle 5.u: s. Tab 5.b

```
        10         20         30         40         50         60
TTAAGGTCTG CTGCCTATTT ACTGCCTTGA ACTGGAACTC CACCAGGGCC CCTAACATTT
TTAAGGTCTG CTGCCTATTT ACTGCCTTGA ACTGGAACTC CACCAGGGCC CCTAACATTT
        10         20         30         40         50         60
        70         80         90        100        110        120
GGGGCCTCCG CACCCTTTTC TCCTTCAACA ACATCAAACT CCACAGTCCC CATCTCCTAC
GGGGCCTCCG CACCCTTTTC TCCTTCAACA ACATCAAACT CCACAGTCCC CATCTCCTAC
        70         80         90        100        110        120
       130        140        150        160        170        180
ACGGCGAAGG TACTTCCTGG GGTTATTCTT TATGGCAGTC TGGTGTACAA ATACGGCTTC
ACGGCGAAGG TACTTCCTGG GGTTATTCTT TATGGCAGTC TGGTGTACAA ATACGGCTTC
       130        140        150        160        170        180
       190        200        210        220        230        240
CTTCTTTCCT GTTGATGAAA CCATATCTGT TCCTTACATC GAACCATTCT ACTGTTCCCA
CTTCTTTCCT GTTGATGAAA CCATATCTGT TCCTTACATC GAACCATTCT ACTGTTCCCA
       190        200        210        220        230        240
       250        260        270        280        290        300
AAACCTTCTT TGTGATGACT TTCTTGTCTC TGCCTCTGGG CGCAGCTGAT GTGAGGCCAC
AAACCTTCTT TGTGATGACT TTCTTGTCTC TGCCTCTGGG CGCAGCTGAT GTGAGGCCAC
       250        260        270        280        290        300
       310        320        330        340        350        360
CCGGGCTGCT GTCTGTGGAG CCAGGCGGCT GCTGGGTCTG GGTCTCACCG CTCACAGCTA
CCGGGCTGCT GTCTGTGGAG CCAGGCGGCT GCTGGGTCTG GGTCTCATCG CTCACAGCTA
       310        320        330        340        350        360
       370        380        390        400        410        420
CAGCTCCTCT CAGGTGTGAT GGGGATCAGG CCAGAGGCTG CTGCGGGGCT CTCAGGGCTC
CAGCTCCTCT CAGGTGTGAT GGGGATCAGG CCAGAXGNTG CTGCGGGGCT CTCAGGGCTC
       370        380        390        400        410        420
       430        440        450        460        470        480
TCTGAGGTCT GCTCTCCACT CCCCACTGCC GATCGAACTC CCCAACTTGC TTCTTAGTCA
TCTGAGGTCT GCTCTCCACT CCCCACTGCC GATCGAACTC CCCAACTTGC TTCTTAGTCA
       430        440        450        460        470        480
       490        500        510        520
TGATGTTTTG TGCAGGAATA CAAACCCTAA CTAAGACATG CGGGTTGCT
TGATGTTTTG TGCAGGAATA CAAACCCTAA CTAAGACATG CGGGTTGCT
       490        500        510        520
```

5.2.1.21 Elongations Faktor 2 (EF-2)

Die Analyse der Sequenz der differentiell exprimierten Bande aus der operierten Seite ergab eine Übereinstimmung von 98% mit der Sequenz *Rattus norvegicus EF-2* aus der NCBI-Genbank. Die Fragmentlänge betrug 357bp (Accession Number: AF 000576.1). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 915-1271 (s. *Tab 5.v*).

Tabelle 5.v: s. Tab 5.b

```
        10          20          30          40          50          60
TTCCTGGACA AACTGTAGGC AGCCTGGTAC TGCCACACTG CTGCACAGTG CCCGCCCATC
TTCCTGGACA AACTGTAGGC AGCCTGGTAC TGCCACAC— CTGCACAGTG CCCGCCCATC
        10          20          30          40          50          60
        70          80          90          100         110         120
AGAAGACACC TTGAGACTGT CCCCACAGTG CCCCTCTGGA GGCTGCTGGG GCCATCCTGA
AGAAGACACC TTGAGACTGT CCCCACAGTGC CCCTCTGGA GGCTGCTGGG GCCATCCTGA
        70          80          90          100         110         120
        130         140         150         160         170         180
CATCACTCAG CACTCNNTTN CTACCAATTC TATTTATTTC GGAATTACAA GGCAGCGTGA
CATCACTCAG CACTCACTTG CTACCAATTC TATTTATTTC GGAATTACAA GGCAGCGTGA
        130         140         150         160         170         180

        190         200         210         220         230         240
ATGGCCCTCT GCAGGCTGGA CTGGCAGGCC GTGGGGTGGG CAGCACACGG TGGTTAGCAT
ATGGCCCTCT GCAGGCTGGA CTGGCAGGCC GTGGGGTGGG CAGCACACGG TGGTTAGCAT
        190         200         210         220         230         240

        250         260         270         280         290         300
TTTCAGAGGG AAATAACGCA GATGTCCAAA ATTCTAAATA AATGCATTCA GAGGTTTATG
TTTCAGAGGG AAATAACGCA GATGTCCAAA ATTCTAAATA AATGCATTCA GAGGTTTATG
        250         260         270         280         290         300
        310         320         330         340         350
GGGTCCATGG CCAAGTGTAA TTCCCCCAGA GGGGGAAGTG GGGGAGTGCC TCCAGGAA
GGGTCCATGG CCAAGTGTAA TTCCCCCAGA GGGGGAAGTG GGGGAGTGCC TCCAGGAA
        310         320         330         340         350
```

5.2.1.22 Phosphoribosyl Pyrophosphat Synthetase

Die Sequenz der *Phosphoribosyl Pyrophosphat Synthetase* wurde aus einer Bande der operierten Seite einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 98% Übereinstimmung mit *Rattus norvegicus phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1* bei einer Stranglänge von 291bp (Accession Number: M31094.1). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 1687-1979 (s. *Tab 5.w*).

Tabelle 5.w: s. Tab 5.b

```
        10          20          30          40          50          60
ACACATGACA GACATTTTAT TAAGTTTCTT CTACATGAGA CAATAAGATC AAATTGTTAA
ACACATGACA GACATTTTAT TAAGTTTCTT CTACATGAGA CAATAAGATC AAATTGTTAA
        10          20          30          40          50          60
        70          80          90          100         110         120
GCCAAACAGA TCGAAGGAAG ATAAATTTTN AATACTTAAA TTAATCAAAA GGCACTACGA
GCCAAACAGA TCGAAGGAAG ATAAAAATTA AATACTTAAA TTAATCAAAA GGCACTACGA
        70          80          90          100         110         120
        130         140         150         160         170         180
CACACACACC ACCTAAAACC CACTAACTCA GAGAGAGCGG GCTAAGGAAG ATTGTGCTAT
CACACACACC ACCTAAAACC CACTAACTCA GAGAGAGCGG GCTAAGGAAG ATTGTGCTAT
        130         140         150         160         170         180
        190         200         210         220         230         240
AGCAAGTTAC CTAATGTCAA CGTTXGCAGT TACATAGCAA GAAGCAAGTC TGTCTTACAG
AGCAAGTTAC CTAATGTCAA CGTTAGCAGT TACATAGCAA GAAGCAAGTC TGTCTTACAG
        190         200         210         220         230         240
        250         260         270         280         290
AAGATTTTGT CACAAACAAT GATCACTGAG TTCAAGATAT TTGTCCAGGA AAG
AAAATTTTGT CACAAACAAT GATCACTGAG TTCAAGATAT TTGTCCAGGA AAG
        250         260         270         280         290
```

5.2.1.23 Stearyl CoA Desaturase- 1 (SCD-1)

Die Sequenz der *Stearyl CoA Desaturase- 1 (SCD-1)* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 96% Übereinstimmung mit *Rat liver stearyl-CoA desaturase* mRNA bei einer Stranglänge von 224bp (Accession Number: J02585). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 4318-4541 (s. *Tab 5.x*).

Tabelle 5.x: s. Tab 5.b

```
      10          20          30          40          50          60
CTGAGGTGAT TAGAGCCTTT TCNNNNNNNA AGCAAGTGTT TGGAGATGCA TGGCAGAGGT
CTGAGGTGAT TAGAGCCTTT TCT T T T T T T A AGCAAGTGTT TGGAGATGCA TGGCAGAGGT
      10          20          30          40          50          60
      70          80          90          100         110         120
TTTCCTGCAG ACTTGTAAAG AGCTAGATGT GTTCTAAGAC CATCTTTAGT CTACATTGCT
TTTCCTGCAG ACTTGTAAAG AGCTAGATGT GTTCTAAGAC CATCTTTAGT CTACATTGCT
      70          80          90          100         110         120
       130         140         150                 160         170         180
CTTCCCAGAG ATCTACAACT ATGACCCAGC CAAAGTGCAA GCCTACCTAC TCACTGCCAT
CTTCCCAGAG ATCTACAACT ATGACCCAGC CAAAGTGCAA GCCTACCTAC TCACTGCCAT
      130         140         150         160         170         180
      190         200         210         220
AAAAACTATT CAGGAAACCT TTTCCTGGCC TGAATGAGAT TTTG
AAAAACTATT CAGGAAACCT TTTCCTGGCC TGAATGAGAT TTTG
      190         200         210         220
```

5.2.1.24 Brain Enriched Hyaloronan Binding Protein (BEHAB)

Die Sequenz des B*rain Enriched Hyaluronan Binding Protein* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 85% mit *Rattus norvegicus BEHAB* bei einer Fragmentlänge von 932bp (Accession number Z28366). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 408-1339 (s. *Tab 5.y*).

Tabelle 5.y: s. Tab 5.b

```
      10          20          30          40          50          60
CCATCCCATG CCACGTTCAC TACCTGCGGC CGTCGCCGAG CCGCCGGGCC GCGCAGGGCT
CCATCCCATG CCACGTCCAC CACCTGAGGC CGCCGCCCAG CCGCCGGGCC GCGCCGGGCT
      10          20          30          40          50          60
      70          80          90          100         110         120
CCCCGCGGGT TAAGTGGACC TTCCTGTCCG GCGGCCGGGA GGCCGAGGTG CTAGTGGCGC
TTCCCCGAGTC AAATGGACC TTCCTGTCCG GGGACCGGGA GGTGGAGGTG CTGGTGGCGC
      70          80          90          100         110         120
      130         140         150         160         170         180
GGGGCCTACG CGTCAAGGTG AGCGAGGCCT ACCGGTTCCG CGTGGCACTG CCTGCTTACC
GCGGGCTGCG CGTCAAGGTA  AACGAAGCCT ATCGGTTCCG CGTGGCGCTG CCTGCCTACC
      130         140         150         160         170         180
      190         200         210         220         230         240
CGGCGTCACT CACCGACGTC TCCCTGGTGC TGAGTGAGCT GCGGCCCAAC GACTCAGGCA
CCGCATCGCT CACAGATGTG  TC T T TAGTAT TGAGCGAACT GCGGCCCAAT GATTCCGGGG
      190         200         210         220         230         240
      250         260         270         280         290         300
TTTACCGCTG CGAGGTCCAG CACGGCATCG ACGACAGCAG CGACGCGGTG GAGGTCAAGG
TCTATCGCTG CGAGGTCCAG CACGGTATCG ACGACAGCAG  TGATGCT G TG GAAGTCAAGG
      250         260         270         280         290         300
```

310 320 330 340 350 360

TCAAAGGGGT CGTCTTTCTC TACCGGGAGG GCTCTGCCCG CTACGCTTTC TCCTTCGCTG

TCAAAGGGGT CGTCTTCCTC TACCGAGAGG GCTCTGCCCG CTATGCTTTC TCCTTCGCTG

310 320 330 340 350 360

370 380 390 400 410 420

GGGCCCAGGA GGCCTGTGCC CGCATCGGAG CCCGAATCGC CACTCCGGAG CAGCTCTATG

GAGCCCAGGA AGCCTGTGCT CGCATCGGAG CCCGAATTGC CACCCCTGAG CAGCTGTATG

370 380 390 400 410 420

430 440 450 460 470 480

CCGCCTACCT CGGGGGCTAT GAACAGTGTG ACGCTGGCTG GCTGTCCGAC CAGACCGTGA

CTGCCTACCT CGGCGGCTAT GAACAGTGTG ATGCTGGCTG GCTGTCCGAC CAAACCGTGA

430 440 450 460 470 480

490 500 510 520 530 540

GGTATCCCAT CCAGACGCCA CGAGAGGCCT GTTATGGAGA CATGGATGGC TTCCCTGGGG

GGTACCCCAT CCAGAACCCA CGAGAAGCCT GTTATGGAGA CATGGATGGC TACCCTGGAG

490 500 510 520 530 540

550 560 570 580 590 600

TCCGGAACTA CGGAGTGGTC GACCCCGATGA CCTCTATGAT GTTTACTGTT ATGCTGAAG

TGCGGAATTA CGGAGTGGTGG GTCCTGATGA TCTCTACGAT GTCTACTGTT ATGCCGAAG

550 560 570 580 590 600

610 620 630 640 650 660

AACTAAATGG AGAGCTGTTC CTGGGTGCCC CTCCAGACAA GCTGACCTTG GAGGAGGCGC

ACCTAAATGG AGAACTGTTC CTAGGTGCCC CTCCCGGCAA GCTGACGTGG GAGGAGGCTC

610 620 630 640 650 660

670 680 690 700 710 720

GGACATACTG CCAGGAGCGG GGTGCTAAGA TTGCAACCAC CGGCCAGCTG TATGCAGCCT

GGGACTACTG TCTGGAACGC GGTGCTCAGA TCGCTAGCAC GGGCCAGCTA TACGCGGCAT

670 680 690 700 710 720

730 740 750 760 770 790

GGGATGGTGG CCTGGACCGC TGCAGCTCTG GCTGGCTGTC TGATGGCAGT GTGCGCTACC

GGAATGGCGG CTTGGACAGA TGTAGCCCTG GCTGGCTGGC TGATGGCAGT GTGCGGTACC

730 740 750 760 770 790

800 810 820 830 840 850

CCATCGTCAC CCCCAGCCAG CGCTGTGGTG GGGGCCTCCC TGGTGTCAAG ACTCTCTTCC

CCATCATCAC GCCCAGCCAA CGCTGTGGGG GAGGCCTGCC AGGAGTCAAG ACCCTCTTCC

800 810 820 830 840 850

860 870 880 890 900 910

TCTTCCCCAA CCAGACTGGC TTCCCCAACA AGCACAGCCG CTTCAACGTC TACTGCTTCC

TCTTTCCCAA CCAGACTGGC TTCCCCAGCA AGCAGAACCG CTTCAATGTC TACTGCTTCC

860 870 880 890 900 910

920 930 940

GAGACTCTGC CCAGCCTTCT GCCATCCCTG AG

GAGACTCTGC CCATCCCTCT GCCTTCTCTG AG

920 930 940

5.2.1.25 T-RNA Synthethase

Die Sequenz des *t-RNA Synthethase Gens* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 85% Übereinstimmung mit *Homo Sapiens Thronyl t-RNA Synthethase* mRNA bei einer Stranglänge von 97bp (Accession Number NM 03191). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 1730- 1826 (s. *Tab 5.z*).

Tabelle 5.z: s. Tab 5.b

```
     10         20         30         40         50         60
AGATTGATAT ACAGATAAAG GACGCTATTG GCCGCTACCA CCAGTGTGCG ACCATCCAGC
AGATTGACAT ACAGATTAAA GATGCGATTG GGCGGTACCA CCAGTGTGCA ACCATCCAGC
     10         20         30         40         50         60
     70         80         90
TGGACTTTCA GTTGCCCATC ANGTTTAACC TCACTTA
TGGATTTCCA GTTGCCCATC AGATTTAATC TTACTTA
     70         80         90
```

5.2.1.26 Guanin Nukleotid- Releasíng Protein (MSS 4)

Die Sequenz des *Guanin Nukleotid Releasing Proteins* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 97% Übereinstimmung mit *Rattus norvegicus Guanine nucleotide- releasing protein MSS4* mRNA bei einer Stranglänge von 187bp (Accession Number L10336). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 271-455 (s. *Tab 5.aa*).

Tabelle 5.aa: s. Tab 5.b

```
     10         20         30         40         50
AGCATAATCA CTTGTTCCTT AATTAGGGAC TAGAATGAAT GGCTAAACGA
AGCATAATCA CTTGTTCCTT AATTAGGGAC TAGAATGAAT GGCTAAACGA
     10         20         30         40         50
     60         70         80         90         100
GGGTTCAACT GTCTCTTACT TTCAATCAGT GAAATTGACC TTCCAGTGAA
GGGTTCAACT GTCTCTTACT TTCAATCAGT GAAATTGACC TTCCAGTGAA
     60         70         80         90         100
    110        120        130        140        150
GAGGCTGGAA TCTCCCAATA AGACXGAGAA GACCCTATGG AGCTTCAATT
GAGGCTGGAA TCTCCCAATA AGACGGAGAA GXCCCTATGG AGCTTTAATT
    110        120        130        140        150
    160        170        180
TACTAGTTCA ACTTATATAA AAACAACCTA ATGGGCT
TACTAGTTCA AXTTATATAA AAACAACCTA ATGGGCT
    160        170        180
```

5.2.1.27 Ribosomales Protein S3

Die Sequenz des *Ribosomalen Proteins S3* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 97% mit dem *Ribosomalen Protein S3 (Maus; Muskel)* bei ein Fragmentlänge von 139bp (Accession number X51536). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 681-817 (s. *Tab 5.bb*).

Tabelle 5.bb: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
TTCAAGATTT TATTAAACGT CTTTACAAGA CAACATCCAG CCTCCAGATG CAGCTGCCAA
TTCAAGATTT TATTAAACGT CTTTACAAGA CAACATCCAG CCTCCAGATG CAGCTGCCAA
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100        110        120
GACCCTGTTA TGCTGTAGGT CCACTGGCTG AGGCATGGCG GGTGGCTCTG GCTT--CCACC
GACCCTGTTA TGCTGTAGG-  CACTGGCTGA GGCATGGCGG GTGGCTCTGG GCTTCCCACC
      70         80         90        100        110        120
     130        140
CTTCTGTTCT GAGATGGGG
CTTCTGTTCT GAGATGGGG
     130        140
```

5.2.1.28 Ribosomales Protein L7

Die Sequenz für das *Ribosomale Protein L7* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 86% Übereinstimmung dem *Ribosomalen Protein L7 (Maus; Muskel)* bei einer Stranglänge von 92bp (Accession Number: X57961). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 433-524 (s. *Tab 5.cc*).

Tabelle 5.cc: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50
GCCAAGCTGT GACTGTTTAT TAACCGTCCA GATTATAAAA ATACCACGGG
GCCAAGCTGT GACTGTTTAT TAACTGACCA GATTACAAAA ATACAATGGG
      10         20         30         40         50
      60         70         80         90
AAATACCTTA GTTCATCCGX XTAATAACCG TGTTTATCTG GT
TGACACCTTA GTTCATCCGT CTAATAAGCC TGTTTATCTG GT
      60         70         80         90
```

5.2.1.29 L-Typ Pyrovatkinase

Die Sequenz der *L-Typ Pyrovatkinase* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 94% Übereinstimmung mit *Rat brain Na- ,K- ATPase beta subunit protein* mRNA bei einer Stranglänge von 74bp (Accession Number X05684). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 10791-10862 (s. *Tab 5.dd*).

Tabelle 5.dd: s. Tab 5.b

```
        10         20         30         40         50
GAGCTGGGGA CCGAACCCAG GGCCTTGTGA CTCGCTAGGC AAGACGCTCT
GAGCTGGGGA CCGAACCCAG GGCCTTGTGX CTTGCTAGGC AAGXCGCTCT
        10         20         30         40         50
        60         70
ACCGCTGAGC TAAATCCCAACCCC
ACCACTGAGC TAAATCCCAACCCC
        60         70
```

5.2.1.30 Non-Muscle Myosin Alkali Light Chain

Die Sequenz der Non Muscle Myosin Light Chain wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 99% bei ein Fragmentlänge von 207bp (Accession number S77858). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 402-608 (s. *Tab 5.ee*).

Tabelle 5.ee: s. Tab 5.b

```
        10         20         30         40         50         60
GGGGCATGAG GACAGCAACG GTTGCATTAA CTATGAAGAG CTTGTCCGGA TGGTGCTGAA
GGGGCATGAG GACAGCAACG GTTGCATTAA CTATGAAGAG CTTCTCCGGA TGGTGCTGAA
        10         20         30         40         50         60
        70         80         90        100        110        120
TGGCTGAGGA CATTTACGTG TCTCGAGCCT GCTCCTTGCC CAGTGTGAGA TTCCTGTGTG
TGGCTGAGGA CATTTACGTG TCTCGAGCCT GCTCCTTGCC CAGTGTGAGA TTCCTGTGTG
        70         80         90        100        110        120
       130        140        150        160        170        180
GCCCCAGAGG CTCCCTAATC ACAGCACCTT GCCTGTCTGG TTTCTTTTGG ATGATGTTTG
GCCCCAGAGG CTCCCTAATC ACAGCACCTT GCCTGTCTGG TTTCTTTTGG ATGATGTTTG
       130        140        150        160        170        180
       190        200
CCTTCACCAA ATAAAACTTG CTCTCTG
CCTTCACCAA ATAAAACTTG CTCTCTG
       190        200
```

5.2.1.31 Vimentin

Die *Vimentin*sequenz wurde aus einer Bande der operierten Seite einer Ratte gewonnen. Die Analyse durch die NCBI-Datenbank ergab 83% Übereinstimmung bei einer Stranglänge von 165bp (Accession Number: Y 07738.1). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 9506-9669 (s. *Tab 5.ff*).

Tabelle 5.ff: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
CAGAGAATCA AATAATCCTG TTTAAAAAAT GGGTACAGCG CTTAACAAAA  TATTCTCTAC
CAGAGAACCA AATAACCCTA CTTAAAAATG GGGTAAAGAG CTTTACAAAG AATTCTCAAC
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100        110        120
TGAAGAATAC TGAATGGCTG AGAAGCACCT AAAAAATGTT CANNATCCTT ATTCATCGTG
TGAGGAATAT TGAATGGCTG AGAAGCATCT AAAAAATGTT CAACATCCTT AGTCATCXAG
      70         80         90        100        110        120
     130        140        150        160
GTAAATACAA  ATXAAAACAA TCCTGAGATT  CTACCTCACA NCAGT
GGAAATGCCA ATCAAAACAA CCCTGAGATT CTAGCTCACA CCAGT
     130        140        150        160
```

5.2.1.32 3 Beta- Hydroxysteroiddehydrogenase Isomerase Typ II.2

Die Sequenz der *3 Beta- Hydoxysteroiddehydrogenase Isomerase TypII.2* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 99% mit *Rat liver 3 Beta- Hydroxysteroiddehydrogenase Isomerase Typ II.2* bei einer Fragmentlänge von 211bp (Accession number S63167). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 439-648 (s. *Tab 5.gg*).

Tabelle 5.gg: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
AGCCACCGCG GGTCATACGA TTAACCCAAA CTAATTATTT TCGGCGTAAA ACGTGCCAAC
AGCCACCGCG G---TCATACGA TTAACCCAAA CTAATTATTT TCGGCGTAAA ACGTGCCAAC
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100        110        120
TATAAATCTC ATAATAGAAT TAAAATCCAA CTTATATGTG AAAATTCATT GTTAGGACCT
TATAAATCTC ATAATAGAAT TAAAATCCAA CTTATATGTG AAAATTCATT GTTAGGACCT
      70         80         90        100        110        120
     130        140        150        160        170        180
AAGCCCAATA ACGAAAGTAA TTCTAATCAT TTATATAATG CACGATAGCT AAGACCCAAA
AAGCCCAATA ACGAAAGTAA TTCTAATCAT TTATATAATG CACGATAGCT AAGACCCAAA
     130        140        150        160        170        180
     190        200        210
CTGGGATTAG ATACCCCACT ATGCTTAGCC C
CTGGGATTAG ATACCCCACT ATGCTTAGCC C
     190        200        210
```

5.2.1.33 Chaperonin

Die Sequenz der *Ccte Gens für Chaperonin* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 94% mit *Ccte Gen für Chaperonin* bei einer Fragmentlänge von 76bp (Accession number AB022158). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 14209-14284 (s. *Tab 5.hh*).

Tabelle 5.hh: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
GTTTGCCCAG AAAATGTCTT AACTTGGTAA TTAACTATGC AGTGTTCTTT AAGCTTCTGG
GTTTGCCCAG AAAACGTTTT AACTTGGTAA TTAACTATGC AGTGTTCTTT AAGCTTCTGG
      10         20         30         40         50         60
      70
ATCAGTATAG AAACCT
GTCAGTGTAG AAACCT
      70
```

5.2.1.34 Oxysterol Binding Protein

Die Sequenz des *Oxysterol Binding Proteins* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 91% mit *Oxysterol Binding Protein (Maus; Muskel)* bei ein Fragmentlänge von 327bp (Accession number AB017026). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 1762- 2086 (s. *Tab 5.ii*).

Tabelle 5.ii: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
AGCNAACACC TGGACTTCTC TGCACTTTAA TAAATATNAG GCAAATTGAA GTAGTTTCTG
AGCAAACACC TTGACTTCTC  TGTACTTTAA  TAAATATCAG GCAAATTGAA GTAGTTTCTG
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100        110        120
TCCCAGTAGC TGCCAGAATA AATCCAGTCC TGTGCTCCAC TGTAGGGGTT AGGGCCTTGA
TCCCAGTAGC TGCCAGAATA AATCCAGTCC TGTGCTCCAC TGTAGGGGTT AGGACCTTGA
      70         80         90        100        110        120
     130        140        150        160        170        180
TGAAACCACC TTGTCTTCCA GTCCTCTTCT GACTTGGACC TGTTTTTGCG GGCTGCTCTT
TGGAACCACC TTGTCTTCCA GTCCTCTTCC GACTTGGACC TGTTCTTGCG GGCTGCTCTT
     130        140        150        160        170        180
     190        200        210        220        230        240
TGTTTTTCCT CGAGTCGNNN NNNNNNCTTC ACTAGCTTGA TCTATCTCTC  CGTTCTCCA T
TGCTTTTCCT CAAGCCG---TT TC T T T T CTTC ACTAGCTAGA TCTATCTCTC  C GTTCTCCA T
     190        200        210        220        230        240
     250        260        270        280        290        300
GGCTCTGATG TCAGGCCGCA GCCTGCAGTC AGTCTTGGGA AATCACGGTC TCCATCTCCT
GGCTCTGATG TCAGGCCGTA GCCTGCAGTC AGTCTTGGG-  AATCACACTC  TCCATCTCCT
     250        260        270        280        290        300
     310        320
TGTCTACCTC ATTCAAGACC ATGGCAA
TGTCGACTTC ATTCAAAACC ATGGCAA
     310        320
```

5.2.1.35 Gap Junction Membran Protein Alpha

Die Sequenz des Gap Junction Membran Protein Alpha wurde aus einer differentiell exprimierten Bande eluiert. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 86% mit *Gap Junction Protein Alpha (Maus; Muskel)* bei einer Fragmentlänge von 201bp (Accession number BC011324). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 2238-2432 (s. *Tab 5.jj*).

Tabelle 5.jj: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
CCCACACCAC AAAGATCCAC TAGGAAGGTT CAAATTTGAA  CACTGTGC--  ATTAGATTCA
CCCACACCAC AAAGATCCAT GAGGAAGGTT CAAATTTGAA CACTGTGTGA ATTCGATTCA
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100        110        120
AATCTGTATT TGTGAGTCTA GACTGCCTCT GCTTGTACCA ATAATGACAA  AACACACACT
AATCTGT------  ------GAGTTTA TACTGCCTCT GCTTGTACCA ATAATGACAA AACACACGCT
      70         80         90        100        110        120
     130        140        150        160        170        180
TACACATGCG CACATCCACA CGT--------AGA AGCGATTGTT AAATCTTGAG CATGGCTACC
TACACACTTG CACACCCACA CATAGACAGA AGCGATTGTT AAATATTGAG CATGGCTTGC
     130        140        150        160        170        180
     190        200
CTCCCTGATG CTAACTCAAA A
CTCCCTGATG CTAACTCAAA A
     190        200
```

5.2.1.36 PMF 31

Die Sequenz des *PMF31* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande gewonnen. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 97% mit *Rattus norvegicus PMF 31* bei einer Stranglänge von 238 bp (Accession Number: AB020504). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 601-839 (s. *Tab 5.kk*).

Tabelle 5.kk: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
GCCAACCATT GCCAATGTCA ATCAATCACA GTATTAGCCT CTGTTAATCT ATTTACTGTT
GCCAACCATT GCCAATGTCA ATCAATCACA GTATTAGCCT CTGTTAATCT ATTTACTGTT
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100        110        120
GCTTCTATAT ACACTCTTCA ATGCATAT--A TGCTCAAAGA TGGCAAGTTG TCCTGGGTTC
GCTTCTATAT ACACTCTTCA ATGCATATGT TGCTCAAAGA TGGCAAGTTG TCCTGGGTTC
      70         80         90        100        110        120
     130        140        150        160        170        180
TGTGAGTCCT GAGGTGGATT TAGTTCTTGA TGCTGGTGCT AGAAGTAGAG TCTTCAAATA
TGTGAGTCCT GAGGTGGATT TAGTTCTTGA TGCTGGTGCT AGAAGTAG--G TCTTCAAATA
     130        140        150        160        170        180
     190        200        210        220        230        240
CGGGCATCGG TTGTCCC--AC CCCTGTACTG TACTCCCAGT GGCCAAACTT ATTTATGCTG
CGGG--ATC--G TTGTCCCAAC CCCTGTACTG TACTCCCAGT GGCCAAACTT ATTTATGCTG
     190        200        210        220        230        240
CT
CT
```

5.2.1.37 Synuclein- Beta

Die Sequenz des *Synuclein- Beta* wurde aus einer differentiell exprimierten Bande gewonnen. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 96% mit *Synuclein- Beta (Maus; Muskel)* bei einer Stranglänge von 108 bp (Accession Number: BC 019409). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 1195-1088 (s. *Tab 5.ll*).

Tabelle 5.ll: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
ACAGACAGAT TGGCTTTATT CATGGACACA CTGGGGAGCG GCTTGGCCGC CCAXCCCGGG
ACAGACAGAT TGGCTTTATT CATGGACACA CTGGGGAGCG GCTTGGCCGC CCACCCCGGG
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100
ACACGCTCAC ACAGTGGNTX GGGGGACTCT CCATGCCACA ATCACAAC
ACACGCTCAC ACGGTGGGTG GGGGGACTCT CCATGCCACA ATCACAAC
      70         80         90        100
```

5.2.1.38 Tubby Protein

Die Sequenz des *Tubby Protein*gens wurde aus einer differentiell exprimierten Bande gewonnen. Die Analyse in der NCBI-Gendatenbank ergab eine Übereinstimmung von 90% mit *Tubby Protein (Maus; Muskel)* bei einer Stranglänge von 107 bp (Accession Number: AJ296303). Die gefundene Sequenz entsprach dem DNA-Abschnitt der Datenbank von Base 19634-19739 (s. *Tab 5.mm*).

Tabelle 5.mm: s. Tab 5.b

```
      10         20         30         40         50         60
AGCAGAGGGC TCTTTTGGAT CTGGGTAATC  CACCAGGATA GTTTCTTGCC TACGCTTGAT
AGCAGAGGGC TCTTTTAGGT CAGGGTAATC CACCAGGATT  GTTTCTTGCC TACGCTTGAT
      10         20         30         40         50         60
      70         80         90        100
ACCATCCGAA AGNTTTTTNT TTTGGATAAG TCTCTTCTGG GTAACCT
ACCATCCGAA AGG-TCATAT ATTGGATAAG TCTCTTCTGG GTAACCT
      70         80         90        100
```

5.3 Gelbeispiele

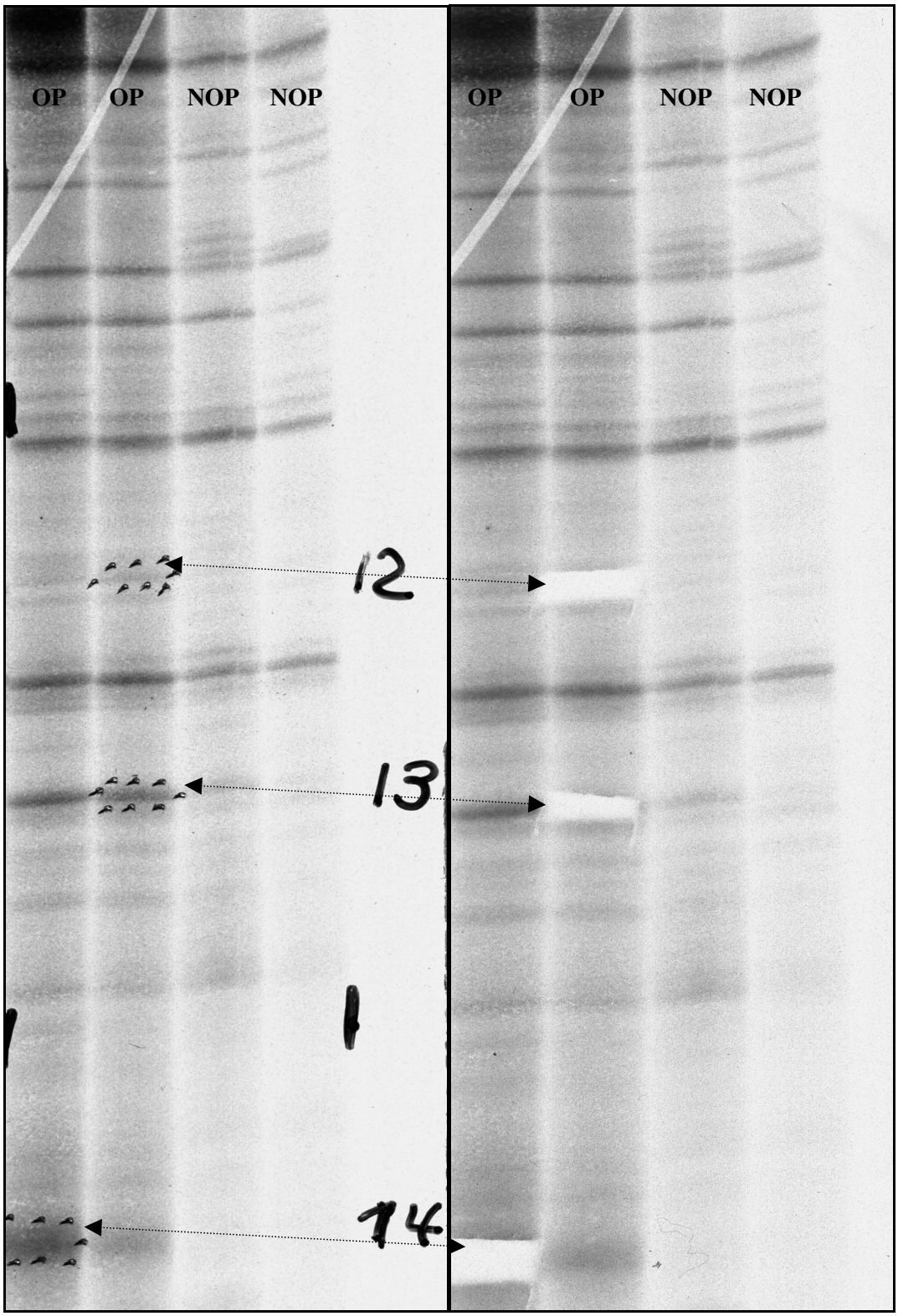


Abbildung 5 Röntgenfilm mit typischem Duplettenbandenmuster vor (links) und nach (rechts) Bandeneluierung

6 Diskussion

Im Folgenden werden die verschiedenen Proteingruppen aus Tabelle 5a beschrieben. Der Übersicht halber wird aus der Vielzahl der jeweiligen, mittels *ddPCR* gefundenen Genfragmente aus den Funktionsgruppen nur einzelne Proteine stellvertretend im Zusammenhang mit der De- bzw. Regeneration im ZNS versus PNS diskutiert.

Anschließend wird die Methode des „Genefishings“, mit Hilfe der *ddPCR* unter den verschiedenen methodischen Gesichtspunkten und im Vergleich zu anderen, zur Zeit aktuellen Möglichkeiten des „differentiellen Screenings“ diskutiert.

6.1 Transkriptionsfaktoren

Der Vorgang der Transkription, also das Übersetzen von DNA in RNA, ist der erste Schritt bei der Neusynthese von Proteinen. Es ist einer der ersten Schritte, die zusammen zur Produktion eines funktionellen Proteins führen. Darüber hinaus spielt die Transkription einer Zelle die entscheidende Rolle bei der Spezifizierung des Gewebetyps, da der Unterschied zwischen verschiedenen Gewebearten letztendlich auf die Art der Proteine zurückzuführen ist, die in den jeweiligen Zellen produziert werden. Tatsächlich findet der größte Teil dieser Spezialisierung auf der Ebene der Genregulation statt, wobei entschieden wird, welches Gen translatiert wird und welches nicht oder weniger häufig [54, 55].

Die Transkription ist von bestimmten Proteinen, sogenannten Transkriptionsfaktoren abhängig. Diese Faktoren binden an bestimmte Sequenzen der DNA, die für die Genregulierung zuständig sind. Diesem Schritt folgt zumeist eine Aktivierung der Transkription. Es gibt aber auch Beispiele negativ regulatorisch wirkender Transkriptionsfaktoren. Somit ist offensichtlich, dass das Zusammenspiel zwischen aktivierenden und hemmenden Faktoren ein kritischer Punkt bei der Kontrolle der Genexpression ist. Aus diesem Grund muss die Zelle die Aktivität der jeweiligen Faktoren regulieren. Das kann entweder in Form der Syntheseregulation des Transkriptionsfaktors, oder über eine Aktivierung desselbigen geschehen, so dass der jeweilige Faktor entweder nur in einem bestimmten Zelltyp vorhanden ist, oder nur in der bestimmten Zelle in aktivierter Form vorliegt [55].

Obwohl die Syntheseregulation der Transkriptionsfaktoren oft als Methode der Genregulierung angeführt wird, besteht hierbei das Problem, dass die Produktion dieses Faktors selbst kontrolliert werden muss. Aus diesem Grund sind viele Faktoren unterschiedlich reguliert. Sie werden zwar in allen Gewebearten produziert, ihre Aktivierung erfolgt aber nur in bestimmten Zellen. Dafür verantwortlich sind zum einen bestimmte Hormoneinflüsse oder aber auch bestimmte Metallionen, die nur in spezifischen Geweben in ausreichender Konzentration vorliegen.

Aus der zentralen Rolle der Transkriptionsfaktoren geht hervor, dass eine Fehlsteuerung zu einer Reihe von Krankheitsbildern führen kann und dass sogar ein einzelner Transkriptionsfaktor, je nach Interaktionspartner und Stimulus, sowohl hemmende als auch aktivierende Funktionen im Zellprogramm haben kann. Ein gutes Beispiel sowohl für das re-, aber auch das degenerative Potential der Transkriptionsfaktoren ist das Protein cJun. Dieser Wachstumsfaktor kann vermehrt in durchtrennten, in der Regeneration befindlichen Axonen nachgewiesen werden. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass cJun, aber auch der im Folgenden beschriebene Faktor Jun B als Folge einer Axonverletzung im ZNS und PNS verstärkt gebildet werden. Die maximale Expressionsrate wurde dabei um den zweiten Tag nach Läsion erreicht und erhöhte Werte waren bis zu 10 Tage lang nachweisbar[15, 56-58]. Neurone, die cJun vermehrt exprimieren, sind in der Lage, sich über mehrere Wochen zu regenerieren, und sie sind auch widerstandsfähiger gegen Sauerstoffmangel, wie beispielsweise beim Schlaganfall. [10]. Auf der anderen Seite ist er aber auch vermehrt in Neuronen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie den Demenzen der Alzheimer Gruppe, der Amyotrophen Lateralsklerose und der Multiplen Sklerose nachgewiesen worden[59-62]. Weiter gestützt wird diese Beobachtung durch die Tatsache, dass eine cJun-Überexpression in sich entwickelnden Neuronen zum programmierten Zelltod (Apoptose) und andersherum die Hemmung zu vermehrtem Zellüberleben führt [63-65].

6.1.1 C-MAF

Der Transkriptionsfaktor c-MAF gehört in der Gruppe der basischen- Leuzin-Reisverschlussproteine (bZIP) zu den großen MAF-Proteinen (236- 370 Aminosäuren) [66]. Sie binden an bestimmten aktivierenden Regionen der DNA, sogenannte Promotor und Enhancer, und verstärken so die Transkription verschiedener Gene, die unter anderem für die Häm- Oxigenase, die Glutathion-S-Transferase und Globuline kodieren [67, 68]. Die Familie der MAF-Proteine wird in vielen verschiedenen Geweben produziert und spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Differenzierung. So zeigte sich, dass c-MAF wichtig für die Entwicklung der Purkinjezellen des Kleinhirns ist, bei der Differenzierung der T-Vorläuferzellen zu T2- Helferzellen sowie bei der Produktion des Interleukin 4 (IL 4) mitwirkt [69, 70].

Wie in der Einführung zu den Transkriptionsfaktoren schon angedeutet, ergab sich in tierexperimentellen Versuchen, dass eine Überstimulation embryonaler Zellen mit dem cMAF Transkriptionsfaktor zu einer Transformation in eine Krebszelle führte [71-73]. Andere Arbeitsgruppen konnten derweil ein Absterben der Zellen bewirken, wenn das p53- Gen

durch cMAF überstimuliert wurde [74]. Bisher sind noch keine Arbeiten erschienen, die cMAF in Zusammenhang mit neuronaler Regeneration bringen.

6.1.2 cFos

cFos ist in der Gruppe der Transkriptionsfaktoren den sogenannten Protoonkogenen zuzurechnen. Protoonkogene kodieren im Allgemeinen Proteine, die an der normalen Teilung, dem Wachstum und der Entwicklung der Zelle beteiligt sind. Ihr Name leitet sich von den krebsinduzierenden Onkogenen mancher Retroviren ab, denen sie sehr ähnlich sind.

cFos bildet mit dem Transkriptionsfaktor cJun sogenannte Dimere und führt zu einer Aktivierung des Zellstoffwechsels. Diese Aktivierung wird in Zusammenhang mit Wachstumskontrolle, Zelldifferenzierung und maligner Transformation gebracht [75, 76]. In Versuchen mit beta-Amyloid-Protein induzierter Apoptose zeigte sich eine verstärkte cFos-Expression in den Neuronen mit kondensiertem Chromatin, was als Kennzeichen für Apoptose angesehen wird [77]. Besonders interessant ist, dass cFos zusammen mit cJun im Schlaganfallmodell, in verschieden Apoptosemodellen und in Neuronen in direkter Nachbarschaft zu Alzheimer-Plaques vermehrt nachgewiesen wurde [59, 63, 78]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass cFos als Interaktionspartner cJun in den Pfad der Degeneration und der Zelltodinitiierung lenkt.

6.1.3 Jun B Transkriptionsfaktor

Jun B ist ein Transkriptionsfaktor aus der Gruppe der Protoonkogene, der zusammen mit cFos und cJun als „immediate-early genes“ bezeichnet wird. Protoonkogenen haben die Eigenschaft, innerhalb weniger Minuten nach zelltoxischen Einflüssen wie der Hypoxie gebildet zu werden.

Über den Faktor JunB weiß man, dass er nicht nur transient nach hypoxischen Zellschäden, sondern auch nach Zellbehandlung mit dem aggregierten Amyloid-Beta-Protein (A-Beta) induziert wird [77, 79]. Aggregiertes A-beta-Protein wird für den Neuronenuntergang bei den dementiellen Krankheiten vom Alzheimertyp verantwortlich gemacht, und in Zellkulturen konnte diese Vermutung bestätigt werden [80-84]. Auch in Modellen für traumatische Gehirnschädigungen wurden bis zu zwei Stunden nach dem Traumaereignis erhöhte Jun B-mRNA Konzentrationen nachgewiesen [79]. Dabei könnte die Aktivierung von Jun B in der Nervenzelle als Versuch gewertet werden, den eigenen Zelltod zu verhindern. Dafür gibt auch es Hinweise aus einer anderen Arbeitsgruppe, die, verschiedene Transkriptionsfaktoren in Hippocampusneuronen nach Ischämie untersucht hat. Im Rahmen dieser Experimente zeigte sich, dass Jun B in den widerstandsfähigeren Neuronen der CA3- Region des Hippocampus im Gegensatz zu den vulnerableren CA1 Neuronen wesentlich länger aktiviert war [85].

6.2 Homeobox Gene

Homeobox Gene sind wichtig für die Etablierung der spezifischen Zellidentität und die topografische Organisation bei der embryonalen Ontogenese [86, 87].

6.2.1 Hox 1; Hox 3; Hox 4.4; ISL-1

Über die Homeoboxgene der Hox Familie ist für postnatale Ereignisse wenig bekannt. Es wird aber angenommen, dass während der Regeneration Programme der embryonalen Entwicklung reaktiviert werden [88].

ISL-1 ist ein wichtiger Marker während der Motoneuronentwicklung. Nach Axotomie in Neuronen des Ncl. N. facialis konnte eine verminderte Expressionsrate festgestellt werden. Dieses Phänomen wird als ein Zeichen für den Verlust der neuronalen Identität gewertet, und ISL-1 gilt als wichtiger Bestandteil bei der neuronalen Regeneration [89]. In diesem Zusammenhang erscheint es als wahrscheinlich, dass die verschiedenen Homeoboxgene eine spezifische Rolle im Rahmen der Regeneration, abhängig vom jeweiligen neuronalen Phänotypen, spielen.

6.3 Proteinmetabolismus

Die Proteinbiosynthese findet im Zytoplasma an den Ribosomen statt. Nach Bildung der m-RNA im Zellkern (Transkription) findet die Übersetzung der RNA in Aminosäuren (Translation) im Zytoplasma statt. Grundsätzlich lässt sich der Mechanismus der Proteinbiosynthese in drei Abschnitte einteilen: Start (Initiation), Kettenverlängerung (Elongation) und Stop (Termination). Für die jeweiligen Abschnitte der Proteinsynthese sind neben RNA und Ribosomen auch jeweils verschiedene Hilfsproteine notwendig, die den Synthesevorgang regulieren. Nach Abschluss der Translation liegt eine sogenannte Polypeptidkette vor. Diese Kette ist in sich relativ instabil. Deshalb lagert sie sich über Wechselwirkungen innerhalb der Kette zu dreidimensionalen Gebilden zusammen. Die Struktur ist zum Teil auch für die jeweilige Funktion des Proteins von Bedeutung und kann sich spontan ausbilden. Es gibt allerdings Proteine, sogenannte Chaperone, die diesen Faltungsvorgang unterstützen.

Der im Folgenden beschriebene Elongationsfaktor 2 (EF 2) ist bei der Proteinbiosynthese der Phase der Elongation zuzurechnen. Das Hitzeschockprotein 60 (HSP 60) bzw. Chaperonin10 ist ein Vertreter der Chaperonproteine und soll mit EF 2 stellvertretend für die weiteren zu dieser Gruppe gehörigen Proteine besprochen werden.

6.3.1 EF 2

Das Protein Elongationsfaktor 2 verhindert im aktivierten Zustand die Proteinbildung über die Reduktion der Peptidkettenverlängerung. Seine Aktivierung erfolgt über die EF 2-Kinase, die ihrerseits durch eine glutamatinduzierte Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels aktiviert wird [90].

Es konnte gezeigt werden, dass es durch zerebrale Ischämien zu einer unterdrückten Proteinsynthese in den Neuronen kommt. Gleichzeitig fand sich ein ischämievermittelter Anstieg des aktivierten EF 2. Derselbe Effekt war bei experimentell zugefügter neuronaler Schädigung durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu beobachten [91]. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Aktivierung des EF 2 als Ursache für zumindest einen Teil der Blockade der Proteinbildung verantwortlich zu machen ist [91].

In diesem Zusammenhang ist die differentielle Expression des EF2 nach zentraler Axotomie ein interessanter Hinweis auf Mechanismen, die einer Regeneration zentraler Neurone im Wege stehen. Der Effekt der Durchtrennung von Neuronen ist zwar nicht mit dem einer Ischämie gleichzusetzen, es kommt jedoch bei beiden Schädigungsarten zur Zellverletzung und zum Neuronenuntergang, so dass die oben genannten Beobachtungen als Hinweis auf eine etwaige Rolle des EF2 im Hemisektionsmodell dienen können. Die durch Zerstörung neuronaler Zellen freigesetzten zytotoxischen Substanzen sind dabei mit der oben erwähnten Wasserstoffperoxidbehandlung zu vergleichen. Es wäre vorstellbar, dass die durch das Trauma zerstörten Neurone, über die Aktivierung des EF2 in noch intakten oder sich in Regeneration befindlichen Zellen, einen Stopp oder zumindest eine Reduktion der erforderlichen Proteinsynthese verursachen. So wäre ein Anpassungsversuch der noch intakten Nervenzellen oder auch ein Bemühen um Regeneration in der verletzten Neuronenpopulation erheblich erschwert oder zum Scheitern verurteilt. Es gibt jedoch auch Arbeiten, die eine Erhöhung der Proteinsynthese nach Axotomie feststellten, so dass die oben geschilderte Annahme sicherlich zu pauschal ist [92]. Eine zweite denkbare Funktion liegt in der Umstellung vom „normalen“ Proteinmetabolismus der geschädigten Zelle auf den „regeneratorischen“ Proteinstoffwechsel. Dem EF 2 könnte dabei eine Art „Resetfunktion“ zukommen. Er wäre dann verantwortlich den „normalen“ Stoffwechsel herunterzufahren, um den Zellmetabolismus auf das „Regenerationsprogramm“ umzustellen.

6.3.2 Stearyl CoA Desaturase 1 (SCD 1)

Das Enzym SCD- 1 katalysiert die Entsättigung von Acetyl-CoA-Fettsäuren. Eines der Hauptsubstrate ist Stearyl- CoA, das durch Entsättigung zu Acetyl –CoA-Olein und weiter zu Ölsäure umgewandelt wird. Ölsäure ist neben seiner Funktion als Energielieferant in Form von Triglyceriden Bestandteil der Zytoplasmamembranen. Es wird angenommen, dass es als solcher Teil der Protein-Kinase-C abhängigen Signalkaskade ist, die an der Aktivierung regenerationsassoziierter Proteine wie dem GAP 43 beteiligt ist [93, 94]. Weiter bestätigt wurde diese Annahme durch vergleichende Studien, in denen keine Induktion der SCD- 1 in nicht regenerierenden rubrospinalen oder Neuronen des Clarkschen Kerns festgestellt werden konnte [S. Breuer, persönliche Mitteilung].

6.3.3 Chaperonin 10/ Hitzeschockprotein 60

Das Hitzeschockprotein 60 (HSP 60) oder nach der neueren Nomenklatur das Chaperonin 10 (CPN 10) ist ein durch Stress induzierbares Protein, das wichtig für die Faltung mitochondrialer Proteine und die Aufrechterhaltung der Mitochondrienfunktion ist. Tierexperimentelle Versuche zeigten, dass HSP 60 nach Ischämie der Großhirnrinde zum Zeitpunkt der Reperfusion bis zu einem Tag signifikant erhöht war. Eine Analyse des Verteilungsmusters konnten bestätigen, dass es eine Konkordanz zwischen dem zytosolischen Stress der Neurone und den Mitochondrien gab, in denen HSP 60 verstärkt exprimiert wurde [95].

Weitere Analysen des HSP 60- Verteilungsmusters weisen auf eine signifikante Abnahme in befallenden Arealen bei Motoneuronerkrankungen hin [96]. Dieser Verlust konnte in neueren Versuchen von Zamostiano et.al. durch Zugabe des aktivitätsabhängigen neurotrophen Faktors (ADNF) vermindert werden [97]. Diese Beobachtung ist insbesondere deshalb interessant, da ADNF für seine neuroprotektive Wirkung bei toxischen Einwirkungen auf das ZNS bekannt ist und als Auslöser für eine verstärkte Exprimierung des HSP 60 in den behandelten Zellen gilt. Eine solche neuroprotektive Wirkungen im Ischämiemodell ist auch im Axotomiemodell von Bedeutung, da betroffene Neurone ebenfalls Zellstress erleiden und protektive und regeneratorische Mechanismen in Gang setzen. Die genannte transiente Mehrproduktion des HSP 60 in Zusammenschau mit der gezeigten neuroprotektiven Wirkung und dem Verlust des HSP 60 in degenerierenden Neuronen deutet auf einen effektiven Schutzmechanismus der Zelle hin, der jedoch aus bisher nicht bekannten Gründen nach 24 h wieder eingestellt wird [95].

6.4 Signaltransduktion

Für die Koordination des Stoffwechsels im Körper ist es notwendig, dass die Zellen Veränderungen der Umwelt wahrnehmen und sich den verschiedenen Bedingungen anpassen. Bestimmte Zellen innerhalb eines Gewebes nehmen dabei Veränderungen der Umwelt wahr und reagieren mit einer Ausschüttung von Botenstoffen in die Umgebung. In oder an der Zielzelle binden diese Signalstoffe an Rezeptoren und lösen so eine Aktivitätsänderung der zweiten Zelle aus. Dieser Vorgang wird allgemein als Signaltransduktion bezeichnet. In fast allen zellulären Prozessen sind verschiedene Signaltransduktionswege involviert. Informationen können so über die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung bestimmter Signalproteine zwischen verschiedenen Zellkompartimenten ausgetauscht werden. Diese Informationswege können von der Zelle schnell aktiviert werden und spielen vielleicht Schlüsselrollen in der Regulation der Genexpression [98]. Beispielsweise ist über den Jak/STAT- Signaltransduktionsweg bekannt, dass er ausschließlich in regenerierenden Neuronen induziert wird und somit wahrscheinlich maßgeblich am Prozess der Regeneration beteiligt ist [99].

Die Gruppe der Stoffe, die als Botenstoffe fungieren, ist sehr umfangreich. Zu ihnen gehören spezielle Signalmoleküle wie Hormone, Neurotansmitter, Wachstumsfaktoren und viele weitere. Beispielhaft werden im Folgenden die Phospholipase A- 2 sowie das Wachstums regulierte Protein (GRO) besprochen.

6.4.1 Phospholipase A- 2

Das Enzym Phospholipase A-2 (PLA- 2) ist im Gehirn weit verbreitet und ist an der Produktion von Eicanosiden sowie dem Membranlipidstoffwechsel beteiligt. Dabei scheint es wichtig für die Erhaltung der synaptischen Plastizität und das Gedächtnis zu sein [100]. Grundsätzlich produziert die PLA-2 durch den Phospholipidabbau der zelleigenen Membranen Arachnoidonsäure, die ihrerseits die Grundlage für weitere Botenstoffe aus der Gruppe der Eicanoside bildet [101]. Die Arachnoidonsäure und ihre Derivate beeinflussen unter anderem verschiedene Kanalsysteme der Membrane, bewirken eine Veränderung der Neurotransmitterausschüttung sowie der Genexpression und dienen als Second Messenger System [102-104]. Die Aktivierung der PLA-2 geschieht direkt durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Wie in mehreren Arbeiten gezeigt werden konnte, bewirken verschiedene Entzündungsmediatoren wie Lipopolysacharide oder Interleukin 1-β [105] sowie das im Gehirn exitatorisch wirkende Glutamat sowohl einen Anstieg der Arachnoidonsäurenkonzentration als auch eine Erhöhung der PLA-2 Konzentration in Neuronen [106-108].

In den letzten Jahren liegen vermehrt Erkenntnisse vor, dass die PLA-2 an vielen Pathomechanismen vor allem im ZNS beteiligt zu sein scheint. So zeigte sich bei starker PLA-2 Aktivierung ein Membranabbau sowohl der Zytoplasma- als auch der Mitochondrienmembran, was zu einem Verlust der Membranintigrität und damit zur Zelldestabilisierung, wie auch zur mitochondrialen Dysfunktion und in Folge dessen zu einem gestörten Energiehaushalt der Zelle führt [109-111]. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten die pathophysiologischen Vorgänge genauer und fanden, dass PLA-2 indirekt durch die Produktion der Eicanoside Sauerstoffradikale freisetzt und diese sich in neuronalen Zellkulturen als toxisch erwiesen [112]. Weiterführende Arbeiten konnten nachweisen, dass PLA- 2 nach Ischämie im ZNS signifikant erhöht war und zeitlich vor der Membranzerstörung der Neurone auftrat. Genauere Untersuchungen ergaben einen direkten Anstieg nach Eintritt der Ischämie und einen weiteren Peak ein bis zwei Wochen später [113, 114]. Diese zweite Konzentrationszunahme der PLA- 2 wird mit der beginnenden entzündlichen Reaktion und der Neurodegeneration in Zusammenhang gebracht [113]. Diese These unterstützen tierexperimentelle Versuche, die durch selektive Hemmung der PLA-2 nach Ischämie und nach Reperfusion des ischämischen Areals einen geringeren Neuronenuntergang und verbesserte Lernfähigkeit der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe fanden [115].

6.4.2 Na-/K-ATPase

Die Na-/K-ATPase ist ein transmembranäres, ubiquitär vorkommendes Enzym, das für die Ionenhomeostase und die Aufrechterhaltung der Membranerregbarkeit der Zelle sorgt.

Es gibt verschiedene Arbeiten, die eine Abnahme der Na-/K-ATPase-Aktivität nach Ischämie nachwiesen [116, 117]. Als ursächlich für diese Aktivitätsminderung werden freie Radikale wie Stickstoffmonooxid (NO) oder Sauerstoffradikale angesehen. Diese werden nach Hypoxämie vermehrt freigesetzt und bewirkten in verschiedenen Versuchen eine Aktivitätsabnahme um bis zu 50% [118]. Interessanterweise wurde in einer Arbeit die mRNA- und Proteinexpression der Na-K-ATPase nach Ischämie untersucht und kein Unterschied festgestellt, so dass der Grund für die Aktivitätsminderung in einer Konformationsänderung und nicht in der verminderten Expression des Enzyms gesehen wird [116].

6.4.3 Wachstum-reguliertes-Onkogen (GRO)

Das Wachstum-regulierte-Onkogen (GRO) gehört zur Familie der CXC-Chemokine (small cytokines) aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren. Chemokine zählen zu den regulatorischen Molekülen, die an der Antwort auf entzündliche Prozesse oder Traumata beteiligt sind. GRO wird im ZNS von Astrozyten und Neuronen gebildet und bindet nach seiner Ausschüttung an den CXC-2 Rezeptor der Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPC), einem G- Protein gekoppelten transmembranären Rezeptor, der eine Proliferation der OPC bewirkt. Aus ihnen gehen die myelinscheidenbildenen Oligodendrozyten hervor. GRO wirkt dabei synergistisch zu dem schon seit längerem bekannten Plättchen-assoziierten Wachstumsfaktor A (PDGF-A) und verstärkt die Wirkung des PDGF-A deutlich [119-121].

In verschiedenen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass das GRO bei genetisch bedingten demyelinisierenden Erkrankungen, aber auch nach Rückenmarkstrauma und Schlaganfall in Oligodendrozyten verstärkt exprimiert wurde [122, 123] und die Menge des sezernierten GRO mit der Anzahl der OPCs korrelierte [124, 125]. Oligodendrozyten werden auch als Myelinisierungszellen bezeichnet und entsprechen in ihrer Funktion den Schwannschen Zellen im PNS. Sie dienen im PNS unter anderem nach Durchtrennung eines Axons als eine Art Leitschiene für die sich regenerierende Nervenzelle (Bünger-Bänder). Fehlt eben diese Leitstruktur, ist ein gerichtetes Nachwachsen des Axons nicht möglich, und es kommt zur Ausbildung von Neuromen [9].

6.4.4 Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 5b

Die Proteine der STAT-Familie sind an verschiedenen Mechanismen auf zellulärer Ebene beteiligt. Dazu gehört auch die Zelldifferenzierung und die Zellproliferation [126]. Ein wichtiger Weg führt über die Aktivierung verschiedener Zytokinrezeptoren und Interleukine (IL) wie IL-2, IL-6 und IL7 [127]. Sie sind an der Signalweiterleitung der Zelle als Antwort auf eine Nervenverletzung beteiligt. Die Aktivierung dieser Signalkaskade führt zu einer Zusammenlagerung der STAT- Proteine, die daraufhin in den Zellkern wandern, wo sie die Transkription aktivieren [128]. Die Proteine der STAT 5 Familie scheinen eine wichtige Rolle für die Zelldifferenzierung zu spielen [129, 130]. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass

der STAT-Signalweg exklusiv in regenerierenden Neuronen beschritten wird, so dass ihm vermutlich eine wichtige Rolle im Prozess der Regeneration zukommt [99].

6.5 Rezeptoren

Rezeptoren sind Empfangseinrichtungen des Organismus für bestimmte Reize. Die membranständigen Rezeptoren der Zelle dienen der Aufnahme und Weiterleitung spezifischer Signale, die durch verschiedene humorale Wirksubstanzen wie Hormone, Neurotransmitter, Mediatoren, Antikörper oder Antigene vermittelt werden. Nach spezifischer Bindung des Signalstoffs an den jeweiligen Rezeptor erfolgt die Aktivierung eines speziellen Effektorproteins im Zellinneren. In der Regel führt dies zu einer Freisetzung von weiteren Signalstoffen (second messenger) und zu einer spezifischen Antwort der Zelle auf den jeweiligen Reiz.

Das männliche Geschlechtshormon Androgen scheint in der Entwicklung des ZNS eine neuroprotektive Wirkung zu besitzen und Motorneurone vor dem programmierten Zelltod zu schützen. Es wird spekuliert, dass es seine Wirkung nicht an den Nervenzellen direkt, sondern zumindest teilweise über den protektiven Effekt auf die der Nervenzelle assoziierten glatten Muskulatur ansetzt. So sollen über den Weg des retrograden Transports von der Muskelzelle produzierte neurotrophe Faktoren wie der „Brain derived neurotrophic factor“ (BNDF) die eigentlich schützende Wirkung auf die Neurone ausüben [131-133].

6.5.1 T- Zell Rezeptor

Lange Zeit wurde das ZNS als „immunologisch privilegiert“ betrachtet. Damit wird die Vorstellung verbunden, dass die Immunzellen des restlichen Organismus nicht in den Liquor des ZNS eindringen könnten. Ursache dafür ist die aus Endothelzellen gebildeten Blut-Hirn-Schranke. Sie ermöglicht es kleinen Molekülen, von der Blutbahn in das ZNS überzutreten; größeren Molekülen ist dies jedoch nicht möglich [134].

In den letzten Jahren zeigte sich jedoch zunehmend, dass es Interaktionen zwischen dem ZNS und dem Immunsystem gibt [135]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass aktivierte B- und T-Lymphozyten in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Sowohl Neurone als auch Gliazellen können Rezeptoren für Mediatoren der Lymphozyten exprimieren [136-138]. Die Arbeitsgruppe um Craig Serpe ging deshalb 1999 der Frage nach, welchen Einfluss das Immunsystem auf das Regenerationsvermögen des PNS hat. Dazu wurde das Modell der Facialis-Axotomie bei genetisch veränderten immundefizienten Mäusen zum einen und normal entwickelten Wildtypmäusen zum anderen benutzt. Interessanterweise konnten Serpe et.al. feststellen, dass bei den immuninkompetenten Mäusen die Regenerationsfähigkeit um 40% abnahm [139]. Das deutet auf die Einbindung des

Immunsystems in den neuronalen Regenerationsprozess hin. Weitere Arbeiten, die in diese Richtung weisen, stammen von Raivich et.al. [140] und Knopf et.al. [137]. Sie stellten nach peripherer Axotomie eine B- und T-Zell-Aggregation an die Motorneurone fest, und auch von Rothwell et.al. [138] wurde gezeigt, dass auf Neuronen Rezeptoren für Zytokine vorhanden sind, welche von aktivierten T-Zellen sezerniert werden.

6.6 Zytoskelettproteine

Als Zell- oder Zytoskelett werden die intrazellulären Systeme verschiedener Filamente bezeichnet, die je nach Kaliber in Mikrotubuli, Aktinfilamente, Intermediärfilamente, Spektrinfilamente und Laminin unterteilt werden können. Ihnen gemeinsam ist die Eigenschaft, aus verschiedenen Proteinuntereinheiten zu bestehen und sowohl für statische als auch für dynamische Funktionen (Gestalt der Zelle, Bewegung und intrazellulärer Transport) innerhalb der Zelle zuständig zu sein [9]. Stellvertretend für die differentiell exprimierten Gene aus dieser Gruppe soll im Folgenden das Zytoskelettprotein Vimentin diskutiert werden.

6.6.1 Vimentin

Das Zytoskelettprotein Vimentin gehört zur Gruppe der Intermediärfilament-bildenden Proteine. Diese Intermediärfilamente bestehen je nach Zelltyp, Entwicklungsstufe der Zelle und in manchen Fällen auch abhängig vom funktionellen Status der Zellen aus verschiedenen Intermediärfilamentproteinen [141]. Vimentin ist neben Nestin und GFAP eines von drei verschiedenen IF-Proteinen, die in Astrozyten gebildet werden. Nestin und Vimentin bilden den Hauptanteil dieser Proteine in inmaturen Astrozyten, während erwachsene Astrozyten hauptsächlich GFAP und Vimentin enthalten.

Interessanterweise zeigte sich, dass in reaktiven Astrozyten, wie sie beispielsweise nach ZNS-Traumata mit konsekutiver Narbenbildung oder in Tumoren vorhanden sind, die Nestinproduktion erlischt, GFAP und Vimentin aber vermehrt gebildet werden [142, 143]. Pekny et al. konnten nachweisen, dass GFAP und Vimentin essentiell für die Narbenbildung im ZNS sind und Knockout Mäuse nicht in der Lage waren, Narbengewebe sinnvoll zu strukturieren und deren Narbengewebe deshalb vermehrt Extrazellulärdebris aufwies [144]. In anderen Arbeiten fanden Stichel et al [27], dass gliales Narbengewebe eine Wachstumsbarriere für aussprossende regenerierende Neuron darstellt und gerade das Protein Vimentin verantwortlich für einen massiven Neuronenuntergang im Bereich der Narbenbildung zu sein scheint [145]. Müller et al. konnten in ihren Arbeiten bereits ein vermehrtes Aussprossen von Neuronen durch das Narbengewebe nachweisen, wenn vorher Kollagen IV in der Narbe durch Antikörper blockiert wird [27, 146].

Der extrazelluläre Raum in tierischen Geweben ist mit einer Grundsubstanz, der sogenannten extrazellulären Matrix gefüllt. Diese hält die Zellen eines Gewebes zusammen und ermöglicht die Diffusion von Nährstoffen zu den einzelnen Zellen. Die Matrix hat eine gelartige Konsistenz, in die zur Stabilisierung Faserproteine wie Kollagen und Elastin eingeflochten sind. Im Zusammenhang mit der Regeneration im ZNS sind vor allem verschiedene Kollagene (Kollagen3+4) beschrieben worden. So wird vor allem das Kollagen 4 für die Narbenbildung nach Rückenmarksverletzungen angeschuldigt, letztendlich neuaussprossende Neurone daran zu hindern, das Narbengewebe zu passieren [146].

6.7 ddPCR als Screening Methode

Die Methode der *differential display PCR* bietet die Möglichkeit, gleichzeitig die Genexpression verschiedener mRNA-Populationen zu untersuchen. Andere Methoden, wie das differentielle Screening oder die Subtraktive Hybridisierung, erfordern die Hybridisierung oder Analyse jedes einzelnen Klons, um differentiell exprimierte Transkripte zu ermitteln [147]. Die Subtraktionsmethoden auf PCR-Basis unterscheiden sich bezüglich des zeitlichen Aufwandes kaum von der *ddPCR*. Der größte Nachteil dieser auf PCR basierenden Methoden, ist die geringe Sensitivität, da sie nur vorhandene versus nicht-vorhandene RNA detektieren, schwach gegen stark exprimierte Gene mit dieser Methode jedoch nicht erfasst werden können. Auch die Mikroarraytechnologie ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, da mit ihr sehr schnell eine große Anzahl an Genen analysiert werden kann. Gegen diese Methode spricht ein höherer Kostenaufwand, da für jeden zu untersuchenden RNA-Pool ein eigener Array-Filter verwendet werden muss. Auch die begrenzte Anzahl der zu analysierenden Gene, die auf einem solchen Arrayfilter aufgebracht sind und die im Vergleich zur *ddPCR* größere erforderliche RNA-Menge, schränken den Nutzen des Micrarrays als Screeningverfahren ein [148]. Besonders bei dem in dieser Arbeit verwendeten Modell ist die Menge an RNA sehr gering, so dass die Verwendung der Arraytechnologie nur durch Zusammenfassen der Gewebe verschiedener Tiere und damit auch zu einer erheblich höheren Anzahl an Versuchstieren führen würde.

Eine weitere Methode, um Unterschiede in der Genexpression festzustellen, ist die Herstellung von cDNA Banken. Diese Methode würde aber mit enormen Arbeits- und Zeitaufwand einhergehen, der vor allem von kleineren Labors alleine kaum zu leisten ist. Die Überlegenheit der *ddPCR* in diesen Punkten erlangt angesichts der Tatsache, dass selten mehr als 1% der gesamten RNA-Population differentiell exprimiert wird, eine besondere Bedeutung [149].

Die *ddPCR* ist vor allem bei der Ermittlung von Expressionsunterschieden in komplexen biologischen Systemen das bevorzugte Verfahren. Das Gehirn ist eines der Paradebeispiele für ein solch komplexes System. Es wird geschätzt, dass 30 – 50 % aller proteinkodierenden

Gene der Säugetiere im Gehirn exprimiert werden [150]. Ein weiterer Vorteil der *ddPCR* liegt in der schnellen Bewertbarkeit der Ergebnisse. Dies ist besonders dann von Interesse, wenn zeitliche Verläufe oder der Erfolg von Behandlungsmethoden dargestellt werden sollen. Die zur Reaktion erforderliche RNA- Menge ist deutlich niedriger als bei der subtraktiven Hybridisierung. Es ist jedoch anzumerken, dass es mittlerweile gelungen ist, diesen Nachteil durch Verbesserung der Methodik fast auszugleichen [151-155].

6.7.1 Sensitivität

Bei der Entscheidung für eine der verschiedenen Methoden sind zwei Überlegungen zu berücksichtigen:

Ist es bei dem Experiment nötig, mehr als zwei Proben simultan zu vergleichen?

Wie groß sind die Konzentrationsunterschiede zwischen den zu vergleichenden Proben? Diese Frage stellt sich meistens bei durch Mikrochirurgie oder Zellseparation gewonnenen Proben. Hierbei kommt es leicht zu Kontamination der Proben mit anderem biologischen Material, das bei einigen Methoden die Ergebnisse verfälschen kann.

Die klassischen Methoden der subtraktiven Hybridisierung beispielsweise bieten in diesem Fall nicht die Möglichkeit, Unterschiede in der Expression zu ermitteln , insbesondere, wenn neben Proben mit kleinen Konzentrationsunterschieden auch solche mit extrem großen zu erwarten sind [156-158]. In diesem Fall würden die Proben mit geringem Konzentrationsunterschied erheblich unterrepräsentiert sein oder gar verloren gehen. Im Gegensatz dazu ist es mit Hilfe der *ddPCR* möglich, Unterschiede aufzuzeigen, die weit unter dieser Nachweisgrenze liegen [159]. Allerdings gilt dies nur für Konzentrationsunterschiede bis zum Faktor 50. Ab einem Unterschied von 50fach und mehr ist es der *ddPCR* nicht mehr möglich, relativ quantitative Aussagen zu treffen, beispielsweise, ob ein Expressionssignal 50fach oder 100fach stärker als ein Vergleichsignal ist [149]. Auch kann man mit dieser Methode keine absolut quantitativen Aussagen bezüglich der gefundenen Gene machen. Eine solche bieten quantitative PCR-Methoden wie die Lightcycler-, die Taqman-PCR, oder aber die im folgenden besprochene Methode des Mikroarrays.

Auch mit dieser Methode ist es möglich, relativ kleine Signalabweichungen zu detektieren. Ein weiterer Vorteil moderner Mikroarrays liegt in der Möglichkeit, die Genexpression quantitativ mittels spezieller Softwareprogramme auszuwerten. Durch die rapide Entwicklung der Arraytechnologie in den letzten Jahren besteht hierbei jedoch das Problem, die richtige Software für den jeweiligen Array zu verwenden, da nur so zuverlässige Ergebnisse zu erzielen sind [160]. Ihr Nachteil bezüglich der Sensitivität liegt in der begrenzten Zahl der Genfragmente, die auf einen Arrayfilter aufgebracht sind. So enthält ein rattenspezifischer Array nur etwa 1100 Genpunkte mit bereits bekannten und beschriebenen cDNA-Fragmenten. Dies ermöglicht, nur einen Teil der tatsächlich vorhandenen RNA zu untersuchen, wobei vor allem in relativ unerforschten Systemen wie dem zentralen Nervensystem die Möglichkeit der Identifizierung neuer Gene ausgeschlossen bleibt. Eine Alternative bieten sogenannte Chips, bei denen Oligonukleotide, die spezifisch für eine bestimmte cDNA sind, auf den Arrayfilter aufgebracht sind. Diese erfüllen im Prinzip die

gleiche Aufgabe wie ein spezifischer Primer bei der PCR. Sie bieten den Vorteil, mehr Proben auf einem Chip unterzubringen, um so die Zahl der analysierbaren Gene zu erhöhen. Außerdem sind diese Chips wegen der einfacheren Herstellung günstiger als der klassische Microarray. Es besteht allerdings weiterhin der Nachteil herkömmlicher Mikroarrays, nur bekannte Gene analysieren zu können.

6.7.2 Spezifität

Ein großer Nachteil der *ddPCR* als Screeningmethode ist ihre geringe Spezifität. Die Zahl der falsch positiven Ergebnisse erreicht bei einigen Autoren, nach Überprüfung mittels Northern Blot oder in situ Hybridisierung, bis zu 50% der zunächst als differentiell exprimiert ermittelten Gene [158]. Ein Teil dieser falsch-positiven Ergebnisse kommt dadurch zustande, dass sich in der Probe sehr geringe mRNA Konzentrationen befinden, die unter der Nachweisgrenze dieser verifizierenden Methoden liegen. Dies trifft aber sicherlich nur für einen Teil der falsch positiven Gene zu. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass diesem Spezifitäsproblem der *ddPCR* mit verschiedenen Strategien entgegengewirkt werden kann, um die Zahl der falsch positiven Ergebnisse zu reduzieren:

Die Experimente sollten mit Duplikaten der jeweiligen RNA- Proben durchgeführt werden, das heißt, paralleles Auftragen von jeweils zwei identischen Ausgang-RNA Proben und zwei identischen Vergleichsproben. So kann verhindert werden, dass versuchsbedingte Ausfälle einzelner Banden nicht fälschlicherweise als differentielle Expression gewertet werden. Weiterhin erwies es sich als vorteilhaft, auf einem Gel Proben verschiedener Ausgangs-RNA-Pools, beispielsweise verschiedener Tiere, nebeneinander zu analysieren. Die Kombination dieser beiden Schritte bietet drei Vorteile hinsichtlich der Spezifität:

- Es ist möglich, durch die Isolation von in allen Proben konstant regulierter Gene die Inzidenz der falsch-positiven Ergebnisse deutlich zu reduzieren.
- Man vermeidet die Isolation von zwar differentiell exprimierten Genen, deren Regulation aber nicht auf die Manipulation durch die Studie, sondern auf Störfaktoren zurückzuführen ist. Das ist besonders dann wichtig, wenn man mit wenig standardisierbaren Systemen arbeitet, wie zum Beispiel mit verschiedenen Tieren.
- In begrenztem Umfang ist es möglich, regulierte Gene zu identifizieren, deren Banden in der Kontrolle nicht völlig fehlen, sondern nur quantitativ reguliert sind.

Durch die Verwendung höherer Annealingtemperaturen binden verwendete Primer spezifischer an die jeweilige cDNA, die Stringenz steigt. Dadurch sinkt aber gleichzeitig auch die Sensitivität der Methode, deren Anwendung man so von Fall zu Fall abwägen muss, vor allem, wenn eine möglichst vollständige Wiedergabe der im zu untersuchenden Gewebe vorhandenen RNA erwünscht ist.

Ein weiteres Problem der *ddPCR* ist die große Zahl unbekannter Gene, die beim Vergleich der differentiell exprimierten Sequenzen mit der Gendatenbank entdeckt werden. (s. Tab 5.a) Ursächlich dafür scheint zum einen, dass die durch *ddPCR* gefundenen Fragmente normalerweise nur zwischen 100 und 400 bp lang sind und oft der 3’ Region eines Gens

entstammen [161]. Diese Genregion ist oft unspezifisch und verhindert so eine genaue Zuordnung einer Sequenz zu einem bestimmten Gen. Zum anderen ist die Gendatenbank nicht für alle Organismen gleich vollständig, so dass Ergebnisse der *ddPCR* dort nicht immer gefunden werden können. Durch die ständig wachsenden Datenmengen lässt sich dieses Problem jedoch durch häufigeren Abgleich der ursprünglich unbekannten Sequenzen mit der Datenbank lösen. Weiterhin zeigte sich, dass die Gesamtmenge der gefundenen Gene problematisch sein kann. Wie aus Tabelle 5a ersichtlich, ist es schwierig, aus einer solchen Vielzahl von Genen unterschiedlicher Funktionsgruppen potentielle Kandidatengene für die Regenerationsmechanismen des ZNS auszuwählen. Die sorgfältige Auswahl der differentiell exprimierten Gene hinsichtlich ihrer vermuteten funktionellen Bedeutung ist wichtig, um die weiteren verifizierenden und funktionellen Untersuchungen rational anzuwenden, da sie mit recht großem Arbeits- und Zeitaufwand verbunden sind.

6.7.3 Wertung der Ergebnisse

Die oben aufgeführten differentiell exprimierten Gene sind als Reaktion der Zellen auf die Axondurchtrennung zu werten. Es ist ersichtlich, dass nach einer solchen Schädigung eine Vielzahl unterschiedlicher Gene aktiviert wird, von denen einige schon durch andere Arbeiten bereits mit De- oder Regenerationsvorgängen in Zusammenhang gebracht worden sind. Mit Hilfe der in dieser Arbeit angewandten Methode ist es ermöglicht worden, weit gefächert die Folgen der Axotomie-induzierten Neuronverletzung als Änderung im Genexpressionsmuster darzustellen und so einen Überblick über die unterschiedlichen Gene zu erhalten. Auf diese Weise sind neue Ansätze im pathophysiologischen Modell der De- und Regeneration entstanden, die als Grundlage für weitergehende Versuche dienen. Die Ziele dieser Experimente sollten die genauere Darstellung der pathophysiologischen Zusammenhänge und etwaige experimentelle Interventionsversuche sein, da diese nicht mit der Methode der *ddPCR* beantwortet werden können.

6.7.4 Ausblick

Die Methode der *ddPCR* ist trotz zahlreicher anderer Methoden zum differentiellen Screening, auch nach der Einführung der Mikroarraytechnologie, immer noch eine gute Alternative um Unterschiede der RNA-Synthese verschiedener Zellen zu detektieren. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, relativ schnell und kostengünstig neben bekannten Genen auch unbekannte Gene auf ihre Expression zu untersuchen. Allerdings muss man sich der Grenzen dieser Methode, vor allem hinsichtlich der Spezifität, bewusst sein und weitere verifizierende Verfahren wie den Northern Blot oder die In Situ Hybridisierung an das Screening anschließen. Grundsätzlich sollte ein solcher Schritt jeder der verschiedenen Screeningmethoden folgen, da keines der Verfahren absolut spezifisch sein kann.

Die Aufgabe eines Screeningverfahrens ist es, einen schnellen, umfassenden Überblick, in diesem Fall über Genregulationen, zu geben, also eine Vorauswahl zu treffen. Die Erfassung der funktionellen Bedeutung der Genregulation kann mit keinem dieser Verfahren aufgezeigt werden. Es kann also nicht unterschieden werden, ob die festgestellte Regulation notwendig für die Regeneration bzw. ursächlich für fehlende Regeneration ist oder ob es sich hierbei lediglich um ein zufällig aufgetretenes Phänomen ohne funktionelle Einfluss handelt. Aus

diesem Grund sind neben verifizierenden Untersuchungen, beispielsweise durch In situ Hybridisierung auch weitergehende funktionelle Analysen in vitro und in vivo notwendig, um etwaige Kandidatengene für die Regeneration zentraler Neurone weiter einzugrenzen und deren genaue Funktion zu beschreiben.

7 Literaturverzeichnis

1. Sunderland, S., *Nerves and Nerve Injuries*. 2 ed. 1978, Churchill Livingstone: Edinburgh.
2. Allt, G., *The Peripheral Nerve*, D.N. Landon, Editor. 1976, Chapmann & Hall: London. p. 666-739.
3. Lawrence, P.A. ,G. Morata, *Homeobox genes: their function in Drosophila segmentation and pattern formation.* Cell, 1994. **78**(2): p. 181-9.
4. Krumlauf, R., *Hox genes in vertebrate development.* Cell, 1994. **78**(2): p. 191-201.
5. Blight, A.R., *Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury.* J Neurotrauma, 1992. **9 Suppl 1**: p. S83-91.
6. Dusart, I. ,M.E. Schwab, *Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord.* Eur J Neurosci, 1994. **6**(5): p. 712-24.
7. Kreutzberg, G.W., *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS.* Trends Neurosci, 1996. **19**(8): p. 312-8.
8. Giulian, D., *The consequenses of inflamation after injury to the central nervous system*, in *The Neurobiology of the Central Nervous System Trauma*, S.K. Salzmann, Faden,A.I., Editors 1994, Oxford University Press: New York. p. 155-165.
9. Leonhardt, H., *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. 8 ed. Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie. Band 3. 1990, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 562.
10. Herdegen, T., P. Skene ,M. Bähr, *The c-Jun transcription factor--bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration.* Trends Neurosci, 1997. **20**(5): p. 227-31.
11. Tetzlaff, W., N.R. Kobayashi, K.M. Giehl, B.J. Tsui, S.L. Cassar ,A.M. Bedard, *Response of rubrospinal and corticospinal neurons to injury and neurotrophins.* Prog Brain Res, 1994. **103**: p. 271-86.
12. Campenot, R.B., *NGF and the local control of nerve terminal growth.* J Neurobiol, 1994. **25**(6): p. 599-611.
13. Verveer, P.J., F.S. Wouters, A.R. Reynolds ,P.I. Bastiaens, *Quantitative imaging of lateral ErbB1 receptor signal propagation in the plasma membrane.* Science, 2000. **290**(5496): p. 1567-70.
14. Tetzlaff, W., S.W. Alexander, F.D. Miller ,M.A. Bisby, *Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43.* J Neurosci, 1991. **11**(8): p. 2528-44.

15. Schmitt, A.B., S. Breuer, M. Voell, F.W. Schwaiger, C. Spitzer, K. Pech, G.A. Brook, J. Noth, G.W. Kreutzberg ,W. Nacimiento, *GAP-43 (B-50) and C-Jun are up-regulated in axotomized neurons of Clarke's nucleus after spinal cord injury in the adult rat.* Neurobiol Dis, 1999. **6**(2): p. 122-30.

16. Schwab, M.E., J.P. Kapfhammer ,C.E. Bandtlow, *Inhibitors of neurite growth.* Annu Rev Neurosci, 1993. **16**: p. 565-95.

17. Kimelberg, H.K., Norenberg, M. D., *Astrocytic responses to central nervous system trauma*, in *The Neurobiology of the Central Nervous System Trauma*, S.K. Salzmann, Faden, A. J., Editor. 1994, Oxford University Press: New York. p. 193-209.

18. Bähr, M., Bonhöffer, F., *Perspectives on axonal regeneration in the mammalian CNS.* TINS, 1994. **17**: p. 473-479.

19. Bähr, M.H., S., *Einflüsse von Gliazellen auf die Regeneration im ZNS von Säugern.* Neuroforum, 1996. **2**: p. 4-11.

20. Müller, H.W., U. Junghans ,J. Kappler, *Astroglial neurotrophic and neurite-promoting factors.* Pharmacol Ther, 1995. **65**(1): p. 1-18.

21. Joosten, E.A., S. Dijkstra, G.A. Brook, H. Veldman ,P.R. Bar, *Collagen IV deposits do not prevent regrowing axons from penetrating the lesion site in spinal cord injury.* J Neurosci Res, 2000. **62**(5): p. 686-91.

22. Schwab, M.E. ,D. Bartholdi, *Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord.* Physiol Rev, 1996. **76**(2): p. 319-70.

23. Schnell, L., R. Schneider, R. Kolbeck, Y.A. Barde ,M.E. Schwab, *Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion.* Nature, 1994. **367**(6459): p. 170-3.

24. Kobayashi, N.R., D.P. Fan, K.M. Giehl, A.M. Bedard, S.J. Wiegand ,W. Tetzlaff, *BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and Talpha1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration.* J Neurosci, 1997. **17**(24): p. 9583-95.

25. Spillmann, A.A., V.R. Amberger ,M.E. Schwab, *High molecular weight protein of human central nervous system myelin inhibits neurite outgrowth: an effect which can be neutralized by the monoclonal antibody IN-1.* Eur J Neurosci, 1997. **9**(3): p. 549-55.

26. Bregman, B.S., E. Kunkel-Bagden, L. Schnell, H.N. Dai, D. Gao ,M.E. Schwab, *Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors.* Nature, 1995. **378**(6556): p. 498-501.

27. Stichel, C.C., S. Hermanns, H.J. Luhmann, F. Lausberg, H. Niermann, D. D'Urso, G. Servos, H.G. Hartwig ,H.W. Muller, *Inhibition of collagen IV deposition promotes regeneration of injured CNS axons.* Eur J Neurosci, 1999. **11**(2): p. 632-46.

28. Bunge, R.P., *Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration.* Curr Opin Neurobiol, 1993. **3**(5): p. 805-9.

29. Ramon-Cueto, A., G.W. Plant, J. Avila ,M.B. Bunge, *Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants.* J Neurosci, 1998. **18**(10): p. 3803-15.

30. Rajaofetra, N., P. Poulat, L. Marlier, F. Sandillon, M.J. Drian, N. Konig, F. Famose, B. Verschuere, D. Gouy, M. Geffard ,et al., *Transplantation of embryonic serotonin immunoreactive neurons into the transected spinal cord of adult monkey (Macaca fascicularis).* Brain Res, 1992. **572**(1-2): p. 329-34.

31. Privat, A., H. Mansour ,M. Geffard, *Transplantation of fetal serotonin neurons into the transected spinal cord of adult rats: morphological development and functional influence.* Prog Brain Res, 1988. **78**: p. 155-66.

32. Iwashita, Y., S. Kawaguchi ,M. Murata, *Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat.* Nature, 1994. **367**(6459): p. 167-70.

33. Gimenez y Ribotta, M. ,A. Privat, *Biological interventions for spinal cord injury.* Curr Opin Neurol, 1998. **11**(6): p. 647-54.

34. Feraboli-Lohnherr, D., D. Orsal, A. Yakovleff, M. Gimenez y Ribotta ,A. Privat, *Recovery of locomotor activity in the adult chronic spinal rat after sublesional transplantation of embryonic nervous cells: specific role of serotonergic neurons.* Exp Brain Res, 1997. **113**(3): p. 443-54.

35. Schwartz, M., O. Lazarov-Spiegler, O. Rapalino, I. Agranov, G. Velan ,M. Hadani, *Potential repair of rat spinal cord injuries using stimulated homologous macrophages.* Neurosurgery, 1999. **44**(5): p. 1041-5; discussion 1045-6.

36. Liang, P. ,A.B. Pardee, *Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction.* Science, 1992. **257**(5072): p. 967-71.

37. Welsh, J., K. Chada, S.S. Dalal, R. Cheng, D. Ralph ,M. McClelland, *Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA.* Nucleic Acids Res, 1992. **20**(19): p. 4965-70.

38. Rausch, O., R.A. Newton, S. Bingham, R. Macdonald, C.P. Case, G.J. Sanger, S.N. Lawson ,A.D. Reith, *Nerve injury-associated kinase: a sterile 20-like protein kinase up- regulated in dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain.* Neuroscience, 2000. **101**(3): p. 767-77.

39. Kobayashi, H., S. Matsukawa, S. Kobayashi ,T. Kubota, *Changes in expression of mRNAs in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia.* Neurol Res, 2000. **22**(8): p. 825-31.

40. Choi, E.J., C.M. Ha, J. Choi, S.S. Kang, W.S. Choi, S.K. Park, K. Kim ,B.J. Lee, *Low-density cDNA array-coupled to PCR differential display identifies new estrogen-responsive genes during the postnatal differentiation of the rat hypothalamus.* Brain Res Mol Brain Res, 2001. **97**(2): p. 115-28.

41. Plunet, W., B.K. Kwon ,W. Tetzlaff, *Promoting axonal regeneration in the central nervous system by enhancing the cell body response to axotomy.* J Neurosci Res, 2002. **68**(1): p. 1-6.

42. Goldberger, M.E., Murray, M., *Patterns of sprouting and implications for recovery of function*, in *Advances in Neurology: Physiologic Basis for Functional Recovery in Neurological Disorder*, S.G. Waxman, Editor. 1988, Raven Press: New York. p. 361-385.

43. Goldberger, M.E., Murray,M., Tessler, A., *Sprouting and regeneration in the spinal cord: Their Roles in Recovery of Function after Spinal cord Injury*, in *Neuroregeneration*, A. Gorio, Editor. 1993, Raven Press: New York. p. 241-264.

44. Kuypers, H.G.J.M., *Anatomy of descending pathways*, in *Handbook of Physiology*, V.B. Brooks, Editor. 1981, American Physiological Society: Washington DC. p. 597-665.

45. Paxinos G., W.C., *The Rat Brain in stereotaxic Coordinates*. 4th ed. 1998, Academic Press: San Diego.

46. Chomczynski, P. ,N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction.* Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.

47. Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich ,N. Arnheim, *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.

48. Saiki, R.K., *Optimizing the polymerase chain reaction*, in *Current Communications in Molecular Biology*, H.H.K. H.A. Ehrlich, R.A. Gibbs, Editor. 1989, Harbour Labaratory Press: Cold Spring. p. 25-30.

49. Kong, H., R.B. Kucera ,W.E. Jack, *Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea Thermococcus litoralis. Vent DNA polymerase, steady state kinetics, thermal stability, processivity, strand displacement, and exonuclease activities.* J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1965-75.

50. Saiki, R.K., *The design and optimisation of the PCR*, in *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Ehrlich, Editor. 1989, Stockton Press: New York. p. 7-16.

51. Chou, Q., M. Russell, D.E. Birch, J. Raymond ,W. Bloch, *Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low- copy-number amplifications.* Nucleic Acids Res, 1992. **20**(7): p. 1717-23.

52. Rompf, R. ,G. Kahl, *mRNA differential display in agarose gels.* Biotechniques, 1997. **23**(1): p. 28, 30, 32.

53. Sanger, F., S. Nicklen ,A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.

54. Darnell, J.E., Jr., *Variety in the level of gene control in eukaryotic cells.* Nature, 1982. **297**(5865): p. 365-71.

55. Latchman, D.S., *Transcription factors: an overview.* Int J Exp Pathol, 1993. **74**(5): p. 417-22.

56. Jenkins, R. ,S.P. Hunt, *Long-term increase in the levels of c-jun mRNA and jun protein-like immunoreactivity in motor and sensory neurons following axon damage.* Neurosci Lett, 1991. **129**(1): p. 107-10.

57. Jenkins, R., W. Tetzlaff ,S.P. Hunt, *Differential expression of immediate early genes in rubrospinal neurons following axotomy in rat.* Eur J Neurosci, 1993. **5**(3): p. 203-9.

58. Leah, J.D., T. Herdegen, A. Murashov, M. Dragunow ,R. Bravo, *Expression of immediate early gene proteins following axotomy and inhibition of axonal transport in the rat central nervous system.* Neuroscience, 1993. **57**(1): p. 53-66.

59. Anderson, A.J., B.J. Cummings ,C.W. Cotman, *Increased immunoreactivity for Jun- and Fos-related proteins in Alzheimer's disease: association with pathology.* Exp Neurol, 1994. **125**(2): p. 286-95.

60. Ferrer, I., S. Barron, E. Rodriquez-Farre ,A.M. Planas, *Ionizing radiation-induced apoptosis is associated with c-Jun expression and c-Jun/AP-1 activation in the developing cerebellum of the rat.* Neurosci Lett, 1995. **202**(1-2): p. 105-8.

61. Martin, G., J. Segui, P. Diaz-Villoslada, X. Montalban, A.M. Planas ,I. Ferrer, *Jun expression is found in neurons located in the vicinity of subacute plaques in patients with multiple sclerosis.* Neurosci Lett, 1996. **212**(2): p. 95-8.

62. Virgo, L. ,J. de Belleroche, *Induction of the immediate early gene c-jun in human spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis with concomitant loss of NMDA receptor NR- 1 and glycine transporter mRNA.* Brain Res, 1995. **676**(1): p. 196-204.

63. Estus, S., W.J. Zaks, R.S. Freeman, M. Gruda, R. Bravo ,E.M. Johnson, Jr., *Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis.* J Cell Biol, 1994. **127**(6 Pt 1): p. 1717-27.

64. Ham, J., C. Babij, J. Whitfield, C.M. Pfarr, D. Lallemand, M. Yaniv ,L.L. Rubin, *A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death.* Neuron, 1995. **14**(5): p. 927-39.

65. Schlingensiepen, K.H., R. Schlingensiepen, M. Kunst, I. Klinger, W. Gerdes, W. Seifert ,W. Brysch, *Opposite functions of jun-B and c-jun in growth regulation and neuronal differentiation.* Dev Genet, 1993. **14**(4): p. 305-12.

66. Blank, V. ,N.C. Andrews, *The Maf transcription factors: regulators of differentiation.* Trends Biochem Sci, 1997. **22**(11): p. 437-41.

67. Inamdar, N.M., Y.I. Ahn ,J. Alam, *The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition*

sequences for MAF and NF-E2 transcription factors. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **221**(3): p. 570-6.

68. Kataoka, K., M. Noda ,M. Nishizawa, *Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(1): p. 700-12.

69. Ho, I.C., M.R. Hodge, J.W. Rooney ,L.H. Glimcher, *The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4.* Cell, 1996. **85**(7): p. 973-83.

70. Kurschner, C. ,J.I. Morgan, *The maf proto-oncogene stimulates transcription from multiple sites in a promoter that directs Purkinje neuron-specific gene expression.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(1): p. 246-54.

71. Nishizawa, M., K. Kataoka, N. Goto, K.T. Fujiwara ,S. Kawai, *v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(20): p. 7711-5.

72. Kawai, S., N. Goto, K. Kataoka, T. Saegusa, H. Shinno-Kohno ,M. Nishizawa, *Isolation of the avian transforming retrovirus, AS42, carrying the v- maf oncogene and initial characterization of its gene product.* Virology, 1992. **188**(2): p. 778-84.

73. Kataoka, K., M. Nishizawa ,S. Kawai, *Structure-function analysis of the maf oncogene product, a member of the b-Zip protein family.* J Virol, 1993. **67**(4): p. 2133-41.

74. Hale, T.K., C. Myers, R. Maitra, T. Kolzau, M. Nishizawa ,A.W. Braithwaite, *Maf transcriptionally activates the mouse p53 promoter and causes a p53- dependent cell death.* J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 17991-9.

75. Smeal, T., P. Angel, J. Meek ,M. Karin, *Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes.* Genes Dev, 1989. **3**(12B): p. 2091-100.

76. Corvello, C.M., R. Metz, R. Bravo ,M.C. Armelin, *Expression and characterization of mouse cFos protein using the baculovirus expression system: ability to form functional AP-1 complex with coexpressed cJun protein.* Cell Mol Biol Res, 1995. **41**(6): p. 527-35.

77. Estus, S., H.M. Tucker, C. van Rooyen, S. Wright, E.F. Brigham, M. Wogulis ,R.E. Rydel, *Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction.* J Neurosci, 1997. **17**(20): p. 7736-45.

78. Kiessling, M., G. Stumm, Y. Xie, T. Herdegen, A. Aguzzi, R. Bravo ,P. Gass, *Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia.* J Cereb Blood Flow Metab, 1993. **13**(6): p. 914-24.

79. Raghupathi, R., T.K. McIntosh ,D.H. Smith, *Cellular responses to experimental brain injury.* Brain Pathol, 1995. **5**(4): p. 437-42.

80. Simmons, L.K., P.C. May, K.J. Tomaselli, R.E. Rydel, K.S. Fuson, E.F. Brigham, S. Wright, I. Lieberburg, G.W. Becker, D.N. Brems ,et al., *Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro.* Mol Pharmacol, 1994. **45**(3): p. 373-9.

81. Pike, C.J., A.J. Walencewicz, C.G. Glabe ,C.W. Cotman, *In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity.* Brain Res, 1991. **563**(1-2): p. 311-4.

82. Loo, D.T., A. Copani, C.J. Pike, E.R. Whittemore, A.J. Walencewicz ,C.W. Cotman, *Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 7951-5.

83. Gschwind, M. ,G. Huber, *Apoptotic cell death induced by beta-amyloid 1-42 peptide is cell type dependent.* J Neurochem, 1995. **65**(1): p. 292-300.

84. Forloni, G., R. Chiesa, S. Smiroldo, L. Verga, M. Salmona, F. Tagliavini ,N. Angeretti, *Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35.* Neuroreport, 1993. **4**(5): p. 523-6.

85. McGahan, L., A.M. Hakim, Y. Nakabeppu ,G.S. Robertson, *Ischemia-induced CA1 neuronal death is preceded by elevated FosB and Jun expression and reduced NGFI-A and JunB levels.* Brain Res Mol Brain Res, 1998. **56**(1-2): p. 146-61.

86. McGinnis, W. ,R. Krumlauf, *Homeobox genes and axial patterning.* Cell, 1992. **68**(2): p. 283-302.

87. Tsuchida, T., M. Ensini, S.B. Morton, M. Baldassare, T. Edlund, T.M. Jessell ,S.L. Pfaff, *Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes.* Cell, 1994. **79**(6): p. 957-70.

88. Aubert, I., J.L. Ridet ,F.H. Gage, *Regeneration in the adult mammalian CNS: guided by development.* Curr Opin Neurobiol, 1995. **5**(5): p. 625-35.

89. Hol, E.M., F.W. Schwaiger, A. Werner, A. Schmitt, G. Raivich ,G.W. Kreutzberg, *Regulation of the LIM-type homeobox gene islet-1 during neuronal regeneration.* Neuroscience, 1999. **88**(3): p. 917-25.

90. Palfrey, H.C., A.C. Nairn, L.L. Muldoon ,M.L. Villereal, *Rapid activation of calmodulin-dependent protein kinase III in mitogen- stimulated human fibroblasts. Correlation with intracellular Ca2+ transients.* J Biol Chem, 1987. **262**(20): p. 9785-92.

91. Alirezaei, M., P. Marin, A.C. Nairn, J. Glowinski ,J. Premont, *Inhibition of protein synthesis in cortical neurons during exposure to hydrogen peroxide.* J Neurochem, 2001. **76**(4): p. 1080-8.

92. Smith, C.B., A.M. Crane, M. Kadekaro, B.W. Agranoff ,L. Sokoloff, *Stimulation of protein synthesis and glucose utilization in the hypoglossal nucleus induced by axotomy.* J Neurosci, 1984. **4**(10): p. 2489-96.

93. Shinomura, T., Y. Asaoka, M. Oka, K. Yoshida ,Y. Nishizuka, *Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5149-53.

94. Khan, W.A., G.C. Blobe ,Y.A. Hannun, *Activation of protein kinase C by oleic acid. Determination and analysis of inhibition by detergent micelles and physiologic membranes: requirement for free oleate.* J Biol Chem, 1992. **267**(6): p. 3605-12.

95. Izaki, K., H. Kinouchi, K. Watanabe, Y. Owada, A. Okubo, H. Itoh, H. Kondo, Y. Tashima, S. Tamura, T. Yoshimoto ,K. Mizoi, *Induction of mitochondrial heat shock protein 60 and 10 mRNAs following transient focal cerebral ischemia in the rat.* Brain Res Mol Brain Res, 2001. **88**(1-2): p. 14-25.

96. Martin, J.E., M. Swash, K. Mather ,P.N. Leigh, *Expression of the human groEL stress-protein homologue in the brain and spinal cord.* J Neurol Sci, 1993. **118**(2): p. 202-6.

97. Zamostiano, R., A. Pinhasov, M. Bassan, O. Perl, R.A. Steingart, R. Atlas, D.E. Brenneman ,I. Gozes, *A femtomolar-acting neuroprotective peptide induces increased levels of heat shock protein 60 in rat cortical neurons: a potential neuroprotective mechanism.* Neurosci Lett, 1999. **264**(1-3): p. 9-12.

98. Hill, C.S. ,R. Treisman, *Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity.* Cell, 1995. **80**(2): p. 199-211.

99. Schwaiger, F.W., G.H. Schmitt, A. Horvat, G. Hager, R. Streif, C. Spitzer, S. Gamal, S. Breuer, G.A. Brook, W. Nacimiento ,G.W. Kreutzberg, *Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT).* Eur J Neurosci, 2000. **12**(4): p. 1165-76.

100. Holscher, C. ,S.P. Rose, *Inhibitors of phospholipase A2 produce amnesia for a passive avoidance task in the chick.* Behav Neural Biol, 1994. **61**(3): p. 225-32.

101. Bonventre, J.V. ,R. Nemenoff, *Renal tubular arachidonic acid metabolism.* Kidney Int, 1991. **39**(3): p. 438-49.

102. Miller, B., M. Sarantis, S.F. Traynelis ,D. Attwell, *Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid.* Nature, 1992. **355**(6362): p. 722-5.

103. Piomelli, D., J.K. Wang, T.S. Sihra, A.C. Nairn, A.J. Czernik ,P. Greengard, *Inhibition of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II by arachidonic acid and its metabolites.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(21): p. 8550-4.

104. Keyser, D.O. ,B.E. Alger, *Arachidonic acid modulates hippocampal calcium current via protein kinase C and oxygen radicals.* Neuron, 1990. **5**(4): p. 545-53.

105. Stella, N., A. Estelles, J. Siciliano, M. Tence, S. Desagher, D. Piomelli, J. Glowinski ,J. Premont, *Interleukin-1 enhances the ATP-evoked release of arachidonic acid from mouse astrocytes.* J Neurosci, 1997. **17**(9): p. 2939-46.

106. Dumuis, A., J.P. Pin, K. Oomagari, M. Sebben ,J. Bockaert, *Arachidonic acid released from striatal neurons by joint stimulation of ionotropic and metabotropic quisqualate receptors.* Nature, 1990. **347**(6289): p. 182-4.

107. Clemens, J.A., D.T. Stephenson, E.B. Smalstig, E.F. Roberts, E.M. Johnstone, J.D. Sharp, S.P. Little ,R.M. Kramer, *Reactive glia express cytosolic phospholipase A2 after transient global forebrain ischemia in the rat.* Stroke, 1996. **27**(3): p. 527-35.

108. Kim, D.K., G. Rordorf, R.A. Nemenoff, W.J. Koroshetz ,J.V. Bonventre, *Glutamate stably enhances the activity of two cytosolic forms of phospholipase A2 in brain cortical cultures.* Biochem J, 1995. **310**(Pt 1): p. 83-90.

109. Malis, C.D., P.C. Weber, A. Leaf ,J.V. Bonventre, *Incorporation of marine lipids into mitochondrial membranes increases susceptibility to damage by calcium and reactive oxygen species: evidence for enhanced activation of phospholipase A2 in mitochondria enriched with n-3 fatty acids.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(22): p. 8845-9.

110. Malis, C.D. ,J.V. Bonventre, *Mechanism of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. A model for post-ischemic and toxic mitochondrial damage.* J Biol Chem, 1986. **261**(30): p. 14201-8.

111. Malis, C.D. ,J.V. Bonventre, *Susceptibility of mitochondrial membranes to calcium and reactive oxygen species: implications for ischemic and toxic tissue damage.* Prog Clin Biol Res, 1988. **282**: p. 235-59.

112. Lafon-Cazal, M., S. Pietri, M. Culcasi ,J. Bockaert, *NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity.* Nature, 1993. **364**(6437): p. 535-7.

113. Lauritzen, I., C. Heurteaux ,M. Lazdunski, *Expression of group II phospholipase A2 in rat brain after severe forebrain ischemia and in endotoxic shock.* Brain Res, 1994. **651**(1-2): p. 353-6.

114. Bonventre, J.V., *Roles of phospholipases A2 in brain cell and tissue injury associated with ischemia and excitotoxicity.* J Lipid Mediat Cell Signal, 1997. **17**(1): p. 71-9.

115. Block, F., M. Kunkel ,K.H. Sontag, *Posttreatment with EPC-K1, an inhibitor of lipid peroxidation and of phospholipase A2 activity, reduces functional deficits after global ischemia in rats.* Brain Res Bull, 1995. **36**(3): p. 257-60.

116. Jamme, I., O. Barbey, P. Trouve, D. Charlemagne, J.M. Maixent, E.T. MacKenzie, L. Pellerin ,A. Nouvelot, *Focal cerebral ischaemia induces a decrease in activity and a shift in ouabain affinity of Na+, K+-ATPase isoforms without modifications in mRNA and protein expression.* Brain Res, 1999. **819**(1-2): p. 132-42.

117. Qayyum, I., A.B. Zubrow, Q.M. Ashraf, J. Kubin, M. Delivoria-Papadopoulos ,O.P. Mishra, *Nitration as a mechanism of Na+, K+-ATPase modification during hypoxia in the cerebral cortex of the guinea pig fetus.* Neurochem Res, 2001. **26**(10): p. 1163-9.

118. DiGiacomo, J.E., C.R. Pane, S. Gwiazdowski, O.P. Mishra ,M. Delivoria-Papadopoulos, *Effect of graded hypoxia on brain cell membrane injury in newborn piglets.* Biol Neonate, 1992. **61**(1): p. 25-32.

119. Robinson, S., M. Tani, R.M. Strieter, R.M. Ransohoff ,R.H. Miller, *The chemokine growth-regulated oncogene-alpha promotes spinal cord oligodendrocyte precursor proliferation.* J Neurosci, 1998. **18**(24): p. 10457-63.

120. Robinson, S. ,L.A. Franic, *Chemokine GRO1 and the spatial and temporal regulation of oligodendrocyte precursor proliferation.* Dev Neurosci, 2001. **23**(4-5): p. 338-45.

121. Wu, Q., R.H. Miller, R.M. Ransohoff, S. Robinson, J. Bu ,A. Nishiyama, *Elevated levels of the chemokine GRO-1 correlate with elevated oligodendrocyte progenitor proliferation in the jimpy mutant.* J Neurosci, 2000. **20**(7): p. 2609-17.

122. McTigue, D.M., M. Tani, K. Krivacic, A. Chernosky, G.S. Kelner, D. Maciejewski, R. Maki, R.M. Ransohoff ,B.T. Stokes, *Selective chemokine mRNA accumulation in the rat spinal cord after contusion injury.* J Neurosci Res, 1998. **53**(3): p. 368-76.

123. Liu, T., P.R. Young, P.C. McDonnell, R.F. White, F.C. Barone ,G.Z. Feuerstein, *Cytokine-induced neutrophil chemoattractant mRNA expressed in cerebral ischemia.* Neurosci Lett, 1993. **164**(1-2): p. 125-8.

124. McTigue, D.M., P. Wei ,B.T. Stokes, *Proliferation of NG2-positive cells and altered oligodendrocyte numbers in the contused rat spinal cord.* J Neurosci, 2001. **21**(10): p. 3392-400.

125. Mandai, K., M. Matsumoto, K. Kitagawa, K. Matsushita, T. Ohtsuki, T. Mabuchi, D.R. Colman, T. Kamada ,T. Yanagihara, *Ischemic damage and subsequent proliferation of oligodendrocytes in focal cerebral ischemia.* Neuroscience, 1997. **77**(3): p. 849-61.

126. Pellegrini, S. ,I. Dusanter-Fourt, *The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs).* Eur J Biochem, 1997. **248**(3): p. 615-33.

127. Foxwell, B.M., C. Beadling, D. Guschin, I. Kerr ,D. Cantrell, *Interleukin-7 can induce the activation of Jak 1, Jak 3 and STAT 5 proteins in murine T cells.* Eur J Immunol, 1995. **25**(11): p. 3041-6.

128. Darnell, J.E., Jr., *STATs and gene regulation.* Science, 1997. **277**(5332): p. 1630-5.

129. Liu, X., G.W. Robinson ,L. Hennighausen, *Activation of Stat5a and Stat5b by tyrosine phosphorylation is tightly linked to mammary gland differentiation.* Mol Endocrinol, 1996. **10**(12): p. 1496-506.

130. Barahmand-pour, F., A. Meinke, M. Kieslinger, A. Eilers ,T. Decker, *A role for STAT family transcription factors in myeloid differentiation.* Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **211**: p. 121-8.

131. Koliatsos, V.E., R.E. Clatterbuck, J.W. Winslow, M.H. Cayouette ,D.L. Price, *Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo.* Neuron, 1993. **10**(3): p. 359-67.

132. Griesbeck, O., A.S. Parsadanian, M. Sendtner ,H. Thoenen, *Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function.* J Neurosci Res, 1995. **42**(1): p. 21-33.

133. Funakoshi, H., N. Belluardo, E. Arenas, Y. Yamamoto, A. Casabona, H. Persson ,C.F. Ibanez, *Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons.* Science, 1995. **268**(5216): p. 1495-9.

134. Shrikant, P. ,E.N. Benveniste, *The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation.* J Immunol, 1996. **157**(5): p. 1819-22.

135. Besedovsky, H.O. ,A. del Rey, *Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses.* Endocr Rev, 1996. **17**(1): p. 64-102.

136. Hickey, W.F., B.L. Hsu ,H. Kimura, *T-lymphocyte entry into the central nervous system.* J Neurosci Res, 1991. **28**(2): p. 254-60.

137. Knopf, P.M., C.J. Harling-Berg, H.F. Cserr, D. Basu, E.J. Sirulnick, S.C. Nolan, J.T. Park, G. Keir, E.J. Thompson ,W.F. Hickey, *Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells.* J Immunol, 1998. **161**(2): p. 692-701.

138. Rothwell, N.J., G. Luheshi ,S. Toulmond, *Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology, and pathology.* Pharmacol Ther, 1996. **69**(2): p. 85-95.

139. Serpe, C.J., A.P. Kohm, C.B. Huppenbauer, V.M. Sanders ,K.J. Jones, *Exacerbation of facial motoneuron loss after facial nerve transection in severe combined immunodeficient (scid) mice.* J Neurosci, 1999. **19**(11): p. RC7.

140. Raivich, G., L.L. Jones, C.U. Kloss, A. Werner, H. Neumann ,G.W. Kreutzberg, *Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration.* J Neurosci, 1998. **18**(15): p. 5804-16.

141. Fuchs, E. ,D.W. Cleveland, *A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease.* Science, 1998. **279**(5350): p. 514-9.

142. Eng, L.F. ,R.S. Ghirnikar, *GFAP and astrogliosis.* Brain Pathol, 1994. **4**(3): p. 229-37.

143. Frisen, J., C.B. Johansson, C. Torok, M. Risling ,U. Lendahl, *Rapid, widespread, and longlasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury.* J Cell Biol, 1995. **131**(2): p. 453-64.

144. Pekny, M., C.B. Johansson, C. Eliasson, J. Stakeberg, A. Wallen, T. Perlmann, U. Lendahl, C. Betsholtz, C.H. Berthold ,J. Frisen, *Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin.* J Cell Biol, 1999. **145**(3): p. 503-14.

145. Acarin, L., B. Gonzalez, J. Hidalgo, A.J. Castro ,B. Castellano, *Primary cortical glial reaction versus secondary thalamic glial response in the excitotoxically injured young brain: astroglial response and metallothionein expression.* Neuroscience, 1999. **92**(3): p. 827-39.

146. Hermanns, S. ,H.W. Müller, *Preservation and detection of lesion-induced collagenous scar in the CNS depend on the method of tissue processing.* Brain Res Brain Res Protoc, 2001. **7**(2): p. 162-7.

147. Rebagliati, M.R., D.L. Weeks, R.P. Harvey ,D.A. Melton, *Identification and cloning of localized maternal RNAs from Xenopus eggs.* Cell, 1985. **42**(3): p. 769-77.

148. Sturtevant, J., *Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology.* Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(3): p. 408-27.

149. Matz, M.V. ,S.A. Lukyanov, *Different strategies of differential display: areas of application.* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(24): p. 5537-43.

150. Milner, R.J. ,J.G. Sutcliffe, *Gene expression in rat brain.* Nucleic Acids Res, 1983. **11**(16): p. 5497-520.

151. Lukyanov, K., L. Diatchenko, A. Chenchik, A. Nanisetti, P. Siebert, N. Usman, M. Matz ,S. Lukyanov, *Construction of cDNA libraries from small amounts of total RNA using the suppression PCR effect.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **230**(2): p. 285-8.

152. Balzer, H.J. ,H. Baumlein, *An improved gene expression screen.* Nucleic Acids Res, 1994. **22**(14): p. 2853-4.

153. Yang, M. ,A.J. Sytkowski, *Cloning differentially expressed genes by linker capture subtraction.* Anal Biochem, 1996. **237**(1): p. 109-14.

154. Zeng, J., R.A. Gorski ,D. Hamer, *Differential cDNA cloning by enzymatic degrading subtraction (EDS).* Nucleic Acids Res, 1994. **22**(21): p. 4381-5.

155. Gurskaya, N.G., L. Diatchenko, A. Chenchik, P.D. Siebert, G.L. Khaspekov, K.A. Lukyanov, L.L. Vagner, O.D. Ermolaeva, S.A. Lukyanov ,E.D. Sverdlov, *Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemaglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate.* Anal Biochem, 1996. **240**(1): p. 90-7.

156. Ermolaeva, O.D., S.A. Lukyanov ,E.D. Sverdlov, *The mathematical model of subtractive hybridization and its practical application.* Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol, 1996. **4**: p. 52-8.

157. Milner, J.J., E. Cecchini ,P.J. Dominy, *A kinetic model for subtractive hybridization.* Nucleic Acids Res, 1995. **23**(1): p. 176-87.

158. Wan, J.S., S.J. Sharp, G.M. Poirier, P.C. Wagaman, J. Chambers, J. Pyati, Y.L. Hom, J.E. Galindo, A. Huvar, P.A. Peterson, M.R. Jackson ,M.G. Erlander, *Cloning differentially expressed mRNAs.* Nat Biotechnol, 1996. **14**(13): p. 1685-91.

159. Guimaraes, L., Zlotnik, *Differntial Display by PCR: novel findings and applications.* Nucleic Acids Research, 1995. **23**(10): p. 1832-1833.

160. Epstein, C.B. ,R.A. Butow, *Microarray technology - enhanced versatility, persistent challenge.* Curr Opin Biotechnol, 2000. **11**(1): p. 36-41.

161. Jurecic, R. ,J.W. Belmont, *Long-distance DD-PCR and cDNA microarrays.* Curr Opin Microbiol, 2000. **3**(3): p. 316-21.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Wilhelm Nacimiento und Herrn Dr. med. Andreas Schmitt danke ich für das Ermöglichen meiner Arbeit, sowie ihre fachliche Unterstützung und für viele Anregungen bei den Korrekturlesearbeiten.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Hubert Korr danke ich für die Korrekturlesung und vielen Anregungen.

Ich möchte Herrn Dr. rer. nat. Sebastian Breuer und Frau Katrin Pech für ihre fachliche Unterstützung und stetige Hilfsbereitschaft herzlich danken.

Bei meinen Mitdoktoranden Imke Ammenwerth, Tanja Bartscher und Kathrin Rache möchte ich mich für die gute, konstruktive Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Frau Ute Zeiffer möchte ich ganz besonders für ihren fachlichen Rat und die stetige Unterstützung meiner Arbeit danken.

Zu großem Dank bin ich auch meinen Eltern verpflichtet, die mich stets unterstützt haben und für deren fachlichen und sachlichen Rat bei zahlreichen Korrekturarbeiten ich sehr dankbar bin.

Tabellarischer Lebenslauf

Jan Liman

Geboren am 16.02.1975 in Holzminden
Sohn von Dr. med. Werner und Helga Liman geb. Reismann
ledig

Schulbildung

1981-1984	Kardinal-von Galen-Grundschule, Sendenhorst
1984-1985	Grundschule Geweke, Hagen-Haspe
1985-1994	Christian-Rohlfs-Gymnasium, Hagen-Haspe
1994	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1994-1995	Evangelisches Krankenhaus, Hagen-Haspe

Medizinstudium

1995-1999	Rheinisch-Westfälische-Technische-Hochschule, Aachen
1997	Ärztliche Vorprüfung
1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999-2000	University of Sydney, Australien
2000-2002	Rheinisch-Westfälische-Technische-Hochschule, Aachen
2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Wissenschaftlicher Werdegang

1998-2001	Experimentalphase der Dissertation an der RWTH-Aachen in der Forschungsgruppe für Neuroregeneration (Prof. Dr. W. Nacimiento/ Dr. A. Schmitt)
Seit 08/2002	Arzt im Praktikum Neurologische Klinik (Leiter: Prof. Dr. M. Bähr) Universitätsklinikum Göttingen