
Aus dem Institut für Hirnforschung
Abteilung Hirnforschung
Lehrbereich Neuropathologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Meyermann

Frühe transkriptionelle Veränderungen der mRNA-Varianten des
Early Growth Response Genes *egr1* sowie des endothelialen
Monozytenaktivierungspeptids *emap* nach ionisierender
Bestrahlung im Zentralen Nervensystem der Ratte

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Sarah Wölfel
aus Berlin

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Meyermann

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Belka

Tabellenverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	2
Vorwort.....	5
1. Einleitung.....	6
1.1 Langzeit-Effekte nach Bestrahlung und ihre möglichen Ursachen	6
1.2 Mittelfristige Effekte ionisierender Bestrahlung	7
1.3 Der Transkriptionsfaktor Egr-1 ist ein wichtiges Schlüsselgen bei diversen physiologischen und pathologischen Anpassungsprozessen	8
1.4 Die EGR – Familie	9
1.5 Fakten zum Transkriptionsfaktor Egr-1 und seine Eigenschaften.....	10
1.5.1 Basale Expression von Egr-1	10
1.5.2 Zielsequenz und -gene von Egr-1	11
1.5.3 Funktionen von Egr-1	11
1.5.4 Vom Transkriptionsfaktor Egr-1 existieren unterschiedliche Varianten mit einer unterschiedlichen subzelluläre Lokalisation.....	13
1.5.5 Die Existenz unterschiedlicher mRNA-Varianten des Egr-1 Genes konnte in der Retina von Mäusen nachgewiesen werden.....	16
1.5.6 Die Einwirkung ionisierender Strahlung auf die Expression von Egr-1 und die Funktion von Egr-1 bei der Antwort auf Bestrahlung	17
1.6 Mikroglia, gliale Zellen	19
1.6.1 Mikroglia agieren als Marker für pathologische Ereignisse im ZNS	19
1.6.2 Mikroglia – Beeinflussung der Funktion neuronaler Vorläuferzellen nach Bestrahlung ?	20
2. Zielsetzung.....	22
3. Material und Methoden.....	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Tiere.....	24
3.1.2 Geräte.....	24
3.1.3 Verbrauchsmittel.....	25
3.1.4 Chemikalien.....	26
3.2 Methoden	27
3.2.1 Tiere und Behandlung.....	27
3.2.2 RNA-Isolation, -aufreinigung.....	29
3.2.3 Photometrische Vermessung	31
3.2.4 Reverse Transkription, cDNA-Synthese	31

3.2.5	Proteinisolation	33
3.2.6	Quantitative Real Time PCR	33
3.2.7	Auswahl der PCR-Primer	34
3.2.8	Etablierung von Primern und Anfertigung von Standardkurven für die Ermittlung der Effizienz der jeweiligen quantitativen real-time RT-PCRs	40
3.2.9	Auswertung und Statistik.....	41
3.2.10	Detektion der Amplifikationsprodukte durch Gelelektrophorese.....	42
3.2.11	Fotographieren der Gele	43
4.	Resultate	44
4.1	Amplifikations-Effizienzen und Stabilität der Expression des Housekeeping – Genes	44
4.2	Spezifität und Variabilität der semiquantitativen real time PCR.....	46
4.2.1	Amplifikationskurven-Analyse.....	46
4.2.2	Schmelzkurvenanalyse	48
4.2.3	Gelelektrophorese-Auswertung	49
4.2.4	Bestimmung der Variabilität.....	49
4.3	Basale Expressionen	51
4.4	Generelle Behandlungs- und Bestrahlungs-induzierte Veränderungen.....	53
4.5	Bestrahlungseffekte	56
4.5.1	<i>egr1-lv</i>	56
4.5.2	<i>egr1-sv</i>	59
4.5.3	<i>emap</i>	62
5.	Diskussion.....	66
5.1	Darstellung des immunhistochemischen Gegenparts zu dieser Arbeit und Beurteilung in Bezug auf Ergebnisse der Molekularbiologie.....	66
5.2	Existenz unterschiedlicher mRNA-Varianten von <i>egr1</i> in unterschiedlichen Hirnregionen	69
5.2.1	Egr-1 in Molekularbiologie und Immunhistochemie	70
5.2.2	Bestrahlung induziert Abnahme der Expression von <i>egr1-lv</i>	71
5.3	Frühe Aktivierung von Mikroglia.....	72
5.4	Beurteilung der real time PCR – Methode	73
5.5	Beurteilung der Verwendung von <i>emap</i> in der PCR als Marker für mikrogliale Aktivierung.....	76
6.	Zusammenfassung	78
7.	Literatur	80
	Danksagung	92

Lebenslauf	93
------------------	----

*für Ulrike, Michael, Jule und Christoph
und ihre Geduld.*

Tabelle 1: Tiere.....	24
Tabelle 2: Geräte	25
Tabelle 3: Verbrauchsmittel	26
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien	27
Tabelle 5: Sequenz und Länge der Sense- und Antisense-Primer.....	37
Tabelle 6: Schmelztemperaturen der Sense- und Antisense- Primer	37
Tabelle 7: Überblick über die Schritte der PCR – Reaktion.....	39

Abbildung 1: Standardkurven zur Berechnung der Effizienz einzelner Primer	45
Abbildung 2: Standardkurven von fünf Verdünnungsstufen mit abnehmender Konzentration.	47
Abbildung 3: Darstellung der Schmelzkurven mit für das jeweilige Amplikon spezifischen Schmelzpunkten.....	48
Abbildung 4: Darstellung der PCR-Spezifität durch Gelelektrophorese-Auswertung der PCR-Läufe.	49
Abbildung 5: Variationskoeffizienten (CV) der CT-Rohdaten und errechneten Mean Normalized Expression – Werte (MNE) in Prozent.....	51
Abbildung 6: Darstellung genereller bestrahlungs-induzierter Effekte.....	55
Abbildung 7: Darstellung der hirregion-spezifischen Veränderungen der <i>egr1-lv</i> Genexpression in Folge von Bestrahlung.....	58
Abbildung 8: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Expressionsänderungen von <i>egr1-</i> <i>lv</i> in den untersuchten Hirnarealen.	59
Abbildung 9: Darstellung der Bestrahlungseinwirkung auf die Expression (MNE x 10 ⁻²) von <i>egr1-sv</i> in den verschiedenen Hirnarealen.	61
Abbildung 10: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Expressionsänderungen von <i>egr1-sv</i> in den untersuchten Hirnarealen.....	62
Abbildung 11: Bestrahlungseinwirkung auf die Expression von <i>emap</i> in den verschiedenen Hirnarealen	64
Abbildung 12: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Expressionsänderungen von <i>emap</i> in den untersuchten Hirnarealen	65
Abbildung 13: Darstellung der additionalen Basenpaare am 3' UTR der <i>egr1-lv</i> mRNA.	69

3'UTR	untranslatierte Region am 3'Ende der mRNA
bp	Basenpaare
cDNA	Copy-DNA
CI	Konfidenzintervall
CRE	cAMP Response Element
CSF	Colony Stimulating Factor
dATP	Desoxy Adenosin Triphosphat
dCTP	Desoxy Cytosin Triphosphat
dGTP	Desoxy Guanosin Triphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dTTP	Desoxy Tyrosin Triphosphat
<i>egr1</i>	early growth response Gen
<i>egr1</i>	early growth response mRNA
Egr-1	early growth response Protein in der Ratte
<i>egr1-lv</i>	early growth response mRNA, lange Variante
<i>egr1-sv</i>	early growth response mRNA, kurze Variante
<i>emap</i>	Endotheliale-Monozyten-Aktivierende-Polypeptid II mRNA
EMAP	Endotheliale-Monozyten-Aktivierende-Polypeptid II, Protein
Gy	Gray
h	Stunde/-n
IFN	Interferon
IL	Interleukin
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid

min	Minute/-n
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
MNE	Mean Normalized Error
mRNA	Messenger-RNA
n	Anzahl
Na	Natrium
NO	Stickoxid
NR	nicht-bestrahlt (non-radiated)
PCR	Polymerasekettenreaktion
R	bestrahlt (radiated)
ROI	Reaktive Oxygen Species
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunde/-n
SRE	Serum Response Element
TGF	Tumor Growth Factor
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV-C	Ultraviolett-Strahlung C
V	Volt
ZNS	Zentrales Nervensystem

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Gemeinschaftsdissertation, welche die Untersuchung früher bestrahlungsinduzierter Veränderungen im ZNS von Ratten zum Ziel hatte. Hierfür wurden auf molekularer Ebene die Veränderungen der Expression sowie der zellulären und subzellulären Lokalisation des Transkriptionsfaktors und „Early Response Genes“ und auf zellulärer Ebene die mikrogliale Antwort untersucht. Dieser Teil der Arbeit stellt dabei den molekularbiologischen Anteil dar. Er befasst sich mit der Untersuchung verschiedener mRNA-Varianten des *egr1*-Genes und möglicher Expressionsänderungen nach Einwirkung ionisierender Strahlung auf unterschiedliche Regionen des ZNS. Da die beiden mRNA-Varianten für das gleiche Protein codieren, ist ihre Unterscheidung lediglich durch molekularbiologische Methoden möglich. Die vorliegende Dissertation verwendet hierbei mit der quantitativen real-time PCR ein Verfahren, welches darüber hinaus eine reliable Quantifizierung einer über ein Gesamtgewebe gemittelten Expression ermöglicht. Für den Diskussionsteil dieser Arbeit wurden noch die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen, die von cand. med. Henning Vollmann durchgeführt wurden, mitberücksichtigt. In der Arbeit von Herrn Vollmann wurden vor allem die Fragen der zellulären und subzellulären Lokalisierung von Egr1 sowie der Aktivierung der Mikroglia auf Proteinebene untersucht.

Die gemeinschaftliche Durchführung der Arbeit erstreckte sich somit auf den Tierversuch und verlief ab der Gewebeentnahme getrennt in einem hier beschriebenen molekularbiologischen Teil und in einem von Herrn Vollmann durchgeführten proteinbiochemischen Teil. Die Zusammenführung der Ergebnisse in der Diskussion profitiert dadurch vom synergistischen Charakter dieser beiden methodisch distinkten Ansätze.

1. Einleitung

1.1 Langzeit-Effekte nach Bestrahlung und ihre möglichen Ursachen

Kognitiver Abbau sowie ein erhöhtes Ausmaß an strukturellen degenerativen Veränderungen wie zum Beispiel Leukenzephalopathie sind das Resultat kranialer Bestrahlungen im Rahmen von Tumorerkrankungen des Gehirns. Vor allem die hippocampal vermittelten Funktionen des Lernens sowie das Gedächtnis und die Verarbeitung räumlicher Funktionen weisen in Untersuchungen nach Monaten bis Jahren nach Bestrahlung signifikante Defizite auf. (J. R. Crossen *et al.* 1994; O. K. Abayomi 1996; D. D. Roman, P. W. Sperduto 1995). Steigende Raten erfolgreich behandelter Tumoren gehen einher mit einer zunehmenden Zahl dementer Patienten unter den Langzeit-Überlebenden (J. R. Crossen *et al.* 1994; P. W. Lee *et al.* 1989). Insbesondere pädiatrische Patienten trifft dies hart. Ihre schulische Laufbahn wird häufig durch neuropsychologische Störungen mit einer Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses, der visuellen Wahrnehmung und des Lernvermögens negativ beeinflusst und Besuche einer Sonderschule und Schulabschlüsse auf niedrigerem Niveau sind die Folge. Je jünger die Kinder zum Zeitpunkt der Bestrahlung, desto deutlicher fällt eine Erniedrigung des Intelligenzquotienten auf (ME Cohen, A. W. Duncan 1994).

Histologisch wird dieser kognitive Abbau jedoch keineswegs von einer offensichtlichen Vaskulopathie oder Demyelinisierung begleitet. Tiermodelle zeigen jedoch einen Anstieg apoptotischer Zellen im Hippocampus (E. Tada *et al.* 2000; W. Peissner *et al.* 1999) sowie eine Abnahme der hippocampalen Proliferationsraten und der Neurogenese (J. S. Snyder *et al.* 2001).

Das Auftreten von Sekundärmalignomen ist mit zirka 3 % eher selten. Zweittumoren wie z.B. Meningeome, Glioblastome, aber auch Schilddrüsentumoren entstehen meist mit einer Latenz von 5-40 Jahren im Bereich des Strahlenfeldes. (ME Cohen, A. W. Duncan 1994; R. J. Packer *et al.* 1992)

1.2 Mittelfristige Effekte ionisierender Bestrahlung

Ebenso wie die oben aufgeführten Untersuchungen der Langzeitfolgen von Bestrahlung wurden von anderen Arbeitsgruppen die mittelfristigen Effekte nach Einwirkung ionisierender Strahlung vor allem auf zellulärer Ebene beschrieben:

So beobachteten Kurita und Kollegen, dass die Bestrahlung des ZNS von Ratten mit Einfachdosen von 10 bzw. 20 Gray (Gy) zu einem signifikanten Anstieg apoptotischer oligodendroglialer Zellen in verschiedenen Gehirnarealen und einer dementsprechenden Abnahme der Zelldichte (Zellzahl/ mm²) führt (H. Kurita *et al.* 2001). Sie berichten eine dosis- und zeitabhängige Zunahme der Apoptoserate, die im Falle einer Bestrahlung mit 10 Gy nach 8 h bzw. bei Behandlung mit 20 Gy nach 4 h ein Maximum aufweist, bevor sie nach 24 h auf Ausgangsniveau zurückkehrt. Sowohl TUNEL-Methode als auch morphologische Aspekte (abgerundete-, geschrumpfte-, alleinstehende Zellen) identifizieren apoptotische Zellen, eine tatsächliche Abnahme der Zellzahl wird durch die Bestimmung der Zelldichte bestätigt. TUNEL-positive Zellen sind überwiegend positiv für CNP (cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase), einen Oligodendrocyten-Marker, und GFAP-negativ (glial fibrillary acidic protein). Bestrahlungsinduzierter zentralnervöser Zellverlust in der weißen Substanz erfolgt via Apoptose und der Hauptanteil betroffener Zellen ist oligodendroglialer Natur (H. Kurita *et al.* 2001). Inwiefern und ob Zusammenhänge bestehen zwischen diesem akuten Ereignis innerhalb der Population von Oligodendrozyten und den leukencephalopathischen Spätfolgen eines Bestrahlungs-Ereignisses ist bis dato ungeklärt. Demyelinisierungs-Prozesse deuten aber auf einen kausalen Zusammenhang mit dem Untergang myelinscheidenbildender Oligodendrozyten.

Es gibt Hinweise, dass die Aktivierung mikroglialer Zellen und eine Veränderung des extrazellulären Milieus nach Bestrahlung eine korrekte Ausdifferenzierung neuronaler Vorläuferzellen verhindern (M. L. Monje *et al.* 2002). Dennoch ist unbekannt, ob die

Aktivierung von Mikroglia -in ihrer Funktion als residente Makrophagen des ZNS- eine sekundäre Reaktion auf ein primär gewebeschädigendes Ereignis darstellt, oder ob sie sich vor dem Auftreten zytotoxischer Effekte finden lässt. Ebenso besteht Unklarheit darüber, ob ein molekularer Pfad existiert, der möglicherweise durch Bestrahlung direkt initiiert wird und welcher in der Lage ist, Bestrahlungsfolgen wie zum Beispiel die Aktivierung von Mikroglia und andere – von einer direkten Bestrahlungseinwirkung unabhängigen – zelluläre Antworten zu vermitteln. Die Induktion von als „Immediate Early Genes“ bezeichneten Transkriptionsfaktoren stellt eine der initialen Antworten auf eine Vielzahl von Stimuli dar, hierunter auch Bestrahlung (S. M. Keyse 1993).

Im Folgenden wird deshalb vor allem auf die Expression des Transkriptionsfaktors *egr1* als möglichen molekularen Marker und die Aktivierung von Mikroglia als möglichen zellulären Marker für eine frühe Reaktion des ZNS auf Bestrahlung eingegangen.

1.3 Der Transkriptionsfaktor Egr-1 ist ein wichtiges Schlüsselgen bei diversen physiologischen und pathologischen Anpassungsprozessen

Ein Organismus reagiert mit der raschen Induktion von „Immediate Early Genes“ auf eine große Anzahl von Stimuli.

Das „Early Growth Response“- Gen-1, auch als Egr-1, Krox-24, zif268, NGFI-A, ZENK, TIS8 ETR103 und d2 bezeichnet, gehört zu der großen Gruppe der „Early Growth Response“ - Gene, einer Gruppe von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, die innerhalb weniger Minuten nach mitogener und anderer Stimulation exprimiert werden (V. P. Sukhatme 1990).

1987 wurde das EGR-1 kodierende Gen von Milbrandt aus PC12 Zellen (Phäochromozytom - Zelllinie) von Ratten isoliert und NGFI-A (Nerv Growth Factor-Inducible Gene A) genannt (J. Milbrandt 1987). Seitdem hat es weitere Bezeichnungen wie zum Beispiel Krox-24, zif268, ZENK, TIS8 ETR103 und d2

erhalten. Die enorme Vielzahl an bisher bekannten Funktionen und Eigenschaften von EGR-1 kommt zum Ausdruck in der Vielfältigkeit der synonymen Bezeichnungen ein und desselben Genes.

Das humane *egr-1* Gen (im Text *egr-1* bezeichnet) ist auf dem Chromosom 5 lokalisiert (5q23-31)(V. P. Sukhatme *et al.* 1988) und sein Genprodukt, das EGR-1 Protein (im Text EGR-1 bezeichnet), wurde ursprünglich als nukleäres Phosphoprotein (C. M. Waters *et al.* 1990) beschrieben, das im Rahmen von Zellwachstums- und Differenzierungsprozessen sowie auch bei neuronaler Depolarisation vermehrt exprimiert wird (V. P. Sukhatme *et al.* 1988).

1.4 Die EGR – Familie

Die Signaltransduktion zwischen Zellen wird von einer Gruppe von regulatorischen Molekülen übernommen, die als Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Kinasen oder Transkriptionsfaktoren agieren können. Es wird immer deutlicher, dass die meisten Regulatoren von Wachstums- und Differenzierungsprozessen durch Gene bestimmter nah verwandter Gen-Familien kodiert werden. Von entscheidender Bedeutung hinsichtlich der Beantwortung eines beispielsweise durch Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren oder Zell-Zell-Interaktion ausgelösten Stimulus sind verschiedene Gruppen von nukleären Transkriptionsfaktoren. Eine dieser Gruppen ist die der Early Growth Response Gene. Zwei Kriterien definieren die Zusammengehörigkeit von Mitgliedern dieser Gruppe:

- 1.) Transkriptionsfaktoren dieser Gruppe binden an sich gleichende GC-reiche DNA-Regionen: 5'-GCGGGGGCG-3', auch bezeichnet als die EGR Konsensus Sequenz (H. Nakagama *et al.* 1995;B. Christy, D. Nathans 1989;S. D. Crosby *et al.* 1991).
- 2.) Die Bindung an diese Region erfolgt über ein C₂H₂ – Zinkfinger- Motiv Nach Literaturangaben liegt die Homologie dieser Zinkfinger-Regionen bei 61-94 % und ist somit sehr hoch (F. J. Rauscher, III *et al.* 1990).

Zu den Repräsentanten dieser Familie gehören unter anderem Egr-1, Egr-2, Egr-3, Egr-4 und WT1 (Wilms' Tumor Gen) (S. L. Madden, F. J. Rauscher, III 1993). Bis auf das WT1 Protein besitzen alle Proteine dieser Genfamilie drei Zinkfinger, deren

Sequenz innerhalb eines Exons kodiert wird. WT1 enthält einen zusätzlichen Zinkfinger, außerdem werden alle Zinkfinger dieses Proteins von verschiedenen Exons kodiert. Laut Madden und Rauscher könnten sowohl der Promoter-Kontext der Egr-1 Bindungsstelle als auch der entsprechende Zelltyp ausschlaggebend dafür sein, ob EGR-1 als Transkriptions-Aktivator oder -Repressor agiert.

1.5 Fakten zum Transkriptionsfaktor Egr-1 und seine Eigenschaften

1.5.1 Basale Expression von Egr-1

ZNS, Ratte

Mack und Kollegen untersuchten 1990 die Verteilung von Egr-1 im zentralen Nervensystem (ZNS) der Ratte und konnten drei Hauptaussagen festhalten:

Das Protein EGR-1 wird in vielen Neuronen in unterschiedlichen Regionen des ZNS der Ratte exprimiert. Immunoreaktive Anfärbungen lassen sich in erster Linie dem Nukleus der Neurone zuordnen, ein geringerer Anteil gefärbter Zellen zeigt auch eine Lokalisation des Proteins im Zytoplasma. Bei dem Protein handelt es sich wie zuvor beschrieben (M. L. Day *et al.* 1990) um ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 84 kDA. Des weiteren erscheinen gliale Zellen negativ, wobei die Autoren nicht ausschließen wollen, dass eine Anfärbung zwar stattfindet, diese jedoch unterhalb der Detektionsgrenze liegt. Die Induktion tonischer oder tonisch-klonischer Krämpfe resultiert in einem moderaten Anstieg der Egr-1–Levels (K. Mack *et al.* 1990).

Neurone im Hippocampus, Ratten

Die basale Expression von Egr-1 im Stratum granulosum des Gyrus dentatus ist gering. Höher ist sie in CA3 und sehr hohe Expressionraten weisen CA1 und Subiculum des Hippocampus auf. Diese Aussagen betreffen in erster Linie die Nuklei der Neurone. Die Bedeutung dieser Feststellung ist nicht vollends geklärt. So bleibt

zum Beispiel die Frage offen, ob die basal exprimierten Proteine in CA1 und Subiculum möglicherweise inaktiv sind und erst posttranslationale Modifikationen (möglicherweise durch Phosphorylierung oder Demethylierung) eine Aktivierung bewirken, während dagegen eine „Aktivierung“ in granulären Neuronen des Gyrus dentatus möglicherweise lediglich durch Transkription des Proteins erfolgen kann (P. Hughes *et al.* 1992).

1.5.2 Zielsequenz und -gene von Egr-1

Egr-1 ist ein Transkriptionsfaktor der Early Gene Response - Familie, der mit seinen drei hoch homologen Zinkfingermotiven an eine GC-reiche Zielsequenz (5'-GCGGGGGCG-3') in DNA-Strängen bindet und dadurch deren Transkription beeinflusst. Verschiedenste in die Regulation von Zellwachstums- und -differenzierungsprozessen involvierte Gene weisen diese Sequenz in denjenigen Abschnitten auf, die ihre Expressierung kontrollieren. Da diese Gene nicht an erster Stelle einer Regulationskette molekularer Mechanismen steht, werden sie auch als „downstream“ Gene bezeichnet. Zu diesen durch Egr-1 regulierten downstream Genen gehören unter anderem der Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), der Transforming Growth Factor β (TGF- β), der Epidermal Growth Factor (EGF), der Platelet Derived Growth Factor A (PDGF-A) (A. Gashler, V. P. Sukhatme 1995), die β -Untereinheit des luteinisierenden Hormons (C. Knight *et al.* 2000; C. Dorn *et al.* 1999) und *egr1* selber (R. G. Meyer *et al.* 2002; A. Pines *et al.* 2003).

Die transiente Induktion von Egr-1 erfolgt durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli wie zum Beispiel Zytokine, Wachstumsfaktoren (F. S. Santiago *et al.* 1999), Hypoxie (S. F. Yan *et al.* 2000), oder ionisierende Strahlung (S. M. Keyse 1993).

1.5.3 Funktionen von Egr-1

Die klinische Relevanz des Transkriptionsfaktors Egr-1 ergibt sich aus seiner initialen Schlüsselfunktion in einer ganzen Reihe von physiologischen und

pathophysiologischen Prozessen. Seine Funktionen sind außerordentlich vielfältig und es darf angenommen werden, dass viele der Vorgänge, an denen Egr-1 beteiligt ist, bis heute unerkannt sind.

Die Proliferation und Differenzierung von eukaryoten Zellen wird durch Wachstumsfaktoren und andere Stimuli beeinflusst. Langzeitveränderungen auf zellulärer Ebene werden durch Veränderungen auf molekularer Ebene eingeleitet. Diese Veränderungen wiederum werden durch biochemischen Vorgänge vermittelt, die rasch im Anschluss an die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor oder eine Veränderung des extrazellulären Milieus stattfinden.

In ersten Veröffentlichungen wird das *egr1* Genprodukt als ein in Analogie mit dem Protoonkogen *c-fos* durch Wachstum, Differenzierung sowie Depolarisation von Zellen reguliertes (V. P. Sukhatme *et al.* 1988), induzierbares, kurzlebiges und nukleäres Phosphoprotein (C. M. Waters *et al.* 1990) beschrieben. Heute weiß man, dass es sich bei Egr-1 tatsächlich um einen Transkriptionsfaktor handelt, der unter anderem an Prozessen wie Immunotoleranz (V. L. Seyfert *et al.* 1990), Ischämie (S. F. Yan *et al.* 2000), Fortpflanzung (S. L. Lee *et al.* 1996; W. G. Tourtellotte *et al.* 2000), Kurzsichtigkeit (A. J. Fischer *et al.* 1999; P. Simon *et al.* 2004a), Schmerzverarbeitung im Hippocampus (F. Wei *et al.* 2000) und der Ausbildung sowohl von Langzeitgedächtnis (M. W. Jones *et al.* 2001) als auch von Angst (S. Malkani, J. B. Rosen 2001) beteiligt ist. Die Proliferation von Schwannzellen und Ausbildung von Myelinscheiden involviert ebenfalls Egr-1 und ist Triiodthyronin (T3)-abhängig (G. Mercier *et al.* 2001).

Auch förderliche (S. F. Sells *et al.* 1995) sowie inhibierende (T. Virolle *et al.* 2001) Auswirkungen auf das Wachstum maligner Tumoren sind beschrieben. Über eine direkte Aktivierung des Tumorsuppressors PTEN bewirkt Egr-1 einen apoptotischen Untergang maligne entarteter Zellen. Auch die bestrahlungs- und etoposid-induzierte Stimulation von PTEN im Rahmen einer Therapie kann nur stattfinden, wenn funktionierendes Egr-1 vorliegt. (T. Virolle *et al.* 2001). PTEN ist eine Lipid – Phosphatase, die das D3-Phosphat von Phosphatidylinositol-3-Phosphaten entfernt und dadurch die Bildung von second messengers verhindert. Andererseits kann Egr-1 über eine Behinderung des Interleukin-1 (IL-1)- induzierten Tumorstillstands einen förderlichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Tumoren ausüben. Das

Zytokin IL-1 wird von aktivierten Makrophagen und Monozyten produziert und kann unter anderem eine Immunantwort des Hosts auf einen Tumor sowie einen Wachstumsstopp von Tumorzellen bewirken. (S. F. Sells *et al.* 1995).

Ein weiterer außerordentlich interessanter Aspekt bezüglich der Funktionen von Egr-1 ist seine Mitwirkung an hippocampal vermittelten zentralnervösen Funktionen wie Schmerzgedächtnis, Langzeitgedächtnis und der diesen Funktionen zugrundeliegenden synaptischen Plastizität. Wei und Kollegen konnten im Jahr 2000 zeigen, dass eine tetanische Stimulation von Hippocampuszellen in Ratten, denen zuvor ein Schmerzreiz zugeführt wurde, über eine Aktivierung exzitatorischer glutaminerger Synapsen zu einer 2-4 Stunden andauernden Hochregulation der *egr1* Genprodukte führt (F. Wei *et al.* 2000). Sie fanden weiterhin heraus, dass diese Hochregulation von Egr-1 bei der Entstehung längerfristiger synaptischer Plastizität von exzitatorisch wirkenden Synapsen (late phase Long Term Potentiation, LTP) eine essentielle Rolle spielt, nicht jedoch im Rahmen der von synaptischen Kurzzeitveränderungen oder Long Term Depression. Dabei ist die Hochregulation von Egr-1 immer abhängig von einer NMDA-Rezeptor Aktivierung. Letzteres zeigten zuvor auch andere Arbeiten (A. J. Cole *et al.* 1989).

Auch die Generierung eines Langzeitgedächtnisses, wohl aber die eines Kurzzeitgedächtnisses, gelang in *egr1*^{-/-} - mutanten Mäusen nicht. Dies zeigt, dass Egr-1 auch für hippocampal vermittelte kognitive Funktionen zumindest teilweise von Notwendigkeit ist (M. W. Jones *et al.* 2001).

Simon und Kollegen beschrieben 2004 erstmals zwei unterschiedliche mRNA Varianten des *egr1* Gens, die in der Netzhaut in Abhängigkeit der neuronalen Aktivität differenziell reguliert werden (P. Simon *et al.* 2004b).

1.5.4 Vom Transkriptionsfaktor Egr-1 existieren unterschiedliche Varianten mit einer unterschiedlichen subzelluläre Lokalisation

Diese Vielfalt an von Egr-1 vermittelten Prozessen ist bemerkenswert und vermutlich noch wesentlich umfangreicher als bis heute bekannt. Zahlreiche Versuche an *egr1*^{-/-} - Mäusen (Knock-out Mäuse) haben diverse funktionelle Schlüsselstellungen von Egr-1 erhellt (F. Wei *et al.* 2000; M. W. Jones *et al.* 2001), dabei allerdings die Frage nach

den genauen molekularen Abläufen offen gelassen. Es ist nach wie vor unklar, wie genau es zustande kommt, dass ein Gen und sein Produkt solch zahlreiche und teilweise widersprüchliche Funktionen erfüllen kann.

Wie bei anderen Transkriptionsfaktoren scheinen diese unterschiedlichen Funktionen wesentlich von posttranskriptionalen und posttranslationalen Prozessierungen in einem genauer zu definierenden zellulären Kontext abzuhängen.

Nukleäres Lokalisations – Signal

In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor ist eine Lokalisierbarkeit von Egr-1 im Zellkern als wesentlichen Wirkort nur natürlich. Nach der Translation der *egr1* mRNA an zytoplasmatischen Ribosomen wird das Genprodukt Egr-1 in den Zellkern transloziert, wo es seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausführen kann. Diejenige Sequenz, die für eine Verschiebung des Proteins vom Zytoplasma in den Nukleus sorgt, nennt sich „Nuclear Localization Signal“ (NLS). Als NLS von Egr-1 wurde der DNA-bindende Anteil, das heißt ein Abschnitt der Zinkfinger-Struktur, identifiziert. Diese wird von den Aminosäuren 328 bis 433 gebildet. Für eine Verschiebung in den Zellkern sind alle drei Zinkfinger - mit unterschiedlicher Gewichtung wie Deletionsversuche einzelner Zinkfinger beweisen - und zudem lediglich der Erhalt der Zinkfinger - Sekundärstruktur entscheidend, nicht jedoch die DNA-Bindungsfähigkeit selber. Die Aminosäuresequenz, die den NLS-Bereich bildet, stellt einen extrem konservativen Bereich der *egr-1* Sequenz dar. Er zeigt eine 80%-ige Identität mit den entsprechenden Zinkfinger-Regionen der anderen Mitglieder der EGR-Familie. (C. Matheny *et al.* 1994)

Die subzelluläre Lokalisation von Egr-1 und ihre funktionelle Bedeutung in den Neuronen des ZNS

1990 konnte durch Untersuchungen an PC12 Zellen, die mit NGF stimuliert wurden, nachgewiesen werden, dass Egr-1 in zwei unterschiedlichen Varianten existiert, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorkommen (M. L. Day *et al.* 1990). Mit gegen verschiedene Regionen von Egr-1 gerichteten Antikörpern und Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass eine 54 kDA- und eine 84 kDA- Variante von Egr-1

existieren, wobei sich die 84 kDA– Bande in der Elektrophorese als Doppelbande darstellt. Diese Doppelbande stellt sich nach einer Behandlung mit Alkalischer Phosphatase nicht mehr dar. Die 84 kDA–Variante ist demnach phosphoryliert. Eine andere mögliche posttranslationale Modifizierung – Glykosylierung – konnte ausgeschlossen werden. Mit Hilfe eines spezifisch gegen die C-terminale Region der Proteine gerichteten Antikörpers wurde gezeigt, dass die 54 kDA–Variante diesen carboxyl-terminalen Anteil nicht enthält. Zellfraktionierungs-Versuche legten eine strenge Auftrennung der Lokalisation beider Varianten nahe. So wurde die 84 kDA-Variante ausschließlich in den Kernen und die 54 kDA-Variante ausschließlich im Zytoplasma gefunden. Es konnte jedoch mit Pulse-Chain-Versuchen kein Precursor-Produkt-Zusammenhang eruiert werden. Dies bedeutet, dass die Kinetik der beiden Varianten in Bezug sowohl auf Induktion als auch auf den anschließenden Rückgang der Hochregulation nach ca. 60 Minuten identisch waren, d.h. eine Induktion der eine Variante nicht den Rückgang der anderen Variante und umgekehrt zur Folge hatte. Day und Kollegen ließen dabei 1990 offen, ob es sich bei der zytoplasmatischen Variante lediglich um ein möglicherweise funktionell unbedeutendes Abbauprodukt der nukleären Variante handelt, welche durch proteolytische Spaltung oder alternatives Splicen entstanden sein könnte.

Wie sich durch die spätere Identifizierung des NLS (C. Matheny *et al.* 1994) herausstellte, enthält sowohl die nukleäre als auch die zytoplasmatische Variante das Signal zum Transport in den Zellkern in demjenigen Teil, der für die Aufrechterhaltung der Funktion des Transkriptionsfaktors von entscheidender Bedeutung ist, nämlich der DNA-bindenden Zinkfinger-Domäne. Dieses NLS liegt im Bereich des Exons 2, und nicht wie zunächst angenommen am C-terminalen Ende. Da das Signal für den Shift in den Nukleus in einem funktionell so wichtigen Anteil liegt, ist es um so erstaunlicher, dass sich zytoplasmatische Anteile von Egr-1 finden lassen. Übereinstimmend mit der Aussage von Day und Kollegen beobachteten auch andere Arbeitsgruppen sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Expressionen des Egr-1-Proteins (P. Topilko *et al.* 1998; C. Knight *et al.* 2000). In den retinalen Neuronen von Mäusen findet sich ebenfalls neben der für einen Transkriptionsfaktor angenommen klassischen nukleären Lokalisation eine zytoplasmatische. (P. Simon *et al.* 2004b).

1.5.5 Die Existenz unterschiedlicher mRNA-Varianten des Egr-1 Genes konnte in der Retina von Mäusen nachgewiesen werden

Die unterschiedlichen Proteinlokalisationen sind der Arbeit von Simon und Kollegen zu Folge wahrscheinlich die Konsequenz zweier differentiell regulierter mRNA-Varianten. Beide Varianten weisen einen Poly-A-Schwanz auf. Durch Gendatenbank gestützte Vergleiche ließen sich eine kurze und eine am 3'-Ende und somit in der untranslated region (UTR) um 293 bp längere Variante der *egr1* mRNA in Mäusen finden. Die längere Version ist als NM_007913 (hier bezeichnet als *egr1-lv*) und die kürzere als AK040925 (hier bezeichnet als *egr1-sv*) in der Gendatenbank eingetragen. Eine besondere Bedeutung konnte den 293 zusätzlichen Basenpaaren zugewiesen werden. Sie weisen im direkten Vergleich der Gensequenzen unterschiedlicher Spezies eine noch stärkere Homologie als der Zinkfinger-kodierende Abschnitt in Exon 2 auf, was eine funktionelle Relevanz dieses Abschnittes sehr wahrscheinlich macht.

In Abbildung 13 sind die Varianten der *egr1* mRNA dargestellt.

Zytoplasmatische Polyadenylierungs Elemente

Im Anschluss an seine Coding Sequence weist die mRNA von *egr1-lv* am 3' untranslatierten Ende einen zusätzlichen Bereich von 293 Basenpaaren auf, der in der kurzen Variante der *egr-1* mRNA nicht existiert. In diesem liegen zwei potentielle zytoplasmatische Polyadenylierungs - Elemente (CPE): CPE1 mit der Sequenz: UUUUUGU und CPE2 mit der Sequenz: UUUUUACUUU. Diese werden gefolgt von dem zytoplasmatischen Polyadenylierungs-Signal AATAAA. Diese Abfolge wird auch als Tandem-Poly-A Arrangement bezeichnet, die je nach Vorhandensein für ein differentielle Regulierung unterschiedlicher mRNA-Varianten verantwortlich sein kann. Ihr werden wichtige regulatorische Eigenschaften hinsichtlich Stabilität (A. P. Levy *et al.* 1995) und Translatabilität (S. Miyamoto *et al.* 1996) zugeschrieben.

Simon und Kollegen konnten zeigen, dass die Expression der kurzen Variante *egr1-sv* im ZNS generell höher ist, wohingegen vor allem *egr1-lv* insbesondere auf exzitatorische Reize wie Lichtexposition oder Glutamat-Freisetzung rasch hochreguliert wird (P. Simon *et al.* 2004b). Wie schon zuvor beschrieben (F. Wei *et*

al. 2000), erfolgt der Anstieg des mRNA – Levels und der Protein-Expression auch nach Lichtexposition innerhalb kürzester Zeit.

Grundsätzlich bestehen viele unterschiedliche Möglichkeiten ein Proteins hoch zu regulieren. Hierzu zählt u.a.: 1.) eine erhöhte Neu-Syntheserate sowie 2.) die vermehrte Translation prä-existierender mRNA (D. G. Wells *et al.* 2000;G. Aakalu *et al.* 2001).

Für andere synaptisch lokalisierte Proteine, wie zum Beispiel die Calcium-Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II (CaMKII), wurde eine NMDA-abhängige Aktivierung eines bestehenden Pools an mRNA durch Polyadenylierung nachgewiesen (D. G. Wells *et al.* 2001). Essentielle Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein von zytoplasmatischen Polyadenylierungs-Elementen (CPE) (L. Wu *et al.* 1998;D. G. Wells *et al.* 2001). Der in der Arbeit von Simon und Kollegen beobachtete und durch Lichteinfluss verursachte Anstieg von *egr1-lv* deutet darauf hin, dass die ausschließlich bei dieser Variante vorhandenen CPEs bei diesem Vorgang eine ähnliche Rolle spielen wie im zuvor beschriebenen Fall von CaMKII.

1.5.6 Die Einwirkung ionisierender Strahlung auf die Expression von Egr-1 und die Funktion von Egr-1 bei der Antwort auf Bestrahlung

Egr-1 ist involviert in die Reaktion auf UV-Strahlung (R. P. Huang *et al.* 1998) und ionisierende Strahlung (R. Datta *et al.* 1993;D. E. Hallahan *et al.* 1995).

Nach UV-C Bestrahlung vermindert Egr-1 die Apoptoserate und trägt zum Überleben von Zellen bei. Vermutlich geschieht dies durch einen Egr-1 vermittelten beschleunigten Übergang in die S – Phase des Zellzyklus. Diese Tatsache trägt vermutlich zur Verhinderung erhöhter Apoptoseraten bei. Experimente, die eine Untersuchung der elektrophoretischen Mobilität beinhalteten, stellten eine verminderte Beweglichkeit von Egr-1 im Anschluss an UV-C Bestrahlung fest. Eine Inkubation mit radioaktiv markiertem Phosphat konnte beweisen, dass die Fraktion mit der verminderten Beweglichkeit phosphoryliert ist. Eine Blockade der Proteinkinase C (PKC) sowie der Tyrosinkinase zeigten, dass diese Phosphorylierung

von der PKC und der Tyrosinkinase abhängt. Zudem fiel auf, dass der Gesamtpool an Egr-1 trotz Anstieg der phosphorylierten Fraktion konstant blieb. Dies ist vermutlich auf eine posttranslationale Modifikation einer vorbestehenden Menge an Egr-1 zurückzuführen, die durch UV-C Bestrahlung induziert wird (R. P. Huang *et al.* 1998).

Ionisierende Strahlung resultiert in einer transienten Induktion der Egr-1 Expression (S. M. Keyse 1993). Zellen, die ionisierender Bestrahlung zugeführt werden, zeigen unter normalen Umständen einen Übergang von der G1-Phase des Zellzyklus in die S-Phase, in der sie sich sammeln. Dieser Vorgang wird auch als S-Phasen-Arrest bezeichnet und wird von einem verzögerten Übergang in die G2-Phase begleitet. Egr-1 trägt auch nach ionisierender Bestrahlung zu Zell-Überleben und DNA-Synthese bei. So ist nach Bestrahlung von dominant negativen *egr1* Zellreihen sowohl ein verminderter Übergang von G1 in S-Phasen zu beobachten als auch eine Abnahme des Zell-Überlebens. Gleichzeitig wird in nicht-defekten Zellreihen eine Korrelation zwischen G1-S-Phasen-Übergang und einer transienten Induktion von Egr-1 festgestellt (D. E. Hallahan *et al.* 1995).

Als wichtige molekulare Strukturen, die nach ionisierender Bestrahlung zu einer Initiation der Transkription von *egr1* mRNA führen, wurden CC(A/T)₆GG – Sequenzen im Promotor von *egr1* identifiziert. Diese auch 'CarG' - Element genannten Abschnitte stellen sogenannte Serum Response Elements (SRE) dar, von denen mindestens fünf in der Promotorregion des Genes liegen (J. L. Schwachtgen *et al.* 2000). Sie sind für die Bestrahlungs-Induzierbarkeit des Genes verantwortlich (R. Datta *et al.* 1992). Datta und Kollegen beschreiben in Versuchen mit Zellreihen, deren Protein-Kinase-C vermittelter Signalweg defekt ist, dass eine vermehrte Expression von Egr-1 durch biologisch aktive reaktive Sauerstoffspezies (ROIs = reactive oxygen intermediates) induziert wird, welche im Rahmen der Bestrahlung entstehen (R. Datta *et al.* 1993). Die Effekte der ROIs werden bei Verwendung des Antioxidants N-acetyl-L-Cystein (NAC) vollständig blockiert. Für die Vermittlung der ROI-induzierten Expression ist lediglich eines der sechs 'CarG'-Elemente des Promotors ausreichend. Ein detektierbarer Anstieg des mRNA – Levels kann nach 15 min nachgewiesen

werden und erreicht sein Maximum nach 3 h bevor ein Abfall der Werte nach 8 h erfolgt (R. Datta *et al.* 1993).

Die Proteinkinase C ist ebenfalls involviert in eine bestrahlungsabhängige Induktion von Egr-1 (D. E. Hallahan *et al.* 1991; R. G. Meyer *et al.* 2002). Sie wirkt vermutlich durch eine Phosphorylierung von Mediatoren, welche wiederum in phosphoryliertem Zustand CarG-Elemente im Promotor von *egr1* aktivieren (R. G. Meyer *et al.* 2002) (G. E. Woloschak *et al.* 1990).

Neben den SREs findet man im Promotor von Egr-1 auch andere Bindungsstellen: ein Aktiviertes-Protein-1/Thiophorbolester - Responsive Element (AP-1 / TRE), zwei cAMP Responsive Elements (CRE) und eine Bindungsstelle für Egr-1 selbst. Der Promotor kann durch einer Einzeldosis von 4 Gy induziert werden. (R. G. Meyer *et al.* 2002)

1.6 Mikroglia, gliale Zellen

1.6.1 Mikroglia agieren als Marker für pathologische Ereignisse im ZNS

1932 erkannte del Rio-Hortega die Rolle der Mikroglia in pathologischen Ereignissen des ZNS (P. Del-Rio Hortega 1932). Ihre histologische Zuordnung wurde lange debattiert, aber inzwischen herrscht weitgehende Übereinstimmung darüber, dass Mikroglia ontogenetisch zu der mononukleär-phagozytotischen Zelllinie gerechnet werden müssen. Mikrogliale Zellen werden sehr rasch nach Veränderungen der strukturellen Integrität des ZNS aktiviert, aber auch nach subtileren Veränderungen des extrazellulären Milieus beispielsweise. Sie besitzen Rezeptoren für Signalmoleküle des ZNS wie ATP (W. Walz *et al.* 1993; J. M. Langosch *et al.* 1994), Calcitonin Gene-Related Peptid (CGRP) (J. Priller *et al.* 1995), Acetylcholin und Noradrenalin (E. R. Whitemore *et al.* 1993) und ihre Reaktionen schließen sowohl Veränderungen des extrazellulären Ionen-Milieus (W. Walz *et al.* 1993) als auch die Aktivierung von Transkriptions-Mechanismen ein (J. Priller *et al.* 1995). Ihre Aktivierung lässt sich durch den immunhistochemischen Nachweis der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle wie zum Beispiel CD68 einerseits und darüber

hinaus anhand morphologischer Charakteristika feststellen. Erfolgt eine Aktivierung, so ist der Effekt abhängig von der Ursache der Aktivierung. So verursacht eine reine Axotomie beispielsweise lediglich die Aktivierung von Mikroglia, während Zell-Untergänge dagegen die Transformierung in phagozytotische Zellen bewirken. Zu den Faktoren, die für eine Aktivierung der Mikroglia verantwortlich sind, zählt die Gruppe der Colony-Stimulating-Factors (CSF) sowie auch ROIs (G. W. Kreutzberg 1996). Die Funktionen aktivierter Mikroglia sind zum Teil entgegengesetzter Natur. Synergistisch mit Astrozyten tragen Mikroglia beispielsweise bei zur Geweberekonstruktion nach Läsionen und der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke. Durch die Produktion von TGF- β 1, der im Rahmen von Geweberekonstruktionen eine potentielle Rolle spielt, wird ihre protektive und konstruktive Funktion weiter untermauert. Andererseits agieren Mikroglia als phagozytische Zellen: Sie besitzen auf ihrer Oberfläche Fc- und Komplementrezeptoren und sind zur Freisetzung potentiell zytotoxischer Substanzen befähigt wie zum Beispiel ROIs, NO, Proteasen und inflammatorischen Zytokinen. Die mikroglialen zytotoxischen Eigenschaften werden durch Zytokine moduliert: IFN- γ sorgt für eine Aktivierung der zytotoxischen Funktion, während TGF- β 1 und IL4 diese eher unterdrücken. An der Kommunikation zwischen mikroglialen und anderen glialen Zellen sowie Neuronen sind verschiedene Moleküle beteiligt, hierunter vermutlich IL1, IL6, TGF- β 1 (G. W. Kreutzberg 1996).

1.6.2 Mikroglia – Beeinflussung der Funktion neuronaler Vorläuferzellen nach Bestrahlung ?

Ein akuter Anstieg von pro-inflammatorischen Zytokinen ist die Folge von kranialer Bestrahlung (J. H. Hong *et al.* 1995). Monje und Kollegen konnten 2002 nachweisen, dass es im Stratum granulosum des Hippocampus und im Hilus des Gyrus dentatus von Ratten zwei Monate nach Bestrahlung mit 10 Gy zu einem dramatischen Anstieg der totalen Anzahl aktivierter Mikroglia um 250 % kommt (M. L. Monje *et al.* 2002). Gleichzeitig zeigten sie, dass nach zwei Monaten in bestrahlten Gehirnen ein signifikanter Abfall der Proliferation von Vorläuferzellen auftritt, wobei in erster Linie die Neurogenese im Hippocampus (Stratum granulosum und Hilus) betroffen ist.

Die *Anzahl* der Vorläuferzellen hingegen unterscheidet sich unwesentlich in bestrahlten und unbestrahlten Gehirnen. Auch die normalerweise anzutreffende räumliche Beziehung zwischen Prekursorzellen und der Mikrovaskulatur des Gehirn ist aufgehoben. Da prinzipiell die Möglichkeit bestand, dass 1.) neuronale Vorläuferzellen direkt durch Bestrahlung geschädigt worden waren, also ein intrinsischer Defekt in diesen Zellen eingetreten war, beziehungsweise dass 2.) eine Veränderung des Mikromilieus eine Ausdifferenzierungsstörung zur Folge gehabt hatte, wurden Vorläuferzellen aus Hirnen entnommen, die zuvor mit 0, 2 oder 10 Gy bestrahlt wurden, um feststellen zu können, ob die Fähigkeit zur Ausdifferenzierung noch vorhanden ist oder nicht. Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl Zellen aus bestrahlten Gehirnen wie auch aus Kontrollgruppen nach ihrer Entnahme die normale Fähigkeit zur Ausdifferenzierung in Neurone und Gliazellen besitzen. Des Weiteren ergab sich, dass die Implantation intakter Vorläuferzellen in bestrahlte Hippocampi zu im Vergleich mit Kontrollgruppen geringeren Ausdifferenzierungsquoten führt. Dies bedeutet, auch intakte Vorläuferzellen sind nach Implantation in bestrahltes Hirngewebe in ihrer Ausdifferenzierung in neuronale Zellen gestört. Dies deutet darauf hin, dass lokale molekulare Abläufe in bestrahlten Hippocampusarealen gestört sind, das heißt, eine Veränderung des lokalen Mikromilieus führt dazu, dass eine regelrechte Ausdifferenzierung von Prekursorzellen in Neurone nicht möglich ist. Die Korrelation von Neurogenese-Störung und der durch einen signifikanten Anstieg der aktivierten Mikroglia repräsentierten chronisch-inflammatorischen Veränderungen ist auffällig und lässt einen Zusammenhang zu einer durch die Mikroglia-Aktivierung hervorgerufenen Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 vermuten.

2. Zielsetzung

Die kraniale Bestrahlung stellt eine wichtige adjuvante Therapieform von primären Hirntumoren, Hirnmetastasen und der Beteiligung des ZNS im Rahmen von Leukämien oder Lymphomen dar. Unglücklicherweise lassen sich sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen Monate bis Jahre nach einer Radiotherapie schwerwiegende Folgen im Sinne signifikanter kognitiver Einbußen und ein größeres Ausmaß an Leukenzephalopathie feststellen (O. Surma-aho *et al.* 2001). Die Folgen sind schwerwiegend und führen bei pädiatrischen Patienten unter anderem oft zu der Notwendigkeit einer speziellen Schulförderung (D. R. Strother, *et al.* 2002)

Viele Autoren beschäftigen sich derzeit mit den zellulären Antworten nach Bestrahlung des ZNS. Ein vermehrter neuronaler sowie oligodendrozytärer Zelltod sind ebenso wie der Anstieg aktivierter Mikroglia für den Zeitraum von Wochen bis Monaten nach kranialer Radiatio beschrieben (H. Kurita *et al.* 2001; M. L. Monje *et al.* 2002). Während einige dieser Bestrahlungseffekte auf die direkte zytotoxische Einwirkung ionisierender Strahlung zurückzuführen sein wird, ist wenig bekannt über die molekularen Mechanismen, die einen solchen Langzeit-Effekt vermitteln. Monje und Kollegen haben für Rattenhirne eine bestrahlungsinduzierte Aktivierung mikroglialer Zellen und konsekutive Veränderungen des extrazellulären Milieus als Vermittler solcher Effekte in das Gespräch gebracht. Zu einem Zeitpunkt von zwei Monaten nach kranialer Bestrahlung beschreiben sie einen signifikanten Abfall neu ausdifferenzierter Neurone und einen gleichzeitigen Anstieg aktivierter Mikroglia. Dennoch ist nicht geklärt, ob die Aktivierung der Mikroglia – auch als Makrophagen des ZNS bezeichnet – ein sekundäres Ereignis nach primärer bestrahlungsinduzierter Läsion des ZNS-Gewebes darstellt oder ob sie auftritt, bevor zytotoxische Effekte auf Oligodendrozyten oder Neurone zu beobachten sind.

Die Schlüsselstellung des Transkriptionsfaktors Egr-1 in einer Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen sowie seine Hochregulation durch Bestrahlung ist seit langem bekannt. Bislang ist jedoch nicht die Bedeutung der

zellulären und subzellulären Lokalisierung dieses Transkriptionsfaktors sowie die Bedeutung der differentiellen Expression zweier unterschiedlicher mRNA-Varianten unter Bestrahlung untersucht worden.

Diese Gemeinschaftsarbeit bestehend aus einem molekularbiologischem und einem immunhistochemischen Anteil will versuchen, das Verhalten der zwei Varianten von Egr-1 und *egr1* und ihren zellulären Kontext in verschiedenen Arealen des ZNS nach Bestrahlung genau zu charakterisieren. Wir wählten als Beobachtungszeitraum insbesondere frühe Zeitpunkte nach Bestrahlung, um eine bessere Aussage darüber machen zu können, welche Effekte nach Bestrahlung primär auftreten und welche sekundären Folgen dies nach sich ziehen könnte.

Die vorliegende Arbeit stellt den molekularbiologischen Anteil der Arbeit dar und ermöglicht in erster Linie eine genaue Charakterisierung der Egr-1 Varianten und deren Verhalten nach Bestrahlung. Durch die Verwendung von Primern für EMAPII, für das bei der Ratte eine frühzeitige Aktivierung beschrieben ist, soll auch eine mögliche Aktivierung von Mikroglia nach Bestrahlungsvorgängen festgestellt werden können.

Durch eine ausführlichere Charakterisierung der mRNA-Varianten sowie der zellulären und subzellulären Lokalisation des Proteins erhoffen wir uns, die Ursachen der funktionellen Vielseitigkeit von Egr-1 besser beurteilen zu können. Dies könnte ein innovativer Ansatzpunkt in der Diagnostik und Therapie verschiedenster pathologischer Ereignisse darstellen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tiere

Ratten	Sprague Dawley	Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland
--------	----------------	--

Tabelle 1: Tiere

3.1.2 Geräte

Computer	PC (IBM kompatibel)	Compaq
Drucker	OfficeJet G55	Hewlett Packard,
Software-Programme	Microsoft Word Version 6.0	Microsoft, München
	Microsoft Excel Version 5.0	Microsoft, München
	Microsoft Power Point	Microsoft, München
	ICycler™ iQ, Version 3.0a	Bio-Rad Laboratories, GmbH, München
	JMP IN, Version 5.1	SAS Institute Inc., NC, USA
	Relative Expression Software Tool (REST®)	Pfaffl, (M. W. Pfaffl <i>et al.</i> 2002)
	Reference Manager 10	ISI ResearchSoft
Vortexgerät	Vortex Genie 2™	Bender & Hohbein AG, Zurich, Switzerland
Zentrifuge	5415 C	Eppendorf, Hamburg

Waage	Analytic AC 210 S	Sartorius
Pipetten	Variopipetten	Eppendorf, Hamburg
Handhomogenisator	Mikromörser, 100-1000 µl	FA Roth, Karlsruhe
Thermoblock	TECHNE Dri Block DB-2A	Thermo-Dux, Wertheim
Photometer	Bio Photometer 8.5 mm	Eppendorf, Hamburg
Präzisions Küvetten	Quarzglas Suprasil 8.5mm	HELLMA GmbH & Co KG, Müllheim, Deutschland
Thermo-Versiegler	Combi Thermo-sealer	Abgene, Surrey, UK
Thermal printer	DPU-414	Seico Instruments Inc.
PCR-Platten Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
iCycler	Thermal Cycler	Biorad
Elektrophoresekammer	Easy-Cast Modell #B1A	Owl Scientific, Inc. Woburn, MA, USA
Power Supply für Elektrophorese	Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratories, GmbH, München

Tabelle 2: Geräte

3.1.3 Verbrauchsmittel

Latexhandschuhe	Safe Skin	Kimberley Clark
Skalpell	10 Cutfix Surgical Disposable Scalpel	Braun, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Einweg Pipetten	Einweg Pasteur Pipetten Mini Plus	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Petrischale	Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	0.25 ml	Eppendorf, Hamburg

	0.75 ml	Eppendorf, Hamburg
	1.5 ml	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen	Cryo.s	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PCR-Platte	96-well plate	Abgene, Rochester, NY, USA
Versiegelungs-Folie	Heat-seal foil	Bio-Rad Laboratories, GmbH, München

Tabelle 3: Verbrauchsmittel

3.1.4 Chemikalien

Trizol	TRIZOL Reagent ®	Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rnase Zap ®		Ambion Inc., UK
Chloroform		Merck, Darmstadt
Isopropanol		Merck, Darmstadt
Ethanol		Merck, Darmstadt
Ampuwa	Eigenherstellung	Institut für Hirnforschung
DNase I	RNAse free DNase I, 10 u / µl	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenol/Chloroform		
Chloroform/Isoamylalkohol		
Natriumacetat		Merck, Darmstadt
Random Primer	Random Primer 500 µg/ ml	Promega GmbH, Mannheim
Desoxyribonukleotide (dNTP)	PCR Nucleotid Mix, (10 mM each)	Promega GmbH, Mannheim
RRNasin® Ribonuclease Inhibitor	40 u / µl	Promega GmbH, Mannheim
Reverse Transkriptase	M-MLV RT, 200 u / µl	Promega GmbH, Mannheim

PCR-Mastermix	Quanti Tect SYBR Green PCR Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Tris base (TBE-Puffer)	Trisma ® Base	Sigma-Aldrich, Steinhausen, Deutschland
Borsäure (TBE-Puffer)		Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
EDTA (TBE-Puffer)	Ethylendiamine-Tetraacetic acid, 0,5 M	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Agarose	Seakem LE Agarose	Biozym, Hameln
Ethidiumbromid	10 mg / ml	Merck, Darmstadt
Ladepuffer Gelelektrophorese	Ladepuffer 6 x	Peq Lab Biotech. GmbH
DNA-Größenmarker	DNA-Leiter Mix 0,5 mg/ml	Peq Lab Biotech. GmbH

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

3.2 Methoden

3.2.1 Tiere und Behandlung

Tiere

Die Haltung der Tiere sowie die Tierexperimente erfolgten nach den Vorgaben des Regierungspräsidium Tübingen. Die Tierversuchsnummer lautet N3/03.

Die Versuche wurden mit dem Gewebe von männlichen Sprague Dawley Ratten durchgeführt (n=21, Alter: 7 Wochen). Die Tiere wurden bei Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland erworben und in dem Tierlabor des Verfügungsgebäudes der Universität Tübingen in Gruppen à 3 gehalten.

Betäubung

Die Tiere wurden zunächst mit 0,7 ml Ketanest (50mg/ml) und 0,4 ml 2%-Rompun (1:10 verdünnt) narkotisiert. Nach erfolgter Bestrahlung bzw. Scheinbestrahlung erhielten alle Tiere bis auf diejenigen der 20-Minuten Gruppen (n=3 bestrahlt sowie n=3 Kontrolle) vor der Dekapitation eine weitere Narkose mit Ketanest und Rompun. Die 3 Tiere der 2 h-Kontrollgruppe dienten dem Ausschluß bzw. der Feststellung eines durch die zweite Narkose bzw. den Effekt des erneuten Erwachens hervorgerufenen signifikanten Einflusses auf die Untersuchungsergebnisse.

Bestrahlung

Anschließend wurden 15 der 21 Tiere mit einer Dosis von 10 Gray (Gy) ganzkörperbestrahlt, wobei die Dosis so gewählt wurde, dass die Schwelle, oberhalb derer Gefäßveränderungen, Demyelinisierung oder Radionekrose-Vorgänge ausgelöst werden, nicht überschritten wurde (H. Hodges *et al.* 1998; W. Calvo *et al.* 1988) und die Dosis ungefähr der therapeutischen Bestrahlungsdosis bei der Behandlung humaner Hirntumoren beispielsweise entsprach (G. E. Sheline *et al.* 1980; J. E. Marks *et al.* 1981). Sechs Kontrolltiere wurden nach der Narkose scheinbestrahlt. Alle Prozeduren bis auf die entscheidende Tatsache der Bestrahlung waren somit zwischen bestrahlten und Kontrolltieren identisch. Angemerkt werden sollte noch, dass zwecks besserer Handhabung des Versuchs Abstand genommen wurde vom Prinzip der fraktionierten Bestrahlung von maximal 2 Gy pro Sitzung, wie sie bei therapeutischer Bestrahlung humaner kranialer Tumoren heute Praxis ist. Dieser Versuchsansatz ist auf ein Tiermodell nur schwer zu übertragen, da die Tiere bei jeder Einzelsitzung erneut betäubt werden müssten.

Gewinnung von Gewebe

Verschiedene Abstände zur Bestrahlung der Ratten wurden von uns so gewählt, dass potentielle Bestrahlungsfolgen zu möglichst frühen Zeitpunkten eruierbar sein sollten. Wir wählten Zeiten von 20 min, 2 h, 6 h, 1 d, 3 d als Beobachtungszeiträume. Wir erhofften uns insbesondere von den besonders frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung interessante Aufschlüsse über frühe bestrahlungsinduzierte Vorgänge. Gruppen à je

drei Tieren wurden zu entsprechenden Zeiten post radiationem mit einer speziell angefertigten Ratten-Guillotine nacheinander dekapitiert und die Schädel sofort in einer kleinen Petri-Schale auf Eis präpariert. Das Gehirn wurde entnommen und anschließend mehrere koronare Schnitte angefertigt. Wir orientierten uns dabei an anatomischen Strukturen laut Anleitung von Heffner. (T. G. Heffner *et al.* 1980).

Sowohl für PCR bzw. Western Blot als auch für den immunhistochemischen Teil der Arbeit wurde Gewebe aus dem frontalen Kortex, dem parietalen Kortex, dem Hippocampus und aus dem Kleinhirn entnommen. Alle für die PCR vorgesehen Proben wurden sogleich gesondert in entsprechend beschrifteten Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, bevor sie anschließend bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurden. Die RNA- bzw. Protein-Isolation erfolgte zeitnah zur Entnahme der Gewebeproben.

3.2.2 RNA-Isolation, -aufreinigung

Die gefrorenen Proben wurden einzeln ausgewogen und mit dem Skalpell wurde von jeder Probe ca. 50 mg Gewebe abgetrennt. Das Gewebe wurde dann mit einem Gewebe- Handhomogenisator unter schrittweiser Hinzufügung von insgesamt 500 μl TRIZOL Reagent[®] zerkleinert. Der Überstand wurde nach jeder Zugabe von 100 μl mit einer Einmalpipette in ein Eppendorf – Gefäß (1000 μl) pipettiert bis insgesamt 500 μl hinzugefügt waren. Die Homogenisierung wurde sorgfältig und gründlich durchgeführt, um die Aufspaltung der Zellen und den Austritt von RNA sicherzustellen. Um eine Kontamination der Proben zu verhindern, wurde der Handhomogenisator nach jedem Homogenisations-Schritt mit Aqua dest., 100%-igem Ethanol und RNase Zap[®] gereinigt bevor die nächste Gewebeprobe zerkleinert wurde.

Die folgenden Schritte schlossen sich daraufhin im Isolationsprozess an:

- Lagerung homogenisierter Gewebeproben für 5 min bei RT
- Hinzufügen von 100 μl reinem Chloroform
- 15 sec vortexen, anschließend Lagerung 2-15 min bei RT

- Zentrifugation: 12000 g, 15 min bei 4 °C
- Überführen oberer, wässriger Phase in neues Röhrchen (untere Phase für Proteinisolation verwendet, s. Proteinisolation)
- Zentrifugation: 12000 g, 8 min bei 4 °C
- Überstand verwerfen, Waschen des Pellets in 500 µl 75% - igem Ethanol, vortexen
- Zentrifugation: 7500 g, 5 min bei 4 °C
- Verwerfen des Überstandes, Lufttrocknung RNA für 10 min
- Sorgfältige Entfernung Rest-Ethanol
- DNase Verdau durch Hinzufügen von 44 µl destilliertem H₂O, 5 µl 10x Dnase Puffer (3M Natriumacetat, pH 5,2), 1 µl DNase I
- Inkubation 1-2 h bei 25 °C
- Inaktivierung der DNase durch Inkubation bei 65 °C für 10 min
- RNA-Aufreinigung durch Hinzufügen von 200 µl Phenol / Chloroform - Gemisch, mischen, Zentrifugation, 14000 rpm, 5 min bei 4 °C , Verwerfen der unteren Phase
- Zugabe von 200 µl Chloroform / Isoamylalkohol Gemisch, mischen, Zentrifugation, 14000 rpm, 5 min bei 4 °C , Überführen der oberen Phase in neues Röhrchen
- Zugabe von 5 µl Natriumacetat (3M, pH 5,2) und 125 µl absolutem Ethanol, Mischung über Kopf, Inkubation bei – 70 °C über Nacht
- Zentrifugation, 14000 rpm, 10 min bei 4 °C, Abpipettieren des Ethanol-Überstandes
- Zugabe von 150 µl 70%-igem Ethanol, Zentrifugation wie oben, dekantieren des Alkohols
- Wiederholung des vorangegangenen Waschschrilles
- Lufttrocknung RNA, sorgfältige Entfernung Ethanolreste mit Pipetten-Spitze
- Aufnahme in 25 µl Aqua dest.

Pro Sitzung wurden jeweils 18 Proben isoliert, wobei darauf geachtet wurde, dass es sich um Proben handelte, die auch in späteren Reverse Transcriptions- bzw. PCR-Läufen gemeinsam verarbeitet werden würden. Dieses Vorgehen sollte einen Einfluss natürlicher, geringfügiger Schwankungen im Isolations- bzw. RT-Verlauf und damit einen verfälschenden Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse minimieren.

Insgesamt wurden 84 Proben bearbeitet (21 Tiere, jeweils 4 Hirnareale = 84 Proben)

3.2.3 Photometrische Vermessung

Die Qualität der RNA – Extraktion wurde im Anschluss an die Isolation durch photometrische Vermessung und Bestimmung der Ratio von Absorptionswerten im Bereich von 260 und 280 nm verifiziert (A_{260}/A_{280}). Da RNA im Gegensatz zu DNA im Wellenlängenbereich von 260 nm besser absorbiert, sollte dieser Quotient für RNA höher liegen als für DNA, und zwar etwa im Bereich von ca. 2.0, für DNA dagegen bei 1.8. Die Proben wurden in 25 µl TBE-Puffer (10 mMol) aufgenommen und wiesen einen Quotient von >1.98 auf. Dies bestätigte die Reinheit der RNA-Proben. Bis zur reversen Transkription wurden alle Proben bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, um eine Degradation der RNA zu verhindern. Alle Proben wurden innerhalb der nächstfolgenden Woche in cDNA umgeschrieben. Die Isolierung der RNA, die Vorbereitung und Durchführung der real-time PCR sowie die im Anschluss durchgeführte Gelelektrophorese wurden streng getrennt an unterschiedlichen Arbeitsplätzen durchgeführt, um eine Kontamination bestmöglichst zu vermeiden.

3.2.4 Reverse Transkription, cDNA-Synthese

Die extrahierte RNA wurde anschließend zwecks Bildung von komplementärer copy DNA (cDNA) einer reversen Transkriptions-Reaktion zugeführt. Hierbei wird komplementär zur vorhandenen mRNA ein DNA-Strang gebildet, der im Gegensatz zur Original-DNA wie die mRNA keine Introns enthält. So erhält man für die spätere PCR eine „Kopiervorlage“, aus der alle überflüssigen Informationen entfernt wurden.

Von jeder Probe wurden 735 ng für den Umschrieb verwendet und ein Reaktionsatz von 25 µl hergestellt. Nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration wurde zunächst für jede der 84 Proben derjenige Volumenteil errechnet, der die entsprechenden 735 ng RNA enthielt. Hinzugegeben wurde jeweils 1 µl Random Primer (250 µg / ml). Da der Anteil von später hinzuzufügendem Mastermix einen fixen Anteil des Endvolumens von 25 µl darstellte, wurde die Volumen-Differenz zwischen errechneter Menge RNA und Mastermix mit Random Primern durch destilliertes H₂O aufgefüllt. Der Mastermix setzte sich zusammen aus 3.0 µl eines Nukleotid-Mixes, 0.625 µl RNAsin Ribonuklease-Inhibitor (entsprechend 25 u bei 40 u/µl), 5 µl M-MLV Reaktions-Puffer (5x) und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 u / µl). Der Nukleotid-Mix bestand aus Natriumsalzen von dATP, dCTP, dGTP und dTTP mit einer Konzentration von jeweils 10mM, so dass die Gesamtkonzentration 40 mM betrug. Zunächst wurden im Thermocycler lediglich RNA, das jeweilige Differenzvolumen H₂O und die Random Primer für 5 min auf 70 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen zu schmelzen und eine Anlagerung der Random Primer zu ermöglichen. Die Random Primer banden dabei zufällig an beliebige komplementäre Abschnitte der RNA und bildeten so Ausgangspunkte für eine Verlängerung des komplementären Stranges durch die M-MLV Reverse Transkriptase. Nach 5 min wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt, um eine Reformierung der die spätere RT behindernden Sekundär-Strukturen zu verhindern. Es wurde zu jedem Ansatz nun 9.6 µl des Mastermixes hinzugefügt. Bei 37 °C fand während der nächsten 60 min die Bildung von zur mRNA komplementärer cDNA-Stränge statt. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die ausgehend von freien 3'-Hydroxylgruppen der Random-Hexamere in 5'-3'-Richtung die freien Desoxynukleotidtriphosphate zu einem sich verlängernden cDNA-Strang verknüpfte. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße zur Beendigung der Reaktion für 5 min auf 95 °C erhitzt und sodann sofort auf Eis gekühlt und schließlich bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes betrug insgesamt 25 µl, so dass sich für die RNA eine Endkonzentration von 29.4 ng / µl ergab. 10 µl jeder Probe wurden vor der PCR entnommen und auf 2 ng / µl verdünnt.

3.2.5 Proteinisolation

Die Protein-Isolation wurde parallel zur Isolierung der RNA durchgeführt. Nach der Auftrennung des Isolationsgemisches in eine obere wässrigen Phase zur weiteren RNA-Isolation und eine organischen unteren Phase wurde letztere zur Protein-Isolation zunächst mit 150 µl reinem Ethanol versetzt und vermischt. Nach einer Lagerung bei RT für 3 min wurde die DNA für 5 min herunter zentrifugiert bei maximalen 2000 g. Der Phenol-Ethanol-Überstand wurde abgenommen und mit 750 µl Isopropanol vermischt und 10 min bei RT gelagert bis das Protein-Präzipitat durch 10-minütige Zentrifugation bei 12000 g ausgefällt wurde. Das so gewonnene Protein-Pellet wurde sodann dreimalig in 1000 µl Guanidin-Hydrochlorid in 95%-igem Ethanol gewaschen. Während jedes Waschvorgangs wurde das Pellet 20 min in der Solution aufbewahrt und danach bei 7500 g 5 min zentrifugiert. Nach dem letzten Durchgang wurden 1000 µl reiner Ethanol hinzugefügt, gevortext und nach 20-minütiger Lagerung ein letztes mal 5 min bei 7500 g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde im Anschluss abdekantiert und die Protein-Pellets luftgetrocknet. Nachdem gesichert war, dass jeglicher Flüssigkeitsrestbestand bestmöglichst entfernt war, wurden die Protein-Pellets bis zur Durchführung der Western Blots bei -20 °C eingefroren.

Für eine genaue Beschreibung der späteren Verarbeitung für die Western Blots verweise ich auf die Arbeit meines Kollegen H. Vollmann.

3.2.6 Quantitative Real Time PCR

Prinzip der quantitativen Real time PCR

Jede PCR Reaktion beruht auf der enzymatischen Amplifikation einer spezifischen Primer-definierten cDNA-Sequenz (bzw. RNA-Sequenz bei Reverser Transkription). Seit der Einführung der Polymerase Kettenreaktion Mitte der Achtziger Jahre (K. Mullis *et al.* 1986) hat sie sich als schnelle und sehr sensitive Methode in der DNA-Analytik bewährt. Durch spezifische Platzierung von Primern können bei dieser

Methode gezielt bestimmte DNA-Abschnitte vervielfältigt werden. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein von hitzestabilen DNA-Polymerasen. Prototyp dieses Enzyms, dessen Wirkungsoptimum im Bereich von etwa 70-80 °C liegt, ist die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte Taq-Polymerase. Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung, Primer-Bindung (annealing) und Elongation wird die zu amplifizierende Zielsequenz im Verlauf der PCR-Reaktion annähernd exponentiell vermehrt. Um das Automatisierungsniveau der PCR zu erhöhen und gleichzeitig die Gefahr potentieller Kontaminationen beispielsweise durch im Anschluss an eine konventionelle PCR durchzuführende Quantifizierungsschritte zu reduzieren, wurden Vorgehensweise entwickelt, bei der Amplifikation und Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß erfolgen kann (real time PCR) (C. A. Heid *et al.* 1996).

SYBR Green I Farbstoff diente hierbei dem Sichtbarmachen von doppelsträngiger DNA, die im Rahmen der PCR entstand. Es handelt sich hierbei um einen ethidiumbromid-ähnlichen Farbstoff, dessen Wirkprinzip darin beruht, dass er durch intercalierende Bindung an doppelsträngige DNA zur Aussendung eines verstärkten Fluoreszenzsignals angeregt wird (K. M. Ririe *et al.* 1997; C. Schneeberger *et al.* 1995). Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge an gebildeter doppelsträngiger DNA. Am Ende einer jeden Elongationsphase im PCR-Zyklus wird das ausgesendete Signal durch den i-Cycler registriert. Ein Problem der Wirkungsweise von SYBR Green liegt daran, dass es auch an Primer-Dimere bindet und ein Signal aussendet. Diese Möglichkeit wurde durch die sorgfältige Analyse der Schmelzkurven überprüft und konnte bei unseren Versuchen ausgeschlossen werden. Primer-Dimere würden eine andere Schmelztemperatur als spezifische PCR-Produkte aufweisen.

3.2.7 Auswahl der PCR-Primer

Die Sequenzen der zu untersuchenden Genabschnitte wurden mit Hilfe einer Internetseite des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) bestimmt. Geeignete spezifische Primer für die Amplifikation der Sequenzen wurden mit der Software Primer 3 (S. Rozen, H.

Skaletsky 2000) und Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA) gesucht. Kriterien für die Auswahl passender Primer waren vor allem eine möglichst geringe Tendenz zur Sekundär-Struktur Formation, ein GC-Gehalt von ca. 50-60 % und eine Schmelztemperatur von cirka 60 °C. Die Ausbildung von Sekundärstrukturen wie beispielsweise Primer-Dimeren würde einen korrekten Ablauf der PCR behindern und die entstehenden doppelsträngigen Strukturen würden eine PCR-Auswertung aufgrund von störenden Nebenprodukten unmöglich machen. Für einen optimalen Ablauf der PCR entscheidend ist darüber hinaus ein GG-Gehalt in der Primer-Sequenz, der im Bereich von ca. 40-75 % liegen sollte. Dies war wegen der Ausbildung von drei statt zwei Wasserstoffbrücken zu beachten, wie es zwischen Guanin und Cytosin im Gegensatz zu Adenin und Thymin der Fall ist. Die Trennung der Doppelstränge würde bei einem zu hoher CG-Gehalt einen höheren Energieaufwand erfordern. Die Primerlänge sollte optimalerweise 15-20 bp betragen und die Schmelztemperatur von Sense- und Antisenseprimer sollte um nicht mehr als 1-2 °C differieren und ihm Bereich von 58-61 °C liegen. Zudem sollte die Länge der entstehenden PCR-Produkte weder zu lang noch zu kurz sein, d.h. Sense- und Antisense-Primer sollten in einem gewissen Abstand an den abzulesenden Strängen (Template-Stränge) „andocken“. Diese Länge sollte bei ca. 100-250 bp liegen (C. W. Dieffenbach *et al.* 1993; A. D. Sharrocks 1994).

Der Primer für die lange *egr1* Variante, *egr1-lv*, genügte diesen Ansprüchen auf den ersten Blick nur annähernd. Was vor allem auffiel war, dass das PCR-Produkt nur 49 bp lang war. Außerdem lag der CG-Gehalt des Sense-Primers bei lediglich 39,1 %. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde spezielles Augenmerk gelegt auf die Praktikabilität dieses Primers. Es ließen sich jedoch keine Auffälligkeiten ausmachen, die seine Verwendung einschränken würden.

Zur Anwendung kamen Primer für *egr1-lv*, für *egr1-sv*, für das Endotheliale-Monozyten-Aktivierende-Polypeptid II (*emap*) als Marker einer mikroglialen Aktivierung und für Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gapdh*) und 18s ribosomaler RNA als potentielle „Housekeeping Gene“. Zu bemerken ist, dass der Primer für *egr1-sv* sowohl mit der kurzen als auch mit der langen Variante von *egr1* arbeitete, der Primer für die lange Version dagegen tatsächlich nur mit der langen. Die Begründung hierfür liegt darin, dass *egr1-lv* der kurzen Variante entspricht, mit dem

Unterschied dass zusätzliche 293 bp angehängt sind. Der Primer für *egr1-sv* setzt in dem Areal an, das sowohl in der kurzen als auch in der langen Variante existiert. Der *egr1-lv*-Primer setzt innerhalb des Bereichs der 293 Extra-Basenpaare an, der lediglich bei der längeren Variante existiert. Da die gemessene Menge der kurzen Variante niemals 1/10 der Menge der langen Version übertraf, konnte davon ausgegangen werden, dass auch signifikante Veränderungen der *egr1-lv* Expression keinen Einfluss auf die Expression der direkt gemessenen *egr1-sv* Expression haben, die über die Messungenauigkeit hinausgeht.

Housekeeping Gene dienen als interne Kontrollwerte der Genexpression und der Errechnung relativer Genexpressions-Werte (M. W. Pfaffl *et al.* 2002). Ihre Expression ist unter variablen Versuchsbedingungen relativ stabil und Expressionsraten der anderen Gene werden als Mean Normalized Expressions relativ in Bezug zu der Expression solcher internen Standards angegeben (P. Simon 2003). In Vorversuchen überprüften wir unter variablen Versuchsbedingungen sowohl die Eigenschaften von *gapdh* als auch von *18s* um uns nach Untersuchung mehrerer potentieller Housekeeping Gene für das stabilere der beiden entscheiden zu können.

Die Primer wurden bei MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) erworben.

Ihre Spezifität wurde durch die Gelelektrophorese der PCR-Produkte (siehe Abbildung 4) und die Analyse der Schmelzkurve der PCR-Läufe verifiziert (siehe Abbildung 3)

Für eine genauere Charakterisierung der verwendeten Primer siehe Tabelle 5 und 6.

<u>Gen</u>	<u>Sense-Primer</u>	<u>Antisense-Primer</u>	<u>Amplicon Size</u>
<i>egr1-lv</i>	5' GCTTATAAACACATTGAATGCG 3'	5' ACACCACATATCCCATGGGC 3'	49 bp
<i>egr1-sv</i>	5' AAAGTTTCACGTCTTGGTGCC 3'	5' GCTCAGCTCAGCCCTCTTCC 3'	158 bp
<i>emap</i>	5' GCTGTCCCAAGCAATGGTG 3'	5' GTCTCCAGGAACAGACCCGT 3'	84 bp
<i>gapdh</i>	5' GCCTGGAGAAACCTGCCAAG 3'	5' TGGTCCTCAGTGTAGCCCAAG 3'	96 bp

Tabelle 5: Sequenz und Länge der Sense- und Antisense-Primer

<u>Primer</u>	<u>Schmelztemperatur</u>
<i>egr1-lv Sense</i>	59.7 °C
<i>egr1-lv Antisense</i>	59.9 °C
<i>egr1-sv Sense</i>	59.3 °C
<i>egr1-sv Antisense</i>	61.3 °C
<i>emap Sense</i>	59.3 °C
<i>emap Antisense</i>	58.5 °C
<i>gapdh Sense</i>	62.0 °C
<i>gapdh Antisense</i>	60.0 °C

Tabelle 6: Schmelztemperaturen der Sense- und Antisense- Primer

PCR-Durchführung

Zur statistischen Auswertung wurden jeweils Triplets der Proben der Vervielfältigung und Aufzeichnung mittels real time PCR zugeführt. Alle PCR – Reaktionsansätze hatten ein Endvolumen von 15 µl, welches sich aus SYBR Green PCR Kit (Quiagen), 400 µM Sense- und Antisense-Primer und revers-transkribierter mRNA (cDNA) zusammensetzte. Die eingesetzte Menge cDNA lag bei 10 ng (5 µl einer Konzentration von 2 ng / µl). Die PCR-Platten wurden hitzeversiegelt und der Inhalt durch sanfte Zentrifugation der Platte gesammelt. Die PCR Reaktionen wurden im iCycler™ durchgeführt.

PCR-Einstellungen

Die Durchführung der PCR erfolgte wie folgt:

Zunächst wurden die Proben 15 min bei 95 °C erhitzt. Hierbei erfolgte die Aktivierung der Fast Start Taq DNA-Polymerase und die Denaturierung der DNA. Es schlossen sich 45 Amplifikations- Zyklen an bestehend aus Denaturierungsphase (15 sec) bei 94 °C, Annealing Phase der Primer für 30 sec bei 62 °C und der 30-sekündigen Elongationsphase bei 72 °C. Nach jedem Annealing-Step wurde die Fluoreszenz gemessen. Zur Generierung der Schmelzkurve folgte ausgehend von 70 °C die schrittweise Erhöhung der Temperatur bis zu einer maximalen Temperatur von 95 °C. Hierbei dauerte jede Erhöhung der Temperatur um 0.5 °C jeweils 10 sec. Insgesamt folgten also 50 Phasen der Temperaturerhöhung.

Aktivierung Taq DNA-Polymerase	95 °C	15 min	1 x
Denaturation	94 °C	15 sec	45 x
Annealing	62 °C	30 sec	45 x
Extension	72 °C	30 sec	45 x
Schmelzkurve	70 – 95 °C, je 0.5 °C	10 sec	50 x

Tabelle 7: Überblick über die Schritte der PCR – Reaktion.

Zunächst erfolgt durch Erhitzen der Proben auf 95 °C die Aktivierung des Enzyms. Bei 94 °C denaturieren die DNA-Doppelstränge woraufhin sich die Primer in der Annealing-Phase spezifisch an bestimmte Areale der nun einsträngig vorliegenden DNA binden und von diesem Startpunkt aus die Extension der komplementären Stränge in dem von Sense- und Anti-Sense Primer umgebenen Abschnitt stattfindet. In einer erneuten Denaturations-Phase trennen sich ursprünglicher Template-Strang und der neu entstandene komplementäre Strang wieder und alle Vorgänge wiederholen sich 45 Mal. In jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge vorhandener DNA. Nach 45 Zyklen wird die Temperatur in Schritten von 0.5 °C von 70 auf 95 °C angehoben und apparativ werden anhand der Fluoreszenzabnahme Schmelzkurven erstellt.

Auswertung der Fluoreszenzsignale

Nach den PCR – Läufen wurde für jede Probe ein „Cycle Threshold“ (CT) -Wert berechnet. Der CT- Wert ist definiert als derjenige Zeitpunkt (Zyklus-Anzahl) bei dem sich die Intensität der Fluoreszenz über eine festgelegte „threshold“-Linie (Grundlinie) erhebt. Diese wurde für jeden Lauf bei etwa einem 1/10 des durchschnittlichen Fluoreszenz-Maximalwertes angesetzt. Der Zyklus, in dem die Grundlinie überschritten wird, gibt Aufschluss über die Menge initial vorhandener cDNA. Je früher ein CT-Wert liegt, desto mehr Ausgangsmaterial liegt vor. Denn je mehr Ausgangsmaterial vorliegt, desto weniger Amplifikationszyklen werden zur Herstellung einer definierten Menge an DNA (und folglich einer festgelegten Intensität der Fluoreszenz) benötigt.

Schmelzkurvenanalyse

Im Anschluss an jeden Amplifikationszyklus wurde eine sogenannte Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wurde in jeweils 10 sec dauernden 0,5 °C – Schritten die Temperatur im Thermocycler von 70 °C auf 95 °C erhöht. Mit steigender Temperatur lösen sich nach und nach die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären DNA-Strängen und das Fluoreszenzsignal verliert an Intensität. Jede dsDNA hat einen spezifischen Schmelzpunkt, der denjenigen Zeitpunkt darstellt, an dem die Hälfte der DNA als Einzelstrang vorliegt. Dieser ist unter anderem abhängig vom individuellen GC-Gehalt jedes Stranges. Gleiche Amplikate haben selbstverständlich den selben Schmelzpunkt, was sich in der späteren Analyse in einer Synchronizität der Schmelzkurven ausdrückt. So lässt sich die Spezifität einer PCR-Reaktion bestimmen. Unerwünschte Nebenprodukte präsentieren sich in der Analyse als abweichende Schmelzkurven.

3.2.8 Etablierung von Primern und Anfertigung von Standardkurven für die Ermittlung der Effizienz der jeweiligen quantitativen real-time RT-PCRs

Um spätere PCR-Ergebnisse korrekt auswerten zu können, wurden zunächst die gewählten Primer etabliert und Standardkurven erstellt anhand derer die Effizienzen der jeweiligen quantitativen real-time RT-PCR berechnet werden konnten. Dafür wurde RNA nach photometrischer Vermessung wie oben beschrieben in cDNA umgeschrieben. Definierte Mengen von 22.5 ng bis 0.7 ng der Ausgangs RNA wurden zur Herstellung von 2-fach-Verdünnungsreihen mit insgesamt 6 Stufen eingesetzt. Zur statistisch genaueren Erfassung möglicher Variabilitäten und Etablierung jedes Primers wurden sodann Triplets jeder Verdünnungsstufe unter variablen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Eigene Mastermixe mit unterschiedlichen Konstellationen von MgCl₂ – beziehungsweise DMSO-Gehalt wurden im Rahmen der Primer-Etablierung erprobt. So wurden beispielsweise die PCR – Ergebnisse der einzelnen Primer mit MgCl₂ – Stoffmengenkonzentrationen von 2.5, 3.0 bzw. 3.5 mM

auf effizienteste Resultate überprüft. Ebenso wurde die Konzentration an DMSO variiert: 0%-, 4%-, 8%- und 16%-ige Lösungen wurden dafür eingesetzt. Auch unterschiedliche „Annealing“-Temperaturen wurden sowohl im Gebrauch eigener Mastermixe als auch bei Verwendung von erworbenen Mastermixen (Quiagen) erprobt. Mehrere Kombinationen aller Variablen wurden getestet, um eine möglichst hohe Effizienz für die auf einer Platte laufenden PCR-Reaktionen (*egr1-lv*, *egr1-sv*, *emap*, *gapdh*) zu erreichen.

Neben $MgCl_2$ und DMSO bestanden die selbsthergestellten Mastermixe aus den Desoxyribonukleinsäure-Bausteinen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin in Form von Desoxy-Nucleosid-Triphosphaten (dNTP), Sybr-Green Farbstoff sowie destilliertem Wasser und dem Enzym Ampli Taq DNA-Polymerase.

Die optimale Effizienz eines Primers sollte bei 2.0 liegen, d.h. der Abstand zweier aufeinanderfolgender Verdünnungsstufen (jede Verdünnungsstufe enthält die halbe Menge Probenmaterial der vorangehenden Probe) sollte beim Überkreuzen der „Grundlinie“ -und somit die CT-Differenz der beiden Proben- genau einen Zyklus betragen. Wir errechneten die Primer-Effizienzen (E) aus den CT-values auf den jeweiligen Verdünnungsstufen mit Hilfe des Software-Programmes REST[®] (R. Rasumssen 2001; M. W. Pfaffl *et al.* 2002).

3.2.9 Auswertung und Statistik

Insgesamt wurden 1008 PCR-Läufe durchgeführt, deren Amplifikations- und Schmelzkurven im Anschluss an die PCR analysiert wurden. Nach Auswertung der Amplifikationskurven und Schmelzkurvenanalyse wurden aufgrund von Irregularitäten 14 PCRs von der Auswertung ausgeschlossen, so dass insgesamt 322 Triplets und 14 Doublets statistisch evaluiert werden konnten.

Statistische Auswertung

Aus den CT-Werten jeder Probe wurden mit Hilfe des Statistik Software Programmes JMP IN Werte für die ‚Mean Normalized Expressions‘ (MNE) berechnet, die die relative Expression eines Gens in Bezug auf das Housekeeping-Gen darstellen. Die Formel für die Berechnung der MNEs lautet:

$$MNE = \frac{\left(E_{reference}\right)^{CT_{reference,mean}}}{\left(E_{target}\right)^{CT_{target,mean}}}$$

(P. Simon 2003).

Da die MNE-Werte in den jeweiligen Behandlungsgruppen nach Durchführung eines Shapiro-Wilk-W-Tests Zeichen einer Nicht-Normalverteilung aufwiesen, wurden die Daten vor der Auswertung logarithmiert. Eine Überprüfung mittels Box-Cox-Transformation ergab, dass eine Logarithmierung der Daten (Log-Normalisierung) am geeignetsten war um eine Normalverteilung der Daten in den Gruppen zu erreichen. Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen wurden dann mittels ANOVA verglichen. Bei signifikantem Gruppenvergleich wurde als Post-hoc-Test ein all pairs Tukey-Kramer-Test durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu bestimmen und um für die Typ I-Fehlerrate zu adjustieren.

Für die graphische Präsentation der Daten wurden die logarithmierten Werte für den Mittelwert und die zugehörigen 95%-Konfidenzintervalle rücktransformiert. Hierdurch kann es in Einzelfällen dazu kommen, dass sich die rücktransformierten 95%-Konfidenzintervalle zwischen Gruppen überlappen, obwohl die Gruppen statistisch signifikante Unterschiede aufwiesen.

3.2.10 Detektion der Amplifikationsprodukte durch Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um eine sehr einfache Nachweismethode von PCR-Amplifikationsprodukten. Durch Anlegen einer Spannung werden die geladenen DNA-Fragmente hierbei entsprechend ihrer Größe in einem Gel

aufgetrennt. Dadurch konnte die Reinheit und Qualität der stattgehabten PCR-Läufe überprüft werden und unerwünschte Nebenprodukte festgestellt werden. Es wurde zunächst ein zwei Prozentiges Agarosegel wie folgt hergestellt: in 1 x TBE (10,8 g/l Tris Base, 5,5 g/l Borsäure, 0,74 g/l Na₂ EDTA) wurde Agarosepulver durch Erhitzen aufgelöst und in diesem flüssigen Zustand in Gelkammern gegossen, die mit Kämmen für die Geltaschen präpariert waren. Zuvor wurden pro 100 ml Gel 10 µl Ethidiumbromid zur Darstellung der DNA-Banden unter UV-Licht hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Gele zum Abkühlen und Auspolymerisieren für 30 min ruhen gelassen. Danach wurden die Gele in den Elektrophoresekammern platziert und mit 1 x TBE bedeckt. Sodann wurde ein Volumen von 12 µl bestehend aus PCR Produkt (10 µl) und 2x Lade Puffer (2 µl) (87%-iges Glycerin, dH₂O, 6 x Loading buffer, 1:1:1) in separate Geltaschen pipettiert. Es wurden für die Kontrolle von Egr-1 LV, Egr-1 SV und GAPDH jeweils drei Taschen gefüllt. Umrahmt wurden die Proben von Längenstandards (Low DNA Mass Ladder, GIBCO BRL®), die der Auswertung der Längen der PCR-Produkte dienen sollten. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 70 V über ca. 90 min.

3.2.11 Fotografieren der Gele

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Amplifikationsprodukte unter UV-Licht bei 312 nm sichtbargemacht und abfotografiert. Zur Auswertung der Größen der Amplifikationsprodukte liefen Längenstandards mit auf dem Gel.

Die Elektrophorese-Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

4. Resultate

4.1 Amplifikations-Effizienzen und Stabilität der Expression des Housekeeping – Genes

Zur Bestimmung der Primer-Effizienzen wurden für jeden Primer Standardkurven pipettiert mit fünf bzw. sechs 2-fach Verdünnungsschritten zwischen 16 ng und 1 ng bzw. 0.5 ng cDNA. Jede Probe wurde als Triplet pipettiert. Die Mittelwerte der Triplets bzw. doppelt pipettierter Proben wurden bestimmt und aus dem Abstand der PCR-Zyklen zweier aufeinanderfolgender 2-fach Verdünnungsstufen wurde die Effizienz eines Primers mit Hilfe des Software-Programms REST bestimmt (M. W. Pfaffl *et al.* 2002). Siehe Abbildung1.

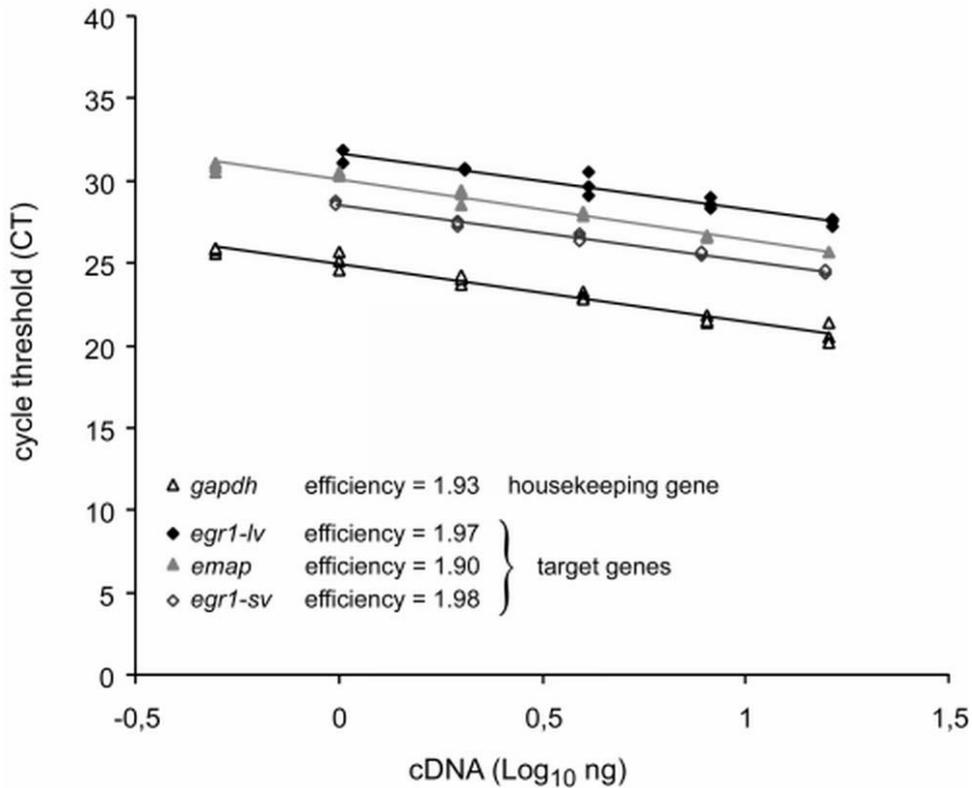


Abbildung 1: Standardkurven zur Berechnung der Effizienz einzelner Primer

Die CT-Werte von der PCR-Läufen von *egr1-lv*, *emap*, *egr1-sv* und *gapdh* sind gegen logarithmierte Werte der cDNA Konzentration aufgetragen. Aus der Neigung des Graphen errechnet sich die Effizienz (E) der Primer: $(E) = 10^{-1/\text{Neigung des Graphen}}$ mit theoretischem Optimum bei 2.0.

Die untersuchten Primer zeigen hohe und homogene real time PCR – Effizienzen (E_{target}):

$E_{\text{egr1-lv}}$: 1.97, $E_{\text{egr1-sv}}$: 1.98, E_{emap} : 1.90 und die Effizienz des Housekeeping-Genes liegt bei E_{gapdh} : 1.93.

Diese Effizienzen treffen für PCR-Ansätze zu, die mit einem PCR-Mastermix der Firma Qiagen pipettiert wurden. Verschiedenste Konstellationen eigener Mastermix-Ansätze mit Variationen im Gehalt von MgCl_2 und DMSO stellten sich für einzelne Primer als gut heraus, die Effizienzen anderer Primer wiederum lagen in einem Bereich, der für die Durchführung von PCRs nicht annehmbar war. Wir griffen daher

für die Etablierung der Primer und die Durchführung der PCRs auf den Kit von Quiagen zurück.

4.2 Spezifität und Variabilität der semiquantitativen real time PCR

Die Spezifität der PCR wurde anhand von Amplifikationskurven, Schmelzkurven und Gelelektrophorese analysiert.

4.2.1 Amplifikationskurven-Analyse

Die CT-Werte der Triplets wurden ausgewertet und auf etwaige Irregularitäten überprüft. Proben, deren Amplifikations- oder Schmelzkurven Unregelmäßigkeiten aufwiesen, wurden von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. 1008 PCR-Läufe wurden durchgeführt, wovon 14 wegen solcher Unsauberkeiten nicht ausgewertet wurden, so dass sich eine Gesamtzahl von 322 ausgewerteten Triplets und 14 ausgewerteten Zweifach-Wiederholungen ergab.

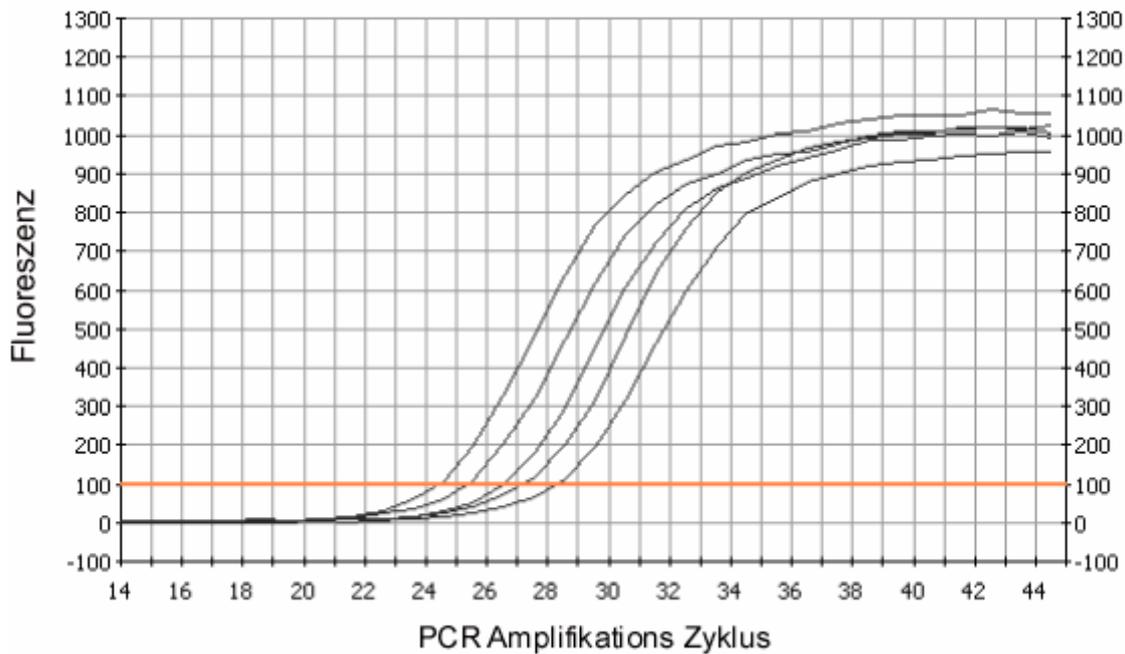


Abbildung 2: Standardkurven von fünf Verdünnungsstufen mit abnehmender Konzentration.

Pipettiert wurden 5 Proben abnehmender Konzentration (16 ng bis 1 ng) Für jeden PCR-Lauf wurden „Cycle Threshold“(CT)- Werte berechnet. Dieser CT-Wert ist definiert als derjenige PCR-Zyklus, in dem die Intensität der Fluoreszenz eines Amplicons eine bestimmte Schwelle (threshold) überschreitet. Diese Schwelle wird auf ca. 1/10 der maximalen Fluoreszenz gesetzt. Im Schaubild wird sie repräsentiert durch die Linie bei Fluoreszenzwert 100. Die entsprechenden CT-Werte im Schaubild liegen optimalerweise in einem Abstand von etwa einem CT-Wert. Pro Amplifikationszyklus wird die Menge an vorhandener cDNA bei bestmöglicher Primereffizienz verdoppelt, so dass sich für fünf Verdünnungsstufen eine Spanne von fünf CT-Werten ergibt.

4.2.2 Schmelzkurvenanalyse

Auch die Schmelzkurven wurden zur Analyse der PCR-Läufe herangezogen und PCRs mit unregelmäßigen Schmelzkurven wurden wie oben beschrieben von einer Auswertung ausgeschlossen.

Die Schmelzkurven aller verwerteten PCR-Reaktionen zeigten für das Amplicon spezifische Melting-Peaks. In keinem Fall gab es einen Anhalt auf unspezifische Nebenprodukte. Die Schmelztemperatur für *egr1-lv* lag bei 75.0 °C, für *egr1-sv* bei 84.5 °C, für *emap* bei 82.5 °C und für *gapdh* bei 83.5 °C. Damit lagen sämtliche Schmelztemperaturen in dem Bereich, der laut Sugimoto vorhergesagt werden konnte (N. Sugimoto *et al.* 1996).

In Abbildung 3 sind die Schmelzkurven eines jeden Amplicons dargestellt.

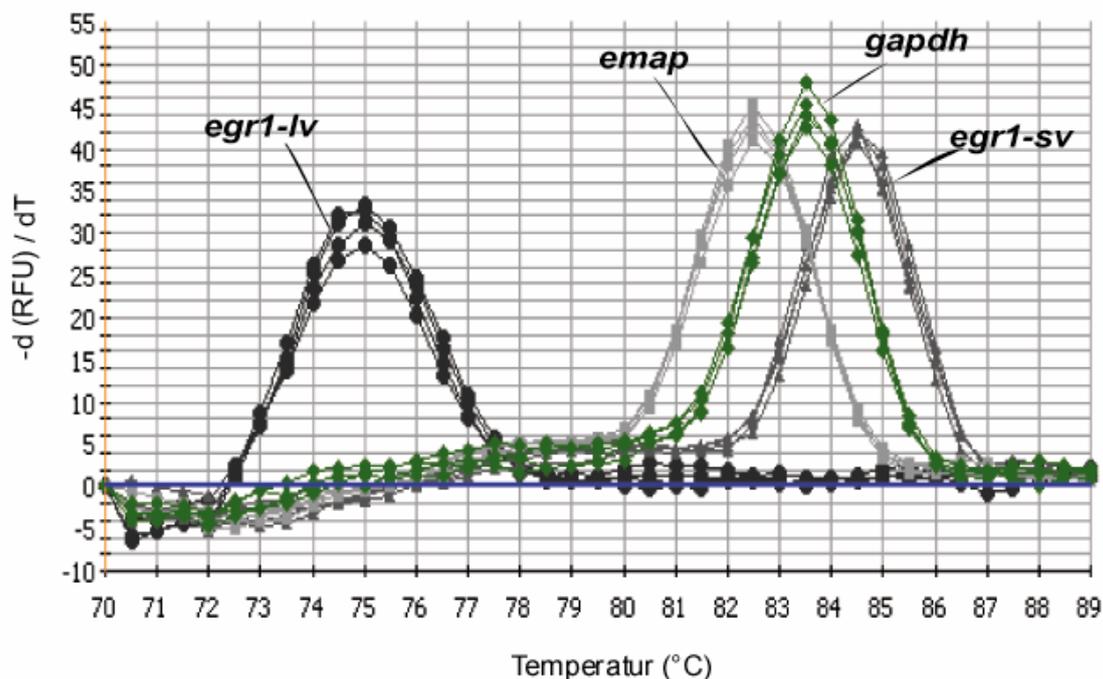


Abbildung 3: Darstellung der Schmelzkurven mit für das jeweilige Amplicon spezifischen Schmelzpunkten.

Die Schmelzpunkte der Gene lauten: *egr1-lv*: 75 °C, *egr1-sv*: 84,5 °C, *emap*: 82,5 °C, *gapdh*: 83,5 °C. Die Analyse der Schmelzkurven ergibt keinen Hinweis auf unspezifische Nebenprodukte, die am Auftreten von Neben-Schmelzpeaks erkennbar sein könnten.

4.2.3 Gelelektrophorese-Auswertung

In Abhängigkeit von der Länge des durch die spezifisch bindenden Primer flankierten Genabschnittes ergeben sich definierte Größen der Amplifikationsprodukte. Für *egr1-lv* liegt die vorausgesagte Länge bei 49 bp, für *egr1-sv* bei 158 bp, für *emap* bei 84 bp und im Falle von *gapdh* bei 96 bp.

Die Gelelektrophorese der Amplifikationsprodukte ergab reine Banden für alle vier verwendeten Primerpaare und die Größe der PCR-Produkte entsprach den erwarteten Längen (siehe auch Tabelle 4).

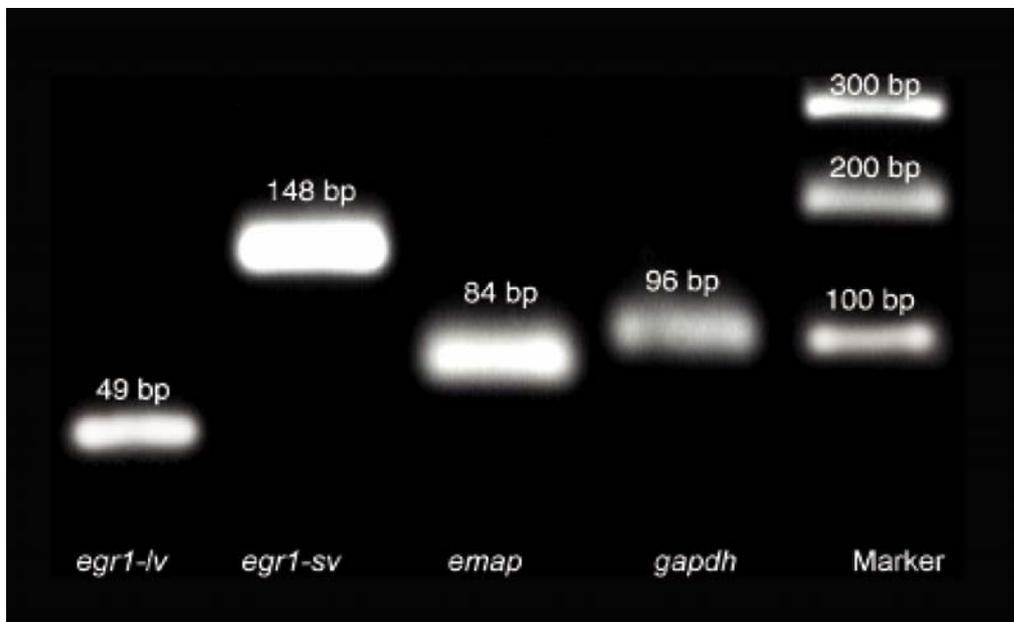


Abbildung 4: Darstellung der PCR-Spezifität durch Gelelektrophorese-Auswertung der PCR-Läufe.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proben ergibt reine Banden, was für eine spezifische Replikation der durch die Primer flankierten Zielsequenz spricht.

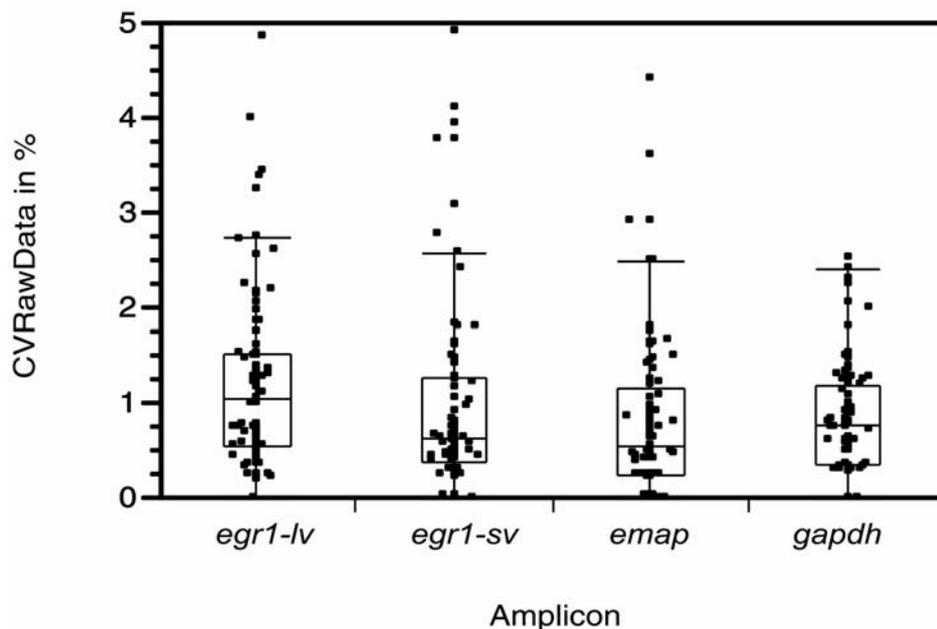
4.2.4 Bestimmung der Variabilität

Zur Evaluation der Reproduzierbarkeit der PCR-Läufe wurde die Variabilität der in Triplets pipettierten einzelnen Proben analysiert. Die Variationskoeffizienten der CT-

Werte aus 84 Messungen werden für alle vier Transkripte in Abbildung 5 dargestellt. Die Variationskoeffizienten (CV) der Rohdaten liegen wie folgt: *egr1-lv* (1.04 %), *egr1-sv* (0.62 %), *emap* (0.54 %), *gapdh* (0.77 %).

MNEs beschreiben die Expression eines Zielgens im Verhältnis zu einem Kontrollgen. Ihre Berechnung berücksichtigt die unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen und das Expressionslevel des Housekeeping-Genes. Aufgrund dieser Tatsachen ist sowohl ein Vergleich der unterschiedlichen Zielgene innerhalb eines PCR-Laufs als auch der Zielgene untereinander in verschiedenen Läufen möglich. Die Darstellung der CV der MNEs stellt aus diesem Grund eine realistischere Darstellung der Variabilität der real time PCR dar, als eine Repräsentation durch die wesentlich geringeren CVs der Rohdaten.

Die CVs der MNEs aus 84 Messungen sind für die drei Zielgene dargestellt in Abbildung 5.

A

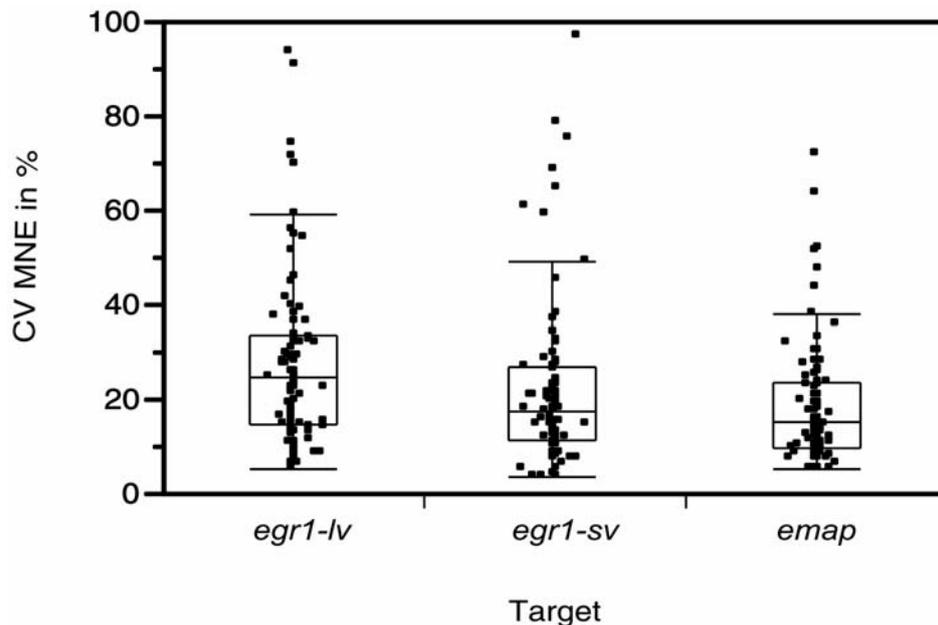
B

Abbildung 5: Variationskoeffizienten (CV) der CT-Rohdaten und errechneten Mean Normalized Expression – Werte (MNE) in Prozent.

Darstellung von CT-Wert Rohdaten jedes Amplikons aus 84 Triplets als Point scatter und Quantilen Box Plot (A) und von daraus errechneten MNE-Werte (B). Jeder Datenpunkt repräsentiert einen CV eines der 84 Triplet-Replikate. Mittellinie der Boxen stellt den medianen CV dar, obere und untere Limits der Boxen die 25 % bzw 75 %- Quantilen, die oberen und unteren Linien markieren 10%- bzw. 90% - Level. Der mediane CV der MNEs liegt bei cirka 22 %, und damit etwa 20 fach höher als derjenige der Rohdaten.

4.3 Basale Expressionen

egr1-sv mRNA

Die basale Expression der kurzen *egr-1* Variante, *egr1-sv*, ist am höchsten im parietalen Kortex (MNE of $6,09 \times 10^{-2}$ [CI: $4,1-8,1 \times 10^{-2}$]), gefolgt von Hippocampus mit einem MNE von $3,37 \times 10^{-2}$ [CI: $1,5 - 5,0 \times 10^{-2}$], frontalem Kortex (MNE of $1,12 \times 10^{-2}$ [CI: $-0,7 - 3,0 \times 10^{-2}$]) und dem Kleinhirn, welches geringste Expressionsraten aufweist (MNE $1,07 \times 10^{-2}$ [CI: $-0,8 - 2,9 \times 10^{-2}$]). Damit ist die Expression der mRNA von *egr1-sv* im ZNS unbestrahlter Ratten im

parietalen Kortex 1.80-fach höher als im Hippocampus, 5.42-fach erhöht verglichen mit dem frontalen Kortex und der Vergleich von parietalen Kortex und dem Zerebellum zeigt 5.71-fach erhöhte Expressionsraten im parietalen Kortex (n= 6 Tiere)(Errechnung der Expressionsunterschiede in allen Fällen aus nicht abgerundeten Rohdaten). Die Unterschiede zwischen den Hirnarealen sind jedoch nicht signifikant.

egr1-lv mRNA

Höchste Level sind im frontalen Kortex zu finden. Der entsprechende MNE Wert liegt bei 0.51×10^{-2} [CI: $0.2-0.8 \times 10^{-2}$]. Zweithöchste Werte weist der parietale Kortex auf: MNE: 0.37×10^{-2} [CI: $0.06-0.6 \times 10^{-2}$], gefolgt vom Hippocampus mit einem MNE von 0.21×10^{-2} [CI: $0.0 - 0.5 \times 10^{-2}$] und dem Kleinhirn mit MNE: 0.10×10^{-2} [CI: $0.0-3.9 \times 10^{-2}$]. Das Level der mRNA im frontalen Kortex liegt somit 1.39-fach höher als im parietalen Kortex und übersteigt die Expression im Hippocampus um das 2.42-fache. Im Kleinhirn finden sich Expressionsraten, die im Vergleich zum frontalen Kortex 5.23-fach geringer sind.

Die Werte der langen Version von *egr-1* sind in den Ergebnissen von *egr1-sv* enthalten. Dies liegt an den Primer-spezifischen Bindungsregionen. Primer für *egr1-sv* binden am 3'-UTR der *egr-1* mRNA an einen Bereich, der sowohl in der langen Variante wie auch in der kurzen existiert. Primer für *egr1-lv* binden innerhalb der 293 Extra-Basenpaare, die lediglich in *egr1-lv* vorkommen. Die Ergebnisse für *egr1-lv* stellen einen Bruchteil derer dar, die für *egr1-sv* gemessen wurden. Da dieser Anteil im Schnitt bei weniger als einem Zehntel liegt, betrachteten wir diesen Fakt in der Auswertung als vernachlässigbar und sahen von einer Subtraktion der Werte ab.

emap mRNA

Die mRNA von EMAP ist wie folgt über die verschiedenen untersuchten Gehirnareale verteilt: Höchste Level finden sich im Zerebellum mit einem MNE von 9.0×10^{-2} [CI: $4.6 - 13.5 \times 10^{-2}$] gefolgt von parietalen Kortex (MNE: 7.8×10^{-2} [CI: $3.5 - 12.4 \times 10^{-2}$]) und Hippocampus mit einem MNE von 7.6×10^{-2} (CI: $3.1 - 12.1 \times 10^{-2}$). Die niedrigste Expression zeigt der frontale Kortex (MNE: 3.1×10^{-2} [CI: $0.0 - 7.1 \times 10^{-2}$]).

²]). Zerebellar finden sich demnach Werte für die mRNA von EMAP, die zirka 1.15-fach höher als im parietalen Kortex und 1.19-fach höher als im Hippocampus liegen. Die Expression überschreitet diejenige, die im frontalen Kortex gefunden wird, um das etwa 2.90-fache.

4.4 Generelle Behandlungs- und Bestrahlungs-induzierte Veränderungen

Zunächst wurden generelle durch Behandlung (Anästhesie) und Bestrahlung verursachte Effekte auf die Expression von *egr-1* und *emap* untersucht.

Narkose-Effekt

Bis auf die 20 min Gruppen (KG und Bestrahlte) wachten alle Tiere nach der ersten Narkose und Bestrahlung bzw. Schein-Bestrahlung noch einmal auf und wurden vor der Dekapitation ein zweites Mal narkotisiert. Eine zweite Kontrollgruppe erhielt ebenfalls eine weitere Narkose. Um eine mögliche Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse durch die abermalige Anästhesie zu eruieren, wurden beide KGs miteinander verglichen. Hierbei lässt sich kein signifikanter Unterschied der Expressionsraten von *egr1-lv*, *egr1-sv* und *emap* zwischen den KGs feststellen. Dies gilt sowohl für die mittleren Werte eines Gesamtquerschnitts durch alle Hirnregionen als auch für diejenigen einzelner Areale.

($MNE_{KG_20min/egr1-lv}$: 0.16×10^{-2} [CI: $0.00 - 0.36 \times 10^{-2}$], $MNE_{KG_2h/egr1-lv}$: 0.44×10^{-2} [CI: $0.23 - 0.64 \times 10^{-2}$],

$MNE_{KG_20min/egr1-sv}$: 2.22×10^{-2} [CI: $0.48 - 3.98 \times 10^{-2}$], $MNE_{KG_2h/egr1-sv}$: 3.57×10^{-2} [CI: $1.81 - 5.36 \times 10^{-2}$],

$MNE_{KG_20min/emap}$: 6.14×10^{-2} [CI: $2.97 - 9.40 \times 10^{-2}$], $MNE_{KG_2h/emap}$: 7.61×10^{-2} [CI: $4.40 - 10.92 \times 10^{-2}$],

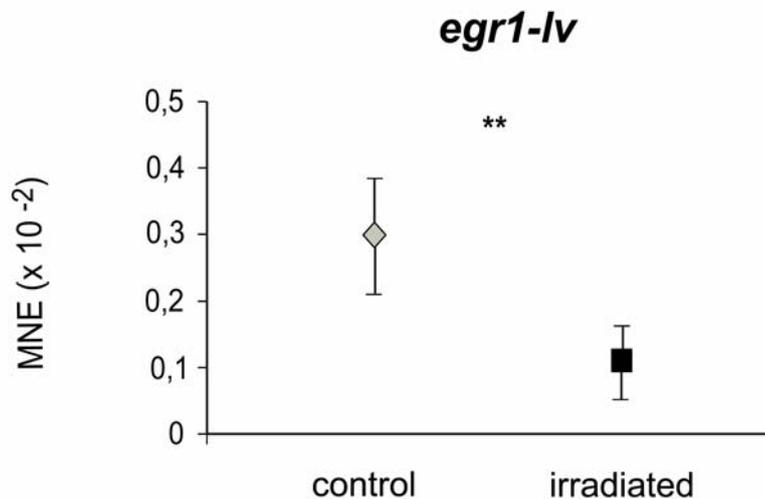
($n_{KG_20min} = 12$, $n_{KG_2h} = 12$)

Bestrahlungseffekt

Bei Betrachtung des mittleren Wertes der *egr1-lv* Expression aller Hirnregionen zeigt sich ein signifikanter bestrahlungsinduzierter Abfall der Genexpression um 64% im Vergleich zu Kontrollgruppen: $MNE_{\text{Non-radiated (NR)}} : 0.29 \times 10^{-2}$ [CI: $0.15 - 0.44 \times 10^{-2}$], $MNE_{\text{radiated (R)}} : 0.11 \times 10^{-2}$ [CI: $0.01 - 0.19 \times 10^{-2}$], $p < 0.01$, $n_{\text{NR}} = 24$, $n_{\text{R}} = 60$ Proben).

Weder der mittlere Expressionswert von *egr1-sv* noch derjenige von *emap* im ZNS werden signifikant durch die Einwirkung ionisierender Strahlung alteriert. Jedoch zeigt sich für *egr1-sv* insgesamt eine Tendenz eher in Richtung steigender Expressionswerte.

A



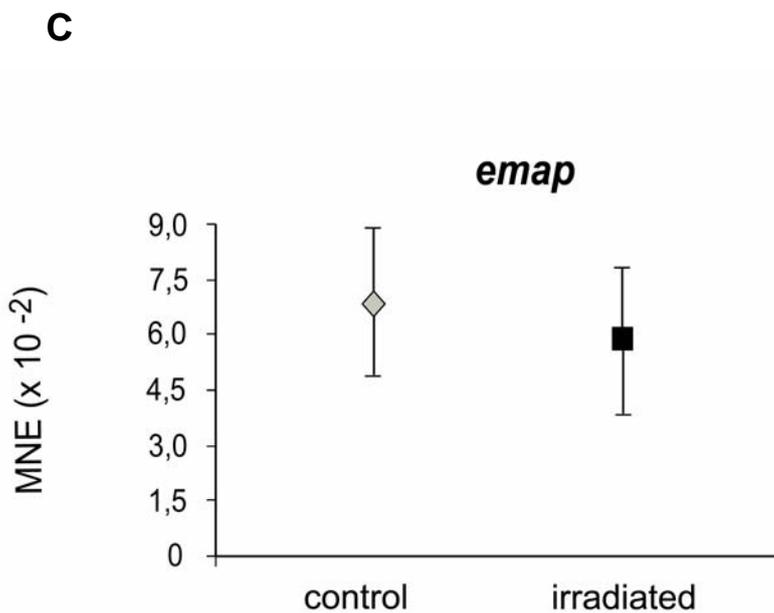
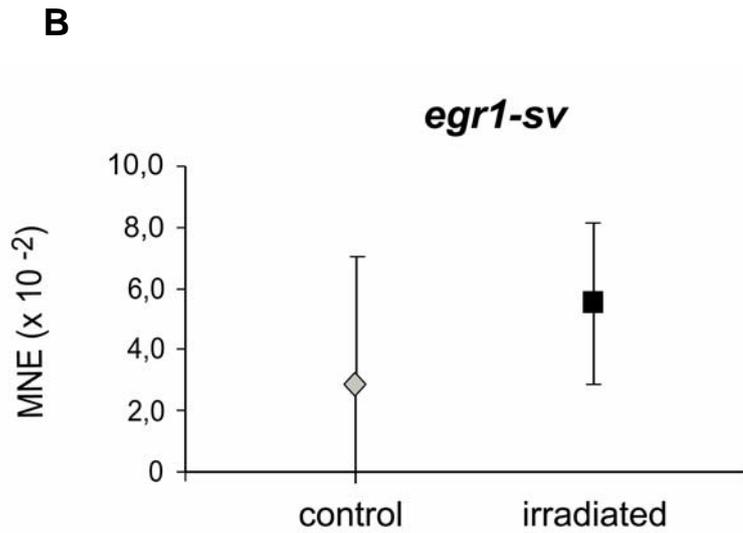


Abbildung 6: Darstellung genereller bestrahlungs-induzierter Effekte.

Die aus allen Hirnarealen berechnete mittlere Expression von *egr1-lv* (B) zeigt ein signifikantes Absinken der Expression in Folge der Einwirkung ionisierender Strahlung. (**: $p < 0.01$). Veränderungen der *egr1-sv*- (A) und *emap*-Expression (C) sind unsignifikant. Dargestellt werden die Mediane (Rauten und Viereck) sowie die jeweiligen 95%-Konfidenzintervalle.

4.5 Bestrahlungseffekte

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte sowohl im Hinblick auf molekulare Veränderungen im ZNS bzw. innerhalb einzelner Areale des ZNS als auch unter Berücksichtigung des zeitlichen Verlaufs möglicher Veränderungen.

4.5.1 *egr1-lv*

alle Hirnregionen

Die Gesamtbetrachtung mittlerer Expressionsraten von *egr1-lv* zeigt im Vergleich mit den KG signifikant reduzierte Ergebnisse: $MNE_{\text{Non-radiated (NR)}} : 0.29 \times 10^{-2}$ [CI: $0.15 - 0.44 \times 10^{-2}$], $MNE_{\text{radiated (R)}} : 0.11 \times 10^{-2}$ [CI: $0.01 - 0.19 \times 10^{-2}$], ($n_{\text{NR}} = 24$, $n_{\text{R}} = 60$), ($p < 0.01$). Im zeitlichen Verlauf lässt sich dieser signifikante Abfall der Expression der 2h – Gruppe zuordnen. Die Werte gehen zu diesem Zeitpunkt um 83.6% zurück auf eine MNE von 0.05×10^{-2} [CI: $0.00 - 0.17 \times 10^{-2}$] ($n_{2\text{h}} = 12$, $n_{\text{KG}} = 24$), ($p < 0.05$). Diejenige Hirnregion mit dem deutlichsten Rückgang von *egr1-lv* stellt der parietale Kortex mit einer 16.14-fachen Reduktion der Expression dar ($MNE_{\text{NR}} : 0.37 \times 10^{-2}$ [CI: $0.06 - 0.66 \times 10^{-2}$], $MNE_{\text{R}} : 0.02 \times 10^{-2}$ [CI: $0.00 - 0.08 \times 10^{-2}$]), gefolgt von Kleinhirn mit einem 8.93-fachen Rückgang, dem frontalen Kortex (8.44-fach) und dem Hippocampus (2.10-fach). Diese Beobachtungen waren allerdings lediglich Tendenzen und wiesen keine statistische Signifikanz auf.

frontaler Kortex

Im frontalen Kortex ist ein signifikanter 4.74-facher Abfall der Expression von *egr1-lv* in bestrahlten Tieren im Vergleich mit Kontrollgruppen festzustellen: $MNE_{\text{NR}} : 0.51 \times 10^{-2}$ [CI: $0.25 - 0.77 \times 10^{-2}$], $MNE_{\text{R}} : 0.10 \times 10^{-2}$ [CI: $0.00 - 0.27 \times 10^{-2}$], ($n_{\text{NR}} = 6$, $n_{\text{R}} = 15$ Tiere) ($p < 0.05$). Nach 2 h ist die Expression um 88.15 % des Ausgangswertes abgesunken ($MNE_{2\text{h}} : 0.06 \times 10^{-2}$ [CI: $0.00 - 0.48 \times 10^{-2}$]) und nach 3 d beträgt der Rückgang 91.55 % ($MNE_{3\text{d}} : 0.04 \times 10^{-2}$ [CI: $0.00 - 0.48 \times 10^{-2}$]).

parietaler Kortex

Auch im parietalen Kortex ist ein signifikanter Rückgang der Expressionsraten von *egr1-lv* mRNA im Vergleich zu Kontrollgruppen zu verzeichnen. Dieser Rückgang beträgt 58.64 % des Ausgangswertes: $MNE_{NR}: 0.37 \times 10^{-2}$ [CI: $0.20 - 0.54 \times 10^{-2}$], $MNE_R: 0.15 \times 10^{-2}$ [CI: $0.05 - 0.26 \times 10^{-2}$], ($n_{NR}= 6$, $n_R= 15$ Tiere) ($p<0.05$). Maximal erniedrigte Werte finden sich nach 2 h. Das mRNA-Level ist zu diesem Zeitpunkt um 93.80 % des Ausgangswertes abgefallen auf eine MNE von 0.02×10^{-2} [CI: $0.00 - 0.28 \times 10^{-2}$].

Hippocampus

Wenn auch nicht signifikant, so lässt sich dennoch auch im Hippocampus eine Tendenz zur Abnahme der Expression feststellen. Der MNE-Wert bestrahlter Tiere fällt um 40.55 % des Ausgangsniveaus der Kontrollgruppen auf 0.13×10^{-2} [CI: $0.07 - 0.18 \times 10^{-2}$]. ($MNE_{NR}: 0.21 \times 10^{-2}$ [CI: $0.12 - 0.29 \times 10^{-2}$])

Kleinhirn

Auch die *egr1-lv* Expressionsveränderungen nach Bestrahlung im Kleinhirn sind tendenziell eher abnehmend, jedoch nicht signifikant: $MNE_{NR}: 0.10 \times 10^{-2}$ [CI: $0.01 - 0.18 \times 10^{-2}$], $MNE_R: 0.04 \times 10^{-2}$ [CI: $0.00 - 0.09 \times 10^{-2}$], ($n_{NR}= 6$, $n_R= 15$ Tiere).

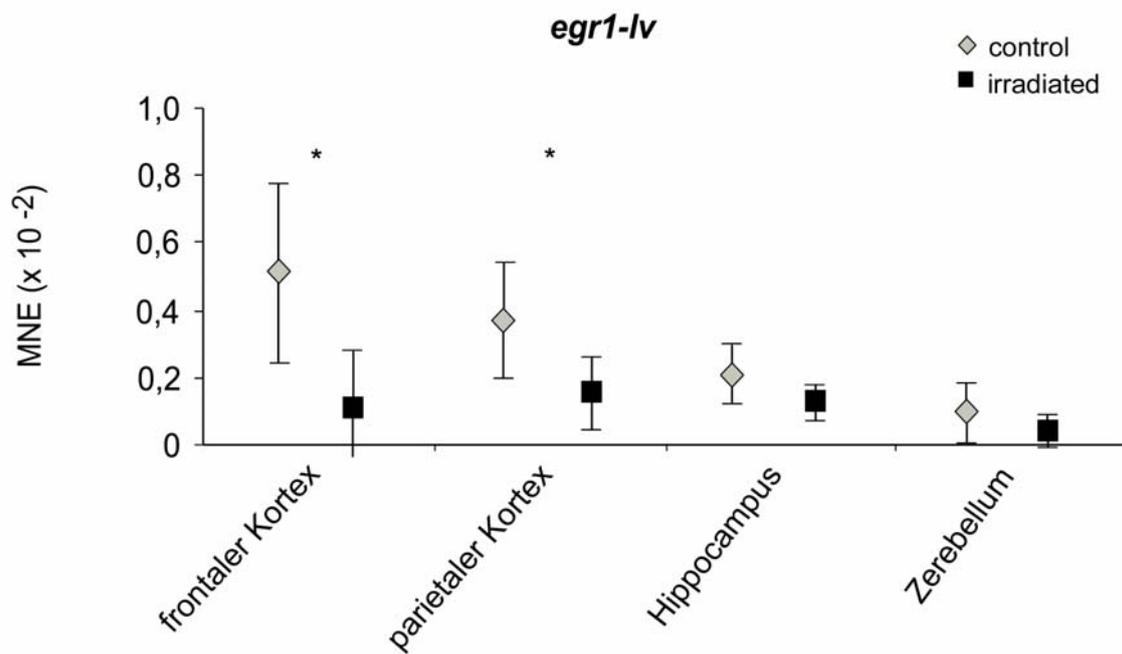


Abbildung 7: Darstellung der hirnregion-spezifischen Veränderungen der *egr1-lv* Genexpression in Folge von Bestrahlung.

Dargestellt werden die Mediane der MNE (x 10⁻²) von Kontrolltieren (je Hirnareal n = 6) und bestrahlten Tieren (je Hirnareal n = 15) sowie die jeweiligen 95%-Konfidenzintervalle. In frontalem sowie parietalem Kortex ergeben sich signifikante bestrahlungs-induzierte Rückgänge der *egr1-lv* Expression (*: p < 0.05).

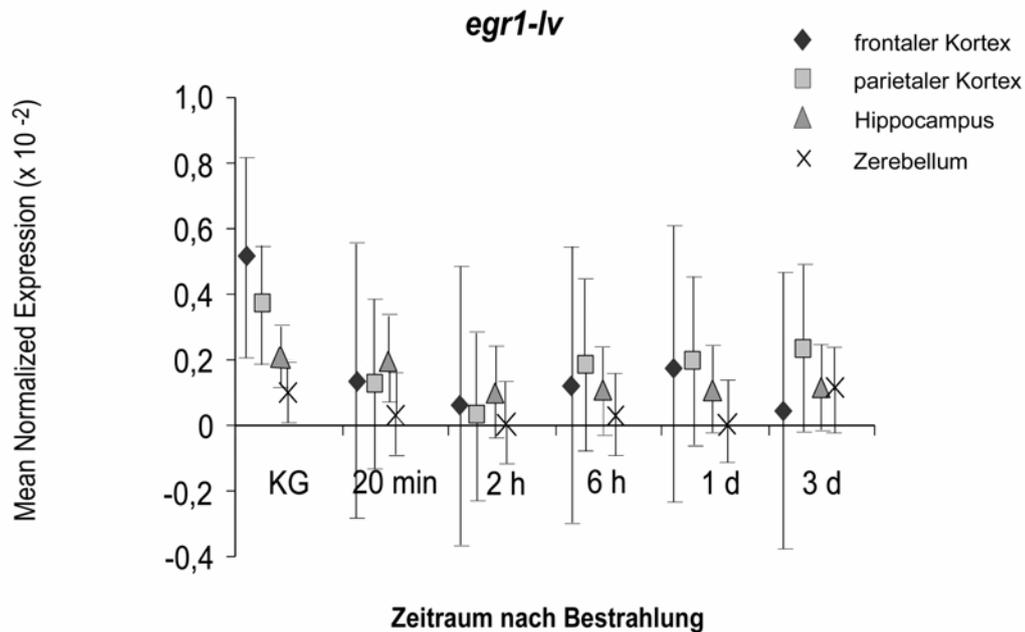


Abbildung 8: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Expressionsänderungen von *egr1-lv* in den untersuchten Hirnarealen.

Ein deutlicher Rückgang der Genexpression ergibt sich für alle Areale nach einer Dauer von 2 h nach Bestrahlung. Dargestellt werden die Mediane (Symbole) sowie die 95% Konfidenzintervalle

4.5.2 *egr1-sv*

Alle Areale

Ein Gesamtquerschnitt durch alle Bereiche ergibt von der Tendenz her steigende mittlere Expressionsraten der kurzen *egr1* Variante, die jedoch insgesamt keine signifikante Veränderung darstellen. Dieser Gesamtanstieg der mittleren Expression ist 1.89-fach.

frontaler Kortex

Die Genexpression im frontalen Kortex wird nur unwesentlich durch die Bestrahlung beeinflusst. Signifikante Veränderungen lassen sich nicht finden.

MNE_{NR} : 1.12×10^{-2} [CI: $0.55 - 1.70 \times 10^{-2}$], MNE_R : 0.88×10^{-2} [CI: $0.52 - 1.24 \times 10^{-2}$], ($n_{NR}=6$, $n_R=15$ Tiere)

Die niedrigste Expression zeigt sich zum Zeitpunkt von 1d nach Bestrahlung (MNE_{1d} : 0.41×10^{-2} [CI: $0.00 - 1.23 \times 10^{-2}$]).

parietaler Kortex

Die *egr1-sv* Expression fällt im parietalen Kortex bestrahlter Tiere im Vergleich mit Kontrolltieren signifikant um 51.20 % ab: MNE_{NR} : 6.09×10^{-2} [CI: $3.80 - 8.43 \times 10^{-2}$], MNE_R : 2.97×10^{-2} [CI: $1.56 - 4.40 \times 10^{-2}$], ($n_{NR}=6$, $n_R=15$ Tiere) ($p<0.05$).

Im zeitlichen Verlauf lässt sich feststellen, dass der maximale Rückgang zum Zeitpunkt von 6 h nach Bestrahlung eintritt: MNE_{6h} : 1.35×10^{-2} [CI: $0.00 - 4.70 \times 10^{-2}$].

Hippocampus

Das Expressionsniveau von *egr1-sv* wird durch Bestrahlung nicht signifikant verändert. Das mRNA Level steigt als Folge der ionisierenden Strahlung geringfügig auf MNE_R : 4.47×10^{-2} [CI: $2.40 - 6.60 \times 10^{-2}$] im Vergleich zu nichtbestrahlten Tieren: MNE_{NR} : 3.37×10^{-2} [CI: $0.14 - 6.70 \times 10^{-2}$], ($n_{NR}=6$, $n_R=15$ Tiere). Dies bedeutet einen Anstieg um 32.62 % des Ausgangswertes. Der Tiefpunkt der *egr1-sv* Expression im Hippocampus liegt bei 1d nach Bestrahlung: MNE_{1d} : 2.21×10^{-2} [CI: $0.00 - 7.11 \times 10^{-2}$].

Kleinhirn

Die *egr1-sv* - Expression steigt nach Bestrahlung um ein 13.19-faches von MNE_{NR} : 1.07×10^{-2} [CI: $0.00 - 17.42 \times 10^{-2}$] auf 14.05×10^{-2} [CI: $3.73 - 25.40 \times 10^{-2}$], wobei auch dieser Anstieg nicht signifikant ist. ($n_{NR}=6$, $n_R=15$ Tiere). Der Anstieg peakt zweigipfelig bei 20 min und 6 h.

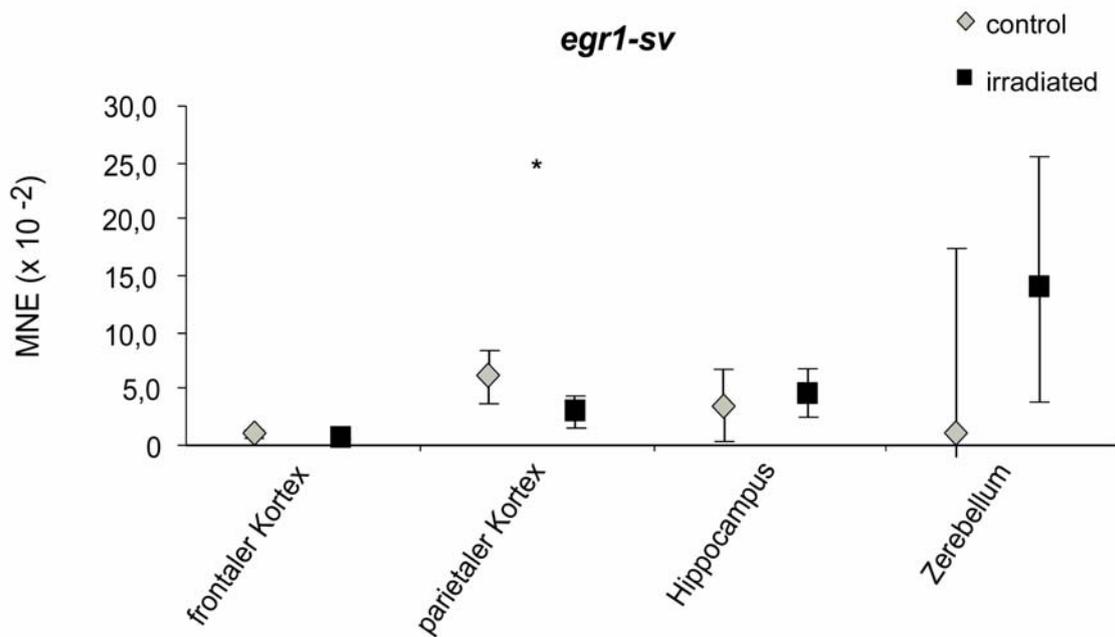


Abbildung 9: Darstellung der Bestrahlungseinwirkung auf die Expression (MNE x 10⁻²) von *egr1-sv* in den verschiedenen Hirnarealen.

Eine signifikante Veränderung nach ionisierender Bestrahlung findet sich im parietalen Kortex in Form eines Expressionsabfalls (* : p < 0.05).

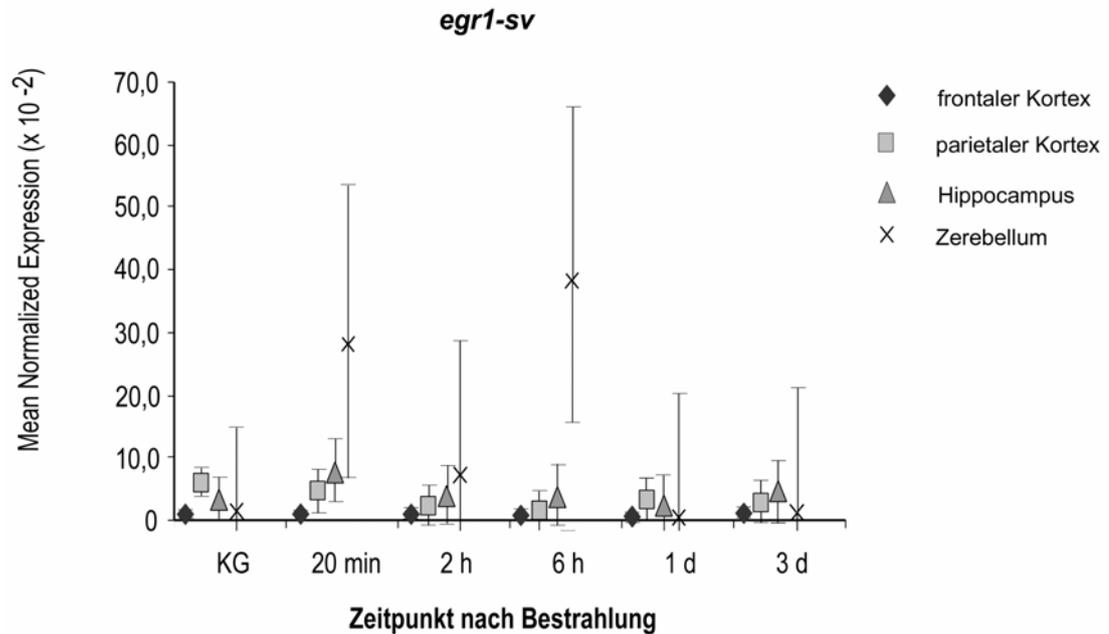


Abbildung 10: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Expressionsänderungen von *egr1-sv* in den untersuchten Hirnarealen.

Die Veränderungen der *egr1-sv* Expression durch Bestrahlung fällt in den meisten Arealen nur gering aus. Lediglich im Kleinhirn finden sich größere Expressionsunterschiede, welche jedoch sehr große Varianz aufweisen.

4.5.3 *emap*

alle Areale

Die Untersuchung eines Gesamtquerschnitts aller Hirnareale ergibt keine signifikanten bestrahlungsinduzierten Veränderungen der mittleren *emap*-Expression. $MNE_{NR}: 6.87 \times 10^{-2}$ [CI: $4.92 - 8.85 \times 10^{-2}$], $MNE_R: 5.85 \times 10^{-2}$ [CI: $4.63 - 7.09 \times 10^{-2}$] ($n_{NR} = 24$, $n_R = 60$)

frontaler Kortex

Weder die Auswertung von zeitlichem Verlauf noch eine Gesamtbetrachtung aller untersuchten Gruppen mit unterschiedlicher Überlebenszeit nach Bestrahlung ergibt signifikante Veränderungen des mRNA-Levels von *emap* im frontalen Kortex. $MNE_{NR}: 3.11 \times 10^{-2}$ [CI: 0.00 – 6.76×10^{-2}], $MNE_R: 3.46 \times 10^{-2}$ [CI: 1.20 – 5.76×10^{-2}], ($n_{NR} = 6$, $n_R = 15$ Tiere)

parietaler Kortex

Auch im parietalen Kortex finden sich keine signifikanten Expressions-Veränderungen. $MNE_{NR}: 7.84 \times 10^{-2}$ [CI: 3.54 – 12.31×10^{-2}], $MNE_R: 7.68 \times 10^{-2}$ [CI: 4.95 – 10.49×10^{-2}], ($n_{NR} = 6$, $n_R = 15$ Tiere)

Hippocampus

Im Hippocampus lässt sich ebenfalls keine Beeinflussung der *emap*-Expression durch ionisierende Strahlung eruieren. $MNE_{NR}: 7.61 \times 10^{-2}$ [CI: 4.06 – 11.27×10^{-2}], $MNE_R: 5.27 \times 10^{-2}$ [CI: 3.06 – 7.52×10^{-2}], ($n_{NR} = 6$, $n_R = 15$ Tiere)

Kleinhirn

Lediglich unsignifikant unterscheiden sich auch die Ergebnisse im Zerebellum. $MNE_{NR}: 9.02 \times 10^{-2}$ [CI: 4.86 – 13.34×10^{-2}], $MNE_R: 7.06 \times 10^{-2}$ [CI: 4.46 – 9.73×10^{-2}], ($n_{NR} = 6$, $n_R = 15$ Tiere)

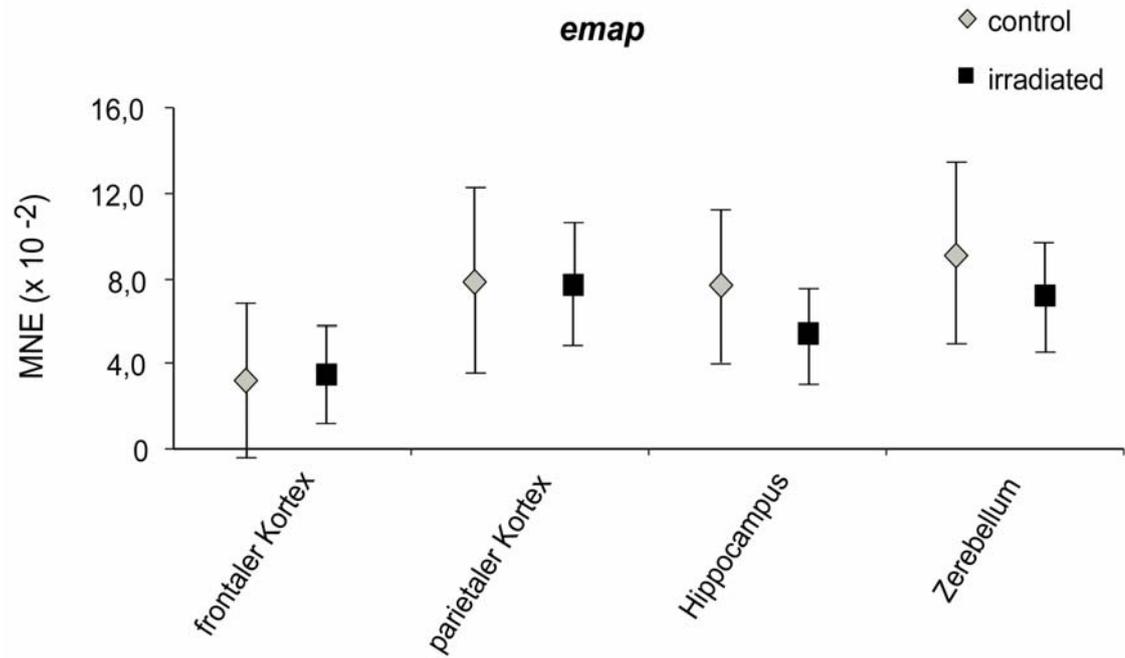


Abbildung 11: Bestrahlungseinwirkung auf die Expression von *emap* in den verschiedenen Hirnarealen

Hier wird deutlich, dass durch Einwirkung ionisierender Strahlung in keinem Hirnareal signifikante Effekte auf die Expression ($\text{MNE} \times 10^{-2}$) von *emap* entstehen.

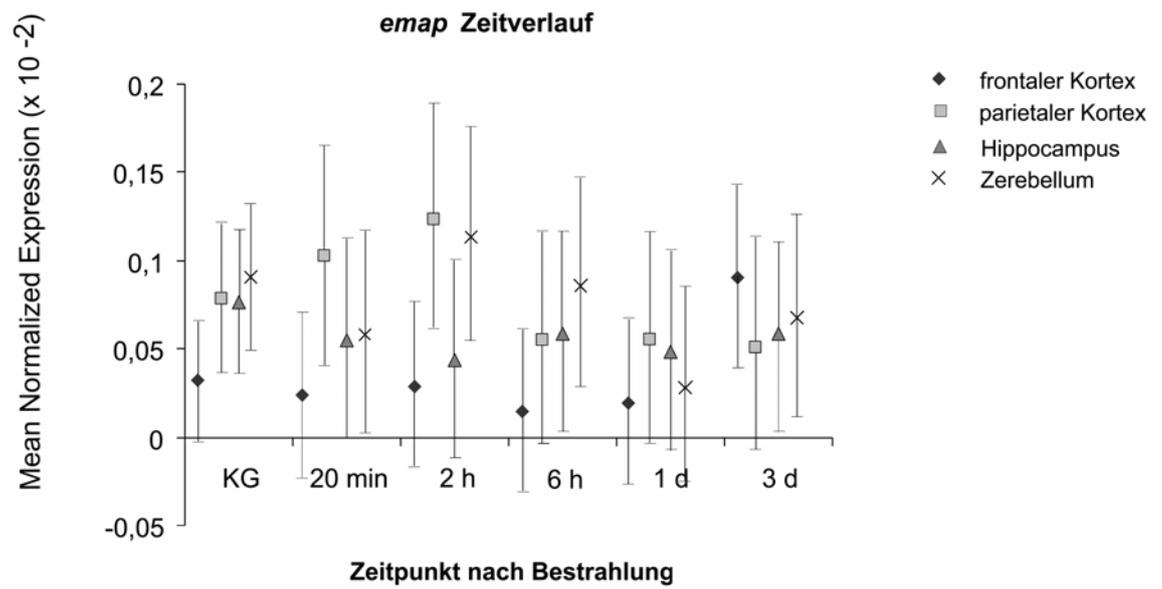


Abbildung 12: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Expressionsänderungen von *emap* in den untersuchten Hirnarealen

Zu keinem Zeitpunkten und in keinem untersuchten Hirnareal ist die *emap* Expression signifikant verändert.

5. Diskussion

5.1 Darstellung des immunhistochemischen Gegenparts zu dieser Arbeit und Beurteilung in Bezug auf Ergebnisse der Molekularbiologie

Zur Beobachtung von Ereignissen auf Protein-Ebene wurden verschiedene Antikörper eingesetzt. Entsprechend der Fragestellung wurden folgende primäre Antikörper eingesetzt: gegen Egr-1 polyklonale anti-Egr-1-Antikörper aus dem Hasen gegen den Carboxyterminus des Egr-1-Proteins und gegen Makrophagen beziehungsweise Mikroglia monoklonale anti-Ratten-CD68-Antikörper aus der Maus.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Basale Expression von Egr-1

In Neuronen: Vorkommen vor allem nukleär, in geringerem Ausmaß auch zytoplasmatisch. Am stärksten ausgeprägt im frontalen Kortex (50 % aller Zellen Egr-1⁺)

In glialen Zellen: Verteilungsmuster hier in erster Linie zytoplasmatisch, bevorzugt im Corpus callosum und im frontalen Kortex (24 bzw. 20 % aller glialen Zellen). Vereinzelt auch nukleäre Anfärbungen (parietaler Cortex, Corpus callosum). In beiden subzellulären Lokalisationen ist das Vorkommen von Egr-1 in glialen Zellen jedoch nicht signifikant. Insgesamt ist das Vorkommen von Egr-1 in unbehandelten glialen Zellen geringer als in unbehandelten Neuronen.

Die in den PCR-Versuchen gefundene Verteilung der basalen Expression von *egr1-sv* stimmt im Wesentlichen überein mit dem immunhistochemisch gefundenen Verteilungsmuster von nukleärem Egr-1 in Neuronen mit einer höchsten

Konzentration von *egr1-sv* bzw. nukleärem neuronalem Egr-1 im parietalen Kortex, gefolgt vom Hippocampus, dem frontalen Kortex und dem Kleinhirn.

Basale Expression CD68

In seiner Eigenschaft als Oberflächenantigen von Makrophagen bzw. Mikroglia diene uns CD68 als Marker zur Auswertung von Veränderungen in der mikroglialen Population des ZNS. Es wurde unterschieden zwischen einer perivaskulären und parenchymalen Lokalisation CD68-positiver Zellen auf der einen Seite und einer ramifizierten bzw. amoeboiden Morphologie der angefärbten Zellen auf der anderen Seite. In unbehandelten Tieren war die Verteilung wie folgt:

CD86⁺ Zellen sind in erster Linie perivaskulär lokalisiert und dies vor allem im Hilus des Hippocampus, der Region um die Seitenventrikel, dem parietalen Kortex und Hippocampus. Eine parenchymale Immunoreaktivität ist seltener. Das Aussehen der positiv gefärbten Zellen ist überwiegend ramifiziert.

Bis auf die Tatsache, dass die höchste *emap* Expression molekularbiologisch im Kleinhirn gefunden wird, stimmen auch hier die Ergebnisse der Immunhistochemie und der PCR weitgehend überein.

Effekte durch Bestrahlung

Signifikante Alterationen der Egr-1 Expression infolge von Bestrahlung konnten weniger in Neuronen, dafür jedoch deutlich in glialen Zellen nachgewiesen werden. In vielen Regionen zeigt sich ein signifikanter Anstieg insbesondere der zytoplasmatischen Egr-1 Anfärbung.

In den *Kortexarealen* steigt die zytoplasmatische Egr-1-Expression in Glia signifikant an, wobei sich dieser Effekt auf der Zeitskala den 6h- und 1d-Gruppen zuordnen lässt. Molekularbiologisch findet sich eher eine Abnahme von *egr1-lv* und *egr1-sv*, wobei beide Effekte zwar nicht signifikant sind, die geringsten Expressionen jedoch gemittelt über beide Kortexareale für *egr1-lv* nach 2h und für *egr1-sv* zwischen 6h und 1d auftreten. Hier könnte die Theorie greifen, dass die Hochregulation von Proteinen nicht zwangsläufig gebunden ist an eine erhöhte Transkriptionsrate und konsekutivem Anstieg von mRNA und Protein, sondern im Gegenteil darauf beruhen

könnte, dass diese Hochregulation von Proteinen durch Zurückgreifen auf einen vorhandenen Pool zytoplasmatischer mRNA und dessen Translation zustande kommt (D. G. Wells *et al.* 2000; G. Aakalu *et al.* 2001). Unsere Ergebnisse würden diese Theorie unterstützen. Auch die signifikanten Rückgänge von *egr1-lv* im frontalen und parietalen Kortex und die signifikante Abnahme der Expression von *egr1-sv* mit maximaler Ausprägung nach 6h ständen in Übereinstimmung hiermit. In der 2h Gruppe nach Bestrahlung findet sich ein signifikanter Anstieg parenchymal anfärbter CD68⁺ - Zellen. Dies wiederum lässt sich molekularbiologisch anhand der *emap* Analyse nicht eruieren.

Hippocampal kann man ebenfalls eine signifikante Zunahme der relativen zytoplasmatischen und nukleären Egr-1 – Anfärbung in Glia feststellen. Die PCR-Ergebnisse zeigen eine von der Tendenz her abnehmende Expression von *egr1-lv* und eine geringfügige Zunahme von *egr1-sv*. Die Zahl CD68⁺ gefärbter Zellen in der Immunhistochemie in der 2h Gruppe signifikant höher als in den Kontrollgruppen, dies betrifft sowohl die totale Anzahl CD68⁺ - Zellen als auch die parenchymal lokalisierten.

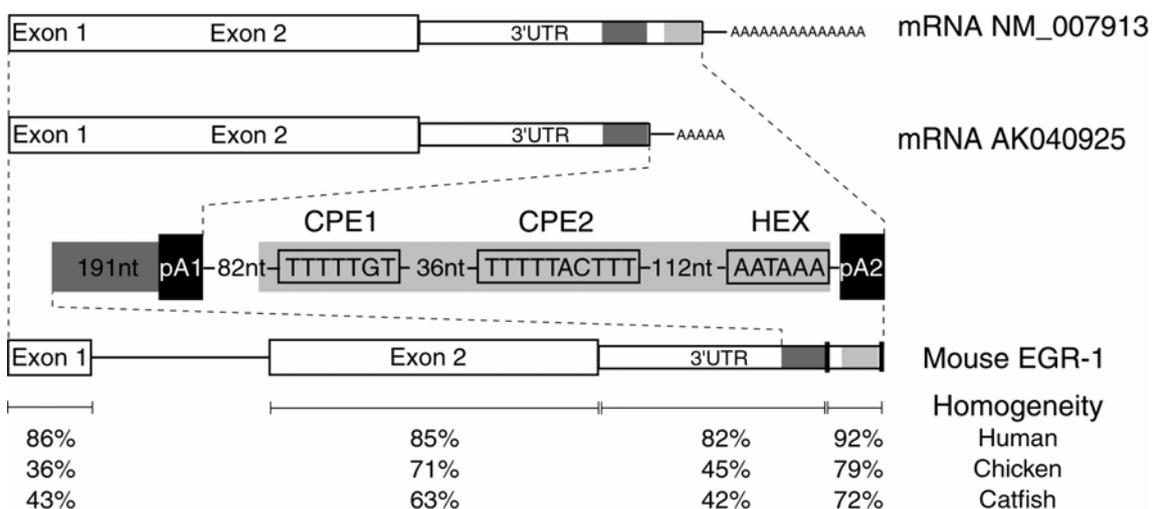
Zerebellar liegt die Egr-1-Immunoreaktivität in Glia zum Zeitpunkt von 2h nukleär signifikant höher als in nichtbestrahlten Tieren. Die PCR-Ergebnisse zeigen hier für *egr1-sv* einen tendenziellen Anstieg. Leider zeigen die Messungsergebnisse von *egr1-sv* gerade im Kleinhirn eine große Varianz so dass nicht mit Bestimmtheit gesagt werden kann, dass hier ein Zusammenhang zwischen immunhistochemisch gefundener erhöhter nukleärer Expression und dem Anstieg der *egr1-sv* besteht. Des weiteren findet sich im Zerebellum eine vermehrte Anfärbung CD68⁺ - Zellen. Dies kann wiederum molekularbiologisch mit *emap* nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass erstaunlicherweise erste Bestrahlungsfolgen zunächst an der Population CD68-exprimierender Zellen beobachtet werden. Ein höherer CD68⁺ Zellgehalt findet sich zeitlich primär zu allen anderen beobachteten Effekten nach 2h mit einem anschließenden Rückgang und einem erneuten Anstieg der CD68-gefärbten Zellen nach 3d. Insbesondere die Zahl parenchymal lokalisierter Mikroglia steigt. Diese Funde können molekularbiologisch durch Analyse der *emap*-Expression jedoch nicht bestätigt werden (siehe auch Abschnitt 5.5).

5.2 Existenz unterschiedlicher mRNA-Varianten von *egr1* in unterschiedlichen Hirnregionen

Wir können molekularbiologisch mit dieser Arbeit zum ersten Mal zeigen, dass unterschiedliche mRNA-Varianten von *egr1*, wie dies in Vorarbeiten in retinalem Gewebe gezeigt werden konnte (P. Simon *et al.* 2004b), auch in anderen Arealen des ZNS existieren.

Abbildung 13 zeigt die unterschiedlichen mRNA Varianten des *egr1*-Gens.



(Abbildung nach Simon, (P. Simon *et al.* 2004b))

Abbildung 13: Darstellung der additionalen Basenpaare am 3' UTR der *egr1-lv* mRNA.

In diesem Abschnitt finden sich unter anderem Cytoplasmatische Polyadenylierungs Elemente, hier als CPE1 und CPE2 dargestellt. Man sieht im Vergleich zwischen Maus, Mensch, Hähnchen und Katzfisch die höhere phylogenetische Konservierung dieses Abschnittes im Vergleich zu den anderen Abschnitten (92% Homogenität zwischen Maus und Mensch im Vergleich zu 86 % bzw. 85 % Homogenität in Exon 1 bzw. 2). Die Homologie dieses Areals überschreitet die des Exons 2, durch welches immerhin solch funktionell wichtige Strukturen wie die Zinkfinger und das NLS kodiert werden.

5.2.1 Egr-1 in Molekularbiologie und Immunhistochemie

Egr-1 kommt im ZNS nukleär und zytoplasmatisch in Neuronen vor, daneben konnten wir aber entgegen Voruntersuchungen (K. Mack *et al.* 1990) auch in glialen Zellen eine Egr-1-Anfärbung feststellen, diese jedoch vor allem zytoplasmatisch. Konträr zu unseren Erwartungen wird die Egr-1 Expression in Neuronen nach Einwirkung ionisierender Strahlung praktisch nicht verändert, sie zeigt jedoch von der Tendenz her sogar eher eine abnehmende Veränderung. Eine auffällige Verbindung besteht hierbei zu der mit PCR gefundenen Expressionsabnahme von *egr1-lv*, die sowohl gemittelt über alle untersuchten Hirnareale zu verzeichnen ist als auch im frontalen und parietalen Kortex. (siehe Abbildung 6A und 7). Glial steigt die Rate insbesondere zytoplasmatisch Egr-1-angefärbter Zellen in Folge der Bestrahlung in den meisten untersuchten Arealen signifikant in einem Zeitrahmen von 6h-1d. Auffälligerweise finden sich zu diesen Zeitpunkten die niedrigsten Expressionslevel von *egr1-sv*, die Expression von *egr1-lv* hat dagegen in allen Arealen ihren Tiefpunkt bereits nach einem Zeitraum von 2h nach Bestrahlung erreicht. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Generierung von Proteinen nicht notwendigerweise einer erhöhten Transkriptionsrate und konsekutiv vermehrter Translation von neu entstandener mRNA bedarf. Vielmehr kann gerade bei „Immediate Early“ Genen eine rasche Produktion von Protein prinzipiell auch aus einem Pool vorhandener residualer mRNA erfolgen. Im Promotor von *egr1* befindet sich zudem eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Egr-1 selbst (A. Gashler, V. P. Sukhatme 1995), so dass man vermuten kann, dass eine Translation von mRNA in Protein die Expressionserhöhung weiter fördert.

Der immunhistochemisch nachweisbare Anstieg von Egr-1 in glialen Zellen ist ein Hinweis darauf, dass die bestrahlungsinduzierten Expressionsveränderungen zelltyp- und stimulusabhängig sein könnten. Gerade die Expressionszunahme in glialen Zellen deutet darauf hin, dass Egr-1 möglicherweise in leukenzephatische Bestrahlungsspätfolgen involviert ist. Wissend, dass Egr-1 zuvor als potenter Induktor apoptotischer Prozesse beschrieben wurde lässt sich auch eine Verbindung zu einer erhöhten apoptotischen Aktivität ziehen.

Insgesamt zeigt sich jedoch auch für die *egr1-sv* mRNA gemittelt über alle Hirnareale eine eher steigende Entwicklung der Expressionsraten nach Bestrahlung. Immunhistochemisch lässt sich dieser Anstieg nur in Gliazellen, nicht jedoch in Neuronen nachweisen. Dies könnte begründen, warum sich mit der PCR nur eine Tendenz feststellen lässt. Bemerkenswerterweise lassen sich auch dort, und insbesondere dort, wo in der Immunhistochemie signifikant höhere Anfärbungs-Raten für Egr-1 nukleär in Glia nachgewiesen werden, molekularbiologisch ansteigende Expressionsraten für *egr1-sv* eruieren (Hippocampus und Kleinhirn, Abbildung 9), die sich jedoch nur tendenziell darstellen. Ursache hierfür könnte eine Maskierung der Ereignisse in spezifischen Zellen durch methodisch bedingte Unzulänglichkeiten der PCR im Sinne einer Analyse eines Gemisches verschiedener Zelltypen sein (J. Chelly *et al.* 1989).

5.2.2 Bestrahlung induziert Abnahme der Expression von *egr1-lv*

Frontaler und parietaler Kortex gehören zu den Hirnarealen mit der höchsten sowohl molekularbiologisch als auch immunhistochemisch gefundenen basalen Expression von *egr1-lv* und *egr1-sv* bzw. Egr-1. Zudem konnte gezeigt werden, dass die basale Egr-1-Expression in diesen Arealen in Neuronen wesentlich höher ist als in Glia (Egr-1⁺ Neurone im parietalen Kortex: 50% aller Neurone, Egr-1⁺ Glia im parietalen Kortex: 17% aller Glia). Signifikant niedrigere *egr1-lv* Niveaus nach Bestrahlung in gerade diesen Arealen mit hoher Differenz der Egr-1 Expression zwischen Neuronen und Glia legen eine Abnahme der *egr1-lv* Expression vor allem neuronal nahe, da glial immunhistochemisch sogar ein Anstieg der Egr-1-Anfärbung zu verzeichnen ist. Aufgrund des methodischen Nachteils der PCR Methode, die immer nur einen Gesamt-Zellpool untersucht sowie des hohen neuronalen Egr-1 Ausgangsniveaus und der vergleichsweise geringen basalen Expression in Glia resultiert aus tendenziell abnehmenden Expressionraten in Neuronen und der signifikant höheren Expression von Egr-1 in Glia dennoch ein molekularbiologischer *egr1-lv* und zumindest teilweise auch ein *egr1-sv* Rückgang. In Anbetracht der Tatsache, dass die lange Variante der *egr1*-mRNA im Bereich ihrer zusätzlichen Basenpaare differenziell regulierte Polyadenylierungs-Areale enthält, die durch Aktivierung des NMDA-Rezeptor

vermehrt exprimiert werden, könnte man *egr1-lv* als eine Art Marker für neuronale Aktivität bezeichnen. Der bestrahlungsinduzierte Rückgang der *egr1-lv* Expression in Neuronen ließe sich sodann interpretieren als ein Übergang der Neurone in einen reduzierten Aktivitätszustand. Dies würde beispielsweise einen durchaus plausiblen und naheliegenden Mechanismus zum Schutz der Neurone vor ROIs darstellen, die im Rahmen von Bestrahlungsvorgängen entstehen.

Die kurze Variante dagegen ist vermutlich in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktor nukleär beteiligt an der Regulation der durch die ionisierende Strahlung induzierten molekularen Antwortmechanismen. Da man mit PCR lediglich einen „Zell-Gemisch“, das heißt einen Pool aus sämtlichen vorhandenen Zellen, beurteilen kann, fallen diese Bewegungen im Expressionsniveau möglicherweise nur als Tendenzen auf, weil immunhistochemisch korrespondierend ausschließlich in glialen Zellen - nicht jedoch in Neuronen - Veränderungen nachgewiesen werden konnten.

Erstmals außerhalb der Netzhaut konnte nachgewiesen werden, dass beide *egr1* Varianten offenbar stimulusabhängig differenziell reguliert werden. Prinzipiell kann man davon ausgehen, dass erniedrigte Expressionswerte der langen Version für eine erniedrigte neuronale Aktivität sprechen.

5.3 Frühe Aktivierung von Mikroglia

Die frühe Anstieg CD68 positiver Zellen tritt vor allen anderen beobachteten Veränderungen ein und deutet insgesamt auf eine entscheidende Rolle mikroglialer Zellen in der Einleitung und Vermittlung genereller inflammatorischer Effekte nach Einwirkung toxischer Strahlung. Wir finden eine vermehrte Expression schon nach 2h, gefolgt von einem relativ raschen Rückgang und einem erneuten Anstieg in einigen Arealen nach 3d. Die Anfärbung parenchymaler Zellen steigt um das neunfache, und die Relation von perivaskulären zu parenchymalen CD68⁺Zellen fällt bei erhöhter Gesamtzahl gefärbter Zellen. Die Morphologie dieser Zellen ist überwiegend ramifiziert, was phänotypisch laut Kreutzberg et al. am ehesten einer frühen Aktivierung mikroglialer Zellen entspricht. Insgesamt unterstreichen unsere Beobachtungen die initiale Schlüsselfunktion der CD68⁺ Zellen als „Sensoren für pathologische Ereignisse im ZNS“ (G. W. Kreutzberg 1996) und als möglichen

zellulären Aktivierungsfaktor weiterer Schlüssel molekule im Rahmen toxischer Ereignisse im ZNS. Höhere Expressionsraten zum Zeitpunkt von 3d sind möglicherweise Ursache von oder Antwort auf weitere histologische Veränderungen wie beispielsweise glialem Zelltod. Dieser könnte Folge der veränderten zytoplasmatischen Egr-1 Expression in Glia sein, die man nach 6h bis 1d nach Bestrahlung feststellen kann. Über die Folgen dieses Anstiegs kann nur spekuliert werden. Zum einen könnte Egr-1 auch hier als potentieller Aktivitätsmarker eine höheres Aktivitätsniveau glialer Zellen anzeigen im Sinne einer erhöhten apoptotischen Aktivität bei reaktiven leukenzephalopathischen Vorgängen, die als Langzeitfolgen von kranialer Bestrahlung bereits durch Surma-aho und andere beschrieben wurden und die im Zusammenhang stehen mit dem Verlust kognitiver Fähigkeiten (O. Surma-aho *et al.* 2001). Kurita *et al.* zeigten, dass in Oligodendrozyten maximale Apoptoseraten zu einem Zeitpunkt von 8h nach Einwirkung ionisierender Strahlung bestehen (H. Kurita *et al.* 2001). Da Egr-1 als potenter Induktor von Apoptose (A. Das *et al.* 2001; P. Nair *et al.* 1997) bereits beschrieben ist, könnte zu der Beobachtung, dass Egr-1 in Glia nach Bestrahlung ansteigt, ein durchaus plausibler Zusammenhang bestehen. Diese immunhistochemisch beobachteten glialen Veränderungen der Egr-1 Expression können mit der PCR nicht bestätigt werden. Dies führen wir zurück auf eine Maskierung durch gegenläufige Tendenzen in der Egr-1 bzw. *egr1* Expression in Neuronen. Der zweite nach einer Latenz von etwa drei Tagen nach Bestrahlung beobachtete Anstieg CD68⁺ Zellen erfolgt möglicherweise in Reaktion auf die erhöhte Anzahl apoptotischer Glia. Molekularbiologisch können wir leider auch die frühe mikrogliale Aktivierung nicht bestätigen (siehe dazu auch: Abschnitt 5.5 der Diskussion). Um weitere Erkenntnisse über die mögliche Ursache der zweiten Phase mikroglialer Aktivierung zu erhalten, sollte man in weiteren Versuchen eine TUNEL-Färbung zur Darstellung apoptotischer Zellen durchführen.

5.4 Beurteilung der real time PCR – Methode

Seit der Einführung der PCR 1986 (K. Mullis *et al.* 1986) hat sich diese Methode weitläufig etabliert als eine extrem sensitive Methode, die eine Analyse der

Genexpression kleinster Mengen RNA ermöglicht. Vorteile dieser Methode sind die enorme Sensitivität, die rasche Durchführbarkeit der PCR selber, die Möglichkeit zur Analyse einer großen Proben-Anzahl und mehrerer Gene innerhalb einer Probe. Ein dadurch verbessertes Maß an Flexibilität hat zur weiten Verbreitung dieser Methode sowohl in der Forschung als auch im klinischen Alltag geführt (S. A. Bustin 2000). Eine weitere Verbesserung erfuhr die Methode durch das Aufkommen der real time PCR 1996, bei der durch Zusammenlegung von Amplifikations- und Detektionsschritt die Kontaminationsgefahr minimiert wird (C. A. Heid *et al.* 1996; W. M. Freeman *et al.* 1999). Nichtsdestotrotz birgt auch die real time PCR die Gefahr der Amplifikation von Fehlern, die sich im Rahmen der zahlreichen Schritten von Gewebe-Präparation über Reverse Transkription bis zur Auswertung einschleichen können. Bustin zeigte 2002 eine relativ erhebliche Varianz von innerhalb eines Labors durch ein und dieselbe Person durchgeführten PCR-Reaktionen (S. A. Bustin 2002). Er plädierte für die Einführung von Robotern, wenn Reproduzierbarkeit und inter-institutionelle Vergleichbarkeit gewährleistet sein soll.

Die Analyse der Varianzen unserer MNE zeigt mit Vorversuchen vergleichbare Ergebnisse, wobei sie CV_MNE im Bereich von 15.14 – 24.91 % liegen bzw. die Rohdaten eine Varianz zwischen 0.54 – 1.04 % (CV_raw data) aufweisen. Die Angaben zu den Variationskoeffizienten vergleichbarer Methoden wie zum Beispiel Northern Blot, in-situ-Hybridisierung oder GeneChips weisen in verschiedenen Literaturquellen zum Teil erhebliche Schwankungen auf, liegen aber ungefähr im Bereich von ~ CV: 3% für Northern Blots, ~ CV: 10 % für in situ Hybridisierung, ~ CV: 25 % für GeneChips und ~CV: 16-28 % für cDNA Microarray-Versuche.

Den RT-Schritt betreffend beschreibt Bustin 2004 (Bustin und Nolan, 2004), dass die RNA-zu-cDNA Konversion zum einen von dem eingesetzten Enzym abhängt, des weiteren wird die Konversions-Effizienz von der Menge an Ausgangsmaterial beeinflusst, wobei die Effizienz abnimmt je weniger Ziel-Templates vorliegen. Der "Monte Carlo"-Effekt beschreibt die Tatsache, dass ein geringeres Vorhandensein von Template dazu führt, dass die Wahrscheinlichkeit eines Primer-Annealing im RT-Schritt sinkt. Da viele Experimente gerade der Identifizierung sehr geringer Mengen mRNA dienen, stellt dies ein schwer zu lösendes Problem dar. Um diese Fehlerquelle jedoch zu minimieren, wurden unsere Proben zum einen in Form von Tripletts

untersucht und des weiteren führt laut Bustin auch – wie es in unseren Experimenten erfolgte - der Einsatz mRNA im RT-Schritt statt „total RNA“ trotz aufwendigerer vorangehender Präparation zu besseren Resultaten.

Einen ganz erheblichen Nachteil, der auch in dieser Arbeit Auswirkungen zeigt, stellt die Tatsache dar, dass PCR-Reaktionen häufig lediglich mit Gewebebiopsien ohne Rücksicht auf verschiedene spezifische Zelltypen innerhalb dieses Gewebes durchgeführt werden. Dies führt unweigerlich zu einer Mittelung der Expressionswerte unterschiedlicher Typen von Zellen. Expressionsprofile innerhalb spezifischer Zelltypen könnten dadurch maskiert werden (J. Chelly *et al.* 1989). Den immunhistochemisch ermittelten klaren Veränderungen der Proteinexpression konnte so zum Beispiel häufig kein klares molekularbiologisches Korrelat zugewiesen werden. Ursächlich hierfür sind vermutlich die bisweilen gegenläufigen Veränderungen in Neuronen und Glia, die sich mit Hilfe der PCR nicht darstellen, weil sich diese Trends in Neuronen und Glia aufheben.

Zur weiteren Verbesserung der real time PCR Methode empfiehlt sich laut Bustin, eine Standardisierung von PCR- Protokollen sowie Kontrolle und Konsistenz im Gebrauch der Reagenzien einzuführen und neben dem Versuchsaufbau auch die verschiedenen Möglichkeiten der Template-Präparation und Analyse der Ergebnisse gut zu überdenken (S. A. Bustin, T. Nolan 2004).

Für die in dieser Arbeit erfolgte Detektion unterschiedlicher mRNA-Varianten und die Ermittlung der Expressions-Verteilung dieser Varianten in verschiedenen Hirnarealen stellt die real time PCR mit annehmbaren CVs, hoher Spezifität und der Möglichkeit zur einfachen Analyse einer großen Menge an Probenmaterial jedoch sicherlich ein sehr probates Mittel dar, zudem wäre eine immunhistochemische Darstellung hier kaum möglich gewesen.

5.5 Beurteilung der Verwendung von *emap* in der PCR als Marker für mikrogliale Aktivierung

Wir analysierten die *emap* – Expression, um Hinweise auf molekulare Veränderungen in der mikroglialen Subpopulation des ZNS nach Bestrahlung zu erhalten. Weder die Mittelung der Werte für die Expression in allen Arealen noch die Analyse der einzelnen Regionen ergab irgendeinen Hinweis auf Veränderungen des *emap* – Expressionsniveaus. Immunhistochemisch kann dies jedoch nicht belegt werden. CD68 wurde hier als Mikroglia-Marker eingesetzt und die Zahl vor allem parenchymal im ZNS-Gewebe lokalisierter positiv gefärbter Zellen steigt in Folge der Bestrahlungseinwirkung in praktisch allen Arealen zu einem frühen Zeitpunkt signifikant an.

Emap wurde in anderen Arbeiten beschrieben als ein 20 kDA Peptid, welches als proinflammatorisches Zytokin an endotheliale Zellen und Leukozyten (und dementsprechend im ZNS Mikroglia) bindet und diese aktiviert (H. J. Schluesener *et al.* 1997). In Normal-Gewebe aus dem ZNS von Ratten zeigt sich in erster Linie eine EMAP-Immunoreaktivität von perivaskulär lokalisierter Mikroglia, wohingegen parenchymale mikrogliale Zellen keine EMAP-Anfärbung zeigen. Erst in experimentellen Modellen zentralnervöser autoimmuner Erkrankungen (Experimentelle Autoimmune Enzephalopathie, EAE) kann man eine parenchymale Lokalisation EMAP⁺ Mikroglia konstatieren, dies jedoch auch erst ab dem 11.Tag nach Einführung der EAE-Läsion. Zu diesem Zeitpunkt sind die EMAP-exprimierenden Zellen lediglich schwach positiv für MHC II- Antigene und nicht positiv für ED1, einem normalerweise auf phagozytierenden Makrophagen vorhandenen Differenzierungsmarker. Dies beweist laut Schluesener *et al.*, dass EMAP II als eindeutiger Marker für eine frühe mikrogliale Aktivierung verwendet werden kann.

Die Ursachen für die ausbleibenden Veränderungen der *emap*-Expression in der PCR bei gleichzeitigen deutlichen Veränderungen der immunhistochemischen CD68-Immunoreaktivität sind vermutlich in den oben beschriebenen Tatsachen zu suchen. Die Einwirkung ionisierender Strahlung ruft offensichtlich nicht dieselben Effekte

hervor, die nach Induktion einer EAE einen Shift von im Normalzustand lediglich perivaskulär zu einer auch parenchymal zu beobachtenden immunhistochemischen Anfärbbarkeit von EMAP II führen. Trotz deutlichem Anstieg der parenchymalen CD68 Expression nach Bestrahlung bleiben die *emap* Level in der Molekularbiologie unbeeinflusst.

Für weitere Arbeiten mit molekularbiologischer Analyse möglicher mikroglialer Aktivierung nach Bestrahlung sollte man daher von der Verwendung von *emap* absehen und einen geeigneteren Aktivierungsmarker ausfindig machen.

6. Zusammenfassung

Die funktionelle Diversität des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *egr1* wirft vielerlei Fragen auf bezüglich einer möglichen differenziellen sowie zelltyp-abhängigen beziehungsweise in Abhängigkeit zur genauen subzellulären Lokalisation stehenden Regulation von Protein und mRNA-Varianten. Unterschiedliche mRNA Varianten des *egr1* Gens wurden bereits in retinalem Gewebe genauer charakterisiert, und die Entdeckung hochkonservierter zytoplasmatischer Polyadenylierungs – Elemente in den Extra-Basenpaaren der längeren Variante legt eine entscheidende funktionelle Relevanz dieser Struktur nahe. Dieser Umstand könnte hinsichtlich der Entschlüsselung der Ursachen für die teilweise sogar diametral einander gegenüberstehenden unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften von *egr1* von großer Bedeutung sein. Deshalb wurde in dieser molekularbiologisch ausgerichteten Arbeit ein Hauptaugenmerk auf das Verhalten der beiden mRNA unter Bestrahlung in unterschiedlichen Gehirnarealen der Ratte gesetzt.

Wir haben mit dieser Arbeit zum ersten Mal die Existenz zweier unterschiedlicher Varianten der *egr1*-mRNA in anderen Hirnarealen als retinalem Gewebe und deren Verteilung in verschiedenen Hirnarealen nachweisen können. Andere Gruppen konnten zeigen, dass *egr1*-Expression für die Ausbildung von Langzeitpotentialen nach neuronaler Aktivierung essentiell ist. Von den beiden untersuchten mRNA-Varianten kommt am ehesten *egr1-lv* mit seinen in der 3'UTR lokalisierten NMDA-response Elementen für die Vermittlung eines Anstiegs von Egr1 Protein in Frage. Wir konnten jetzt eine bestrahlungsinduzierte Abnahme von *egr1-lv* feststellen, während *egr1-sv* sich nicht signifikant veränderte. Diese Entdeckung bestätigt erstmals außerhalb der Netzhaut, dass beide Varianten stimulusabhängig differentiell reguliert werden und ist prinzipiell mit der Einschätzung vereinbar, dass erniedrigte Werte für *egr1-lv* nach Bestrahlung für eine verminderte neuronale Aktivität sprechen. Neurone vermindern möglicherweise nach Bestrahlung im Sinne eines protektiv

wirkenden Mechanismus ihr Aktivitätsniveau, um vor direkt und indirekt toxischen Bestrahlungsfolgen (beispielsweise durch ROIs) besser geschützt zu sein.

Anscheinend besteht auch auf Proteinebene ein Zusammenhang zwischen Funktion und zellulärer oder auch subzellulärer Lokalisation des Genproduktes von Egr1, da gliale Zellen im Gegensatz zu Neuronen immunhistochemisch einen raschen Anstieg der Egr1 Expression nach Bestrahlung aufweisen und die subzelluläre Lokalisation von Egr-1 ferner zelltyp- und stimulusabhängig zu sein scheint. Die vermehrte Egr-1 Expression gerade in glialen Zellen kann einerseits in Hinblick auf beschriebene leukencephalopathische Bestrahlungs-Spätfolgen sowie andererseits auf Grund von Beschreibungen von Egr1 als potenten Induktor apoptotischer Prozesse auf eine vermehrte apoptotische Aktivierung hindeuten.

In nachfolgenden Arbeiten wäre es interessant, genauer herauszuarbeiten, in wieweit Bestrahlung mit therapeutischen Dosen am Menschen tatsächlich in der Lage ist, das allgemeine neuronale Aktivitätsniveau zu senken. Unter anderem würde man auf der Basis der hier vorgelegten Ergebnisse im Stundenbereich nach Bestrahlung eine messbare Verschlechterung von Reaktionszeiten und kognitiven Leistungen erwarten. Auch ist es wichtig, durch weitere molekularbiologische Untersuchungen zu sichern, inwiefern sich neuronale Aktivität tatsächlich ausschließlich einer der beiden mRNA-Varianten zuschreiben lässt. Auf jeden Fall bieten die Ergebnisse dieser Arbeit Grund zu der Annahme, dass es entscheidend sein kann, bei Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene die differentielle Expression der unterschiedlichen mRNA-Varianten von *egr-1* zu berücksichtigen, und sie gegebenenfalls unterschiedlichen Funktionszusammenhängen zuzuordnen.

7. Literatur

1. Aakalu, G., Smith, W. B., Nguyen, N., Jiang, C., Schuman, E. M. "Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons." *Neuron*, May 2001, 30 (2), 489-502.
2. Abayomi, O. K. "Pathogenesis of irradiation-induced cognitive dysfunction." *Acta Oncol.*, 1996, 35 (6), 659-663.
3. Bustin, S. A. "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J.Mol.Endocrinol.*, October 2000, 25 (2), 169-193.
4. Bustin, S. A. "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *J.Mol.Endocrinol.*, August 2002, 29 (1), 23-39.
5. Bustin, S. A., Nolan, T. "Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction." *J.Biomol.Tech.*, September 2004, 15 (3), 155-166.
6. Calvo, W., Hopewell, J. W., Reinhold, H. S., Yeung, T. K. "Time- and dose-related changes in the white matter of the rat brain after single doses of X rays." *Br.J.Radiol.*, November 1988, 61 (731), 1043-1052.
7. Chelly, J., Concordet, J. P., Kaplan, J. C., Kahn, A. "Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, April 1989, 86 (8), 2617-2621.

8. Christy, B., Nathans, D. "DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, November 1989, 86 (22), 8737-8741.
9. Cohen, ME,|Duncan, A. W. *Brain tumors in children: principles of diagnosis and treatment*. Raven, New York: 1994.
10. Cole, A. J., Saffen, D. W., Baraban, J. M., Worley, P. F. "Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation." *Nature*, August 1989, 340 (6233), 474-476.
11. Crosby, S. D., Puetz, J. J., Simburger, K. S., Fahrner, T. J., Milbrandt, J. "The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family." *Mol.Cell Biol.*, August 1991, 11 (8), 3835-3841.
12. Crossen, J. R., Garwood, D., Glatstein, E., Neuwelt, E. A. "Neurobehavioral sequelae of cranial irradiation in adults: a review of radiation-induced encephalopathy." *J.Clin.Oncol.*, March 1994, 12 (3), 627-642.
13. Das, A., Chendil, D., Dey, S., Mohiuddin, M., Mohiuddin, M., Milbrandt, J., Rangnekar, V. M., Ahmed, M. M. "Ionizing radiation down-regulates p53 protein in primary Egr-1^{-/-} mouse embryonic fibroblast cells causing enhanced resistance to apoptosis." *J.Biol.Chem.*, February 2001, 276 (5), 3279-3286.
14. Datta, R., Rubin, E., Sukhatme, V., Qureshi, S., Hallahan, D., Weichselbaum, R. R., Kufe, D. W. "Ionizing radiation activates transcription of the EGR1 gene via CArG elements." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, November 1992, 89 (21), 10149-10153.
15. Datta, R., Taneja, N., Sukhatme, V. P., Qureshi, S. A., Weichselbaum, R., Kufe, D. W. "Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to

- mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, March 1993, 90 (6), 2419-2422.
16. Day, M. L., Fahrner, T. J., Aykent, S., Milbrandt, J. "The zinc finger protein NGFI-A exists in both nuclear and cytoplasmic forms in nerve growth factor-stimulated PC12 cells." *J.Biol.Chem.*, September 1990, 265 (25), 15253-15260.
 17. Del-Rio Hortega, P. in *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* (Penfield, W., ed.), pp. 481-534. 1932.
 18. Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., Dveksler, G. S. "General concepts for PCR primer design," *PCR Methods Appl.* 1993, 30-37.
 19. Dorn, C., Ou, Q., Svaren, J., Crawford, P. A., Sadovsky, Y. "Activation of luteinizing hormone beta gene by gonadotropin-releasing hormone requires the synergy of early growth response-1 and steroidogenic factor-1." *J.Biol.Chem.*, May 1999, 274 (20), 13870-13876.
 20. Fischer, A. J., McGuire, J. J., Schaeffel, F., Stell, W. K. "Light- and focus-dependent expression of the transcription factor ZENK in the chick retina." *Nat.Neurosci.*, August 1999, 2 (8), 706-712.
 21. Freeman, W. M., Walker, S. J., Vrana, K. E. "Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential." *Biotechniques*, January 1999, 26 (1), 112-115.
 22. Gashler, A., Sukhatme, V. P. "Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors." *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.*, 1995, 50 191-224.
 23. Hallahan, D. E., Dunphy, E., Virudachalam, S., Sukhatme, V. P., Kufe, D. W., Weichselbaum, R. R. "C-jun and Egr-1 participate in DNA synthesis and cell

- survival in response to ionizing radiation exposure." *J.Biol.Chem.*, December 1995, 270 (51), 30303-30309.
24. Hallahan, D. E., Sukhatme, V. P., Sherman, M. L., Virudachalam, S., Kufe, D., Weichselbaum, R. R. "Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, March 1991, 88 (6), 2156-2160.
25. Heffner, T. G., Hartman, J. A., Seiden, L. S. "A rapid method for the regional dissection of the rat brain." *Pharmacol.Biochem.Behav.*, September 1980, 13 (3), 453-456.
26. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. "Real time quantitative PCR." *Genome Res.*, October 1996, 6 (10), 986-994.
27. Hodges, H., Katzung, N., Sowinski, P., Hopewell, J. W., Wilkinson, J. H., Bywaters, T., Rezvani, M. "Late behavioural and neuropathological effects of local brain irradiation in the rat." *Behav.Brain Res.*, March 1998, 91 (1-2), 99-114.
28. Hong, J. H., Chiang, C. S., Campbell, I. L., Sun, J. R., Withers, H. R., McBride, W. H. "Induction of acute phase gene expression by brain irradiation." *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, October 1995, 33 (3), 619-626.
29. Huang, R. P., Fan, Y., deBelle, I., Ni, Z., Matheny, W., Adamson, E. D. "Egr-1 inhibits apoptosis during the UV response: correlation of cell survival with Egr-1 phosphorylation." *Cell Death.Differ.*, January 1998, 5 (1), 96-106.
30. Hughes, P., Lawlor, P., Dragunow, M. "Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus." *Brain Res.Mol.Brain Res.*, May 1992, 13 (4), 355-357.

31. Jones, M. W., Errington, M. L., French, P. J., Fine, A., Bliss, T. V., Garel, S., Charnay, P., Bozon, B., Laroche, S., Davis, S. "A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories." *Nat.Neurosci.*, March 2001, 4 (3), 289-296.
32. Keyse, S. M. "The induction of gene expression in mammalian cells by radiation." *Semin.Cancer Biol.*, April 1993, 4 (2), 119-128.
33. Knight, C., Slade, J. P., Carter, D. "The nuclear, 75 kDa form of early growth response protein-1/nerve growth factor-induced A protein is primarily restricted to LH beta-subunit-expressing cells in rat anterior pituitary." *Eur.J.Endocrinol.*, December 2000, 143 (6), 817-821.
34. Kreutzberg, G. W. "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." *Trends Neurosci.*, August 1996, 19 (8), 312-318.
35. Kurita, H., Kawahara, N., Asai, A., Ueki, K., Shin, M., Kirino, T. "Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in the adult rat brain." *Neurol.Res.*, December 2001, 23 (8), 869-874.
36. Langosch, J. M., Gebicke-Haerter, P. J., Norenberg, W., Illes, P. "Characterization and transduction mechanisms of purinoceptors in activated rat microglia." *Br.J.Pharmacol.*, September 1994, 113 (1), 29-34.
37. Lee, P. W., Hung, B. K., Woo, E. K., Tai, P. T., Choi, D. T. "Effects of radiation therapy on neuropsychological functioning in patients with nasopharyngeal carcinoma." *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry*, April 1989, 52 (4), 488-492.
38. Lee, S. L., Sadovsky, Y., Swirnoff, A. H., Polish, J. A., Goda, P., Gavrulina, G., Milbrandt, J. "Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1)." *Science*, August 1996, 273 (5279), 1219-1221.

39. Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S., Goldberg, M. A. "Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia." *J.Biol.Chem.*, June 1995, 270 (22), 13333-13340.
40. Mack, K., Day, M., Milbrandt, J., Gottlieb, D. I. "Localization of the NGFI-A protein in the rat brain." *Brain Res.Mol.Brain Res.*, July 1990, 8 (2), 177-180.
41. Madden, S. L., Rauscher, F. J., III. "Positive and negative regulation of transcription and cell growth mediated by the EGR family of zinc-finger gene products." *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, June 1993, 684 75-84.
42. Malkani, S., Rosen, J. B. "N-Methyl-D-aspartate receptor antagonism blocks contextual fear conditioning and differentially regulates early growth response-1 messenger RNA expression in the amygdala: implications for a functional amygdaloid circuit of fear." *Neuroscience*, 2001, 102 (4), 853-861.
43. Marks, J. E., Baglan, R. J., Prasad, S. C., Blank, W. F. "Cerebral radionecrosis: incidence and risk in relation to dose, time, fractionation and volume." *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, February 1981, 7 (2), 243-252.
44. Matheny, C., Day, M. L., Milbrandt, J. "The nuclear localization signal of NGFI-A is located within the zinc finger DNA binding domain." *J.Biol.Chem.*, March 1994, 269 (11), 8176-8181.
45. Mercier, G., Turque, N., Schumacher, M. "Rapid effects of triiodothyronine on immediate-early gene expression in Schwann cells." *Glia*, August 2001, 35 (2), 81-89.
46. Meyer, R. G., Kupper, J. H., Kandolf, R., Rodemann, H. P. "Early growth response-1 gene (Egr-1) promoter induction by ionizing radiation in U87 malignant glioma cells in vitro." *Eur.J.Biochem.*, January 2002, 269 (1), 337-346.

47. Milbrandt, J. "A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor." *Science*, November 1987, 238 (4828), 797-799.
48. Miyamoto, S., Chiorini, J. A., Urcelay, E., Safer, B. "Regulation of gene expression for translation initiation factor eIF-2 alpha: importance of the 3' untranslated region." *Biochem.J.*, May 1996, 315 (Pt 3) 791-798.
49. Monje, M. L., Mizumatsu, S., Fike, J. R., Palmer, T. D. "Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction." *Nat.Med.*, September 2002, 8 (9), 955-962.
50. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 1986, 51 Pt 1 263-273.
51. Nair, P., Muthukkumar, S., Sells, S. F., Han, S. S., Sukhatme, V. P., Rangnekar, V. M. "Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53." *J.Biol.Chem.*, August 1997, 272 (32), 20131-20138.
52. Nakagama, H., Heinrich, G., Pelletier, J., Housman, D. E. "Sequence and structural requirements for high-affinity DNA binding by the WT1 gene product." *Mol.Cell Biol.*, March 1995, 15 (3), 1489-1498.
53. Packer, R. J., Bleyer, W. A., Pochedly, C. "Pediatric neurooncology: new trends in clinical research," Lanzkowsky, P., *Monographs in Clinical Pediatrics*. Paris, Philadelphia, Tokyo, Melbourne: 1992.
54. Peissner, W., Kocher, M., Treuer, H., Gillardon, F. "Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus." *Brain Res.Mol.Brain Res.*, July 1999, 71 (1), 61-68.
55. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L. "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative

- expression results in real-time PCR." *Nucleic Acids Res.*, May 2002, *30* (9), e36.
56. Pines, A., Romanello, M., Cesaratto, L., Damante, G., Moro, L., D'andrea, P., Tell, G. "Extracellular ATP stimulates the early growth response protein 1 (Egr-1) via a protein kinase C-dependent pathway in the human osteoblastic HOBIT cell line." *Biochem.J.*, August 2003, *373* (Pt 3), 815-824.
57. Priller, J., Haas, C. A., Reddington, M., Kreutzberg, G. W. "Calcitonin gene-related peptide and ATP induce immediate early gene expression in cultured rat microglial cells." *Glia*, December 1995, *15* (4), 447-457.
58. Rasumssen, R. "Quantification on the LightCycler," Meurer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K., *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Heidelberg: Springer Press, 2001, 21-34.
59. Rauscher, F. J., III, Morris, J. F., Tournay, O. E., Cook, D. M., Curran, T. "Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence." *Science*, November 1990, *250* (4985), 1259-1262.
60. Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Wittwer, C. T. "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." *Anal.Biochem.*, February 1997, *245* (2), 154-160.
61. Roman, D. D., Sperduto, P. W. "Neuropsychological effects of cranial radiation: current knowledge and future directions." *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, February 1995, *31* (4), 983-998.
62. Rozen, S., Skaletsky, H. "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." *Methods Mol.Biol.*, 2000, *132* 365-386.
63. Santiago, F. S., Lowe, H. C., Day, F. L., Chesterman, C. N., Khachigian, L. M. "Early growth response factor-1 induction by injury is triggered by release and

- paracrine activation by fibroblast growth factor-2." *Am.J.Pathol.*, March 1999, 154 (3), 937-944.
64. Schluesener, H. J., Seid, K., Zhao, Y., Meyermann, R. "Localization of endothelial-monocyte-activating polypeptide II (EMAP II), a novel proinflammatory cytokine, to lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis and uveitis: expression by monocytes and activated microglial cells." *Glia*, August 1997, 20 (4), 365-372.
65. Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., Zeillinger, R. "Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain." *PCR Methods Appl.*, February 1995, 4 (4), 234-238.
66. Schwachtgen, J. L., Campbell, C. J., Braddock, M. "Full promoter sequence of human early growth response factor-1 (Egr-1): demonstration of a fifth functional serum response element." *DNA Seq.*, 2000, 10 (6), 429-432.
67. Sells, S. F., Muthukumar, S., Sukhatme, V. P., Crist, S. A., Rangnekar, V. M. "The zinc finger transcription factor EGR-1 impedes interleukin-1- inducible tumor growth arrest." *Mol.Cell Biol.*, February 1995, 15 (2), 682-692.
68. Seyfert, V. L., McMahon, S. B., Glenn, W. D., Yellen, A. J., Sukhatme, V. P., Cao, X. M., Monroe, J. G. "Methylation of an immediate-early inducible gene as a mechanism for B cell tolerance induction." *Science*, November 1990, 250 (4982), 797-800.
69. Sharrocks, A. D. "The design of primers for PCR," Griffin, H. G., Griffin, A. M., *PCR Technology: Current Innovations*. Boca Raton: CPR Press, 1994, 5-11.
70. Sheline, G. E., Wara, W. M., Smith, V. "Therapeutic irradiation and brain injury." *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, September 1980, 6 (9), 1215-1228.

71. Simon, P. "Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data." *Bioinformatics.*, July 2003, *19* (11), 1439-1440.
72. Simon, P., Feldkaemper, M., Bitzer, M., Ohngemach, S., Schaeffel, F. "Early transcriptional changes of retinal and choroidal TGFbeta-2, RALDH-2, and ZENK following imposed positive and negative defocus in chickens." *Mol.Vis.*, August 2004a, *10* 588-597.
73. Simon, P., Schott, K., Williams, R. W., Schaeffel, F. "Posttranscriptional regulation of the immediate-early gene EGR1 by light in the mouse retina." *Eur.J.Neurosci.*, December 2004b, *20* (12), 3371-3377.
74. Snyder, J. S., Kee, N., Wojtowicz, J. M. "Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus." *J.Neurophysiol.*, June 2001, *85* (6), 2423-2431.
75. Strother, D. R., et al. "Tumors of the central nervous system," Pizzo, P. A. & Poplack D. G., *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Philadelphia, Pennsylvania: Lipincott Williams and Wilkins, 2002, 751-824.
76. Sugimoto, N., Nakano, S., Yoneyama, M., Honda, K. "Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes." *Nucleic Acids Res.*, November 1996, *24* (22), 4501-4505.
77. Sukhatme, V. P. "Early transcriptional events in cell growth: the Egr family." *J.Am.Soc.Nephrol.*, December 1990, *1* (6), 859-866.
78. Sukhatme, V. P., Cao, X. M., Chang, L. C., Tsai-Morris, C. H., Stamenkovich, D., Ferreira, P. C., Cohen, D. R., Edwards, S. A., Shows, T. B., Curran, T. *et al.* "A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization." *Cell*, April 1988, *53* (1), 37-43.

79. Surma-aho, O., Niemela, M., Vilkki, J., Kouri, M., Brander, A., Salonen, O., Paetau, A., Kallio, M., Pyykkonen, J., Jaaskelainen, J. "Adverse long-term effects of brain radiotherapy in adult low-grade glioma patients." *Neurology*, May 2001, 56 (10), 1285-1290.
80. Tada, E., Parent, J. M., Lowenstein, D. H., Fike, J. R. "X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats." *Neuroscience*, 2000, 99 (1), 33-41.
81. Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Trembleau, A., Gourdj, D., Driancourt, M. A., Rao, C. V., Charnay, P. "Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice." *Mol.Endocrinol.*, January 1998, 12 (1), 107-122.
82. Tourtellotte, W. G., Nagarajan, R., Bartke, A., Milbrandt, J. "Functional compensation by Egr4 in Egr1-dependent luteinizing hormone regulation and Leydig cell steroidogenesis." *Mol.Cell Biol.*, July 2000, 20 (14), 5261-5268.
83. Virolle, T., Adamson, E. D., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., Mustelin, T., de Belle, I. "The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling." *Nat.Cell Biol.*, December 2001, 3 (12), 1124-1128.
84. Walz, W., Ilschner, S., Ohlemeyer, C., Banati, R., Kettenmann, H. "Extracellular ATP activates a cation conductance and a K⁺ conductance in cultured microglial cells from mouse brain." *J.Neurosci.*, October 1993, 13 (10), 4403-4411.
85. Waters, C. M., Hancock, D. C., Evan, G. I. "Identification and characterisation of the egr-1 gene product as an inducible, short-lived, nuclear phosphoprotein." *Oncogene*, May 1990, 5 (5), 669-674.

86. Wei, F., Xu, Z. C., Qu, Z., Milbrandt, J., Zhuo, M. "Role of EGR1 in hippocampal synaptic enhancement induced by tetanic stimulation and amputation." *J.Cell Biol.*, June 2000, *149* (7), 1325-1334.
87. Wells, D. G., Dong, X., Quinlan, E. M., Huang, Y. S., Bear, M. F., Richter, J. D., Fallon, J. R. "A role for the cytoplasmic polyadenylation element in NMDA receptor- regulated mRNA translation in neurons." *J.Neurosci.*, December 2001, *21* (24), 9541-9548.
88. Wells, D. G., Richter, J. D., Fallon, J. R. "Molecular mechanisms for activity-regulated protein synthesis in the synapto-dendritic compartment." *Curr.Opin.Neurobiol.*, February 2000, *10* (1), 132-137.
89. Whittemore, E. R., Korotzer, A. R., Etebari, A., Cotman, C. W. "Carbachol increases intracellular free calcium in cultured rat microglia." *Brain Res.*, September 1993, *621* (1), 59-64.
90. Woloschak, G. E., Chang-Liu, C. M., Shearin-Jones, P. "Regulation of protein kinase C by ionizing radiation." *Cancer Res.*, July 1990, *50* (13), 3963-3967.
91. Wu, L., Wells, D., Tay, J., Mendis, D., Abbott, M. A., Barnitt, A., Quinlan, E., Heynen, A., Fallon, J. R., Richter, J. D. "CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses." *Neuron*, November 1998, *21* (5), 1129-1139.
92. Yan, S. F., Fujita, T., Lu, J., Okada, K., Shan-Zou, Y., Mackman, N., Pinsky, D. J., Stern, D. M. "Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress." *Nat.Med.*, December 2000, *6* (12), 1355-1361.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Meyermann danke für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung dieser Arbeit.

Bei meinem Betreuer Dr.med. Dr.rer.nat Perikles Simon möchte ich mich vielmals und recht herzlich für seine exzellente Betreuung, seine Anleitung und seinen Rat und Unterstützung und Hilfe bedanken. Ich bin ihm sehr dankbar, dass er stets das Gefühl zu vermitteln wusste, dass der Weg nicht so lang ist!

Vielmals danke ich auch Henning Vollmann, meinem Mitstreiter bei diesem Projekt. Ohne ihn hätte ich noch viel häufiger den Kopf in den Sand stecken mögen! Seine Nachfragen und sein Ansporn ließen mir keine Ruhe (Dankeschön!), und ich bin froh, dass ich diese Arbeit mit ihm durchführen durfte!

Herrn PD Dr. Wick danke ich für Hilfe mit den Tieren.

Katrin Trautmann, Wilma Ott und dem Rest des „Hifo-Teams“ danke ich für ihre Unterstützung. Insbesondere Katrin hat mir manchen trüben Labortag etwas unterhaltsamer gemacht und mir vielfach bei mühsamen Recherchen hilfreich unter die Arme gegriffen.

Der Arbeitsgruppe Wendel der Herz-Gefäß-Thorax-Chirurgie danke ich dafür, dass sie mich ihr PCR-Gerät benutzen ließen.

PD Dr. Vonthein danke ich für seine engagierten statistischen Hinweise.

Dank gilt auch Katrin Renner für ihren Rat beim Erstellen der Graphiken.

Meinem Onkel Dr. Henne danke ich für das Korrekturlesen und seine Anregungen.

Gar nicht genug danken kann ich meinen Eltern - meinem Vater auch für seine Rechtschreibkenntnisse -, Julia und Christoph - für alles -. (Christoph auch dafür, dass er unter anderem ein Computerheld ist.)

Lebenslaufpersönliches

geboren: 20.02.1980
Geburtsort Berlin

Schulausbildung

Grundschule Löcknitz-Grundschule, Berlin Schöneberg
Gymnasium Beethoven-Gymnasium, Berlin Steglitz,
Abitur 1999

Studium

Universität Greifswald ab WS 1999
Physikum: Herbst 2001
1.Staatsexamen: Herbst 2002
Lunds Universitetet, Schweden September 2002 bis Dezember 2002, chirurgische
Klinik
Universität Tübingen ab SS 2003
2.Staatsexamen: Herbst 2005
Universität Düsseldorf Oktober 2005 bis November 2006
3.Staatsexamen: November 2006