

Validierung von Genexpressionsanalysen in einem Mausmodell für Hirnschlag



Diplomarbeit

Vorgelegt von Gina Ziegler

Matrikel Nr. 189265

Studiengang Medizinische Biotechnologie

Februar 2006

Danksagung

Im besonderen Maße danke ich Dr. Wilfried Nietfeld für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit die Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik zu schreiben, sowie für die freundliche Anleitung und Unterstützung bei der Anfertigung meiner Diplomarbeit. Daneben danke ich ihm für die angenehme Zusammenarbeit.

Ebenso danke ich Dr. George Trendelenburg für die Möglichkeit die immunohistochemische Färbung in der experimentellen Neurologie der Charité erlernen und durchführen zu können, sowie für seine Unterstützung und Anleitung.

Für die Betreuung und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit danke ich außerdem Professor Lauster.

Ein weiterer Dank gehört Dr. Johann Braun für seine Hilfe bei der Beurteilung und Optimierung der Immunohistochemie.

Mein Dank gebührt außerdem Vincent Prinz, der trotz engen Zeitplans die Präparation der Mäuse durchführte.

Für die freundliche Hilfe und Anleitung möchte ich zudem Kerstin Zurth und Alexandra Antunez-Mora danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Manja Erb nicht nur für die praktische Hilfe während der Anfertigung dieser Arbeit sondern auch für ihren allgemeinen Beistand.

Abschließend möchte ich meiner Schwester Melanie für ihre mentale und tatkräftige Unterstützung danken.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	1
ZUSAMMENFASSUNG	4
AUFGABENSTELLUNG	5
Validierung von Genexpressionsanalysen in einem Mausmodell für Hirnschlag	5
EINLEITUNG	6
a) Der Aufbau des menschlichen Gehirns	6
b) Das Mäusegehirn	10
c) Die Blutversorgung des Gehirns	11
d) Der Hirnschlag	12
e) Die Methodik zur Auffindung von Schlüsselgenen	14
MATERIAL UND METHODEN	17
a) Affymetrix GeneChip-Daten	17
b) Validierung der Affymetrix-GeneChip-Daten mittels quantitativer real-time PCR (TaqMan Assay)	17
b 1) Auswahl der Gene	18
b 2) Induktion einer Ischämie	20
b 3) First-strand cDNA-Synthese	21
b 4) quantitative real-time PCR (TaqMan Assay)	22
b 5) relative Quantifizierung ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)	23
c) Lokalisierung der Expression ausgewählter Gene	26
c 1) Auswahl der Gene	26
c 2) Präparation der Mäuse	27
c 3) Erstellung von Hirnschnitten	28
c 4) Immunohistochemie	28
d) Analyse von Signalwegen	34

ERGEBNISSE UND DISKUSSION	35
a) Validierung der Affymetrix-GeneChip-Daten mittels quantitativer real-time PCR (TaqMan Assay)	35
a 1) First-strand cDNA-Synthese	35
a 2) quantitative real-time PCR (TaqMan Assay)	36
a 3) relative Quantifizierung ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)	38
a 4) Reproduzierbarkeit	44
a 5) Berechnung des Fold Change	46
a 6) Vergleich der TaqMan-Daten mit den Affymetrix-Daten	47
b) Immunohistochemie	52
b 1) IHC von Mt2	53
b 2) IHC von Blnk	56
b 3) IHC von Ccl9	58
b 4) IHC von Hmgb1	62
b 5) IHC von Plaur	71
b 6) IHC von Tlr2	73
b 7) Zusammenfassung der Immunohistochemie	75
c) Analyse von Signalwegen	77
d) Diskussion eigener Ergebnisse bezüglich des aktuellen Standes der Forschung	78
e) Eignung des Mausmodells	86
RESÜMEE	88
QUELLEN	90
HÄUFIG VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	95
ANHANG	96
1. quantifizierende TaqMan real-time PCR	96
2. Realtive Quantifizierung ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)	98
3. Reproduzierbarkeit	125
4. Vergleich der TaqMan-Daten mit den Affymetrix-Daten	129
5. Diskussion eigener Ergebnisse bezüglich des aktuellen Standes der Forschung	143

Zusammenfassung

Zur Identifizierung wichtiger Signalgene beim Schlaganfall im Mausmodell wurden Genexpressionsprofile mit Hilfe der Affymetrix-GeneChip-Technologie anfertigt und mir zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Diese wurden mit einer unabhängigen Methode, der quantitativen real-time PCR, validiert. Dazu wurde in Wildtypmäusen (C57 black six) ein sechzigminütiger Verschluss der Arteria cerebri media verursacht und die Genexpressionsstärke von differentiell exprimierten Genen zu vier verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Es wurden Expressionswerte der ipsilateralen Hemisphäre relativ zur kontralateralen Gehirnhälfte errechnet und diese Werte anschließend graphisch mit den zu validierenden Hybridisierungsdaten verglichen. Von den 150 untersuchten Genen konnten 96 (63%) angesichts ihrer im Trend gleichförmigen Hoch- bzw. Herunterregulierung sehr gut belegt werden. Weitere 34% wurden aufgrund des Abweichens eines Messpunktes vom gesamten Trend als relativ gut validiert beurteilt. Für 3% bzw. 4 Gene konnte auf keine Bestätigung der Hybridisierungsdaten geschlossen werden. Aus Reproduzierbarkeitsexperimenten ergab sich eine mittlere Abweichung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte von $\pm 0,9$ bzw. ein Fold Change-Wert von $\pm 1,87$.

Die Expression einzelner, ausgewählter Proteine, z.B. Mt2, Blnk, Ccl9, Hmgb1, Plaur und Tlr2 sollte immunohistochemisch überprüft werden. Dabei auftretende Schwierigkeiten konnten noch nicht vollständig gelöst werden. Hierzu gehört die schlechte Fixierung des Gewebes aufgrund der ungenügenden Postfixierung mit PFA bzw. mit einem Methanol/Aceton-Gemisch. Gewebeschnitte PFA-perfusionsfixierter Mäusehirne konnten jedoch eine verbesserte Fixierung vorweisen und zusätzlich eine Spezifitätserhöhung der immunohistochemischen Färbung von Ccl9 ermöglichen. Bei Mt2 und Blnk führte erst das Verwenden eines Mouse-On-Mouse-Kits zur Detektion des Antigens mit monoklonalen Mausantikörpern. Die zu erwartende Regulierung von Hmgb1 und Tlr2 konnte teilweise dargestellt werden.

Eine Zuordnung der differentiell exprimierten Gene war nur zu den bereits bekannten Signalwegen der Entzündung, der Apoptose und Zelldifferenzierung möglich.

Aufgabenstellung

Validierung von Genexpressionsanalysen in einem Mausmodell für Hirnschlag

Zu Beginn dieser Arbeit standen Genexpressionsprofile für den Schlaganfall (englisch stroke) im Mausmodell zur Verfügung, die mit Hilfe der Affymetrix-GeneChip-Technologie erstellt wurden. Eine Auswahl differentiell exprimierter Gene sollte mittels der quantitativen real-time PCR (TaqMan Assay) unabhängig validiert werden.

Aus dem gegebenen Set wurden 150 differentiell exprimierte Gene ausgewählt. Ihre Expression im Mäusehirn sollte in der schlaganfallinduzierten Hemisphäre sowie in der nichtschlaganfallinduzierten Hemisphäre bestimmt und anschließend miteinander korreliert werden. So sollte eine Hoch- oder Herunterregulation erfassbar werden. Nachfolgend sollten diese Resultate mit den schon vorhandenen Affymetrix GeneChip-Daten verglichen und die Validierung beurteilt werden.

Der zweite Teilbereich dieser Arbeit sollte zur Lokalisierung der Genexpression auf Proteinebene führen und gleichzeitig das gemessene mRNA-Expressionsmuster auf Proteinebene überprüfen. Hierzu sollten Cryoschnitte von Mäusehirnen angefertigt werden und anschließend mit Antikörpern ausgesuchter Gene immunohistochemisch angefärbt werden.

Des weiteren sollten mittels verfügbarer Software, die auf das Wissen öffentlicher Datenbanken zurückgreift, differentiell exprimierte Gene Signalwegen zugeordnet und so ein mögliches Zusammenwirken aufgedeckt werden.

Der Schlaganfall (engl. stroke) ist die dritthäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Jeder vierte Behinderte Deutschlands leidet an den Folgen eines Schlaganfalls. Somit ist der Hirnschlag auch die Krankheit, die in Deutschland am meisten Kosten verursacht. Er beruht auf einer akuten Durchblutungsstörung des Gehirns, die verschiedenartigste funktionelle Störungen zur Folge haben kann. Welche das im einzelnen sind, hängt davon ab, welche Stelle des Gehirns betroffen ist und wie schwer die Durchblutungsstörung ist. (Nolte et al. 2002).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation der Genexpression beim Hirnschlag in einem Mausmodell. Eine Genexpressionsanalyse mit der Affymetrix-GeneChip-Technologie führte zu einer Reihe differenziell exprimierter Gene, die hier durch eine weitere Methode unabhängig validiert werden sollten.

Um den biologischen Hintergrund zu erarbeiten, wird in den folgenden Abschnitten kurz der Aufbau des menschlichen und des Mäusegehirns skizziert, gefolgt von einer zusammenfassenden Beschreibung der Blutversorgung sowie der molekularen Vorgänge während eines Schlaganfalls.

a) Der Aufbau des menschlichen Gehirns

Das Gehirn ist als Teil des Zentralnervensystems die Steuerzentrale im Wirbeltierkörper. Es ist für die Regulierung lebenswichtiger Körperfunktionen wie Bewegungen, Schlaf, Hunger oder Durst verantwortlich. Hier entstehen alle menschlichen Gefühle. Außerdem empfängt und interpretiert das Gehirn die unzähligen Signale, die es über die Nervenbahnen von anderen Körperteilen und aus der Umgebung erhält und macht so eine adäquate Reaktion auf diese möglich.

Das Gehirn eines erwachsenen Menschen hat ein durchschnittliches Gewicht von 1330g. Bei der Betrachtung lässt sich es in vier anatomische Bereiche einteilen: das Großhirn (Telencephalon), das Kleinhirn (Cerebellum), das Zwischenhirn (Diencephalon) sowie den Hirnstamm. Letzterer besteht aus dem Mittelhirn (Mesencephalon), dem Pons sowie der Medulla oblongata (Thews et al. 1999).

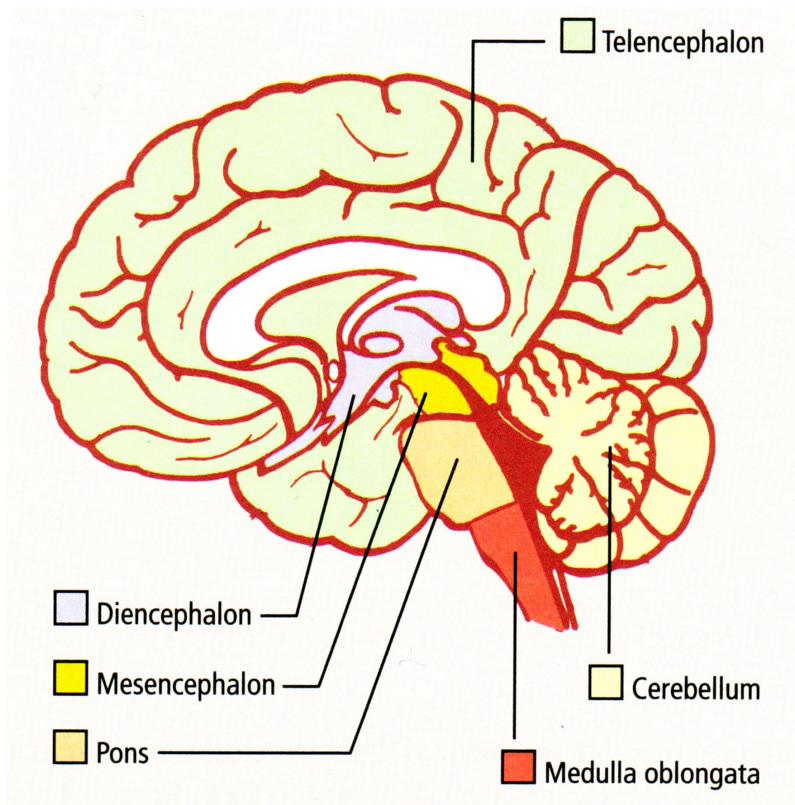


Abb. 1.1 Der Aufbau des Gehirns. Das Gehirn lässt sich wie folgt in vier Hauptbereiche einteilen: das Telencephalon (Großhirn), das Cerebellum (Kleinhirn), das Diencephalon (Zwischenhirn) sowie der Hirnstamm. Der Hirnstamm teilt sich in die Medulla oblongata (verlängertes Mark), der Pons (Brücke) und dem Mesencephalon (Mittelhirn) (Thews et al. 1999).

Das **Kleinhirn** dient der unbewussten Aufrechterhaltung des Gleichgewichts, der Aufrechterhaltung des Muskeltonus und der Koordination der gesamten Muskelbewegung.

Das **Zwischenhirn** besteht aus vier Teilen, dem Thalamus, Hypothalamus, Subthalamus und Epithalamus. Der Thalamus ist die zentrale Schaltstation für ankommende Sinnesinformationen und ausgesandte motorische Signale. Der Hypothalamus reguliert das Hormonsystem und ist damit für Körperfunktionen zuständig, die als Triebkraft bezeichnet werden, wie z.B. Essen, Trinken, Schlafen und Fortpflanzung. Außerdem reguliert er die Tätigkeit innerer Organe und bildet eine Schaltstelle zu den anderen Gehirnzentren.

Das **Mittelhirn** koordiniert u.a. die Augenbewegungen.

Der **Medulla oblongata** und der **Pons** übertragen die Nervenimpulse zwischen Gehirn und Rückenmark und regulieren so die Blutzirkulation, den Herzschlag und die Lungenaktivität sowie wichtige Reflexe. Dazu gehören Gähnen, Husten, Niesen und sich erbrechen.

Das **Großhirn** ist stark gewunden und teilt sich in die beiden Großhirnhälften, den Hemisphären, die über den Balken verbunden sind. Jede Gehirnhälfte gliedert sich durch

Einfurchungen in fünf Lappen. Das Großhirn ist der am höchsten entwickelte Bereich des Gehirns im Menschen. Hier entsteht logisches Denken, die Fähigkeit zu Schlussfolgerungen, Phantasie und Schöpfergeist. Informationen werden hier im Langzeitgedächtnis festgehalten. Wie in Abb. 2 erkennbar ist, kann das Großhirn dabei in verschiedene Assoziationsareale unterteilt werden, die bestimmten Funktionen zugeordnet sind (Smith, 1997, Gray und Lewis, 2000).

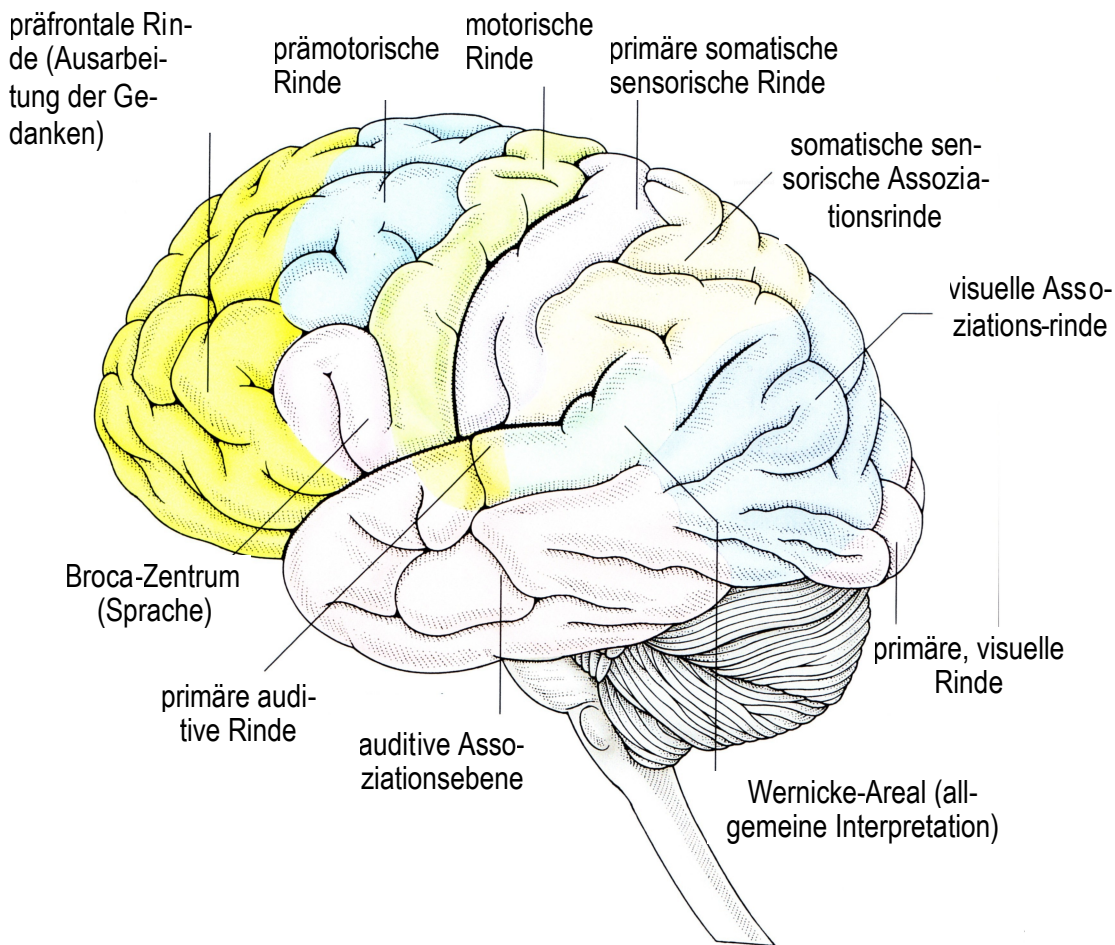


Abb. 1.2 Die Funktionsareale des menschlichen Gehirns. Das Großhirn lässt sich entsprechend seiner Leistungen in verschiedene Funktionsareale unterteilen. Hier entspringt das logische Denken, ankommende Sinnesinformationen werden verarbeitet und interpretiert, willkürliche Muskeln werden bewegt und Informationen im Langzeitgedächtnis festgehalten (Smith, 1997). Kommt es zu einer Mangeldurchblutung in einem Gehirnabschnitt, wie beispielsweise beim Schlaganfall, kann dies zu einem Gewebsuntergang führen. Das Gehirnareal kann dann seine Aufgaben nicht mehr erfüllen. Typische Ausfallerscheinungen sind die Folge.

Das Nervengewebe gliedert sich prinzipiell in zwei Zelltypen, die Neuronen und die Neuroglia (Thews et al., 1999).

Neuronen besitzen meist mehrere Zellfortsätze, zu denen die Neuriten und die Dendriten gehören. Mit Hilfe der Neuriten können sie Impulse vom Neuron weggleiten. Dendriten empfangen Nervenimpulse (Thews et al., 1999, Smith, 1997).

Neurogliazellen leiten keine Impulse weiter, sondern dienen als Stützzellen. Sie lassen sich in zwei Hauptgruppen, den Astrozyten und den Oligodendrozyten, einteilen. Die Astrozyten sind die häufigste Gliazellform. Sie regulieren den Fluss von Substanzen aus dem Blut zu den Neuronen, indem sie die Gehirnkapillare umgeben und Endfüßchen auf der Oberfläche von Blutgefäßen bilden. Des weiteren stützen sie Neuronen, sind für die Reparaturen verletzter Nervengewebe mittels starker Vermehrung durch Proliferation verantwortlich, umhüllen und isolieren einzelne Gruppen von Nervenfasern und Nervenendigungen und beteiligen sich an Transportprozessen der Transmitter, Ionen und Metaboliten (Thews et al., 1999, Seite 48; Smith, 1997, Nicholls et al., 1995, Nolte et al., 2002). Die Oligodendrozyten bilden die Myelinscheiden um Axone, isolieren sie damit und sorgen so für eine schnelle Erregungsweiterleitung (Thews et al., 1999, Nicholls et al., 1995).

b) Das Mäusegehirn

Im Unterschied zum menschlichen Gehirn ist das Gehirn der Mäuse wesentlich kleiner. Dennoch eignet es sich als Modellorganismus sehr gut, da es zu mehr als 99% aller Mausgene ein homolog im Menschen gibt (Ensembl). Abbildung 1.3 zeigt das Gehirn einer Maus in vier verschiedenen Perspektiven.

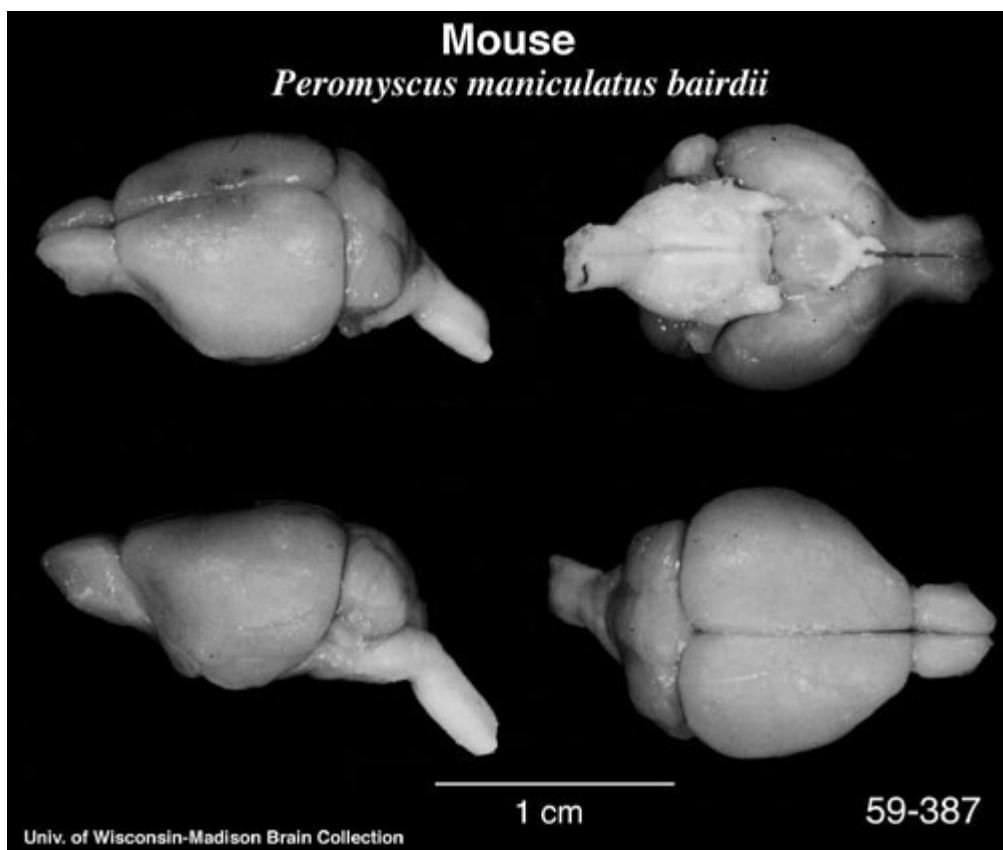


Abb. 1.3 Darstellung eines Mäusegehirns. In dieser Abbildung wird ein Mäusegehirn in verschiedenen Perspektiven gezeigt. In der dorsalen Perspektive (unten rechts) sind von rechts nach links der olfaktorische Lappen, das Großhirn, das Kleinhirn und der Hirnstamm zu sehen.

c) Die Blutversorgung des Gehirns

Das menschliche Gehirn und das der meisten anderen Säugetiere wird von vier großen Schlagadern mit Blut versorgt, von denen sich je zwei auf jeder Seite des Halses befinden. Den Hauptbeitrag leisten die rechte und linke innere Halsschlagader (*Arteria carotis interna dextra* und *sinistra*).

Des Weiteren wird das Gehirn von der rechten und linken Wirbelarterie (*Arteria vertebralis dextra* und *sinistra*) versorgt. Sie entspringen aus den Schlüsselbein-Schlagadern (*Arteria subclavia*) und verlaufen in einem Längskanal der Halswirbelsäule. Die beiden Wirbelarterien vereinigen sich an der *Medulla oblongata* mit einer am Rückenmark längsverlaufenden Arterie zur *Arteria basilaris*.

Die Hauptstämme der beiden inneren Halsschlagadern und der *Arteria basilaris* münden nach Eintritt in den Schädel in eine ringförmige Verbindung unter dem Gehirn (*Circulus arteriosus Willisii*). Aus dem *Circulus arteriosus* entspringen zum Großhirn auf jeder Seite drei Hirnarterien (vordere, mittlere und hintere Hirnarterien), die auch als *Arteria cerebri anterior*, *Arteria cerebri media* bzw. *Arteria cerebri posterior* bezeichnet werden (Gray und Lewis, 2000).

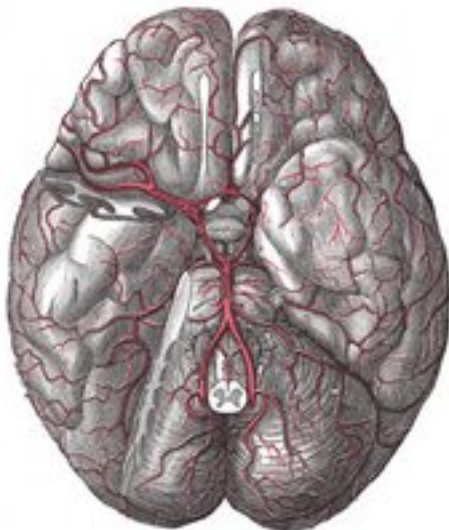


Abb. 1.4 Die Arterien des Gehirns.

Gezeigt wird das menschliche Gehirn von unten. Die aus den Schlüsselbeinarterien stammende rechte und linke Wirbelarterie vereinigen sich an der *Medulla oblongata* zur *Arteria basilaris* (im Bild unten). Die *Arteria basilaris* mündet in eine ringförmige Verbindung unter dem Gehirn (*Circulus arteriosus Willisii*), die das Gehirn mit Blut versorgt. Neben der *Arteria basilaris* münden auch die rechte und linke innere Halsschlagader (*Arteria carotis interna dextra* und *sinistra*) in den *Circulus arteriosus Willisii*. Links wurden die Schläfenlappen teilweise entfernt. Dadurch ist die den *Circulus arteriosus* verlassende *Arteria cerebri media* zu sehen (im Bild links oben), die diese Schläfenlappen versorgt (Gray und Lewis, 2000).

Diesen Hirnarterien kann man bestimmte Versorgungsgebiete im Gehirn zuordnen. Ein plötzlicher Verschluss eines der Gefäße führt in aller Regel zum Absterben von Gehirngewebe im jeweiligen Gebiet. Wegen der Verbindungen im *Circulus arteriosus* kann ein langsamer Gefäßverschluss manchmal durch kompensatorische Erweiterung der anderen Gefäße ausgeglichen werden und ist dann symptomlos.

Fällt die gesamte Blutzufuhr für zehn Sekunden aus, so kommt es zur Bewußtlosigkeit. Bei einem Ausfall von zwei bis drei Minuten stirbt Gehirngewebe ab, nach ca. fünf Minuten tritt der Hirntod ein (Gray und Lewis, 2000).

d) Der Hirnschlag

Zu dem Begriff Schlaganfall (Apoplexie) werden die Ischämie und die Hirnblutungen zusammengefasst. Die Mangeldurchblutung (Ischämie) macht dabei etwa 80% aller Fälle von Hirnschlag aus. Oft sind aber Durchblutungsstörungen nur vorübergehend und haben somit kein Absterben von Nervenzellen zur Folge. Hier kommt es zu Dysfunktionen, die sich wieder zurückbilden können. Geschieht die Rückbildung innerhalb von 24 Stunden spricht man von einer *transitorisch ischämischen Attacke* (TIA). Bei den *prolongierten reversiblen ischämischen neurologischen Defiziten* sind nach einer Woche keine Symptome mehr erkennbar (Thews et al., 1999, Smith et al., 1997).

Ein vollendeter Hirninfarkt (complete stroke) ist ein ischämischer Schlaganfall, bei dem eine Mangeldurchblutung im Gehirn entsteht. In einem Blutgefäß, das zum Hirn führt oder innerhalb des Hirns verläuft, kommt es zu einem plötzlichen Verschluss und so zu einem Sauerstoffmangel in der angeschlossenen Hirnregion. Dieser Verschluss kann zum Beispiel durch einen wachsenden Blutpfropfen (Thrombose) verursacht werden, der zur Blockade des Blutflusses führt. Damit ist das nachgeschaltete Gewebe vom Glukose- und Sauerstoffmangel bedroht. Die energieabhängigen Ionenpumpen können so nicht mehr arbeiten und der Ionengradient zwischen Extra- und Intrazellularraum ist nicht mehr aufrechtzuerhalten. Dadurch kommt es zu einer anoxischen Depolarisation. Die Nervenzellen werden durch Osmolyse, Lipolyse und Proteolyse irreversibel geschädigt. Die Folge ist ein Gewebsuntergang (Hirninfarkt). (Nolte et al., 2002; Thews et al., 1999, Smith et al., 1997). Hier können schwerwiegende neurologische Defizite auftreten, die sich nicht oder nur teilweise zurückbilden lassen. Die sichtbaren und spürbaren Folgen sind von der Lokalisation der Durchblutungsstörung abhängig. Dazu gehören halbseitige Lähmungen (Hemiparese) von Extremitäten oder des Gesichtes (hängender Mundwinkel bei Facialisparesie), Sprachstörungen (Aphasie), Anfälle, Beeinträchtigungen des Sehvermögens, Schwindel und Ausfälle kognitiver Funktionen (z.B. Gedächtnis, Konzentration, Orientierung, Wahrnehmung usw.). Sie können einen Schlaganfall begleiten oder als Folgeerscheinungen mehr oder weniger ausgeprägt be-

stehen bleiben (Stiftung deutsche Schlaganfallhilfe, Österreichische Gesellschaft für Schlaganfallforschung).

Der Randbereich eines vom Hirninfarkt betroffenen Areals wird als Penumbra bezeichnet. Hier kann es zu weiteren pathogenetischen Vorgängen kommen, die zeitlich nacheinander einsetzen. (Thews et al., 1999, Nolte et al.). In der Penumbra ist die Perfusion zwar herabgesetzt, dennoch kann der Energiemetabolismus noch teilweise aufrecht erhalten werden. Die anoxische Depolarisation im Infarktkern führt zu einer extrazellulären Akkumulation von Kalzium und Kalium. Über die Aktivierung der Kalziumkanäle und der Glutamatausschüttung kommt es zu einer Überreaktion (Exzitation) bei einem gleichzeitigen Energiemangel, aufgrund des verminderten Blutflusses. Durch den extrazellulären Kalziumanstieg werden in der Penumbra immer wieder Depolarisationen hervorgerufen. Eine erneute Repolarisation kostet die Zelle Energie, die nur eingeschränkt zur Verfügung steht, sodass schließlich auch diese depolarisiert bleiben muss (Peri-Infarkt-Depolarisationen). Gleichzeitig aktiviert Kalzium proteolytische Enzyme und die Bildung von Giftstoffen aus NO. Zu dem weiteren Fortschreiten der pathogenetischen Vorgänge tragen die Inflammation und die Apoptose bei. Die durch die Inflammation hervorgerufene Zelleinwanderung kann zu einer weiteren Verminderung der Mikrozirkulation, zur Bildung von Sauerstoffradikalen und Giftstoffen sowie auch zur Induktion apoptotischer Prozesse beitragen. (Dirnagl et al., 1999, Nolte et al., 2002) In Abb. 4 ist eine typische Schadenskaskade abgebildet, die mit Hilfe angebrachter therapeutischer Maßnahmen eingeschränkt werden sollte, um so die Funktionstüchtigkeit dieses noch nicht abgestorbenen Bereiches erhalten zu können.

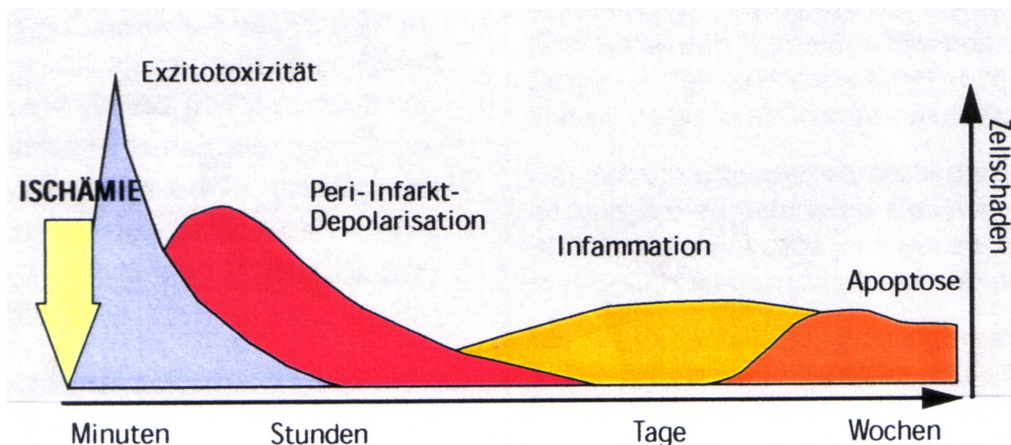


Abb. 1.5 Die Schadenskaskade in der Penumbra bei einer zerebralen Ischämie. Nach einer Ischämie sind in der umliegenden Penumbra verschiedene zeitlich versetzte Prozesse zu beobachten. Der Kalziumausstrom in den Extrazellularraum im Infarktkern führt in der Penumbra nach wenigen Minuten zur Exzitotoxizität und nach einigen Minuten bis Stunden zur Peri-Infarkt-Depolarisation. Weiterer Zellschaden wird durch die Inflammation und Apoptose hervorgerufen, die nach einigen Tagen bzw. Wochen einsetzen (Nolte et al., 2002).

Neben der typischen Schadenskaskade sind auch andere Prozesse im postischämischen Gehirn zu beobachten. So kommt es zu einer Zellmigration von Gliazellen in das geschädigte Gebiet, um dort ein „tissue remodelling“ auszulösen (May Lu et al., 2004). Gehirnzellen können sich nach einem Schlaganfall schützen und sich so gegen einen erneuten Schlaganfall präkonditionieren (Mergenthaler et a., 2004). Des weiteren führt ein akuter Schlaganfall häufig zu einem Immundefizitssyndrom (CIDS). Der Hypothalamus kontrolliert normalerweise die Immunreaktion. Schäden in diesem Gehirnbereich können aufgrund einer Überaktivierung des Sympathikus zu anti-inflammatorischen Signalen führen. Eine angemessene Immunreaktion ist nicht mehr möglich. Infolgedessen erleiden Schlaganfallpatienten mit einem DICS häufig schwere bakterielle Infektionen (Mergenthaler et a., 2004, Meisel et a., 2005). Auch diese Prozesse bieten potentielle therapeutische Ansätze, um Selbstheilungsprozesse zu unterstützen und schädliche Vorgänge zu unterbinden.

e) Die Methodik zur Auffindung von Schlüsselgenen

Um die fortschreitenden pathogenetischen Prozesse nach einem Schlaganfall wirksam einschränken oder sogar aufhalten zu können, ist die Kenntnis der zugrunde liegenden molekularen Abläufe während und nach einer Ischämie unerlässlich. Die Suche nach diesen Abläufen soll zu neuen therapeutischen Ansatzpunkten führen, sodass zukünftig apoptotische Prozesse aufgehalten, die Zellmigrationen und Differenzierungen zu Nervenzellen begünstigt und die Reorganisationen des Gehirns unterstützt werden können. Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis dieser Prozesse leistet die Genomforschung mit ihren Hochdurchsatztechnologie und –analysen.

Zur Auffindung von Schlüsselgenen, auch als „Targets“ bezeichnet, wird der Schlaganfall im Tiermodell nachgestellt. Hierfür eignen sich Nagetiere, insbesondere Mäuse. Die Induktion einer cerebralen Ischämie in Mäusen ist einfach und schnell durchführbar. Die Präparation von Tieren ist in großer Stückzahl möglich (Carmichael, 2005). Außerdem gibt es zu mehr als 99% aller Mausgene ein homolog im Menschen (Ensembl). Da es sich in 80% aller Schlaganfälle um eine Mangel durchblutung aufgrund eines Gefäßverschlusses handelt, ist das Modell einer induzierten Okklusion der mittleren cerebra-

len Arterie mittels der Fadenmethode weit verbreitet. Das Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media wird hierbei von der Blutzufuhr abgeschnitten. Nach einem definierten Zeitraum wird das Filament entfernt und so eine Reperfusion zu ermöglichen. (Carmichael, 2005).

Um eine differentielle Regulierung aller beteiligten Gene aufzuzeigen und so mögliche Schlüsselgene erkennbar zu machen, werden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Einsetzen der Reperfusion Genexpressionsprofile erstellt. Genomweite High-Throughput-Verfahren wie sie mit DNA Arrays möglich sind, können die Expression einer Vielzahl von Genen simultan bestimmen. Dabei sind in tausenden Spots DNA-Fragmente immobilisiert, die Teilstücke von Genen repräsentieren und als Messsonden dienen. Für die Hybridisierung der Microarrays wird zunächst mRNA in cDNA umgeschrieben und dabei fluoreszenzmarkiert. Diese geht dann eine Watson-Crick-Basenpaarung mit der immobilisierten DNA ein und sendet beim Auslesen der Arrays ein Lichtsignal aus, dessen Intensität der gebundenen Menge an cDNA entspricht und somit auch als Maß für die mRNA-Menge des entsprechenden Gens dient (Schaffer, 2004). So entstandene Hybridisierungsmuster geben Auskunft über die Genexpression des betrachteten Gewebes in einem bestimmten Zustand und ermöglichen Vergleichstudien zwischen verschiedenen Geweben oder Zuständen. Im Falle der Schlaganfallsforschung können so Genexpressionen der geschädigten Gehirnhälfte relativ zu nicht geschädigten Gehirnhälfte betrachtet werden, Genexpressionsmuster von geschädigten Tieren mit denen ungeschädigter Tiere verglichen werden oder Genexpression zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden.

Mit Hilfe der Microarray-Technologie können große Datenmengen erzeugt und potentielle „Targets“ identifiziert werden. Diese „Targets“ müssen jedoch unabhängig validiert werden, um ihre Richtigkeit sicherzustellen. Hierfür eignet sich die quantitative PCR oder TaqMan-PCR, da sie ebenso wie die Microarray-Technologie eine Methode zur Bestimmung der Genexpressionsstärke darstellt.

Genexpressionsprofile zeigen differentiell regulierte Gene auf. Signifikant hoch- oder herunterregulierte Gene stellen dabei potentielle Schlüsselgene für den Krankheitsverlauf dar. Für diese Kandidatengene muss zusätzlich überprüft werden, ob sich das mRNA-Regulierungsmuster auch auf Proteinebene bestätigen lässt. Hierfür eignet sich die Immunohistochemie, bei der Proteine über die Bindung an Antikörper detektiert werden und weiterhin eine genaue Lokalisierung der Expression ermöglicht. Funktionelle Untersuchungen über den „knock out“ oder der Überexprimierungen des betrach-

teten Gens sowie der Zuordnung zu Stoffwechselwegen, soll zum Verständnis der molekularen Zusammenhänge führen. Dieser Prozess soll schließlich in der Entwicklung von Medikamenten oder Behandlungsmethoden münden, um in schädliche Signalwege einzugreifen und heilungsfördernde Prozesse zu unterstützen.

Inzwischen sind bereits eine Reihe von Genen bekannt, die nach einer MCAO zu verschiedenen Zeitpunkten differentiell exprimiert werden. Gene für Transkriptionsfaktoren (Jun, c-fos, Egr1, Egr2), Hitze-Schock-Proteine (Dnajb1, Dnaja4), Entzündungsproteine (Zytokine und Chemokine), Apoptose einleitende Proteine (Ptgs2, Gadd45g, c-fos, c-jun), Proteine des Zellmetabolismus, neuronale Reparaturproteine sowie Proteine, die auf das Zytoskelett wirken, werden in einem diffizilen zeitlichem Muster hochreguliert. Dagegen werden Gene für Neurotransmitterrezeptoren, für Ionenkanäle sowie für synaptische Proteine als Reaktion auf die Übererregbarkeit des Gehirns nach einer Ischämie herunterreguliert (Nagata et al., 2003, May Lu et al., 2004).

a) *Affymetrix-GeneChip-Daten*

Zur Identifikation differentiell exprimierter Gene während eines Schlaganfalls wurde in wt-Mäusen eine sechzigminütige MACO (middle cerebral artery occlusion) hervorgerufen. Nach 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden wurden die Mäuse getötet, die RNA der Gehirnhälften extrahiert und anschließend Microarray-Genexpressionsprofile mit der Affymetrix GeneChip-Technologie erstellt. Diese Expressionsdaten standen mir zu Beginn meiner Experimente zur Verfügung.

b) *Validierung der Affymetrix-GeneChip-Daten mittels quantitativer real-time PCR (TaqMan Assay)*

Um die Aussagekraft der Affymetrix-GeneChip-Daten zu gewährleisten, insbesondere bei der Auswahl bestimmter Kandidatengene, müssen sie mit einer unabhängigen Methode validiert werden. Dazu wurden insgesamt 150 Gene herangezogen und deren Expression im Mäusehirn in der schlaganfallinduzierten Hemisphäre („ipsilateral“) sowie in der nicht-schlaganfallinduzierten Hemisphäre („contralateral“) mit Hilfe der real-time PCR (TaqMan Assays) bestimmt. Ich korrelierte die Expressionsdaten beider Gehirnhälften miteinander, um so eine mögliche Hoch- oder Herunterregulation erfassen zu können. Anschließend verglich ich diese Daten mit den schon vorhandenen GeneChip-Daten. Des Weiteren wurden auch die Expressionsdaten von Tieren mit induziertem Schlaganfall mit denen gesunder Tiere verglichen, um so zu zeigen, dass die Contra-Hemisphäre ebenso wie die Gehirne gesunder Tiere als Referenzen zur Beurteilung der Expression herangezogen werden können.

b 1) Auswahl der Gene

Aus den Set der differentiell exprimierten Gene wurden 150 gemäß der Regulationsstärke und der Verfügbarkeit entsprechender Primer ausgewählt und mittels real time PCR validiert. Sie sind in Tabelle 1 dargestellt. Zur Normierung der Expressionsdaten bestimmte ich ebenfalls die Expressionsstärke des Haushaltsgen 18S-rRNA.

LocusLink Gene Symbol	LocusLink Gene Name
2510004L01Rik	RIKEN cDNA 2510004L01 gene
AA408868	expressed sequence AA408868
Adm	adrenomedullin
Akap12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12
Akap2	A kinase (PRKA) anchor protein 2
Akap8	A kinase (PRKA) anchor protein 8
Aldh1a2	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2
Arrdc4	arrestin domain containing 4
Blnk	B-cell linker
Brd8	bromodomain containing 8
C1qr1	complement component 1, q subcomponent, receptor 1
C230080I20Rik	RIKEN cDNA C230080I20 gene
C4	complement component 4 (within H-2S)
Ccl9	chemokine (C-C motif) ligand 9
Clic4	chloride intracellular channel 4 (mitochondrial)
Ctla2a	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha
Ctsl	cathepsin L
Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
Cxcl4	chemokine (C-X-C motif) ligand 4
D230019K20Rik	RIKEN cDNA D230019K20 gene
Dicer1	Dicer1, Dcr-1 homolog (Drosophila)
Egr2	early growth response 2
Esam1	endothelial cell-specific adhesion molecule
Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb
Fin15	fibroblast growth factor inducible 15
Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1
Fosb	FBJ osteosarcoma oncogene B
Gclm	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
Gp38	glycoprotein 38
Gpc1	glypican 1
Gpr88	G-protein coupled receptor 88
Gps2	G protein pathway suppressor 2
Gtl2	GTL2, imprinted maternally expressed untranslated mRNA
Hmgb1	high mobility group box 1
Hnrpab	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
Hpca	hippocalcin
Hspa2	heat shock protein 2
Hspb8	heat shock 27kDa protein 8
Ifitm1	interferon induced transmembrane protein 1
Ifitm2	interferon induced transmembrane protein 2
Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3
Igfbp7	insulin-like growth factor binding protein 7
Il6st	interleukin 6 signal transducer
Junb	Jun-B oncogene

LocusLink Gene Symbol	LocusLink Gene Name
Kcnip2	Kv channel-interacting protein 2
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1
Lass2	longevity assurance homolog 2 (S. cerevisiae)
Lcn2	lipocalin 2
Lgals1	lectin, galactose binding, soluble 1
Lgals3	lectin, galactose binding, soluble 3
Ltbr	lymphotoxin B receptor
Luc7l2	LUC7-like 2 (S. cerevisiae)
Mafk	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K (avian)
Map3k6	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6
Mt2	metallothionein 2
Nde1	nuclear distribution gene E homolog 1 (A nidulans)
Nid1	nidogen 1
Nptx2	neuronal pentraxin 2
Nrgn	neurogranin
Nxf	bHLH-PAS type transcription factor NXF
Osmr	oncostatin M receptor
P2ry12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 12
Phc1	polyhomeotic-like 1 (Drosophila)
Phip	pleckstrin homology domain interacting protein
Plaur	urokinase plasminogen activator receptor
Ptbp1	polypyrimidine tract binding protein 1
Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
Pttg1ip	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein
Pycard	PYD and CARD domain containing
Ramp2	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2
Rbm6	RNA binding motif protein 6
Rhoj	ras homolog gene family, member J
Rora	RAR-related orphan receptor alpha
Sdc4	syndecan 4
Slc39a14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14
Slc6a3	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3
Smarca1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, sub-family a, member 1
Smox	spermine oxidase
Socs2	suppressor of cytokine signaling 2
Sorbs1	sorbin and SH3 domain containing 1
Sox4	SRY-box containing gene 4
Spop	speckle-type POZ protein
Stat3	signal transducer and activator of transcription 3
Stk4	serine/threonine kinase 4
Stxbp3	syntaxin binding protein 3
Tgfb1	transforming growth factor, beta induced
Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide
Tle3	transducin-like enhancer of split 3, homolog of Drosophila E(spl)
Tlr2	toll-like receptor 2
Zfp148	zinc finger protein 148
Zfp288	zinc finger protein 288
Zfp313	zinc finger protein 313
Zipro1	zinc finger proliferation 1

Tab.2.1 Auswahl der Gene für eine Validierung. Es wurden 150 Gene für eine Validierung der Gene-Chip-Daten ausgewählt, von denen hier 95 Gene aufgelistet wurden. Ihr LocusLink Gene Symbol sowie ihr LocusLink Gene Name sind in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Das Haushaltsgen 18S-rRNA diente bei der Validierung als endogene Referenz.

b 2) Induktion einer Ischämie

Das Auslösen einer Okklusion der mittleren cerebralen Arterie erfolgte mit Hilfe der Fadenmethode (Hara et al., 1996; Hata et al., 1998; Trapp et al., 2001). Durch Isofluran narkotisierten Wildtypmäusen (C57 black six, sechs bis acht Wochen alt, männlich, BFR) wird ein Filament in die Arteria carotis interna eingeführt und von dort aus in den Circulus arteriosus Willisii bis zum Abgang der Arteria cerebri media verschoben. Das Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media ist so von der Blutzufuhr abgeschnitten. Die Maus wird in einen beheizten Käfig gelegt und wacht dort wieder auf. Sechzig Minuten nach der Auslösung der MACO wird die Maus erneut narkotisiert und das Filament wieder entfernt, um auf diese Weise eine Reperfusion zu ermöglichen. Nach 3, 12, 24 und 48 Stunden wurden die Mäuse getötet, die Gehirne entnommen und die RNA extrahiert. Pro Zeitpunkt wurden drei Tiere präpariert, deren RNA gepoolt und mit Hilfe des Bioanalysers von Agilent einer Qualitätskontrolle unterzogen. Anschließend wurde die RNA-Konzentration am Nanodrop bestimmt. Die Zeitpunkte 3 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden sollen der Validierung der Affymetrix-GeneChip-Ergebnisse dienen. Der Zeitpunkt 48 Stunden soll künftig Rückschlüsse über den weiteren Expressionsverlauf geben. Der Verzicht auf die Zeitpunkte eine und drei Stunden soll lebende Ressourcen sparen.

Zur Kontrolle wurden Mäuse einer identischen Prozedur unterzogen, mit Ausnahme der Einführung des Filaments. Die Kontrollmäuse bekamen die Bezeichnung Sham-Tiere. Die Schlaganfallinduzierten Mäuse wurden als Ischämie-Tiere bezeichnet. Ipsilateral (kurz ipsi) benennt die von der Ischämie betroffene Hemisphäre, kontralateral (kurz kontra) die nicht betroffene.

Die Induktion der Ischämie und das Extrahieren der Maus-RNA wurden im wesentlichen von Vincent Prinz an der Charité übernommen.

b 3) First-strand cDNA Synthese

Zur quantitativen Bestimmung der mRNA mittels TaqMan real-time PCR muss sie zunächst in cDNA umgeschrieben werden, da eine direkte Amplifizierung von RNA nicht möglich ist. Man bezeichnet dieses Verfahren auch als first-strand synthesis. Dazu verwendete ich den *SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR*-Kit von InvitrogenTM. Es können 1 ng bis 5 µg total-RNA in first-strand cDNA umgeschrieben werden. Hierbei wird die Synthese des first-strands durch die SuperScriptTM II Rnase H⁻ Reverse Transkriptase (RT) katalysiert. Dieses Enzym wurde im Gegensatz zu anderen RTs so verändert, dass es keine Rnase H-Aktivität mehr hat, die die mRNA während der first-strand-Synthese degradieren würde. Das führt zu einer höheren Ausbeute (InvitrogenTM, 2003, S.3).

Zu je 1 ng bis zu 5 µg total-RNA, werden 1 µl 10 mM dNTP Mix sowie 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl) pipettiert und mit DEPC-behandeltem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Zusätzlich werden 2 Kontrollen angesetzt. In der ersten wird die Sample-RNA durch 1 µl Kontroll-RNA ersetzt. Zur zweiten Kontrolle wird später keine RT gegeben. Die Proben werden 5 min bei 65°C denaturiert und dann mindestens eine Minute auf Eis gelegt. Zu jeder Probe werden jeweils 9 µl des Reaktionsmixes (2 µl 10X RT buffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT sowie 1 µl RNaseOUTTM Recombinant Rnase Inhibitor) beigefügt und 2 min bei 42°C inkubiert. Abgesehen von der minus-RT-Kontrolle wird zu jedem Tube 1 µl SuperScriptTM II Rnase H⁻ RT gegeben und 50 min bei 42°C inkubiert. Die Termination der Reaktion wird durch eine Erwärmung auf 70°C für 15 min erreicht. Um die Sensitivität der anschließenden TaqMan-PCR zu erhöhen, muss die RNA von den cDNA:RNA-Hybriden entfernt werden. Dazu wird zu jedem Tube 1 µl Rnase H gegeben und 20 min bei 37°C inkubiert (InvitrogenTM, 2003, S. 4ff). Die cDNA wurde abschließend einer Qualitätskontrolle (Bioanalyser) sowie einer Konzentrationsbestimmung (Nanodrop) unterworfen.

b 4) Quantitative real-time PCR

Die TaqMan real-time PCR ist eine Methode, bei der die Menge der amplifizierten DNA direkt in Form eines Fluoreszenzsignals abgelesen werden kann. Ich führte sie mit dem 7900HT TaqMan Low Density Array for Gene Expression Micro Fluidic Card-System von Applied Biosystems durch. Die MFC (Micro Fluidic Card) wird mit 100µl PCR-Mix je Port beladen. Er setzt sich aus 50µl TaqMan Universal PCR Master Mix (2x), 45µl Rnase/Dnase-freiem Wasser und 5µl cDNA sample zusammen. In 100µl PCR Mix sollten 1ng-100ng total RNA in cDNA umgeschrieben sein. Der PCR Mix wurde zweimal eine Minute zentrifugiert um die Luftblasen zu entfernen.

Zur Verhinderung von Kreuzkontaminationen wird die MFC verschweißt und anschließend in das ABI Prism 7900HT System plaziert, das die TaqMan- PCR mit Hilfe der mitgelieferten CD ausführt. Das Temperaturprofil ist wie folgt:

- ➔ 50 Grad, 2 min, 100% ramp
- ➔ 94.5 Grad, 10 min, 100% ramp
- ➔ 97 Grad, 30 sec, 50% ramp
- ➔ 59.7 Grad, 1 min, 100% ramp
- ➔ each of 40 Cycles

Die ausgewählten 150 Gene finden sich auf zwei verschiedenen zusammengesetzten Micro Fluidic Cards wieder. Die MFCs 1 belud ich dabei mit cDNA-Reaktionsgemische aller vier Zustände für einen Zeitpunkt, d.h.

1. cDNA-Reaktionsgemische der ipsilateralen Hemisphäre der gestrokten Tiere („Ischämie, ipsi“)
2. cDNA-Reaktionsgemische der kontralateralen Hemisphäre der gestrokten Tiere („Ischämie, kontra“)
3. cDNA-Reaktionsgemische der ipsilateralen Hemisphäre der nichtgestrokten Tiere („Sham, ipsi“) und
4. cDNA-Reaktionsgemische der kontralateralen Hemisphäre der nichtgestrokten Tiere („Sham, kontra“).

Da den Mäusen nach einer einstündigen MCAO zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten das Gehirn entnommen wurden, waren so vier MFCs 1 notwendig. Eine weitere MFC 1 diente zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit dieser Experimente. Die Beladung der MFCs 2 unterschied sich von der oben beschriebenen, da die Karten anders konzipiert wurde. Ich belud sie pro Zeitpunkt mit zwei Zuständen, jeweils als Dopplebestimmung. Das waren im einzelnen:

1. cDNA-Reaktionsgemische der ipsilateralen Hemisphäre der gestrokten Tiere („Ischämie, ipsi“)
2. cDNA-Reaktionsgemische der kontralateralen Hemisphäre der gestrokten Tiere („Ischämie, kontra“).

Hier waren abermals 4 Karten notwendig. Die TaqMan-PCR wird mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet.

b 5) Relative Quantifizierung ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)

Der Amplifizierungsplot einer quantitativen TaqMan-PCR folgt einer typischen Rampenkurve, wie sie in Abb.2.1 dargestellt ist. Hier sind die Zyklenanzahl und die Signalstärke der Fluoreszenz gegeneinander aufgetragen. Je größer dabei das Fluoreszenzsignal, desto größer ist die Anzahl der amplifizierten DNA.

Die Zyklusanzahl, bei der ein festgelegter Schwellenwert (Threshold) an amplifizierter DNA erreicht wurde, wird als C_T -Wert bezeichnet. Je mehr zu amplifizierende cDNA zu Beginn der TaqMan-PCR in einer Probe vorhanden ist, desto schneller wird der Threshold erreicht und desto kleiner ist der C_T -Wert. Ich normalisierte die C_T -Werte, indem ich den C_T -Wert der endogenen Referenz von den Sample- C_T -Werten abzog und erhielt so ΔC_T . Als endogene Referenz dient das Haushaltsgen 18S-rRNA. Seine Expression sollte sich während des Experimentes nicht verändern.

$$\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{target gene})} - \Delta C_{T(\text{endogenous reference gene})}$$

(Qiagen, 2004)

Typical Amplification Plot

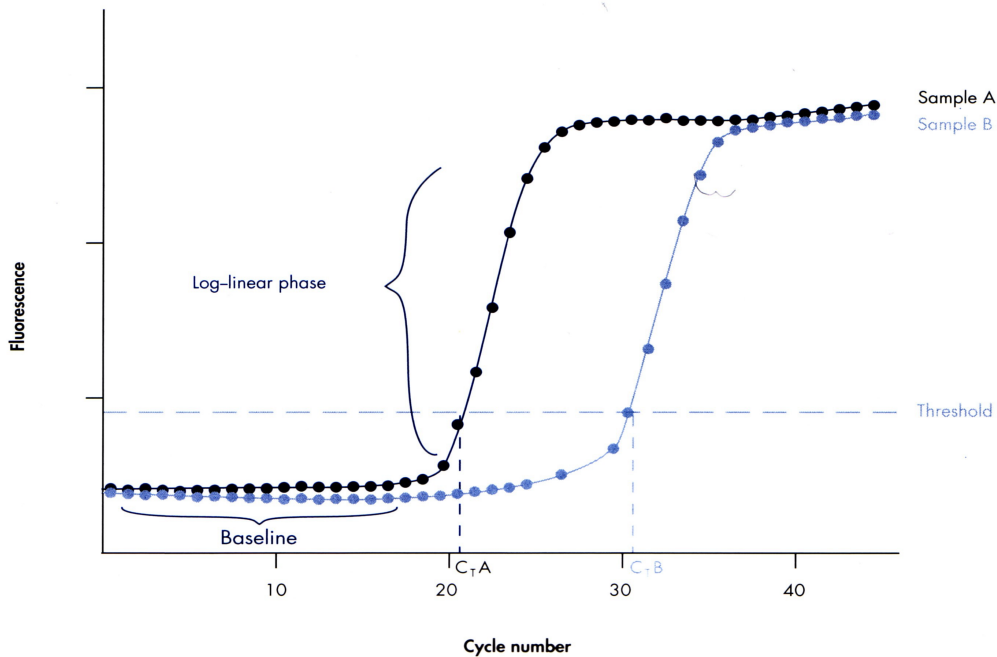


Abb. 2.1 Amplifizierungsplot einer TaqMan-PCR. Die Anzahl der PCR-Zyklen und Fluoreszenzsignale wurde gegeneinander aufgetragen. Je mehr cDNA zu Beginn der TaqMan-PCR in einer Probe vorhanden ist, desto schneller wird der Threshold überschritten und desto kleiner ist der C_T -Wert. (Qiagen, 2003 S. 31)

Um beurteilen zu können wie sich die Genexpressionen der zu untersuchenden Gene während des Versuches ändert, zieht man die ΔC_T -Werte der untersuchten Gene der nicht geschädigten Hemisphäre (kontra) als Referenz von denen der geschädigten Hemisphäre (ipsi) ab. Auf diese Weise erhält man $\Delta\Delta C_T$.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Sample}) - \Delta C_T (\text{Referenz})$$

Eine erhöhte Genexpression hat somit einen niedrigeren ΔC_T -Wert und damit einen negativen $\Delta\Delta C_T$ -Wert zur Folge. (Qiagen, 2004)

Da die $\Delta\Delta C_T$ -Werte nur den relativen Zyklusabstand beim Erreichen des Thresholds angeben, sind sie wenig anschaulich. Außerdem sollen die TaqMan-Daten im gleichen Format wie die GeneChip-Daten vorliegen, um eine Vergleichbarkeit gewährleisten zu können. Deshalb habe ich die $\Delta\Delta C_T$ -Werte ebenso in Fold Change-Werte (FC) umgerechnet.

Die dazugehörige Formel dazu lautet:

$$\text{fold change} = \begin{cases} 2^m & | m \geq 0 \\ (-1) * 2^{-m} & | m < 0 \end{cases} \quad \text{wobei } m = -\Delta\Delta C_T$$

Ist die Expression eines untersuchten Gens in der ipsilateralen Hemisphäre genauso groß wie in der kontralateralen Hemisphäre, so ist FC=1. Ist die Expression doppelt so hoch, dann ist FC = 2. Analog ist FC = -2, wenn die Expression in der ipsilateralen Hemisphäre nur halb so groß wie in der kontralateralen Hemisphäre ist. Letzteres geht mit einer Herunterregulierung des Gens einher (Schaffer, 2004).

c) Lokalisierung der Expression ausgewählter Gene

Zur Lokalisierung der Genexpression auf Proteinebene dient die Immunohistochemie, kurz IHC. Sie kann auch zeigen, ob sich das mRNA-Expressionsmuster auf Proteinebene bestätigen lässt. Hierfür wurden ein Kontrollgen und vier weitere Gene ausgewählt, die mit Hilfe kommerziell erhältlicher Antikörper detektiert werden sollten.

c 1) Auswahl der Gene

Als Kontrollen wurde das Protein Metallothionein 2 (Mt2) gewählt. Die Relevanz von Mt2 im Maus-Modell für Hirnschlag wurde bereits nachgewiesen. Es wird von Metallen, Glucocorticoiden und Entzündungssignalen induziert (Trendelenburg et al., 2002). Es bindet Metallione wie Zink, ist bei der stickstoffmonoxidvermittelten Signaltransduktion beteiligt und kann als Wachstumsfaktor dienen (Genomics Institute of the Novartis Research Foundation). Die Gene Blnk (B-cell linker), Hmgb1 (High mobility group box protein 1), Plaur (urokinase plasminogen activator receptor) sowie Ccl9 (chemokine (C-C motif) ligand 9) wurden jeweils sehr gut bis gut validiert und aus diesem Grund für die IHC ausgewählt. Zusätzlich führte ich immunohistochemische Färbungen für den Tlr2 (toll like receptor) durch.

Blnk ist ein transmembranes Molekül und unerlässlich für das Induzieren der intrazellulären Signalkaskade der Prä-B-Zellen. So ist es unter anderem an Prozessen wie Proliferation und Apoptose beteiligt (Köhler, 2005, DeFranco, 1997, Santa Cruz Biotechnology, inc., 2005, Genomics Institute of the Novartis Research Foundation). Hmgb1 hingegen ist ein Transkriptionsfaktor, der an Tumor-Suppressor-Proteinen wie Rb und p130 bindet. Es stoppt den Zellzyklus und terminiert so eine weitere Proliferation (Liebermann, 1998). Daneben ist Hmgb1 noch an einer Reihe anderer molekularer Zellprozesse beteiligt. Dazu gehört das DNA-packing, die DNA-Rekombination, die DNA-Reparatur die Entwicklung des Nervensystems sowie der Biosynthese von Stickstoffmonoxid (Genomics Institute of the Novartis Research Foundation). Plaur ist ein Oberflächenrezeptor, der zur systemischen Aktivierung der Koagulationskaskade während der Epithelisierung von Läsionen, der Wundheilung und dem tissue remodelling beiträgt. Es besitzt neben seiner Rezeptoraktivität auch eine Kinaseaktivität (Santa Cruz Biotechnology, inc., 2005, Genomics Institute of the Novartis Research Foundation). Ccl9 ist ein chemotaktisches Cytokin. Es löst chemotaktische Bewegungen von Leuko-

zyten, Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten aus, indem es spezifische G-proteingekoppelte Rezeptoren auf diesen Zelltypen aktiviert (Abdi et al., 2004, Young et al., 1995). Außerdem kann CC chemokine 9 als Wachstumsfaktor bei der Angiogenese dienen (Kim et al., 2003).

Der Tlr2 (toll like receptor 2) konnte aufgrund der unterschiedlichen Expressionsverläufe der GeneChip- und der TaqMan-Daten sowie einer zu großen Wertedifferenz nicht eindeutig validiert werden. Dennoch wurde Tlr2 für die immunohistochemische Färbung ausgewählt, da er in beiden Messungen eine Hochregulierung über den gesamten, untersuchten Zeitraum zeigt. Des Weiteren ist für Tlr2 eine Schlaganfallrelevanz bereits bekannt (Karikó et al., 2004). Tlr2 ist ein transmembraner Rezeptor. Er bindet PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) bestimmter Mikroben und löst über eine intrazelluläre Signalkaskade eine Entzündungsreaktion aus, die den Wirt schützen soll (Zhang und Sankar, 2001, Martinon und Tschopp, 2005). Ebenso ist das Erkennen von Proteinen nekrotischer oder verletzter Zellen beispielsweise nach einer Ischämie möglich. Die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade führt erneut zur Inflammation und kann schließlich in der Apoptose enden (Karikó et al., 2004). Beide Prozesse führen zu einer erheblichen Verschlechterung eines Schlaganfalls.

c 2) Präparation der Mäuse

In wt-Mäusen (C57BL/6) wird ein sechzigminütiger Verschluss der arteria cerebri media induziert, ebenso wie bereits im Abschnitt b II) beschrieben. Die Tötung der Mäuse erfolgte nach 12 bzw. 48 Stunden. Anschließend wurde ihr Gehirn entnommen und schockgefroren.

Ein Teil der Mäuse erfuhr vor der Tötung eine PFA-Perfusion um einen besseren Gewebeerhalt zu ermöglichen.

Die Präparation sowie die PFA-Perfusion wurden von Vincent Prinz an der Charité übernommen.

c 3) Erstellung von Hirnschnitten

Es wurden Cryoschnitte von schockgefrorenen Gehirnen angefertigt, die 12 bzw. 48 Stunden nach einer einstündigen MACO entnommen wurden. Die Gehirne wurden zunächst von -80°C Lagertemperatur auf -21°C gebracht und anschließend mit Hilfe von TissueTek senkrecht auf den Stempel des Cryostatens geheftet. Nach dem Einspannen der Klinge und des Stempels wird der Schnittstrecker justiert. Das Gehirn wird in $20\ \mu\text{m}$ Sektionen geteilt und Schnitte aus drei verschiedenen Gehirnbereichen (interaurel 5,34 cm, 3,94 cm und 1,86 cm) auf einen Objektträger gebracht. Der Vorgang wurde für die entsprechenden Sham-Tiere wiederholt.

Die Gehirnschnitte wurden in Zusammenarbeit mit Vincent Prinz angefertigt.

c 4) Immunohistochemie

Die Immunohistochemie (abgekürzt IHC) ist eine Methode, bei der Proteine als Antigene spezifisch von bestimmten Antikörpern erkannt und anschließend gebunden werden. Hierdurch ist die Detektion dieser Proteine im Gewebe möglich. Zur Markierung der ausgewählten Genprodukte griff ich auf die Zwei-Schritt indirekte Methode zurück, dessen Prinzip in Abbildung 2.2 verdeutlicht wird. Dabei bindet ein gegen das gesuchte Protein gerichteter primärer Antikörper das Protein. Anschließend wird ein sekundärer Antikörper dazugegeben. Er erkennt den primären Antikörper an der spezifischen Zusammensetzung des konstanten Teils des Antikörpers, der für die Tierspezies kennzeichnend ist, in der der primäre Antikörper herangezüchtet worden ist. Das kann unter anderem das Kaninchen sein. In diesem Falle wäre also der sekundäre Antikörper ein anti-rabbit-Antikörper. Da er außerdem mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist, wird so eine Lokalisierung des Proteins im Gewebeschnitt möglich. Dabei wird der gefärbte Gewebeschnitt unter einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert (DAKO Corporation, USA, S. 6, 26).

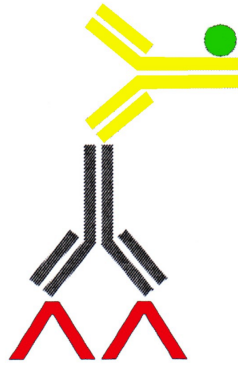


Abb.2.2 Zwei-Schritt indirekte Methode. Der primäre Antikörper (im Bild grau) erkennt spezifisch das Antigen (rot). Das Antigen ist hier das zu lokalisierende Protein. Der mit einem Fluoreszenzfarbstoff (grün) markierte sekundäre Antikörper (gelb) bindet an den primären Antikörper. Dabei erkennt er die Merkmale, die für die Spezies aus der der Antikörper stammt spezifisch sind.

Die primären Antikörper können dabei monoklonal oder polyklonal sein. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen Zellen im Tier hergestellt und reagieren somit gegen mehrere verschiedene Epitope. Monoklonale Antikörper sind nur gegen ein einziges Epitop gerichtet und haben somit eine höhere Spezifität und geringere Kreuzreaktivität. So ist es beispielsweise möglich auch in Mauszellkultur entstandene monoklonale Antikörper spezifisch zur Detektion von Mäuseproteinen zu verwenden. Monoklonale Antikörper werden von Hybridzellen hergestellt, die durch die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen entstanden sind (DAKO Corporation, USA, S. 7).

Die richtige Detektion von Proteinen mittels der Immunohistochemie ist von vielfältigen Faktoren abhängig. So müssen nicht nur die richtigen Konzentrationen der Antikörper gefunden werden, sondern auch die optimale Fixierung des Gewebes, die bestmögliche Blockierung sowie sämtlichen zeitlichen Rahmen der einzelnen Experimentierschritte festgelegt werden. Aus diesem Grunde sind im folgenden nur die jeweils zu letzt gebrauchten Arbeitsvorschriften genannt.

c 4.1) Immunohistochemische Anfärbung von Mt2 (Metallothionein2)

Auf jedem Objektträger befinden sich jeweils Schnitte aus drei verschiedenen Gehirnbe-
reichen (interaaural 5,34 cm, 3,94 cm und 1,86 cm). Die Objektträger wurden bei -80°C
gelagert. Zu Beginn der Färbung lies ich die Schnitte 30 Minuten lufttrocknen. Dadurch
wird ein späteres Abspülen der Schnitte vom Objektträger verhindert und die Schnitte
werden vorfixiert. Anschließend wurden sie 10 Minuten mit 4%igem PFA fixiert. Das
soll eine Autolyse der Zellen verhindern, die Spezifität der Immunohistochemischen
Bindung erhöhen und dem Gewebe eine höhere Resistenz gegenüber den nachfolgenden
Experimentierschritten vermitteln (DakoCytomation). Dabei wurden die Schnitte zum
Schutz vor Austrocknung mit Parafilm abgedeckt und in eine mit Wasser gefüllte Inku-
bationskammer gelegt. Nun wurden sie dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen und
nachfolgend eine Stunde geblockt. Die Blockierungslösung enthält 10% Ziegen Serum
(engl.: normal goat serum, kurz: NGS) und 0,3% Triton X in PBS. Ich ließ die Schnitte
über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper anti-Mt2 (monoclonal mouse anti-
horse Metallothionein (MT, E9), DakoCytomation, # M0639) inkubieren. Zuvor ver-
dünnte ich anti-Mt2 1:200 mit der Inkubationslösung (0,3% Triton X, 3% NGS in PBS).
Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten gewaschen und anschlie-
ßend mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L),
Molecular Probes, # A11001) inkubiert. Diesen habe ich zuvor 1:200 bzw. 1:400 mit
der Blockierungslösung verdünnt. Nach dem nochmaligen Waschen, färbte ich die
Schnitte mit Hoechst gegen. Hoechst färbt die Zellkerne an und soll später Rückschlüs-
se liefern, ob der primäre Antikörper Zellen anfärbt. Nach der Gegenfärbung wusch ich
die Schnitte in destilliertem Wasser und deckelte sie anschließend ein. Die Objektträger
müssen über Nacht im Kühlschrank trocknen, damit sie am nächsten Tag unter einem
Fluoreszenzmikroskop untersucht und fotografiert werden können.

Des weiteren habe ich eine immunohistochemische Färbung mit Hilfe des Mouse on
Mouse-Färbekits (Vector M.O.M. Fluorescein Kit, Linaris, # FMK-2201 durchgeführt,
um die spezifische Bindung der aus der Maus stammenden primären Antikörper an ihr
Antigen zu verbessern. Die Immunohistochemie wurde entsprechend der Herstelleran-
gaben ausgeübt. Dabei wurde der primäre Antikörper mouse anti-Metallothionein im
Verhältnis 1:100 in der Gebrauchslösung des Proteinkonzentrats verdünnt. Im M.O.M.-
Kit wird bereits Fluorescein mitgeliefert.

c 4.2) Immunohistochemische Anfärbung von Blnk (B-cell linker)

Zur Anfärbung von Blnk in Mäusehirnschnitten wurden die Schnitte zunächst 30 Minuten luftgetrocknet, dann 10 Minuten mit PFA nachfixiert, dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen und anschließend geblockt (3% NGS, 0,3% Triton X in PBS). Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht mit anti-Blnk (monoclonal mouse anti-Blnk (2B11), Santa Cruz Biotechnology, # sc-8003) in der Verdünnung 1:50 sowie 1:100. Am nächsten Tag wurden die Schnitte gewaschen und mit dem sekundären Antikörper anti-mouse (Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L), Molecular Probes, # A11001) in der Verdünnung 1:300 inkubiert. Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen, mit Hoechst gegengefärbt, mit destilliertem Wasser gewaschen und abschließend eingedeckelt.

c 4.3) Immunohistochemische Anfärbung des Chemokins Ccl9

Zur Optimierung der Gewebefixierung führte ich drei verschiedene Experimente zur immunohistochemischen Anfärbung von Ccl9 durch. Dabei postfixierte ich die Schnitte zunächst mit PFA und später mit einem Methanol/Aceton-Gemisch. Abschließend verwendete ich PFA-perfusionsfixierte Schnitte. Die drei Fixierungsmethoden und Anfärbungen werden nachfolgend beschrieben.

1. Nachdem ich die Objektträger aus dem -80°C -Gefrierschrank nahm, taute ich die Hirnschnitte auf, indem ich dem Objektträger auf der Rückseite berührte. Anschließend wedelte ich den Schnitten Luft zu, bis sie getrocknet waren. Die Gehirnschnitte wurden 18 Minuten mit PFA fixiert, eine Stunde geblockt und über Nacht mit dem primären Antikörper anti-Ccl9 (polyclonal rabbit anti-MRP2 (H-300), Santa Cruz Biotechnology, # sc-20766) in der Verdünnung 1:100 inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein erneutes Waschen und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper anti-rabbit (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), Molecular Probes, # A11008) in der Verdünnung 1:500 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nachfolgend wusch ich die Schnitte erneut mit PBS, färbte sie mit Hoechst gegen, wusch sie mit destilliertem Wasser und deckelte sie ein.

2. Zur Verbesserung der Fixierung ließ ich die Schnitte in der Wiederholung des Experiments 30 Minuten trocknen und fixierte sie in einem -20°C kalten Methanol/Aceton-Gemisch (1:1). Danach wurden sie 12 Minuten unter dem Abzug getrocknet

und 3 mal 5 Minuten gewaschen. Das Experiment setzte sich wie im obigen Abschnitt beschrieben fort.

3. Um die Beschaffenheit des Gewebes zu verbessern wurden einige Gehirne im noch lebenden Tier PFA-perfusionsfixiert. Die daraus entstandenen Schnitte ließ ich 20 Minuten lufttrocknen, fixierte sie noch einmal 20 Minuten mit PFA nach und wusch sie anschließend. Ich blockierte sie eine Stunde und 30 Minuten und inkubierte sie 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper anti-Ccl9 (polyclonal rabbit anti-MRP2 (H-300), Santa Cruz Biotechnology, # sc-20766) in einer Verdünnung von 1:100. Nach dem Waschen und dem einstündigem Trocknen wurden die Schnitte 20 Minuten mit dem sekundären Antikörper anti-rabbit (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), Molecular Probes, # A11008) der Verdünnung 1:100 inkubieren. Abschließend wurden die Schnitte mit Hoechst gegengefärbt, mit destilliertem Wasser gewaschen und eingedeckelt.

c 4.4) Immunohistochemische Anfärbung von Hmgb1 (High mobility group box proteins 1)

Für die Detektion von Hmgb1 ließ ich die Hirnschnitte zunächst 20 Minuten lufttrocknen und fixierte sie anschließend 20 Minuten mit PFA. Nach dem Waschen folgte das eineinhalbstündige Blocken mit einer Doppelblocklösung. Sie enthält 5% NGS und 5% BSA in PBS. Die Schnitte wurden 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper anti-Hmgb1 (polyclonal rabbit anti-HBP1 (H-300), Santa Cruz Biotechnology, # sc-25390) inkubiert, der zuvor 1:50 verdünnt wurde. Die Verdünnungslösung enthielt 1,6% NGS sowie 1,6% BSA in PBS. Nach dem Waschen folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper anti-rabbit (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), Molecular Probes, # A11008) in der Verdünnung 1:300. Abschließend wusch ich die Schnitte mit PBS, färbte sie mit Hoechst gegen, wusch sie mit destilliertem Wasser und deckelte sie ein.

Da ein Seitenunterschied in der Hmgb1-Expression im Sham-Tier festgestellt wurde, wiederholte ich die Immunohistochemie für Hmgb1 und führte gleichzeitig vergleichend eine zweite IHC mit dem Endotheloberflächenmarker von Willebrandt-Faktor (VWF) durch. Während allen Inkubationen wurde jeweils ein Schnitt eines Sham-Tiers entweder geschüttelt oder von einem Fettstift umrandet, sodass neben der Abdeckung mit Parafilm ein weiterer Verdunstungsschutz vorhanden war. Die Schnitte wurden

hierbei 20 Minuten luftgetrocknet, 20 Minuten mit PFA fixiert und gewaschen. Nachfolgend blockierte ich sie eine Stunde mit der Doppelblockierungslösung und ließ sie mit dem primären Antikörper in der Verdünnung 1:50 zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren. Neben dem oben genannten anti-Hmgb1 verwendete ich anti-VWF (polyclonal goat anti-VWF, Santa Cruz Biotechnology, # sc-8068). Die Schnitte werden gewaschen und mit dem sekundären Antikörper in der Verdünnung 1:300 eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde der oben genannte anti-rabbit sowie der anti-goat (Cy3 conjugated affinity purified donkey anti-goat IgG [H&L], Rockland, # 605-704-125) genutzt. Abschließend wusch ich die Schnitte, färbte sie gegen und deckelte sie nach einem erneuten Waschen ein.

c 4.5) Immunohistochemische Anfärbung von Plaur (urokinase plasminogen activator receptor)

Zum Auftauen der Hirnschnitte berührte ich den Objektträger auf der Rückseite und wedelte den Schnitten Luft zu, bis sie getrocknet waren. Nun wurden sie mit PFA fixiert, gewaschen und eine Stunde mit 3% NGS und 0,3% Triton X in PBS geblockt. Die Schnitte wurden über Nacht mit dem primären Antikörper anti-Plaur (polyclonal rabbit anti-uPAR (FL-290), Santa Cruz Biotechnology, # sc-10815, 1:100 verdünnt) inkubiert. Am nächsten Tag wusch ich die Schnitte und ließ sie mit dem sekundären Antikörper inkubieren. Hierbei verwendete ich anti-rabbit (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), Molecular Probes, # A11008). Ebenso wie auch bei den anderen immunohistochemischen Experimenten folgte ein Waschen mit PBS, die Gegenfärbung, ein erneutes Waschen mit destilliertem Wasser und das Eindeckeln.

c 4.6) Immunohistochemische Anfärbung von Tlr2 (Toll like receptor)

Für die Detektion von Tlr2 lies ich die Cryoschnitte zunächst auftauen und 30 Minuten trocknen. Anschließend fixierte ich sie fünf Minuten mit einem Methanol/Aceton-Gemisch (1:1) bei -20°C und lies sie erneut zwölf Minuten unter dem Abzug trocknen. Die Schnitte wurden eine Stunde geblockt (0,3% Triton X und 3% NGS in PBS) und über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper anti-TLR2 (polyclonal rabbit anti-TLR2 (H-175) # sc-10739, Santa Cruz Biotechnology) in der Verdünnung 1:100 inkubiert. Am folgenden Tag wusch ich die Schnitte drei mal fünf Minuten und inkubierte sie eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper anti-rabbit (Alexa

Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), Molecular Probes, # A11008) in der Verdünnung 1:300. Nachfolgend wusch ich die Schnitte, färbte sie mit Hoechst gegen, wusch sie mit destilliertem Wasser und deckelte sie ein.

d) Analyse von Signalwegen

Um die genauen molekularen Vorgängen während und nach einer Ischämie zu verstehen ist eine Zuordnung der differentiell exprimierten Gene zu funktionell bedeutenden Signalwegen und das Aufdecken ihres Zusammenwirkens wichtig. So soll es möglich werden „Targets“ für eine positive Manipulierung dieser Signalwege zu finden.

Zur Identifizierung dieser Stoffwechselwege nutze ich verschiedene kommerziell erhältliche Programme, wie beispielsweise PathwayAssist™ von Ariadne Genomics (<http://www.ariadnegenomics.com>), Pathway Analytics von Teranode™ (<http://www.teranode.com>) und Pathway Analysis von Ingenuity™ (<http://ingenuity.com>) und wandte sie entsprechend den Herstellerangaben an. Diese Programme greifen auf bereits bekanntes Wissen über Gene und ihre gegenseitigen Wechselwirkungen aus öffentlichen Datenbanken, wie z.B. PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov) zurück.

a) Validierung der Affymetrix-GeneChip-Daten mittels quantitativer real-time PCR (TaqMan Assay)

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden genomweite Genexpressionsmuster für den Hirnschlag im Mausmodell mittels Hybridisierungen von Affymetrix-GeneChips erstellt. Diese Ergebnisse wurden von mir mit einer weiteren unabhängigen Methode validiert. Dazu habe ich für insgesamt 150 Gene die Genexpression der ipsilateralen sowie der kontralateralen Hemisphäre mit Hilfe der real-time PCR (TaqMan Assay) bestimmt. Die Expressionsdaten beider Gehirnhälften wurden miteinander korreliert, um so eine mögliche Hoch- oder Herunterregulation erkennbar zu machen. Diese Daten habe ich anschließend mit den schon vorhandenen Affymetrix-Hybridisierungs-Daten verglichen. Hierfür wurde zunächst in sechs bis acht Wochen alten, männlichen C57 black six-Wildtypmäusen eine Okklusion der mittleren cerebralen Arterie ausgelöst und für eine Stunde aufrecht erhalten. Drei, zwölf, 24 und 48 Stunden später wurden die Tiere getötet und ihre Gehirne entnommen, um aus diesen die RNA zu extrahieren. Für jeden der angegebenen Zeitpunkte wurden drei Tiere präpariert und ihre RNA gepoolt. Für eine Quantifizierung der RNA war es zunächst notwendig die RNA mittels first-strand cDNA Synthese in cDNA umzuschreiben.

a 1) First-strand cDNA Synthese

Bei der First-strand cDNA Synthese wird RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgewandelt. Ausgehen von 2,32 µg bis 3,35 µg total RNA wurden schließlich cDNA-Konzentrationen zwischen 87,28 ng/µl und 162,31 ng/µl erhalten und für die TaqMan Assays verwendet.

a 2) Quantitative real-time PCR (TaqMan Assay)

Für die Quantifizierung der Genexpression mittels der TaqMan-PCR setzte ich sogenannte Micro Fluidic Cards (MFCs) ein. Mit einer MFC können insgesamt 384 TaqMan-PCRs durchgeführt werden. Die Karten sind so konzipiert, dass vier mal 95 Gene und vier mal eine endogenen Referenz (18S-rRNA) untersucht werden können. Für 96 Assays werden 1-100 ng in cDNA umgeschriebene total RNA benötigt. Für die Durchführung der TaqMan Assays verdünnte ich die cDNA-Gemische zuvor 1:3 bzw. 1:5. Eine hinsichtlich der Konzentration exakt übereinstimmende Beladung mit cDNA war nicht notwendig, da die TaqMan-Werte anschließend normiert werden. In der folgenden Abbildung 3.1 wird exemplarisch der Amplifizierungsplot für 95 Gene nach dreistündiger Reperfusion gezeigt. Die fehlenden Amplifizierungsplots finden sich im Anhang [1. a2) quantitative real-time PCR (TaqMan Assay)]. Die ersten vier Karten wurden mit cDNA aller vier Zustände pro Zeitpunkt beladen. Die Zustände waren hierbei die ipsilaterale Hemisphäre des Ischämietiers, die kontralaterale Hemisphäre des Ischämietiers, die ipsilaterale Hemisphäre des Shamtiers sowie die kontralaterale Hemisphäre des Shamtiers. Die letzten vier Karten belud ich jeweils als Doppelbestimmung mit cDNA der ipsilateralen sowie der kontralateralen Hemisphäre des Ischämietiers.

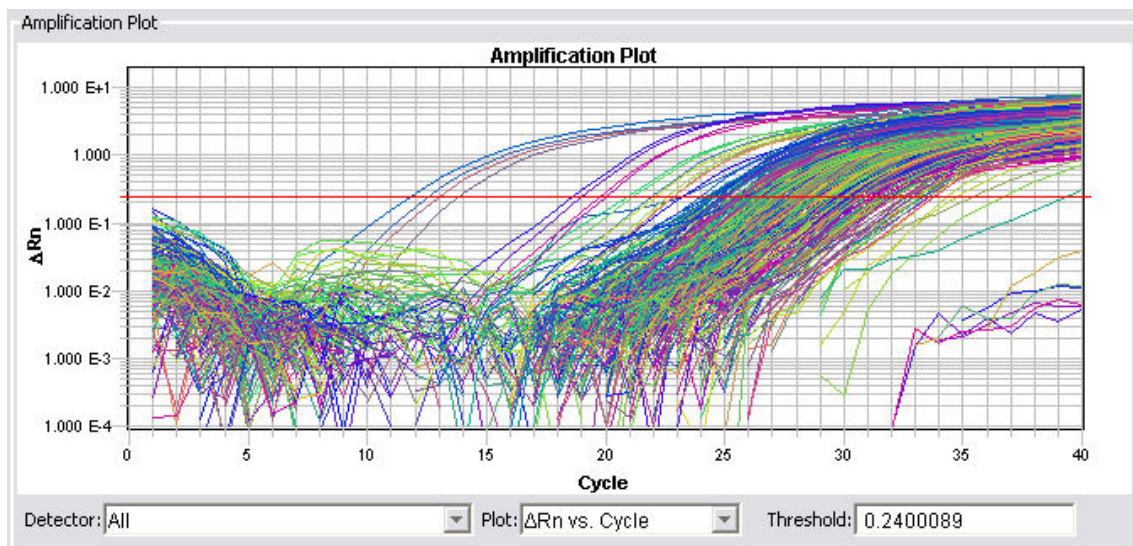


Abb. 3.1 Amplifizierungsplot der TaqMan-PCR für den Zeitpunkt 3 Stunden Reperfusion nach einer einstündigen MCAO. Hier sind die Amplifizierungskurven von 95 Genen und einer endogenen Kontrolle zum Zeitpunkt drei Stunden des ischämischen Tiers sowie des Shamtiers der jeweils ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre dargestellt.

In einem Amplifizierungsplot wurden die Zyklenzahl der PCR und die Fluoreszenzsignalstärke halblogarithmisch gegen einander aufgetragen. Der Plot geht von der Baseline (Zickzacklinien in der linken Hälfte der Abbildung) in die lineare Phase über. Hier setzte ich den Threshold bzw. Schwellenwert (rote Linie). Die Zyklusanzahl, die zum Threshold eines Gens gehört, wird als C_T -Wert bezeichnet. Er entspricht also dem Zyklus, bei dem ein festgelegter Schwellenwert an amplifizierter DNA erreicht wurde. Tabelle 3.1 zählt die gesetzten Schwellenwerte auf.

Die vier Graphen mit dem kleinsten C_T -Wert gehören zur 18S-rRNA, dass heißt sie wird stärker exprimiert als die untersuchten Gene. Das stimmt mit den Erwartungen überein, da rRNAs den Hauptbestandteil an total-RNA bilden (Vandesompele et al., 2001). Die Graphen des Haushaltsgens 18S-rRNA liegen wie erwartet sehr dicht beieinander, da Haushaltsgene konstant exprimiert werden. Die Graphen, die auch bei fortgeschrittenen C_T -Werten den Threshold nicht erreichten, konnten nicht ausgewertet werden.

	Zeitpunkte	Threshold
MFC 1	3 Stunden	0,24
	12 Stunden	0,20
	24 Stunden	0,25
	48 Stunden	0,12
Wiederholung	3 Stunden	0,20
	24 Stunden	0,20
MFC 2	3 Stunden	0,19
	12 Stunden	0,21
	24 Stunden	0,21
	48 Stunden	0,23

Tab. 3.1 Auflistung der Thresholds. Um den Amplifizierungsplot auswerten zu können, muss der Threshold so gesetzt werden, dass sich der Graph eines jeden Gens im linearen Bereich befindet. Andernfalls sind die Expressionswerte der einzelnen Gene nicht miteinander vergleichbar. Gene bei denen dies nicht möglich ist, können nicht ausgewertet werden.

a 3) Relative Quantifizierung ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)

Um die Genexpression der herangezogenen 150 Gene beurteilen zu können, wertete ich die aus der TaqMan-PCR gewonnenen Daten mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode aus. Hierbei bestimmt man zunächst den C_T -Wert für jedes Gen. Zur Normierung dieser Werte wird der C_T -Wert der endogenen Referenz von den C_T -Werten der ausgewählten Gene abgezogen. Man erhält so ΔC_T , das als Maß für die Genexpressionsstärke des betrachteten Gens dient. Als endogene Referenz diente das Haushaltsgen 18S-rRNA. Seine Expression sollte sich während des Experimentes nicht verändern, da Haushaltsgene im allgemeinen konstant exprimiert werden. Durch diese Normierung ist es möglich unterschiedliche Extraktionsvolumina sowie nicht exakt gleiche Konzentrationen an cDNA beim Beladen der MFCs auszugleichen. Denn nicht die absoluten C_T -Werte sind entscheidend, sondern lediglich $C_{T, \text{sample}} - C_{T, 18S-rRNA}$, d.h. ΔC_T . Dieser Wert drückt dabei aus, wie stark oder schwach die Expression eines Gens im Vergleich zum Haushaltsgen 18S-rRNA ist. In Tabelle 3.2 wird die Berechnung der ΔC_T -Werte beispielhaft für einige Gene dargestellt.

Eine Auflistung aller errechneten ΔC_T -Werte findet sich im Anhang [2. a3) Relative Quantifizierung ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)]. Um die Genexpressionen der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre miteinander vergleichen zu können, subtrahierte ich die ΔC_T -Werte der kontralateralen von denen der ipsilateralen Hemisphäre. Auf diese Weise erhielt ich $\Delta\Delta C_T$. Ein positiver $\Delta\Delta C_T$ -Wert drückt dabei eine geringere Expression des Gens in der ipsilateralen Hemisphäre und damit eine Herunterregulierung aus. Der Betrag des Wertes $\Delta\Delta C_T$ gibt dabei an, um wie viele Zyklen später das Gen auf der ipsilateralen Hemisphäre den Threshold erreicht.

Eine Hochregulierung hat einen negativen $\Delta\Delta C_T$ -Wert zur Folge. In Tabelle 3.3 wird beispielhaft die Berechnung von $\Delta\Delta C_T$ des Gens *Hmgb1* für alle vier Zeitpunkte demonstriert. Hierbei wurde die Expressionsstärke der ischämischen Hemisphäre relativ zur kontralateralen Hemisphäre des Ischämie-Tiers bestimmt. Eine Aufführung aller $\Delta\Delta C_T$ -Werte findet sich im Anhang [2. a3) Relative Quantifizierung ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)] an diese Arbeit.

	Detektor	Task	C_T	ΔC_T
Ischämie 12h / ipsilateral	18S	Endogenous Control	12,27	0
	Hmgb1	Target	28,53	16,26
	Stat3	Target	24,31	12,04
	Ccl9	Target	26,00	13,73
	Plaur	Target	28,39	16,12
	Blnk	Target	26,14	13,88
	Mt2	Target	25,24	12,97
Ischämie 12h / kontralateral	18S	Endogenous Control	12,10	0
	Hmgb1	Target	28,04	15,94
	Stat3	Target	25,17	13,08
	Ccl9	Target	29,791	17,69
	Plaur	Target	31,32	19,23
	Blnk	Target	27,34	15,25
	Mt2	Target	26,26	14,16

Tab. 3.2 Berechnung von ΔC_T . In dieser Tabelle sind die C_T -Werte einiger Gene exemplarisch aufgeführt. Zieht man von diesen den C_T -Wert der endogenen Referenz ab, so erhält man ΔC_T . Dadurch werden die Expressionswerte der Gene normiert.

Hmgb1	ΔC_T ipsi	ΔC_T kontra	$\Delta \Delta C_T$
3h	16,79	15,65	1,13
12h	16,26	15,94	0,32
24h	16,01	15,55	0,46
48h	15,39	15,91	-0,52

Tab.3.3 Berechnung von $\Delta \Delta C_T$. Der Wert $\Delta \Delta C_T$ drückt die Expressionsstärke der ipsilateralen (ipsi) relativ zur kontralateralen (kontra) Hemisphäre aus. Dabei wird ΔC_T kontra von ΔC_T ipsi abgezogen. Positive Werte für $\Delta \Delta C_T$ deuten auf eine Herunterregulierung des Genes auf der ischämiegeschädigten Hemisphäre relativ zur kontralateralen Gehirnhälfte hin. Negative $\Delta \Delta C_T$ -Werte kennzeichnen eine Hochregulierung.

Analog bestimmte ich die $\Delta\Delta C_T$ -Werte für jedes gewählte Gen zu allen vier Zeitpunkten. Die Ergebnisse dieser Auswertung werden in der Abbildung 3.2 gezeigt.

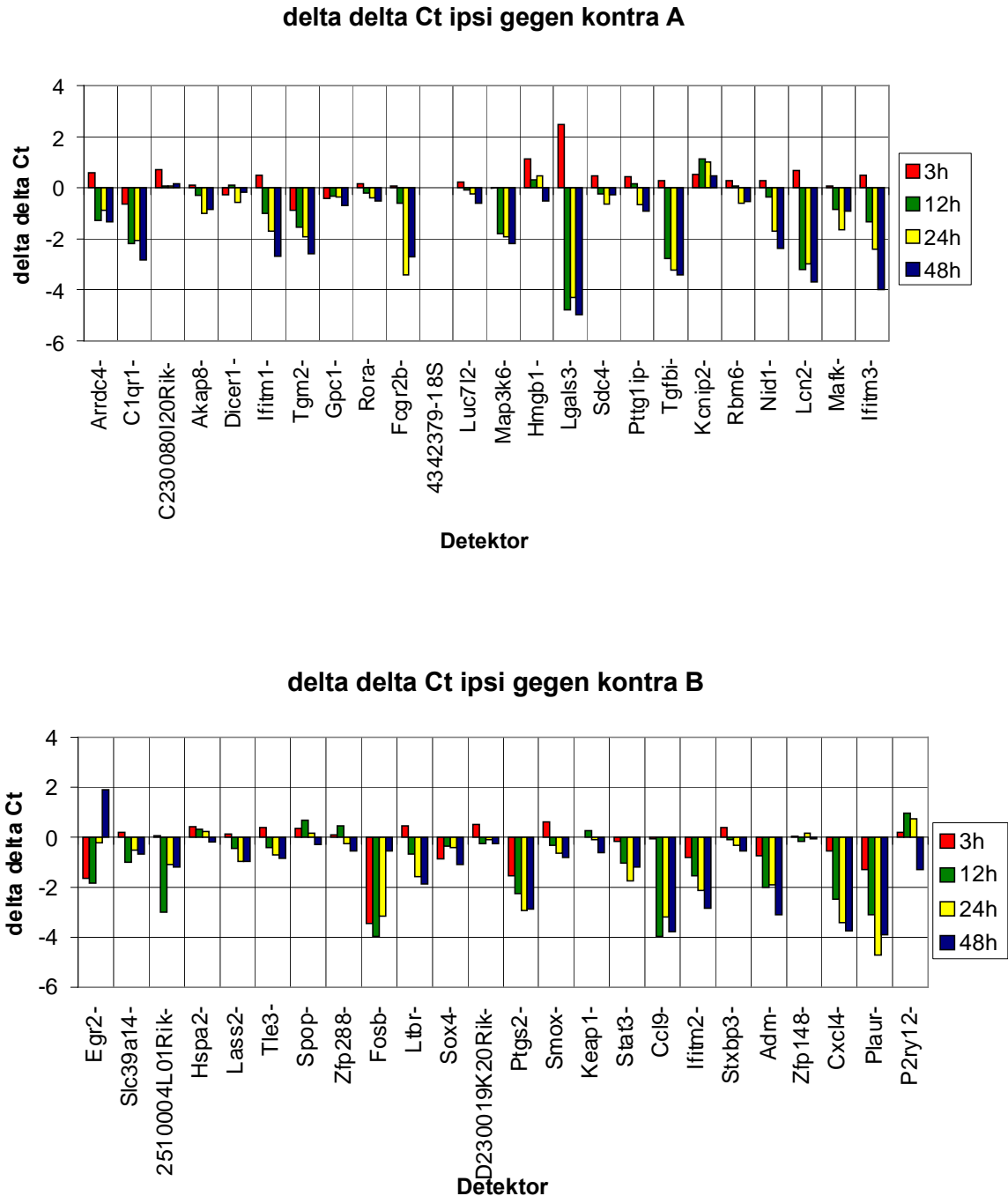


Abb. 3.2 A-B $\Delta\Delta C_T$ ipsi gegen kontra. In den obigen Abbildungen A bis B sind die $\Delta\Delta C_T$ -Werte einiger ausgewählter Gene zu jedem untersuchten Zeitpunkt dargestellt. $\Delta\Delta C_T$ wurde dabei durch die Subtraktion des ΔC_T -Wertes der kontralateralen Hemisphäre des Ischämietieres von der ipsilateralen Hemisphäre berechnet. Dadurch wird eine Regulierung der Gene auf der geschädigten Gehirnhälfte im Vergleich zur nicht geschädigten Gehirnhälfte sichtbar. Negative $\Delta\Delta C_T$ -Werte drücken eine Hochregulierung des Gens aus. Der Betrag des Wertes $\Delta\Delta C_T$ drückt dabei genau aus, wie viele Zyklen früher (bzw. später bei positiven $\Delta\Delta C_T$ -Werten) der Threshold auf der ipsilateralen Hemisphäre erreicht wird. Die $\Delta\Delta C_T$ -Werte der übrigen Gene finden sich in den Abbildungen 3.2 C bis G.

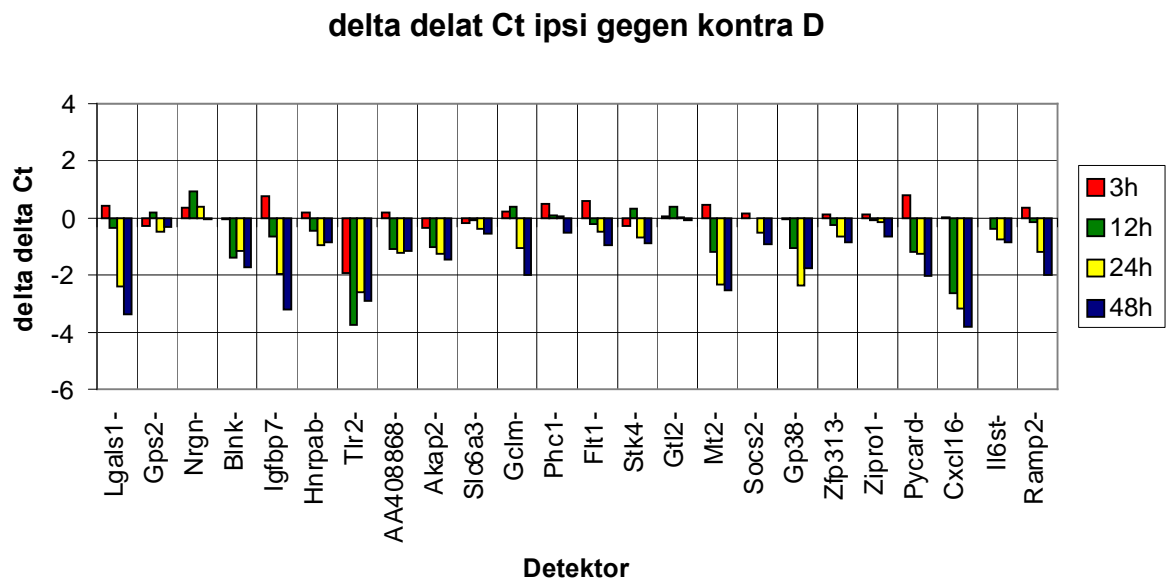
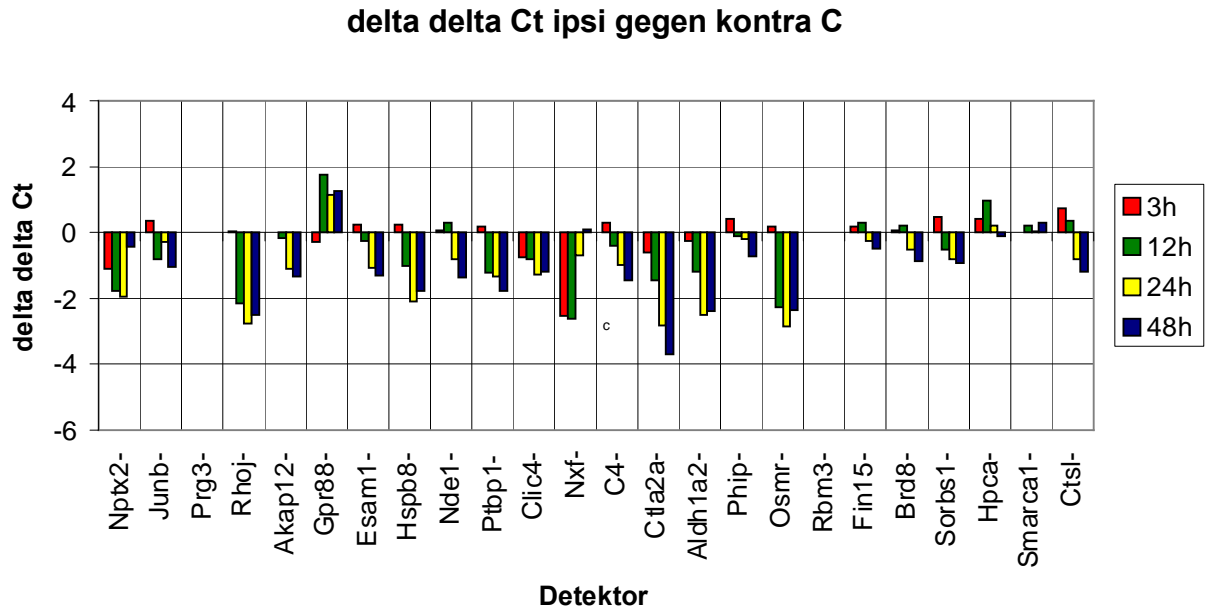


Abb. 3.2 C-D $\Delta\Delta C_T$ ipsi gegen kontra. In den obigen Abbildungen C bis D sind weitere $\Delta\Delta C_T$ -Werte aufgeführt. (Fortsetzung in den Abbildungen 3.2 E bis G)

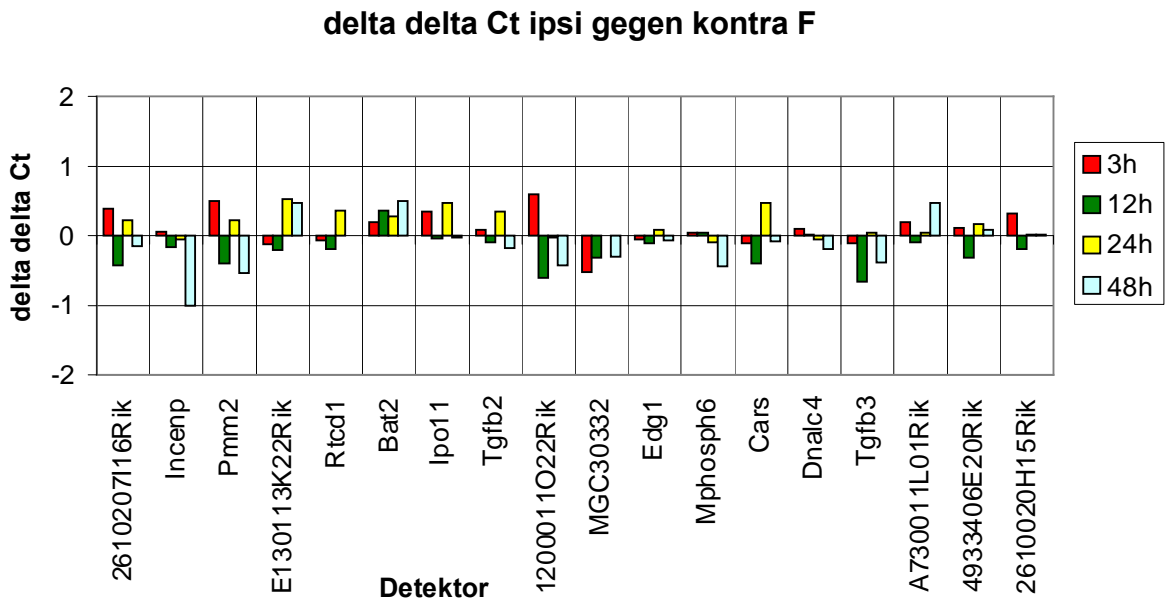
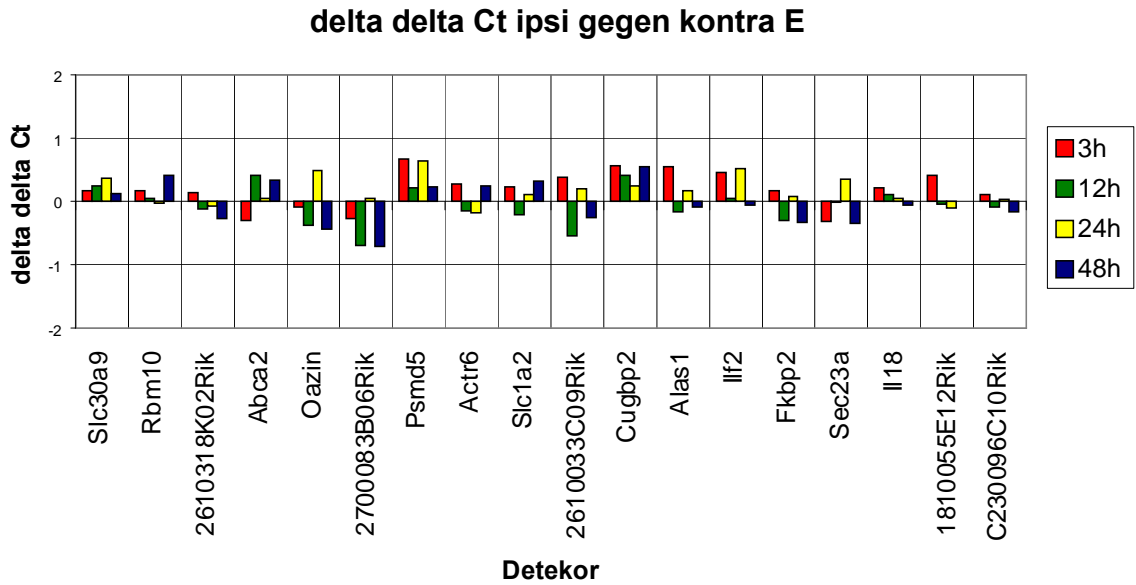


Abb. 3.2 E-F $\Delta\Delta C_T$ ipsi gegen kontra. Die Abbildungen C bis D listen weitere $\Delta\Delta C_T$ -Werte auf. (Fortsetzung in den Abbildungen 3.2 G)

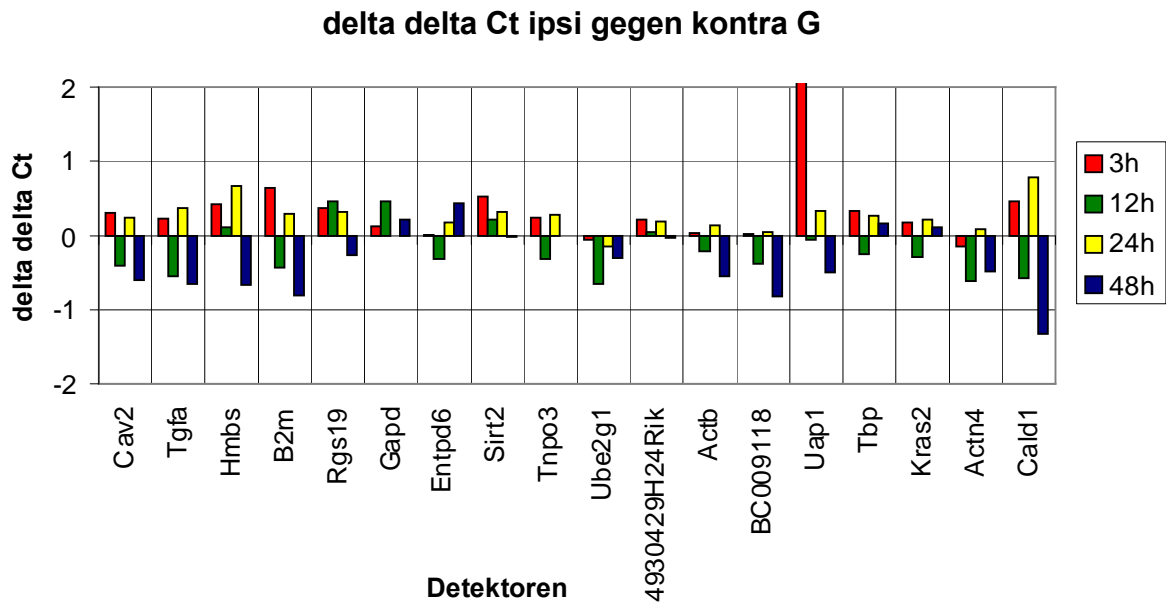


Abb. 3.2 G $\Delta\Delta C_T$ ipsi gegen kontra. In der obigen Abbildung G sind die restlichen $\Delta\Delta C_T$ -Werte der ausgewählten Gene zu jedem untersuchten Zeitpunkt dargestellt. $\Delta\Delta C_T$ ist ein Maß für die Regulierung der Gene auf der geschädigten Gehirnhälfte im Vergleich zur nicht geschädigten Hemisphäre. Wird ein Gen hochreguliert, so ist der $\Delta\Delta C_T$ -Wert negativ.

Neben der Berechnung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte als Ausdruck der Expressionsstärke der ipsilateralen Hemisphäre relativ zur kontralateralen Hemisphäre („ipsi gegen kontra“), bestimmte ich ebenfalls die $\Delta\Delta C_T$ -Werte „Ischämie gegen Sham“, indem ich von den ΔC_T -Werten der ipsilateralen Hemisphäre der Ischämietiere die ΔC_T -Werte der entsprechenden Gehirnhälfte der Shamtiere abzog. Die Ergebnisse waren denen von ipsi gegen kontra ungefähr gleich. Im weiteren Verlauf dieser Arbeiten beschränke ich mich auf die Darstellung von ipsi gegen kontra, da so die Varianzen zwischen verschiedenen Tieren geringer ins Gewicht fallen.

a 4) Reproduzierbarkeit

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wiederholte ich die TaqMan-PCR für 95 Gene. Es wurden die Zeitpunkte drei Stunden und 24 Stunden gewählt und jeweils die ΔC_T -Werte für die ipsilaterale und kontralaterale Gehirnhälfte der Ischämie-Tiere bestimmt. Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch die Gegenüberstellung der Werte für die kontralaterale Hemisphäre zum Zeitpunkt drei Stunden. Die Diagramme für die Zustände drei Stunden/ipsilateral, 24 Stunden/kontralateral und 24 Stunden/ipsilateral besitzen den gleichen Charakter. Im Anhang sind alle berechneten ΔC_T -Werte, die Mittelwerte der ΔC_T -Werte für jedes Gen sowie die Abweichungen von den Mittelwerten aufgelistet [3. a4) Reproduzierbarkeit]. Die rechnerische mittlere Abweichung liegt bei 0,45 ΔC_T . Damit konnte die Reproduzierbarkeit gesichert werden. Für die Gene Prg3 und Rbm3 konnte jedoch kein oder nur ein ΔC_T -Wert bestimmt werden. Deshalb werden sie als Ausreißer betrachtet und gehen in die Wertung nicht mit ein.

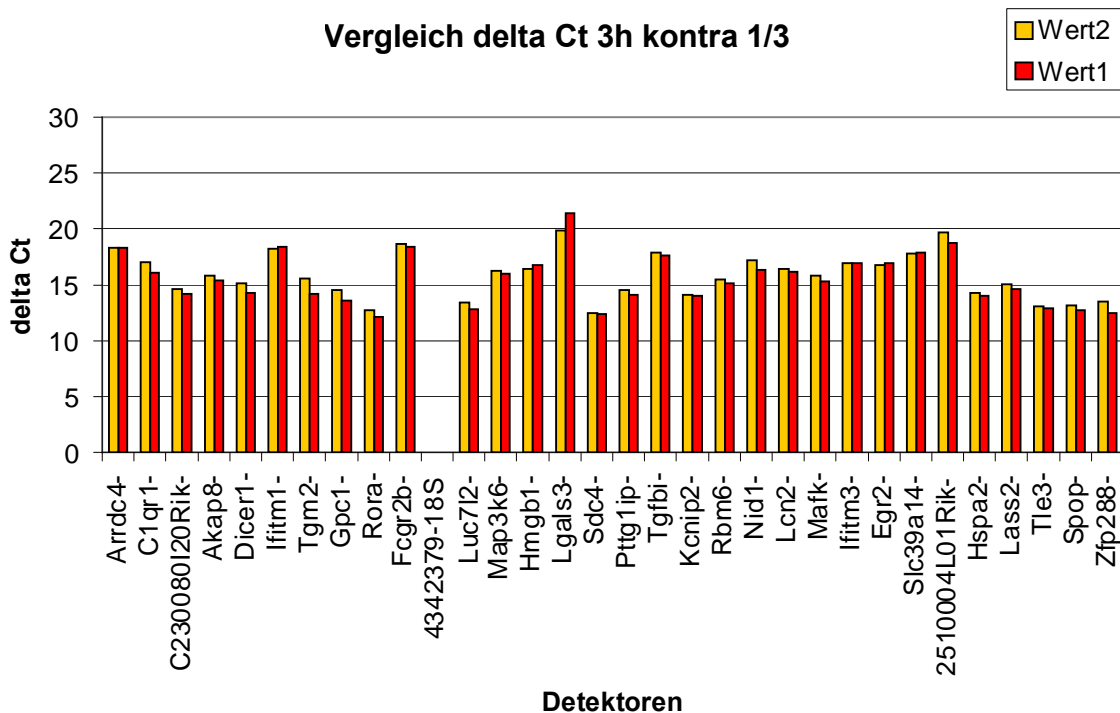


Abb. 3.3 1/3 Reproduzierbarkeit der TaqMan-PCR. Für 95 Gene wurde ΔC_T erneut bestimmt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Hier wurden die ΔC_T -Werte für die kontralaterale Gehirnhälfte zum Zeitpunkt drei Stunden gegenübergestellt. Die mittlere Differenz beider Werte liegt bei $\Delta C_T = 0,45$. Die Graphik zeigt nur einen Teil der untersuchten Gene. Die Fortsetzung auf der nächsten Seite zu sehen.

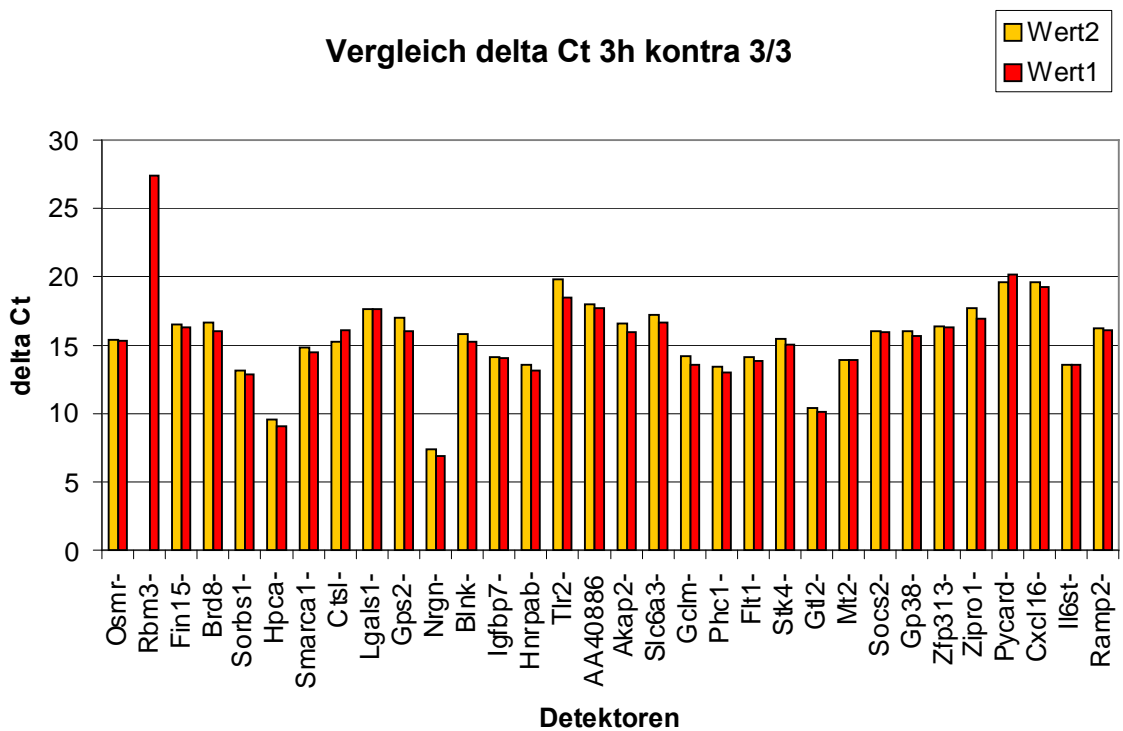
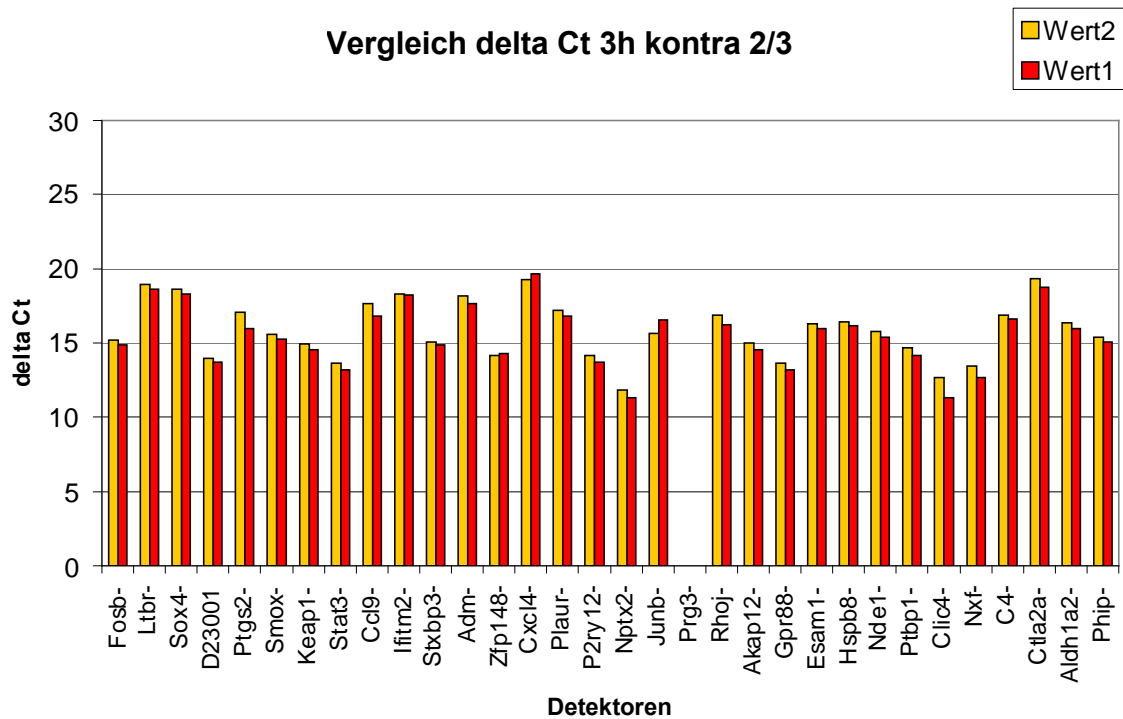


Abb. 3.3 2/3 und 3/3 Reproduzierbarkeit der TaqMan-PCR. Diese Abbildung zeigt die Expressionswerte der verbleibenden Gene der kontralateralen Hemisphäre zum Zeitpunkt drei Stunden.

Da bei der $\Delta\Delta C_T$ -Berechnung die mittlere Abweichung von 0,45 ΔC_T zweimal zum tragen kommt, ist die mittlere Abweichung für $\Delta\Delta C_T = 0,9$. Die folgende Formel veranschaulicht diesen Sachverhalt.

$$\Delta C_{T, \text{ipsilateral}} (\pm 0,45) - \Delta C_{T, \text{kontralateral}} (\pm 0,45) = \Delta\Delta C_T (\pm 0,9)$$

a 5) Berechnung des Fold Change

Da die $\Delta\Delta C_T$ -Werte nur den relativen Zyklusabstand beim Erreichen des Thresholds angeben, sind sie wenig anschaulich. Außerdem sollen die TaqMan-Daten im gleichen Format wie die GeneChip-Daten vorliegen, um eine Vergleichbarkeit gewährleisten zu können. Deshalb wurden die $\Delta\Delta C_T$ -Werte in Fold Change-Werte (FC) umgerechnet. Sie drücken aus, um welches Vielfache die Gene auf der ipsilateralen Hemisphäre hochreguliert sind.

Die Formel dazu lautet:

$$\text{fold change} = \begin{cases} 2^m & | m \geq 0 \\ (-1) * 2^{-m} & | m < 0 \end{cases} \quad \text{wobei } m = -\Delta\Delta C_T$$

Ist die Expression eines untersuchten Gens in der ipsilateralen Hemisphäre genauso groß wie in der kontralateralen, so ist $FC=1$. Ist die Expression dreimal so hoch, dann ist $FC = 3$. Analog ist $FC = -2$, wenn die Expression in der ipsilateralen Hemisphäre nur halb so groß wie in der kontralateralen Hemisphäre ist. Das Gen wurde also in diesem Fall herunterreguliert. Die so erhaltenden FC-Werte habe ich im folgenden Abschnitt mit den Werten der Affymetrix-Hybridisierungs-Experimente verglichen.

Ebenso wie für jeden einzelnen $\Delta\Delta C_T$ -Wert, kann auch für die mittlere Abweichung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte von $\pm 0,9$ ein Fold Change-Wert berechnet werden. Er liegt bei $\pm 1,87$. Die Anzahl der ermittelten Werte genügt zwar nicht für eine vollständige Fehleranalyse, reicht aber für eine grobe Abschätzung der zu erwartenden Abweichungen aus. Das heißt, die tatsächliche Genexpression kann durchschnittlich 1,87fach höher oder geringer als der ermittelte Wert ausfallen.

a 6) Vergleich der TaqMan-Daten mit den Affymetrix-Daten

Zur Validierung der Affymetrix-Hybridisierungs-Daten habe ich im vorherigen Abschnitt die Expressionsstärke der betrachteten Gene ermittelt und sie ins FC-Format gebracht. Für den Vergleich der TaqMan-PCR-Ergebnisse mit den Affymetrix-Hybridisierungs-Daten bietet sich eine graphische Gegenüberstellung an, da es für dieses Experiment nicht nur wichtig ist, dass die Expressionsstärke zu den einzelnen Zeitpunkten, sondern auch der allgemeine Verlauf der Hoch- bzw. Herunterregulierung bestätigt werden kann. Es wurden drei Zeitpunkte (3, 12, und 24 Stunden) miteinander verglichen. Um lebende Ressourcen zu sparen, wurde auf die Zeitpunkte eine und sechs Stunden verzichtet. Ich habe vier Gruppen gewählt, denen die Gene zugeordnet werden können. Der Bewertungsmaßstab ist wie folgt:

- +/+ Die Tendenz, d.h. die Linienführung des Graphen ist sehr ähnlich. Das bedeutet im Einzelnen, dass die Gene bei beiden Methoden der Expressionsbestimmung eine ähnliche zeitliche Abfolge der Hoch- und Herunterregulierung zeigen. Hierfür wird das erste Plus erteilt. Des Weiteren haben mindestens zwei der drei zu vergleichenden Zeitpunkte eine Fold Change-Differenz zwischen TaqMan- und Affymetrix-Daten unter 2,5.
- +/- Die Tendenz ist ähnlich, aber mindestens zwei Zeitpunkte haben eine FC-Differenz von mehr als 2,5.
- /+ Die Tendenz ist eher unähnlich, aber mindestens zwei Zeitpunkte haben eine FC-Differenz unter 2,5.
- /- Die Tendenz ist ebenfalls eher unähnlich und mindestens zwei Zeitpunkte haben eine FC-Differenz von mehr als 2,5.

In Abbildung 3.4A bis F sind einige graphische Vergleiche beispielhaft aufgeführt und ihre Einordnung in eine der vier Gruppen erklärt.

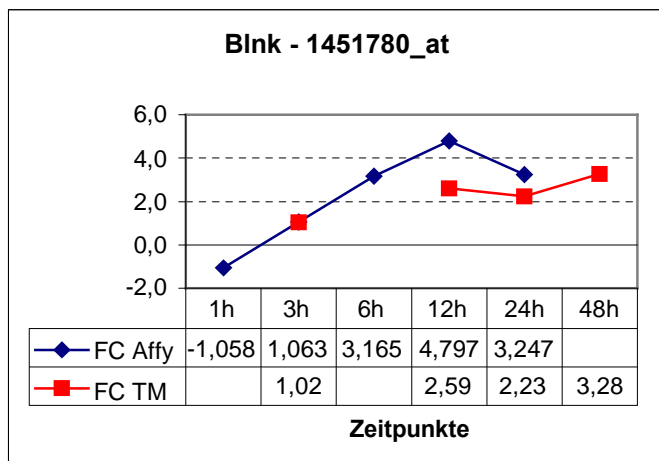


Abb. 3.4A Graphische Validierung des Gens Blnk. Es werden die FC-Werte resultierend aus den Affymetrix-Hybridisierungs-Daten (Affy) und der TaqMan-PCR (TM) für das Gen Blnk (B-cell linker) verglichen. Da sich beide Kurven im Verlauf sehr ähneln und die beiden FC-Werte für jeden Zeitpunkt weniger als 2,5 Einheiten auseinander liegen, habe ich dieses Gen als validiert (+/+) gewertet. Genauere Erklärungen der Validierungskriterien finden sich im Text. 1451780_at ist die Affymetrix-Nomenklatur des Gens Blnk.

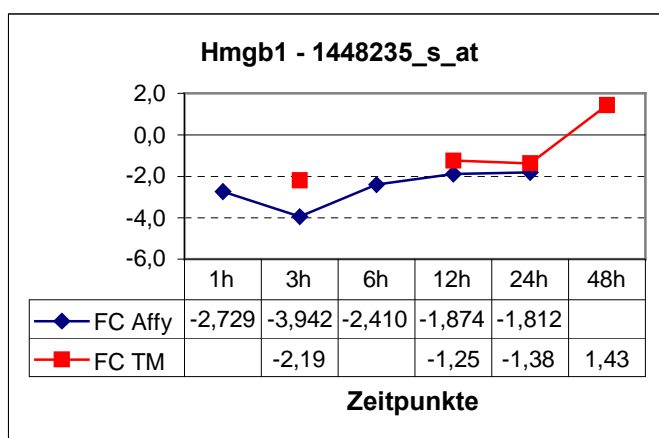


Abb. 3.4B Graphische Validierung des Gens Hmgb1. Der Vergleich beider Kurven für das Gen Hmgb1 (high mobility group box 1) lies ebenfalls auf eine Validierung (+/+) schließen. 1448235_s_at kennzeichnet die Affymetrix-Nomenklatur des Gens Hmgb1.

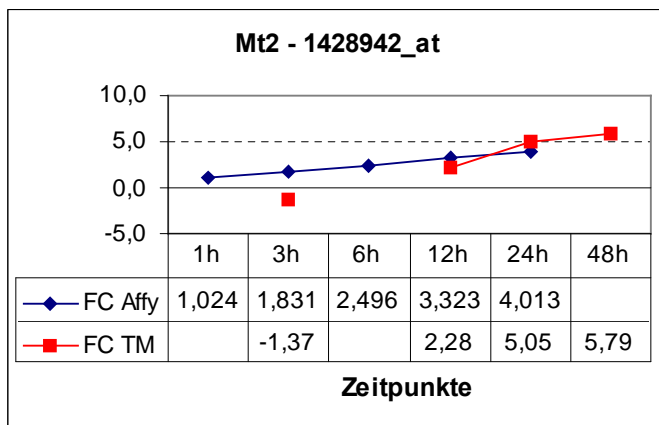


Abb. 3.4C Graphische Validierung des Gens Mt2. Aufgrund des ähnlichen Kurvenverlaufs und einer Differenz der FC-Werte unter 2,5, konnte das Gen für Metallothionein ebenfalls validiert (+/+) werden. 1428942_at beschreibt dabei die Affymetrix-Nomenklatur dieses Gens.

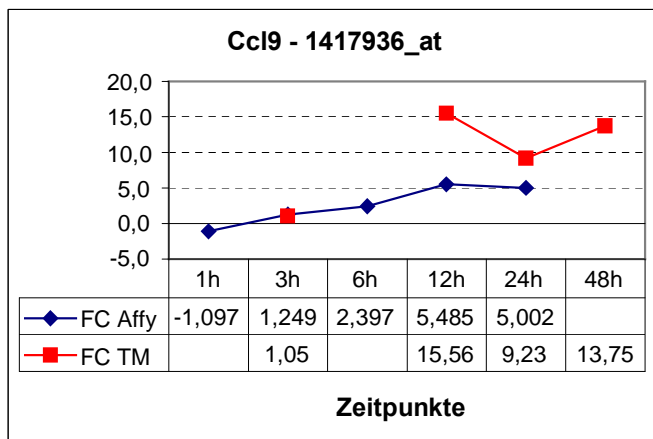


Abb. 3.4D Graphische Validierung des Genes Ccl9. Der Vergleich beider Kurven für das Gen chemokine (C-C motif) ligand 9 lies auf eine (+/-)-Validierung schließen, da die Kurven zwar ähnlich verlaufen, aber zwei Punkte eine Differenz größer als 2,5 haben. Die Affymetrix-Nomenklatur des Genes Ccl9 ist 1417936_at.

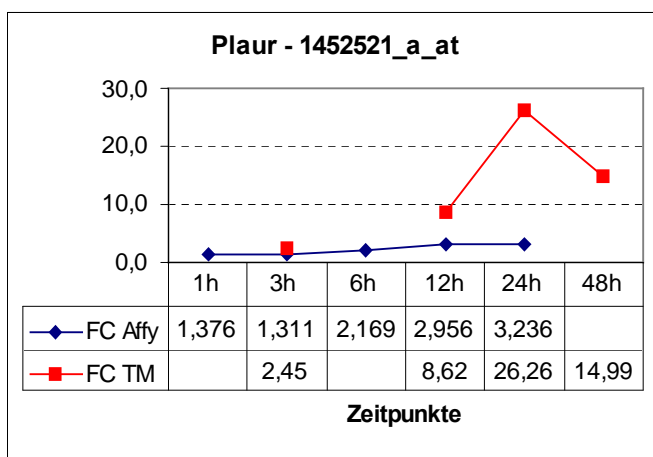


Abb. 3.4E Graphische Validierung des Genes Plaur. Wie zuvor bei Ccl9 folgt auch hier aus dem Vergleich beider Kurven eine (+/-)-Validierung. Plaur wird auch als uPAR (urokinase plasminogen activator receptor) bezeichnet. Die entsprechende Affymetrix-Nomenklatur ist 1452521_a_at.

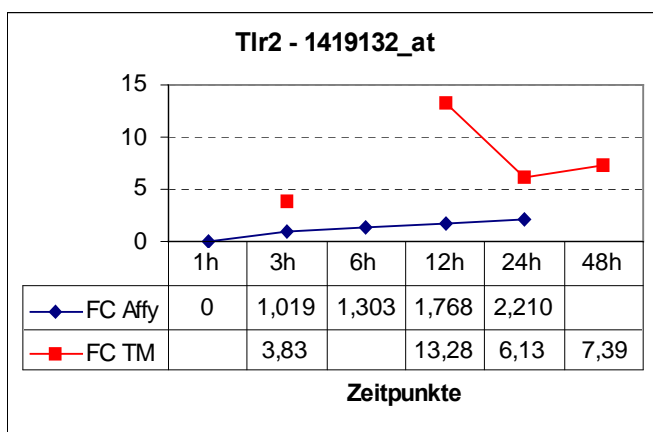


Abb. 3.4F Graphische Validierung des Genes Tlr. Für den toll like receptor zeigt weder der Kurvenverlauf eine ausreichende Ähnlichkeit, noch besitzen die zusammengehörigen FC-Werte eine Differenz unter 2,5. Dieses Gen kann unter den hier gewählten Kriterien nicht eindeutig validiert werden (-/-). 1419132_at ist die Affymetrix-Nomenklatur für Tlr2.

Von allen 150 ausgewählten Genen konnten 96 mit +/+, 19 mit +/- und 31 mit -/+ validiert werden. Für vier Gene war nur eine Zuordnung in die Gruppe -/- und infolgedessen auch keine eindeutige Bestätigung möglich. Tabelle 3.4 listet alle Gene und ihre Einteilung auf.

Wertung	Gene				Anzahl
+/+ Tendenz ähnlich, Werte ähn- lich (mindestens 2 Werte haben eine Differenz unter FC = 2,5)	AA408868 Akap12 Akap2 Akap8 Aldh1a2 Blnk C1qr1 C230080120Rik C4 Clic4 D230019K20Rik k Dicer1 Ergr2 Esam1 Fcgr2b Fin15 Flt1 Gclm Gp38 Gpc1 Gpr88 Gps2 Gtl2 Hmgb1	Hpca Hspb8 Ifitm1 Ifitm2 Ifitm3 Igfbp7 Il6st Kcnip2 Keap1 Lass2 Lcn2 Lgals1 Ltbr Mafk Map3k6 Mt2 Nid1 Nxf Phip Ptbp1 Ptgs2 Pttglip Pycard Rhoj	Sdc4 Slc39a14 Slc6a3 Smox Socs2 Sorbs1 Sox4 Spop Stat3 Stxbp3 Tgfbi Tgm2 Tle3 Zfp288 Zipro1 1200011O22Rik 1810055E12Rik 2610020H15Rik 2610207L16Rik 2610318K02Rik 4930429H24Rik 4933406E20Rik A730011L01Rik Abca2	Actr6 Bat2 C230096C10Rik Cald1 Cugbp2 Dnalc4 E130113K22Rik Entpd6 Gapd Il18 Ilf2 Incenp Mphosph6 Oazin Pmm2 Rbm10 Rgs19 Sirt2 Slc1a2 Slc30a9 Tbp Tgfb2 Tnp03 Uap1	96
+/- Tendenz ähnlich, Werte un- ähnlich	Adm Ccl9 Ctla2a Ctsl Cxcl4	Cxcl16 Hspa2 Junb Lgals3 Nde1	Nptx2 Nrgn Osmr P2ry12 Phc1	Plaur Zfp148 Zfp313 2610510H01Rik	19
-/+ Tendenz unähnlich, Werte ähn- lich	2510004L01Rik Arrdc4 Brd8 Hnrapab Luc712 Ramp2 Rora Smarca1	Stk4 2610033C09Rik 2700083B06Rik Actb Actn4 Alas1 B2m Bc009118	C230096C10Rik Cars Cav2 Edg1 Fkbp2 Hmbs Ipo11 Kras2	Mgc30332 Psm5 Rted1 Sec23a Tgfa Tgfb3 Ube2g1	31
-/- Tendenz und Werte un- ähnlich	Fosb Rbm3 Rbm6 Tlr2				4

Tab. 3.4 Auflistung der Zugehörigkeiten der 150 Gene zu den Validierungsgruppen. Die überwiegende Menge an Genen konnte auf Grund der Einordnung in die Gruppe +/+ sehr gut validiert werden. Die Expression konnte für nur vier Gene nicht eindeutig bestätigt werden.

Es konnten somit 63% aller Gene sehr gut validiert werden. Fasst man die Gruppen +/- und -/+ zusammen, so führt das zu weiteren 34%, die relativ gut bestätigt wurden. Für 3% der Gene konnten die Affymetrix-Daten nicht belegt werden. Eine graphische Veranschaulichung ist in der Abbildung 3.5 dargestellt.

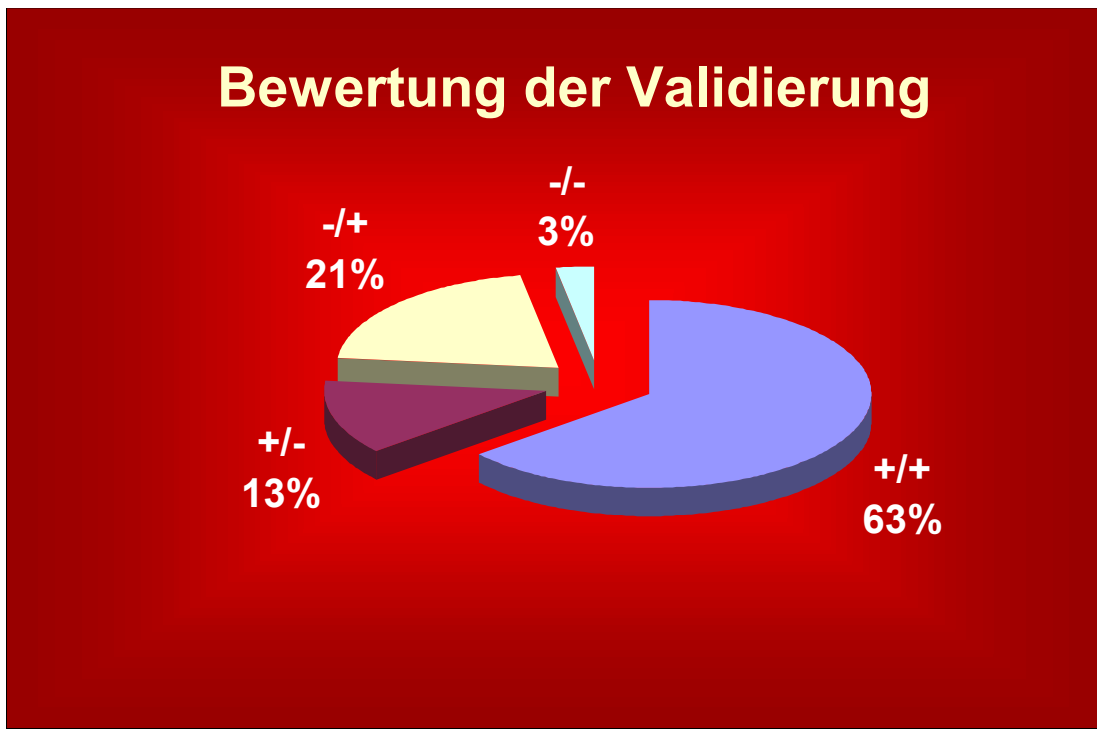


Abb.: 3.5 Bewertung der Validierung. Von 150 Genen konnten 96 Gene in die Gruppe +/+ geordnet und somit sehr gut validiert werden. Das entspricht einem Prozentsatz von 63%. Weitere 34% konnten relativ gut belegt werden. Hierbei wurden die 19 Gene der Gruppe +/- und 31 Gene der Gruppe -/+ zusammengefasst. Für 3% bzw. 4 Gene konnte auf keine eindeutige Bestätigung der Affymetrix-Hybridisierungsdaten geschlossen werden.

b) Immunohistochemie

Mit Hilfe der Immunohistochemie (IHC) sollen Proteine detektiert werden. So sollen Rückschlüsse über den genauen Ort der Expression dieser Proteine im Hirngewebe möglich sein. Zum anderen soll die Übertragbarkeit der Genexpressionsdaten auf tatsächlich vorhandene Proteinprodukte überprüft werden, da nicht immer davon ausgegangen werden kann, dass eine Hochregulierung der Genexpression in einer vermehrten Produktion des entsprechenden Proteins mündet. So ist es denkbar, dass die Proteinmenge auch durch andere Prozesse als die der Transkriptionsregulierung beeinflusst wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Zelle auf Grund der fortgeschrittenen pathogenetischen Prozesse nicht mehr in der Lage ist, das Transkript entsprechend in Protein umzusetzen. Zur Markierung der ausgewählten Genprodukte griff ich auf die Zwei-Schritt indirekte Methode zurück. Die Proteine werden dabei von primären und fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern spezifisch erkannt. Mt2 und Blnk wurden mit primären Maus-Antikörpern, Ccl9, Hmgb1 und Plaur mit primären Kaninchen-Antikörpern angefärbt. Eine Hochregulierung des Proteins mündet hierbei in einem Anstieg der Fluoreszenz. Je höher der FC-Wert ist, desto stärker ist die ipsilaterale Hochregulierung, d.h. desto stärker ist die zu erwartende immunohistochemische Anfärbung. Die Mäusehirne wurden dabei in der Frontalebene in 20 µm Sektionen geteilt. Schnitte aus drei verschiedenen Gehirnbereichen (interaureale 5,34 cm, 3,94 cm und 1,86 cm) wurden anschließend auf einen Objektträger gebracht und für die Immunohistochemie verwendet.

Für eine erfolgreiche immunohistochemische Detektion sind verschiedene Optimierungen notwendig. Im Folgenden werden nur die letzten Ergebnisse präsentiert.

b 1) Immunohistochemische Anfärbung von Mt2 (Metallothionein2)

Zunächst wurde versucht, das Protein Metallothionein in den Mäusehirnschnitten anzu-färben. Von diesem Protein ist eine Hochregulierung innerhalb des hier untersuchten Hirnschlagkontextes bereits gezeigt worden (Trendelenburg et al., 2002).

Für die Färbung benutze ich den primären Antikörper mouse anti-Mt2 und den sekundären Antikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L). Der primäre Antikörper sollte aufgrund seiner Monoklonalität eine Mouse on Mouse-Färbung möglich machen. Leider ist das nicht gelungen. Eine immunohistochemische Anfärbung brachte fadenförmige Strukturen zum Vorschein, wie in Abbildung 3.6 erkennbar ist. Diese Strukturen sind aber ebenso darstellbar, wenn man die Schnitte nur mit dem sekundären Anti-körper inkubiert (nicht mit abgebildet). Das heißt, es handelt sich hierbei nicht um eine spezifische Färbung von Metallothionein-Proteinen, da nicht der primäre, sondern allein der sekundäre Antikörper für das Anfärbungsmuster verantwortlich ist. Des weiteren lassen die fadenförmigen Strukturen im angefärbten Schnitt auf Endothelien schließen. Metallothionein wird aber in Neuronen beispielsweise in Astrozyten exprimiert. Letzteres ist ebenfalls ein Indiz für das Nichtgelingen der Metallothionein-Anfärbung mit den oben genannten Antikörpern. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass obwohl ein monoklonaler Mausantikörper gegen Metallothionein verwendet wurde, dessen Eignung für Mäusegewebeschnitte ausgepriesen war, keine Anfärbung von Metallothionein-Proteinen möglich war.

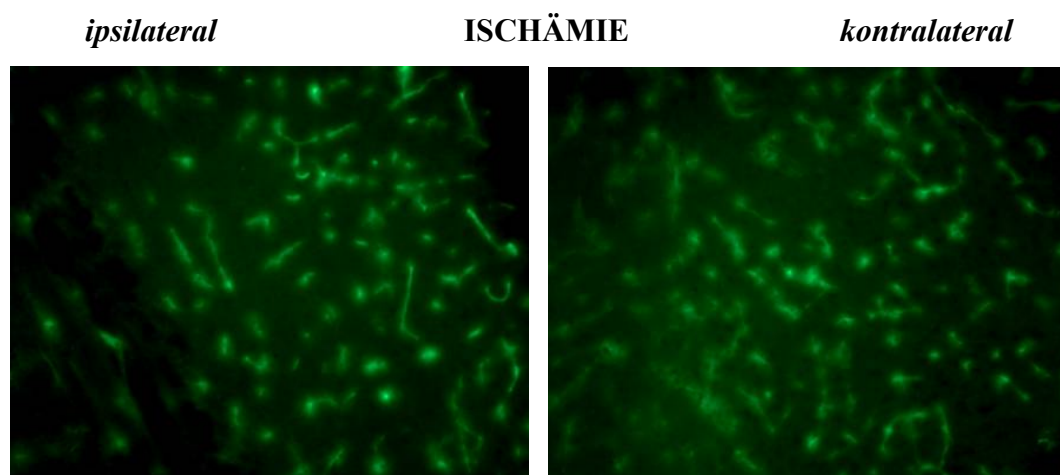


Abb. 3.6 Anfärbung von Metallothionein. Links ist die ipsilaterale und rechts die kontralaterale Hemisphäre dargestellt. Dieser Mäusehirnschnitt wurde mit den primären Antikörper mouse anti-Mt2 und den sekundären Antikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) inkubiert. Die negative Kontrolle der alleinigen Inkubation mit dem sekundären Antikörper zeigt das gleiche Erscheinungsbild. Ferner sind in diesem Bild fadenförmige Strukturen sichtbar. Sie weisen auf Endothelien hin. Metallothionein wird jedoch von Neuronen exprimiert.

Aus diesem Grunde griff ich auf den Mouse on Mouse-Färbe-Kit (Vector M.O.M. Fluorescein Kit) zurück, der eine Verwendung von Mausantikörpern auf Mausgeweben möglich macht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7 zu sehen. Metallothionein erscheint durch den mit Fluorescein konjugierten sekundären Antikörper grün. In den blauen Abbildungen sind angefärbte Zellen dargestellt. Eine Negativkontrolle brachte keinerlei Anfärbung hervor, die sich vom allgemeinen Background abhebt (nicht mit abgebildet). Hier wird also im Vergleich zur vorangegangenen Methode, das Anfärbungsmuster vom primären Antikörper verursacht. Dem hinzuzufügen ist das punktuelle Färbungsmuster. Es deutet darauf hin, dass es sich bei Metallothionein wie erwartet um ein neuronal exprimiertes Protein handelt. Weiterhin auffällig ist die erkennbare Seitendifferenz zwischen der ipsilateralen Hemisphäre (links im Bild) und der kontralateralen Hemisphäre (rechts im Bild). Entsprechend der Genexpressionsdaten ist eine deutliche Hochregulierung von Metallothionein auf der ipsilateralen Hemisphäre relativ zur kontralateralen zu

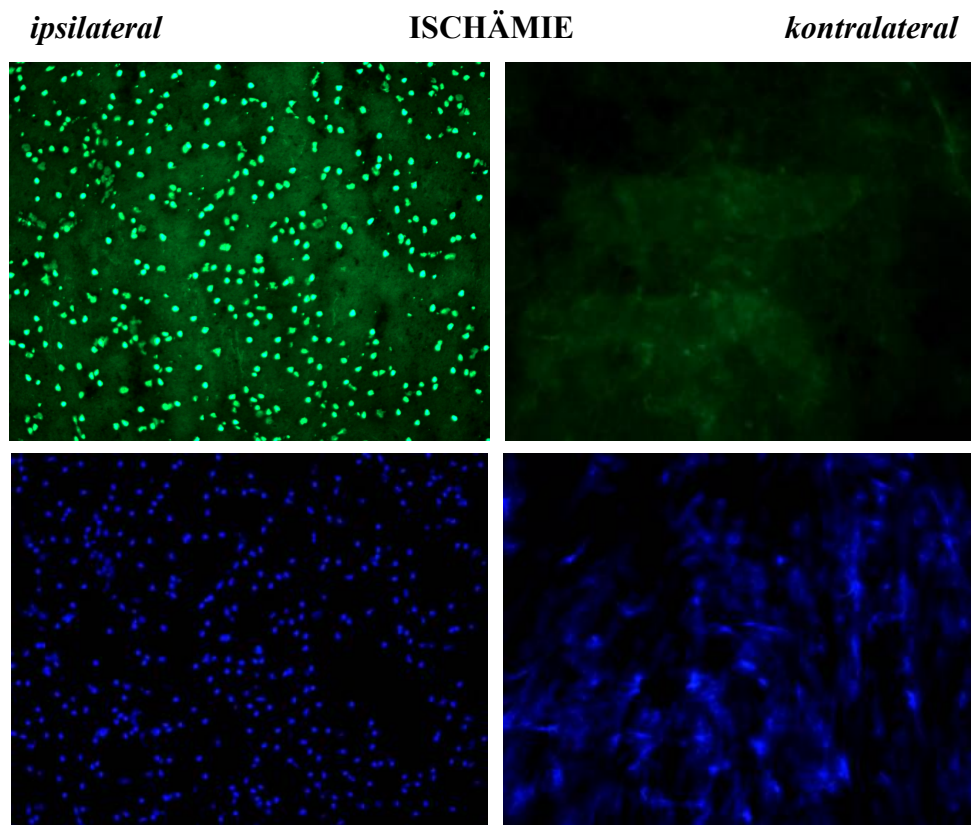


Abb. 3.7 Anfärbung vom Metallothionein im Hirnschnitt eines Ischämietiers mit Hilfe des M.O.M.-Kits, 48 Stunden. Die oberen, grünen Abbildungen präsentieren die Proteinfärbungen mit Antikörpern, die unteren, blauen Abbildungen zeigen die Zellkernanfärbung mit Hoechst. Links ist die ipsilaterale und rechts die kontralaterale Hemisphäre zu sehen. Hier wird eine zelluläre Anfärbung von Metallothionein auf der ipsilateralen Hemisphäre (links) dargestellt. Allerdings ist das kontralaterale Gehirngewebe sehr zerstört. Darauf weist die Hoechstfärbung (unten rechts) hin, bei der keine intakten Zellen mehr zu erkennen sind.

erwarten. Der Fold Change liegt für die 48-Stunden-Tiere bei 5,79. Von einer Bestätigung dieses Wertes auszugehen wäre allerdings vorschnell. Das kontralaterale Gehirngewebe ist sehr zerstört. Die Hoechstfärbung (unten rechts) lässt keine intakten Zellen mehr erkennen. Die Metallothionein-Anfärbung ist zellulär. Daher ist kontralateral jedoch keine Detektion zu erwarten. Der schlechte Erhalt des Gewebes lässt sich teilweise auf das Verwenden eines Methanol/Aceton-Gemisches zur Postfixierung zurückführen. Besser geeignet, obgleich noch nicht optimal ist PFA (Paraformaldehyd) als Postfixierungsmittel. Dieses konnte hier allerdings aufgrund seiner Inkompatibilität mit dem M.O.M.-Kit nicht angewandt werden.

Abbildung 3.8 zeigt die Anfärbung des Gehirnschnitts eines Sham-Tieres, das als Vergleich zur Anfärbung im Ischämie-Tier dienen sollte. Auch hier ist eine mangelnde Fixierung des Gewebes sichtbar. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Metallothionein-Färbung noch nicht ausreichend geglückt ist. Künftig muss es zunächst gelingen, dass Gewebe besser zu fixieren. Anschließend wird die Optimierung der Konzentrationen von Antikörper- und Blockierungslösungen sowie der Inkubationszeiten und Temperaturen erfolgen.

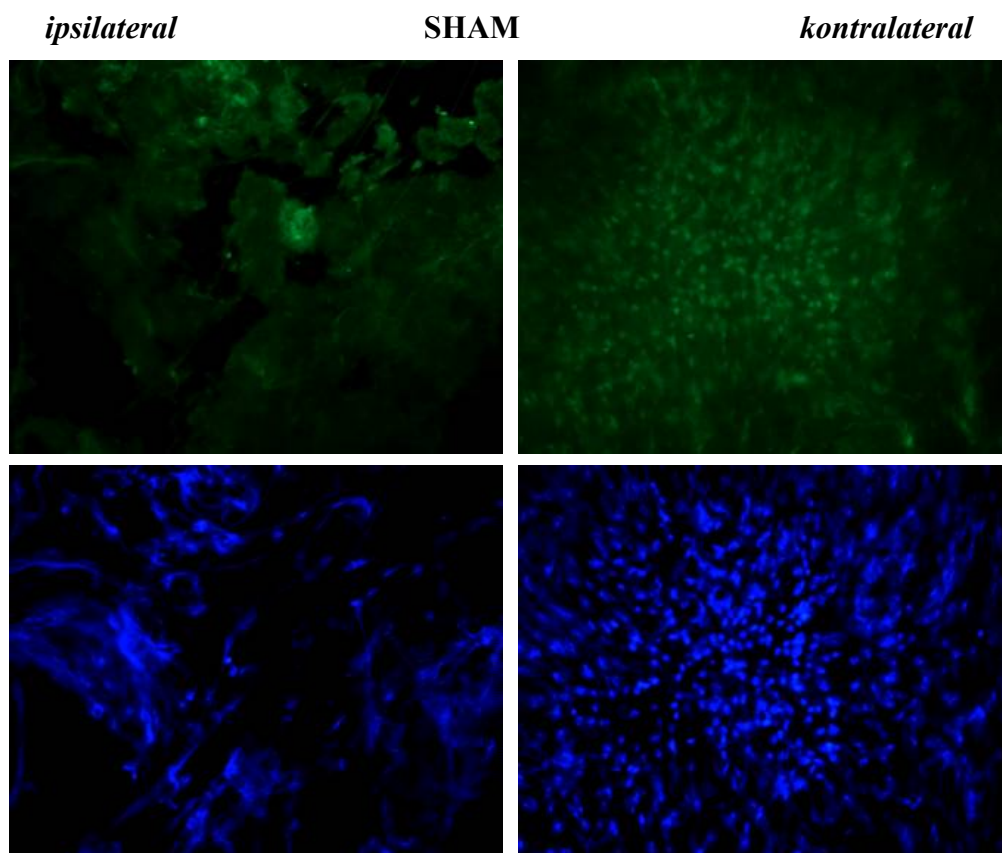


Abb. 3.8 Anfärbung vom Metallothionein im Hirnschnitt eines Shamtiers mit Hilfe des M.O.M.-Kits, 48 Stunden. Auf der linken Seiten ist die ipsilaterale und auf rechten die kontralaterale Hemisphäre abgebildet. Die Hoechstfärbung weist auf eine starke Zerstörung des Gewebes hin.

b 2) Immunohistochemische Anfärbung von Blnk (B-cell linker)

Die Immunohistochemie für Blnk wurde mit dem primären Antikörper mouse anti-Blnk und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) durchgeführt. Für die 48-Stunden-Tiere konnte im Vorfeld ein Fold Change von 3,28 ermittelt werden. Aus diesem Grunde ist mit einer ipsilateralen Hochregulierung zu rechnen. Da Blnk ein Molekül der intrazellulären Signalkaskade ist (DeFranco, 1977, Genomics Institute of the Novartis Research Foundation), wird außerdem eine zelluläre Färbung erwartet. Die Ergebnisse dieser Anfärbung sind in Abbildung 3.9 zu sehen. Da der anti-Blnk ein Antikörper aus der Maus ist, besteht hier das gleiche Problem, wie auch schon zuvor bei der Mt2-Anfärbung. Der sekundäre Antikörper färbt das Gewebe ohne vorherige Detektion durch primäre Antikörper. Allerdings ist das fadenförmige Erscheinungsbild angefarbter Endothelien hier nur kontralateral im Ischämie-Tier und im Sham-Tier wiederzufinden. Die Fotografien der ipsilateralen Hemisphäre im Ischämie-Tier zeigen eine flächige unspezifische Anfärbung. Die entsprechende Hemisphäre des Sham-Tiers weist ein eher „wolkiges“ Färbungsmuster auf. Das geht möglicherweise erneut auf eine mangelnde Fixierung zurück.

Eine weitere Optimierung der immunohistochemischen Färbung von Blnk wird mit der Verbesserung der Fixierung beginnen, mit dem Einsatz des M.O.M.-Kits zur Anfärbung fortschreiten und mit der Optimierung der Konzentrationen sowie Inkubationszeiten und -temperaturen enden.

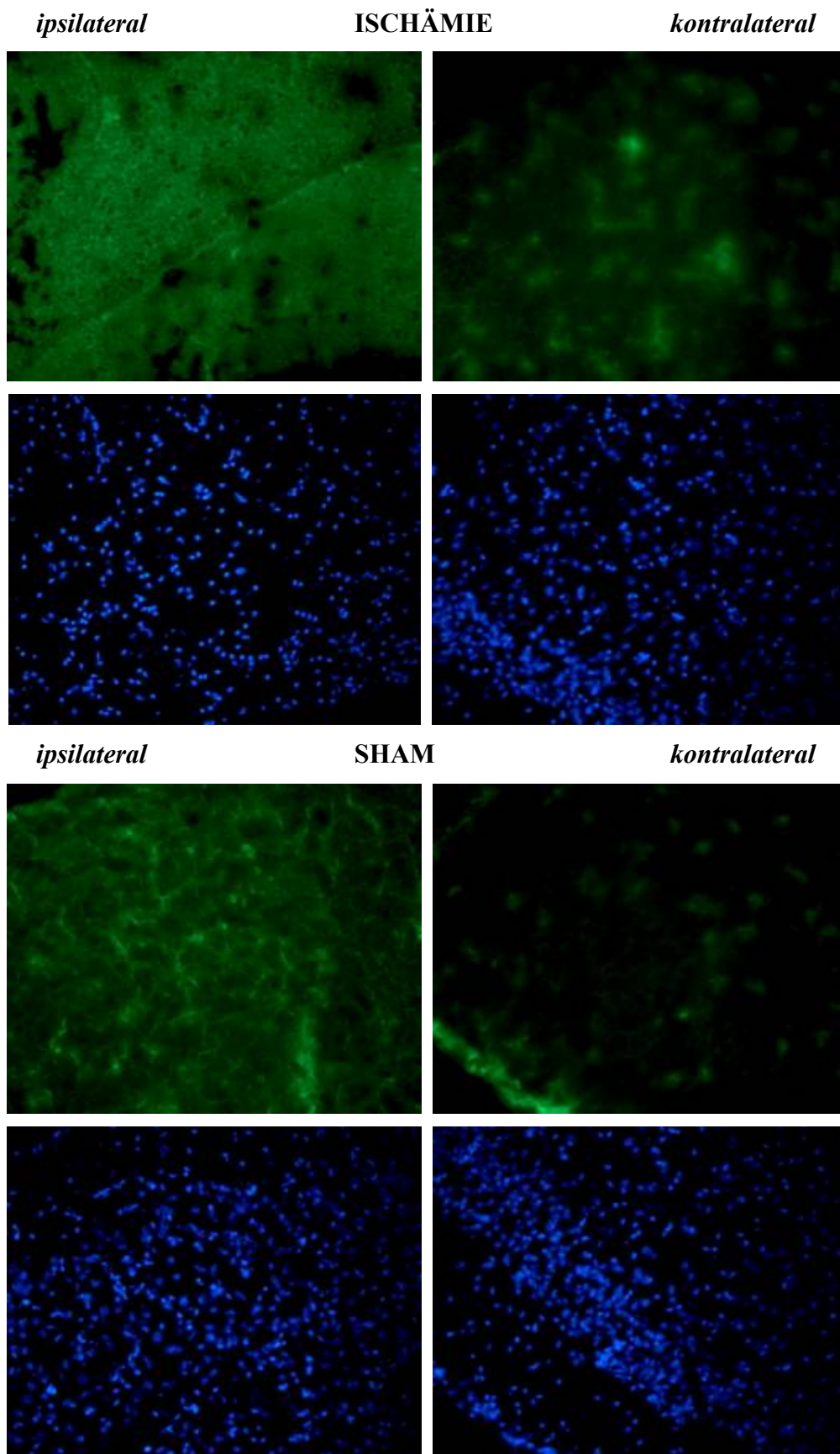


Abb. 3.9 Anfärbung von Blnk. Diese Abbildung zeigt die IHC von Blnk im ischämischen Tier (oben) und im Sham-Tier (unten). Es ist keine spezifische Anfärbung zu erkennen.

b 3) Immunohistochemische Anfärbung des Chemokins Ccl9

Zur Anfärbung des Proteins chemokine (C-C motif) ligand 9 bzw. Ccl9 wurden die Gewebeschnitte zunächst mit PFA postfixiert und anschließend mit dem primären Antikörper rabbit anti-MRP2 und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) inkubiert. Ccl9 ist ein chemotaktisches Cytokin, das beispielsweise von Leukozyten und Stromazellen gebildet wird (Yang and Odgren, 2005) und durch die Bindung an G-Proteinrezeptoren chemoattraktorische Bewegungen auslöst (Abdi et al., 2004, Young et al., 1995) oder Differenzierungen von Zellen bewirken kann (Yang and Odgren, 2005). Abbildung 3.10 zeigt die Anfärbung mit einer primären Antikörperverdünnung von 1:100. Die Detektion von Ccl9 ist nur unzureichend. Das Signal-to-Noise-Verhältnis ist zu schwach bzw. der Background ist im Vergleich zu den angefärbten Zellen deutlich zu stark. Eine Verringerung der Antikörperkonzentration führt in der Regel zu einer Verbesserung dieses Verhältnisses. Leider ist das hier nicht gelungen. Eine Konzentrationsverringerung der Antikörper zeigt nur eine universelle Abnahme der Anfärbungsstärke.

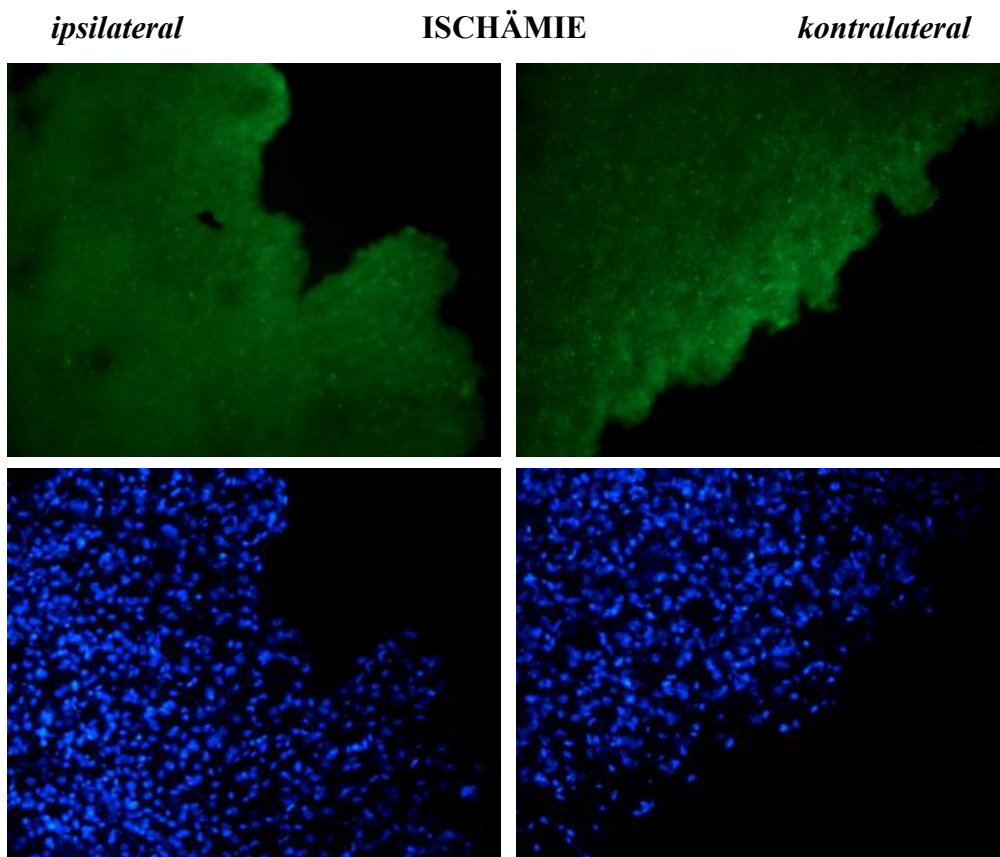


Abb. 3.10 Anfärbung von Ccl9 im Hirnschnitt der Maus nach PFA-Postfixierung. Hier wird die immunohistochemische Anfärbung eines ischämischen Tieres dargestellt. Das detektierte Signal ist zu unspezifisch.

Aus diesem Grunde versuchte ich die Fixierung zu verbessern, um dem Ausspülen von Proteinen während der Waschprozesse vorzubeugen. Die Proteine sollen so in den Zellen verbleiben und nicht zu einer Verstärkung des Backgrounds führen. Dazu wurden die Gehirnschnitte in einem -20°C kalten Methanol/Aceton-Bad inkubiert. Wie in Abbildung 3.11a oben zu erkennen ist, führt das aber zu einer Verschlechterung des Gewebezustandes. Die ipsilaterale Hemisphäre des Ischämie-Tiers weist im Infarktareal eine schwach-leuchtende, diffus zerstörte Struktur auf, bei der keinerlei spezifische Anfärbung zu erfassen ist. Die kontralaterale Hemisphäre dagegen hat kein diffuses Erscheinungsbild und ist insgesamt stärker gefärbt. Jedoch ist diese Färbung unspezifisch.

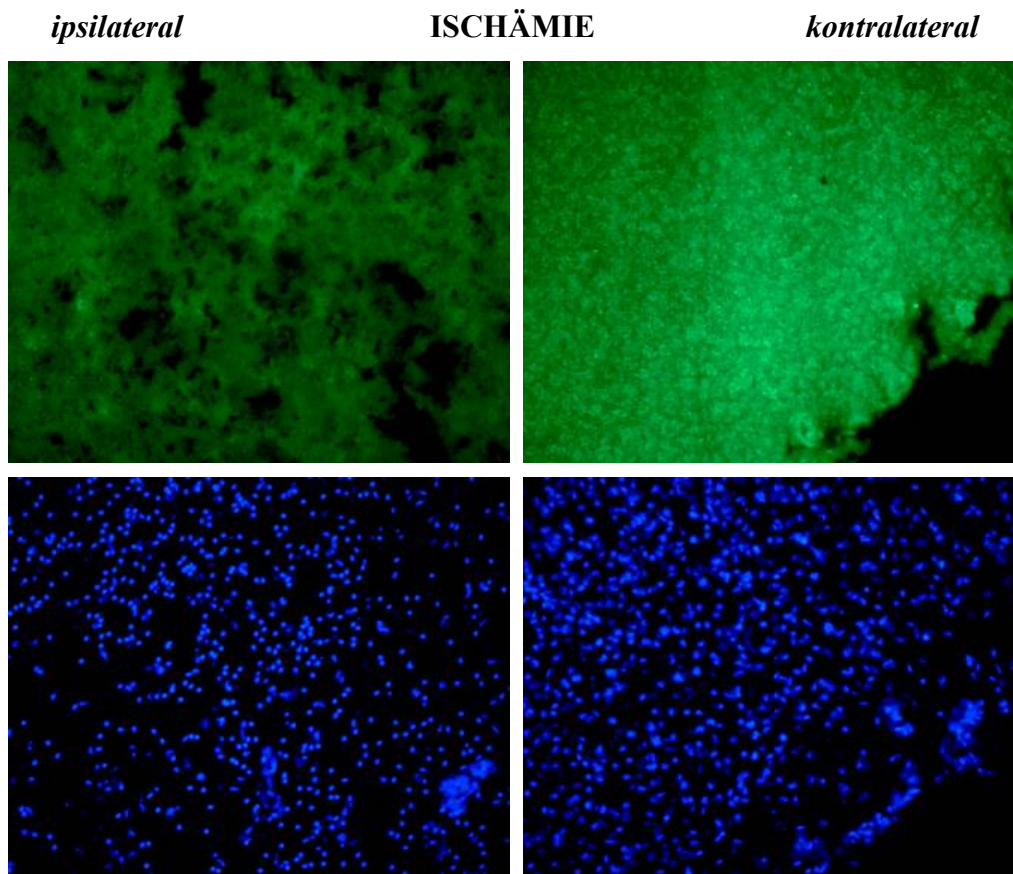


Abb. 3.11a IHC von Ccl9 im Hirnschnitt einer ischämischen Maus nach Aceton/Methanol-Fixierung. Das Signal-to-Noise-Verhältnis ist klein und die Färbung daher unspezifisch. Das Gewebe ist unzureichend fixiert.

Im Sham-Tier ist keine Seitendifferenz zu erkennen. Beide Hemisphären sind, wie in Abbildung 3.11b oben sichtbar, unspezifisch gefärbt. Des Weiteren lässt erneut die Hoechst-Färbung auf eine unzureichende Gewebefixierung schließen, da die Zellkerne keine klare Abgrenzungen zeigen, sondern verschwommene, schlierenartige Umrisse besitzen. Die Fixierung mit Aceton/Methanol führte daher nicht zu einer Verbesserung des Gewebezustandes.

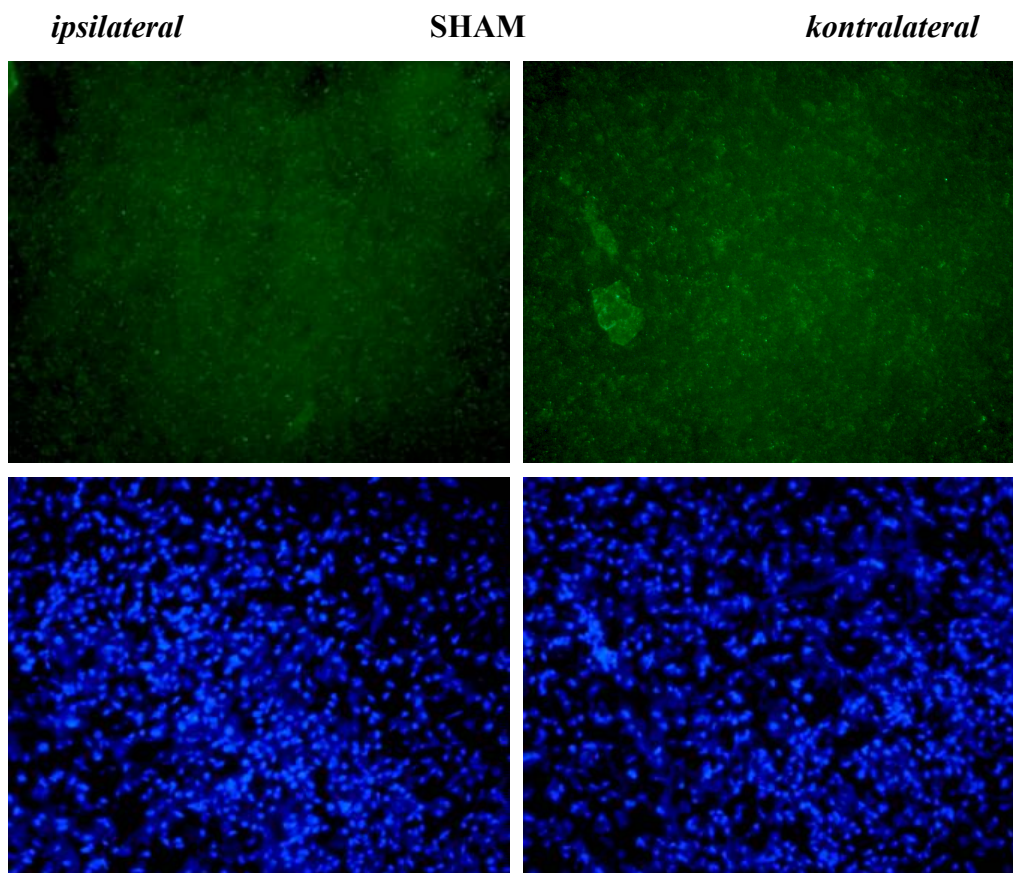


Abb. 3.11b IHC von Ccl9 im Hirnschnitt einer Sham-Maus nach Aceton/Methanol-Fixierung. Die Färbung ist unspezifisch. Die Zellkerne sind in der Hoechstfärbung nicht klar abgegrenzt, sondern weisen verschwommene, schlierenartige Umrisse auf.

Um die Beschaffenheit des Gewebes zu verbessern und den Signal-to-Noise zu erhöhen, sollten einige Gehirne im noch lebenden Tier PFA-perfusionsfixiert werden. Da die Präparation der Tiere und Aufarbeitung der Gehirne in der eigenen Arbeitsgruppe noch nicht weit genug vorangebracht werden konnte, wurde zu Vorversuchszwecken auf einen Schnitt eines PFA-perfundierten Tieres einer anderen Gruppe zurückgegriffen. Die Schnitte wurden 20 Minuten luftgetrocknet und noch einmal 20 Minuten mit PFA fixiert. Abb. 3.12 zeigt, dass diese Methode erfolgreich war.

Es ist eine deutlich spezifische Anfärbung von Ccl9 gelungen. Diese Färbung ist zellulär, da die mit Alexa488 grün angefärbten Bereiche mit den Zellanfärbungen übereinstimmen. Ebenso ist die Gewebestruktur sehr gut konserviert. Es finden sich keine diffus zerstörten Bereiche wieder und die Zellen weisen in der Hoechst-Färbung eine klare Abgrenzung auf.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die PFA-Perfusionsfixierung als die beste Methode für einen optimalen Gewebeerhalt eignet. Die Gewebestruktur erscheint deutlich verbessert und es sind keine diffus zerstörten Bereiche zu beobachten. Stattdessen zeigen sich die Zellen in der Hoechst-Färbung klar und abgegrenzt. Des Weiteren ist das Signal-to-Noise deutlich besser, als bei anderen Fixierungsmethoden.

Künftig werde ich an PFA-perfusionsfixierten Tieren die immunohistochemischen Experimente weiterführen und an der Optimierung der Konzentrationen von Antikörper- und Blockierungslösungen sowie der Inkubationszeiten und Temperaturen arbeiten.

PFA-Perfusionsfixierung

ISCHÄMIE

Methanol/Aceton-Fixierung

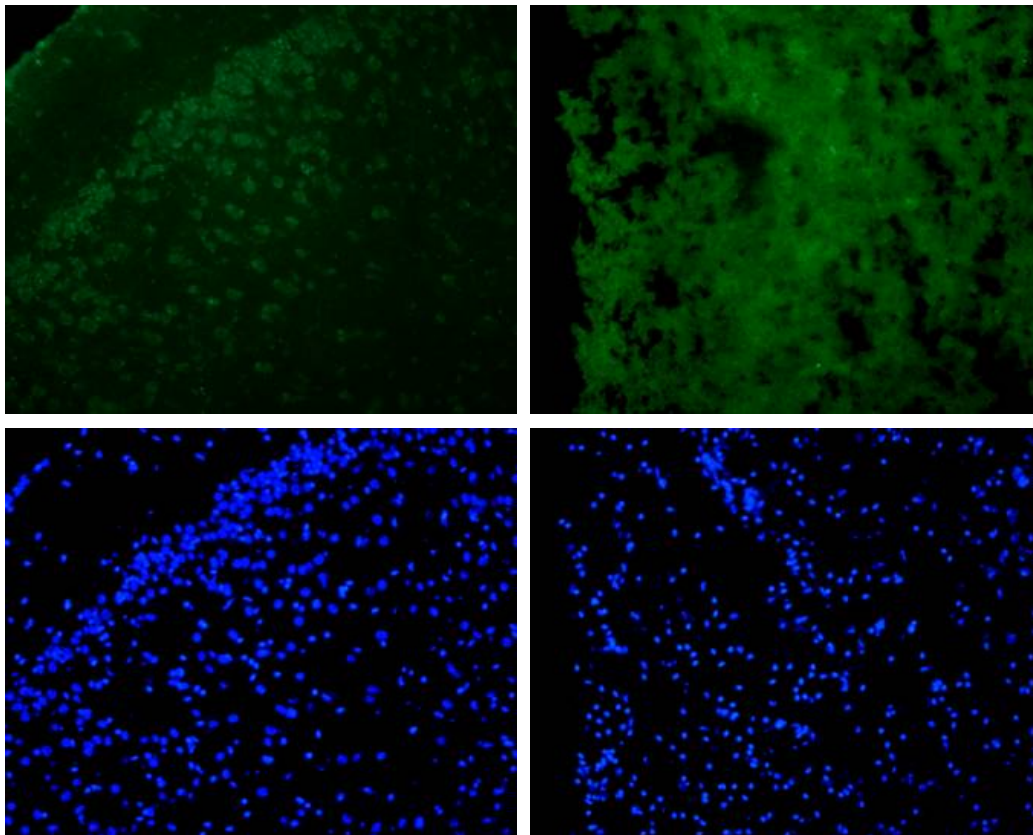


Abb. 3.12 Vergleich der immunohistochemische Anfärbung von Ccl9 im Gewebeschnitt eines PFA-perfusionsfixierten Gehirns mit einem Methanol/Aceton-fixiertem Gewebeschnitt. Der ipsilaterale Gewebeschnitt einer PFA-perfusionsfixierten Maus (links) zeigt relativ zum Methanol/Aceton-fixiertem Schnitt eine deutlich höhere Spezifität der Anfärbung sowie eine Verbesserung des Gewebezustandes.

b 4) Immunohistochemie von Hmgb1 (High mobility group box proteins 1)

Dem high mobility group box protein 1 (Hmgb1) werden insgesamt drei verschiedene Funktionen zugeordnet. Es ist ein Transkriptionsfaktor, wirkt extrazellulär als Cytokin und membranassoziiert als Wachstumsfaktor (Czura et al., 2003). Für die Detektion von Hmgb1 wurden Gehirnschnitte der Zeitpunkte 12 und 48 Stunden mit dem primären Antikörper anti-HBP1 und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit inkubiert. Abbildung 3.13 präsentiert die Ergebnisse des 12 Stunden-Schnitts. Hmgb1 ist ein Transkriptionsfaktor und membranassoziiertes Wachstumsfaktor (Czura et al., 2003). Der Fold Change beträgt $-1,87$ (Affymetrix-Hybridisierung) bzw. $-1,25$ (TaqMan). Daher war eine zelluläre Anfärbung und Herunterregulierung der Hmgb1-Expression ipsilateral im Ischämie-Tier zu erwarten. Abbildung 3.13 bestätigt diese Erwartungen. Die immunohistochemische Anfärbung ist ipsilateral schwächer als kontralateral und stimmt mit der Hoechst-Färbung überein. Allerdings geht die Zellballung ipsilateral (siehe roter Pfeil) nicht mit einer vermehrten Fluoreszenzfärbung einher, so wie das kontralateral der Fall ist. Zellen in diesem Bereich bilden also weniger Hmgb1 aus. Da Hmgb1 auch extrazellulär existiert (Czura et al., 2003), ist ein stark angefärbter Background möglich. Dennoch weist das Signal-to-Noise-Verhältnis auf eine spezifische Anfärbung hin. Hmgb1 scheint daher extrazellulär in geringeren Mengen als intrazellulär vorzukommen.

Im Sham-Tier war trotz eines Fold Change von $1,14$ eine gleichmäßige Verteilung von Hmgb1 zu erwarten, da das Sham-Tier keiner Ischämie ausgesetzt wurde. Außerdem ist es fraglich, ob ein FC-Wert in der Größenordnung immunohistochemisch nachweisbar ist. Ferner ist von den Reproduzierbarkeitsexperimenten der TaqMan-PCR (siehe Kapitel a IV) eine mittlere Abweichung von $1,87$ bekannt. Ein FC-Wert von $1,14$ hat also nur eine geringe Aussagekraft hinsichtlich einer Hochregulierung. Dennoch ist in Abbildung 3.13 eine leichte Hochregulierung erkennbar. Der Fehler könnte in einer ungleichmäßigen Verteilung der Antikörper während der Inkubationen liegen. Ein unzureichender Verdunstungsschutz könnte zu einer partiellen Konzentrationserhöhung der Antikörper führen. Auf diese Annahmen werde ich später noch einmal eingehen.

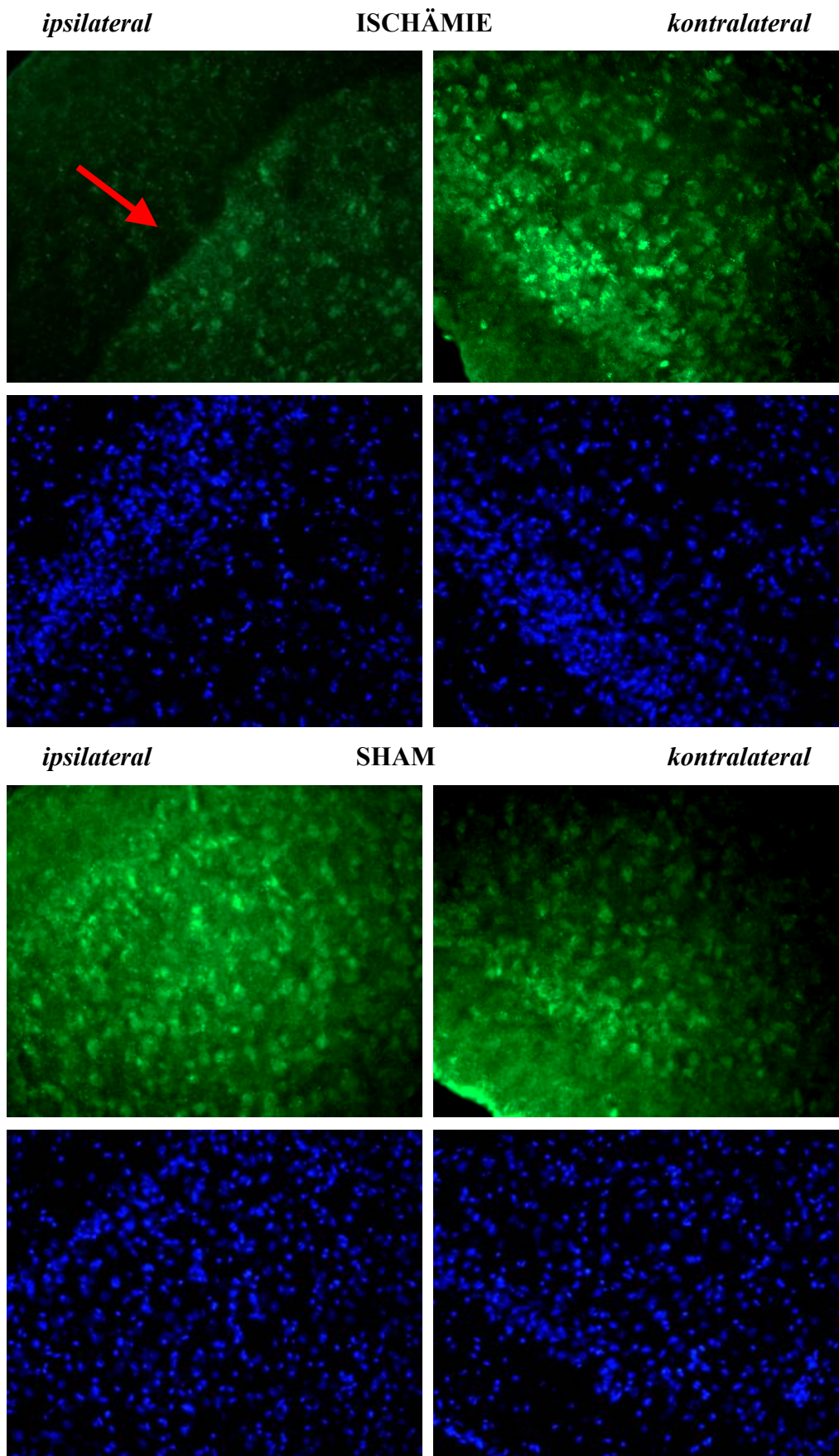


Abb. 3.13 Immunohistochemische Färbung von Hmgb1 in Maushirnschnitten (12 Stunden). Die IHC zeigt eine ipsilaterale Herunterregulierung von Hmgb1 im Ischämie-Tier. Das Sham-Tier lässt auf eine leichte Hochregulierung schließen. Die Färbungen sind zellulär.

Neben den 12 Stunden-Schnitten färbte ich auch 48-Stunden-Schnitte an. Hier waren andere Ergebnisse zu erwarten. Ein Fold Change von 1,43 deutet auf eine ipsilaterale Hochregulierung im Ischämie-Tier hin. In zwei von drei Gehirnbereichen ließ sich keine ipsilaterale jedoch eine starke kontralaterale Färbung erreichen. Abbildung 3.14 zeigt eine fehlende und Abbildung 3.15 eine vorhandene ipsilaterale Färbung im Ischämie-Tier. Das ipsilaterale Gewebe wirkt außerdem in allen drei Gehirnbereichen diffus zerstört, die Zellen scheinen in der Hoechst-Färbung jedoch intakt zu sein. Aufgrund fortgeschrittener Gehirnschädigung im 48-Stunden-Ischämie-Tier erscheint das ipsilaterale Gewebe schwieriger fixierbar. Die geringe Anfärbung lässt sich zum einen durch Auspülungen von Zellinhalten, aufgrund unzureichender Fixierungen erklären. Zum anderen ist es denkbar, dass aufgrund der fortschreitenden pathogenetischen Prozesse zwar die Genexpression von Hmgb1 ansteigt, aber nicht in eine entsprechende Bildung von Hmgb1-Proteinen mündet. Künftig werden diese Versuche mit PFA-perfusionsfixierten Mäusen weitergeführt, damit eine ausreichende Fixierung des Gewebes gewährleistet ist.

Für das Sham-Tier war mit einer ungefähren Gleichverteilung der Anfärbung zu rechnen. In den Sham-Tieren wird keine Ischämie ausgelöst und daher kein unterschiedliches Expressionsmuster zwischen beiden Gehirnhälften induziert. Der Fold Change beträgt $-1,14$. Dieser Wert ist so gering, dass auch hinsichtlich der Genexpressionsdaten nicht von einer unterschiedlichen Expression in beiden Hemisphären ausgegangen werden kann. Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15 widersprechen diesen Annahmen. Im Sham-Tier ist die ipsilaterale Hemisphäre deutlich stärker gefärbt. Eine ungleichmäßige Konzentrationsverteilung der Antikörper während der Inkubation wäre als Erklärung dieser Beobachtungen denkbar. Diese partiellen Konzentrationsunterschiede könnten aufgrund von Verdunstungen entstanden sein.

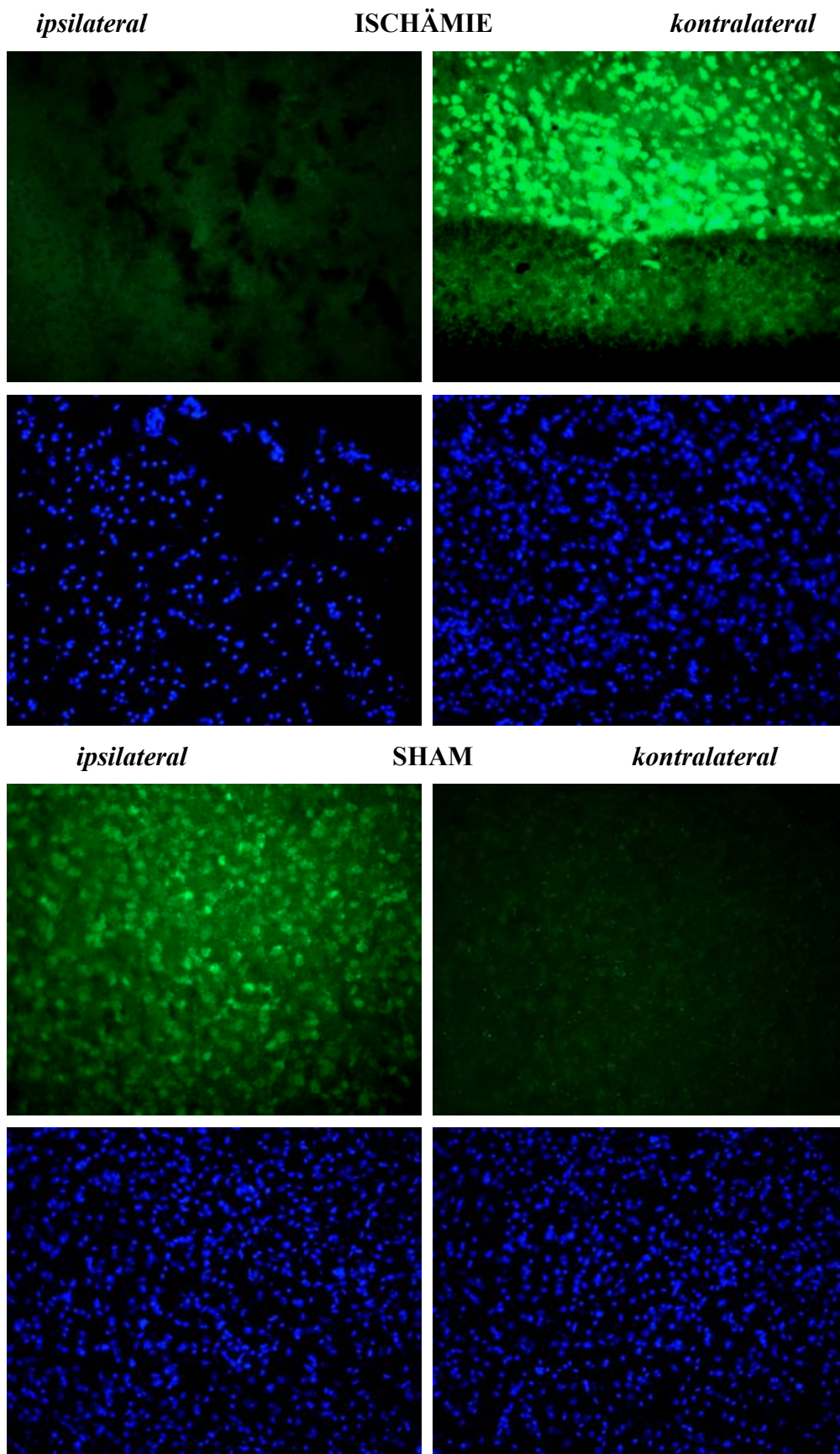


Abb. 3.14 Immunohistochemische Anfärbung von Hmgb1 im Gehirnschnitt eines 48 Stunden-Tiers. Das ipsilaterale Gewebe des Ischämie-Tiers ist diffus und unspezifisch gefärbt. Die kontralaterale Hemisphäre zeigt hingegen eine starke und spezifische Färbung auf. Im Sham-Tier ist eine starke Seitendifferenz zwischen der ipsilateralen und der kontralateralen Hemisphäre zu beobachten.

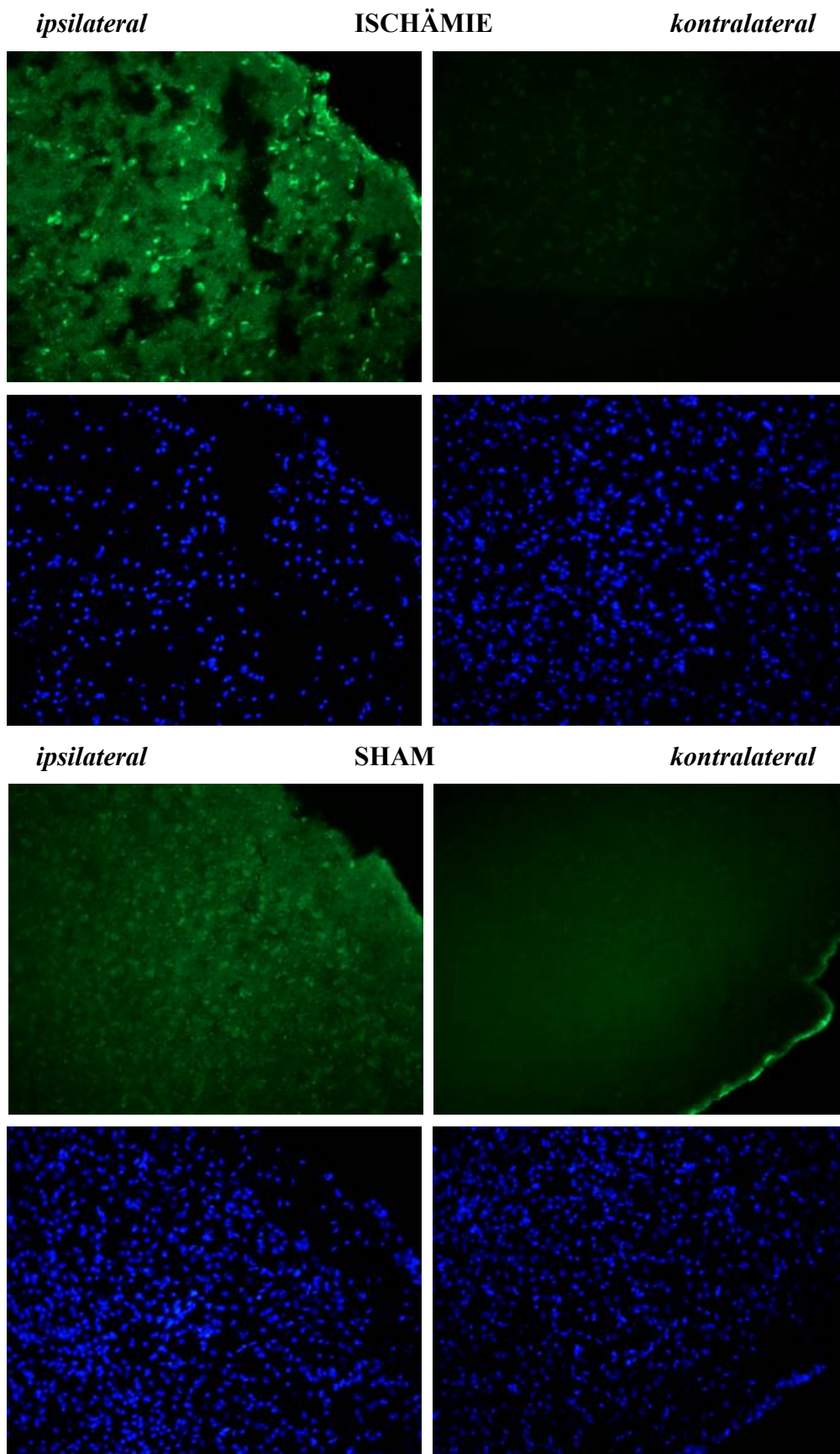


Abb. 3.15 Immunohistochemische Anfärbung von Hmgb1 im Gehirnschnitt eines 48 Stunden-Tiers. In diesen Fotografien ist eine ipsilaterale Hochregulierung von Hmgb1 erkennbar. Dennoch ist das Gewebe ipsilateral diffus zerstört. Im Sham-Tier ist eine starke Seitendifferenz zwischen der ipsilateralen und der kontralateralen Hemisphäre zu beobachten.

Um einen methodischen Fehler auszuschließen, führte ich einen weiteren Versuch durch. Ich wiederholte die Immunohistochemie für Hmgb1 und ergänzte diese durch eine zweite, vergleichende IHC gegen den Endotheloberflächenmarker von Wil-lebrandt-Faktor (VWF). Dieser soll Endothelien anfärben. Da zu erwarten ist, dass Endothelien im Sham-Tier gleichmäßig verteilt sind, ist hier mit keiner Seitendifferenz zu rechnen. Bisher wurden die Schnitte während sämtlicher Inkubationsschritte lediglich mit Parafilm abdeckt. Nun wurde zusätzlich während allen Inkubationen jeweils ein Schnitt eines Sham-Tiers entweder geschwenkt oder von einem Fettstift umrandet. Das Schwenken soll die Inkubationslösung immer wieder von Neuem durchmischen. Die Fettstiftumrandung soll neben der Abdeckung mit Parafilm einen weiteren Verdunstungsschutz bieten und so partielle Konzentrationsunterschiede vermeiden. Abbildung 3.16 zeigt die Anfärbung von Hmgb1 im Schnitt 2 und 3 des Sham-Tiers mit Hilfe der Fettstiftmethode. Dabei lassen jeweils die beiden oberen Fotografien die ipsilaterale und die beiden unteren die kontralaterale Hemisphäre erkennen. Im Schnitt 2 ist trotz Fettstiftanwendung immer noch eine starke Seitendifferenz zwischen den beiden Gehirnhälften erkennbar. Im Schnitt 3 ist diese Differenz geringer.

Des weiteren sollten mit Hilfe des anti-VWF-Antikörpers Endothelien angefärbt werden. Das „pünktchenhafte“ Erscheinungsbild in Abbildung 3.18 lässt aber eher auf eine Anfärbung von Zellen schließen, da Endothelien in der IHC ein fadenförmiges Muster zeigen. Der Antikörper anti-VWF von Santa Cruz Biotechnology, inc. ist also zur Detektion von Endothelien ungeeignet. Dennoch ist die Verteilung der Anfärbung gleichmäßig.

Zur Verbesserung der Verteilung der Inkubationslösungen, wurden die Schnitte zusätzlich zur Abdeckung mit Parafilm geschwenkt. Abbildung 3.17 zeigt dabei die Anfärbung von Hmgb1 im Sham-Tier. Die Seitendifferenz zwischen beiden Hemisphären scheint sogar verstärkt worden zu sein. Es ist denkbar, dass durch das Schwenken die Verdunstung noch verstärkt wird. Deshalb ist diese Methode zur besseren Verteilung der Antikörper ungeeignet.

Abbildung 3.19 zeigt einen weiteren Grund für die Unzweckmäßigkeit der Schwenk-methode auf. Es sind keine spezifischen Anfärbungen zu erkennen. Vielmehr zeigt sich ein gleichmäßiges Leuchten des gesamten Schnittes. Das Schwenken scheint Auswaschungen von Proteinen zu fördern, was in starkem Maße unerwünscht ist. Abbildung 3.17 bestätigt diese Annahme, da auch hier der Background ein stärkeres Leuchten vorweist, als das in Abbildung 3.16 zu erkennen ist.

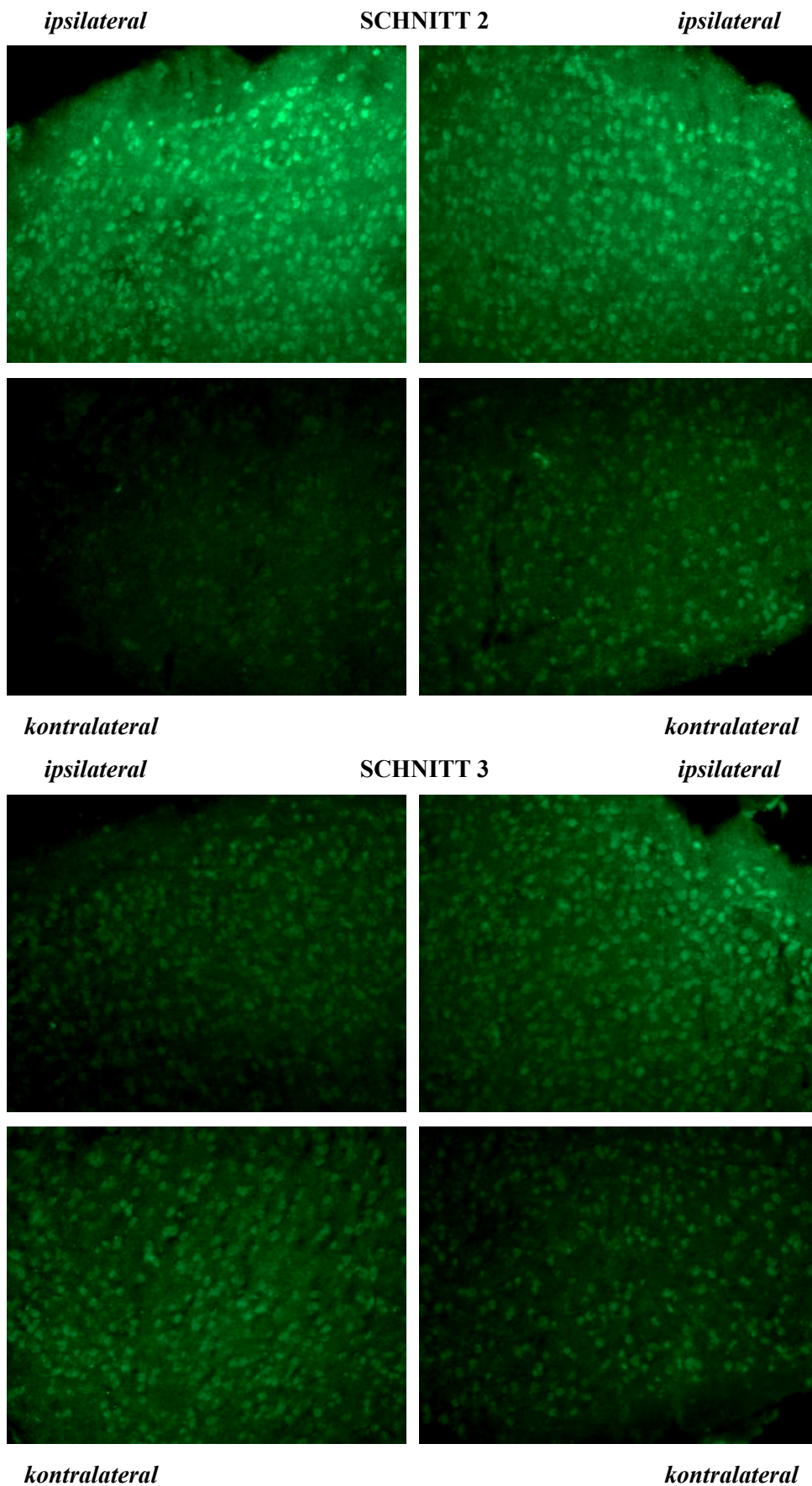
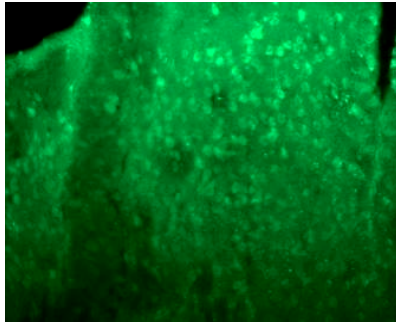
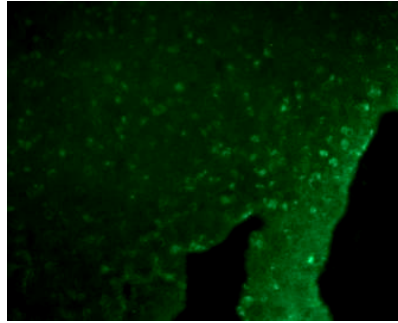
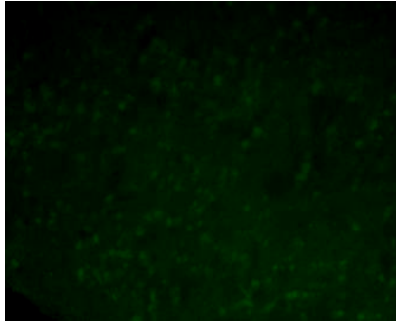
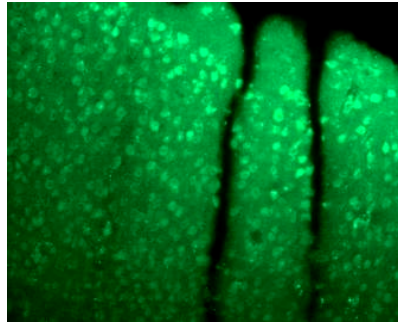


Abb. 3.16 Test auf gleichmäßige Verteilung von Hmgb1 im Sham-Tier (Fettstiftmethode). Im Schnitt 2 ist trotz Fettstiftanwendung immer noch eine starke Seitendifferenz zwischen den beiden Gehirnhälften erkennbar. Im Schnitt 3 ist diese Differenz geringer.

ipsilateral



ipsilateral

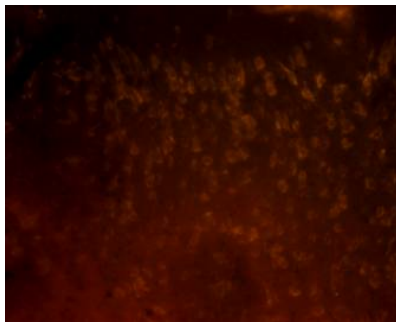


kontralateral

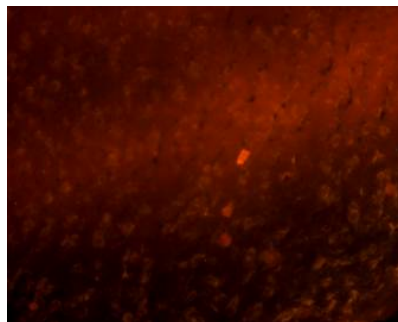
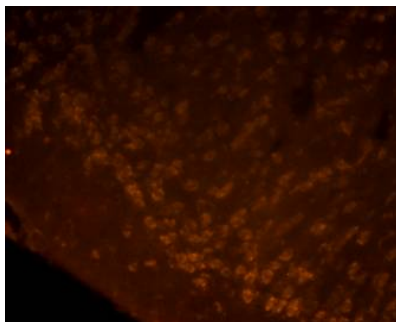
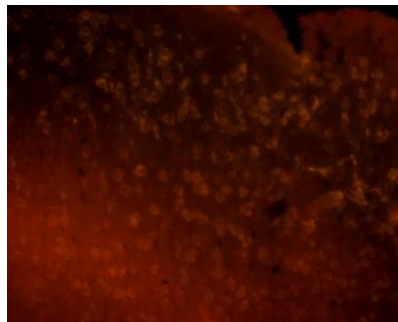
kontralateral

Abb. 3.17 Test auf gleichmäßige Verteilung von Hmgb1 im Sham-Tier (Schwenkmethode). Zur Verbesserung der Verteilung der Inkubationslösungen, wurden die Schnitte zusätzlich zur Abdeckung mit Parafilm geschwenkt. Die beiden oberen Fotografien spiegeln hierbei die ipsilaterale Hemisphäre wieder und die beiden unteren die kontralaterale. Die Seitendifferenz zwischen beiden Gehirnhälften ist immer noch sehr groß.

ipsilateral



ipsilateral



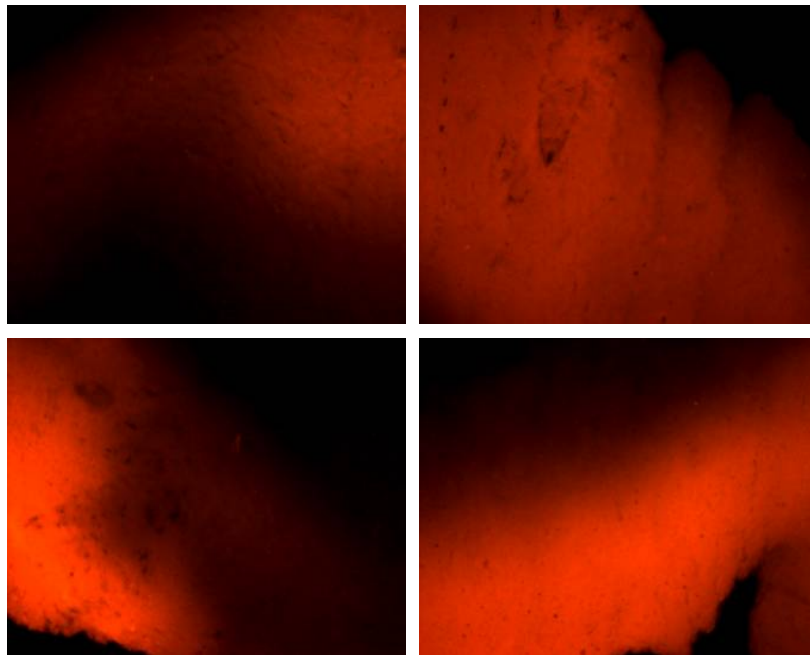
kontralateral

kontralateral

Abb. 3.18 Test auf gleichmäßige Verteilung im Sham-Tier (Fettstiftmethode). Vergleichend zur Hmgb1-Detektion sollten Endothelien angefärbt werden. Das punkthafte Erscheinungsbild lässt jedoch auf eine Anfärbung von Zellen schließen, da Endothelien fadenförmig sind. Dennoch ist die Verteilung der Anfärbung gleichmäßig.

ipsilateral

ipsilateral



kontralateral

kontralateral

Abb. 3.19 Test auf gleichmäßige Verteilung im Sham-Tier (Schwenkmethode). In dieser Abbildung sind keine spezifischen Anfärbungen zu erkennen. Das Schwenken scheint Auswaschungen von Proteinen zu fördern.

Da der Antikörper gegen den Endotheloberflächenmarker von Willebrandt-Faktor (VWF) in diesem Experiment keine Endothelien angefärbt hat, ist diese Färbung nur bedingt als Maß für eine gleichmäßige Verteilung der Lösungen während der Inkubationen nützlich. Es ist nicht klar welches Antigen angefärbt wurde. Jedoch ist sicher, dass es keine Endothelien sind. Nichts desto trotz ist die Anfärbung durch anti-VWF mit Hilfe der Fettstiftmethode gleichmäßig, die Anfärbung mit anti-HBP1 nicht. Eine ungleichmäßige Konzentrationsverteilung der Inkubationslösungen ist daher als Ursache für eine asymmetrische Anfärbung unwahrscheinlich. Möglicherweise ist das Protein High mobility group box protein 1 auch im nicht ischämiegeschädigten Mäusegehirn unterschiedlich verteilt. So könnte aufgrund molekularer Regulationsmechanismen eine Verstärkung entstehen, die in einer größeren Abweichung der Menge an Hmgb1-Protein zwischen beiden Hemisphären mündet.

Es ist aber auch möglich, dass die Färbung mit anti-HBP1 noch von anderen Störfaktoren als die ungleichmäßige Inkubation beeinflusst wird. Das bleibt im Weiteren zu untersuchen.

b 5) Immunohistochemie von Plaur (urokinase plasminogen activator receptor)

Zur Detektion von Plaur wurden die 12-Stunden-Schnitte mit dem primären Antikörper anti-Plaur und dem sekundären Antikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit inkubiert. Ein Fold Change von 8,63 lies eine deutliche ipsilaterale Hochregulierung erwarten. Plaur ist ein Oberflächenrezeptor, der zur systemischen Aktivierung der Koagulationskaskade während der Epithelisierung von Läsionen, der Wundheilung und dem tissue remodelling beiträgt. (Santa Cruz Biotechnology, inc., 2005, http://www.ensembl.org/Mus_musculus). Daher ging ich davon aus, eine zelluläre Anfärbung aufzufinden.

Wie die Abbildung 3.20 zeigt, erfüllten sich diese Erwartungen nicht. Die kontralaterale Hemisphäre ist insgesamt stärker angefärbt, als die ipsilaterale Gehirnhälfte. Obwohl sich eine zelluläre Anfärbung besonders kontralateral erkennen lässt, ist der Background sehr groß. Das Signal-to-Noise-Verhältnis muss deshalb deutlich verbessert werden. Diese Färbung ist also noch nicht ausreichend gelungen.

Im Sham-Tier ist eine ipsilaterale Hochregulierung sichtbar. Der Fold Change beträgt 1,73. Da im Vorfeld eine mögliche Abweichung von $FC = 1,87$ bestimmt wurde, kann hier durchaus davon ausgegangen werden, dass die Färbung fehlerhaft ist. Außerdem wurde im Sham-Tier keine Ischämie ausgelöst und damit kein unterschiedliches Expressionsmuster zwischen beiden Hemisphären induziert.

Hier muss weitere Optimierungsarbeit geleistet werden. Künftig wird die IHC mit Schnitten PFA-perfusionsfixierter Mäuse fortgesetzt. Eine weitere Optimierung der Konzentrationen von Antikörper- und Blockierungslösungen sowie der Inkubationszeiten und -temperaturen wird folgen.

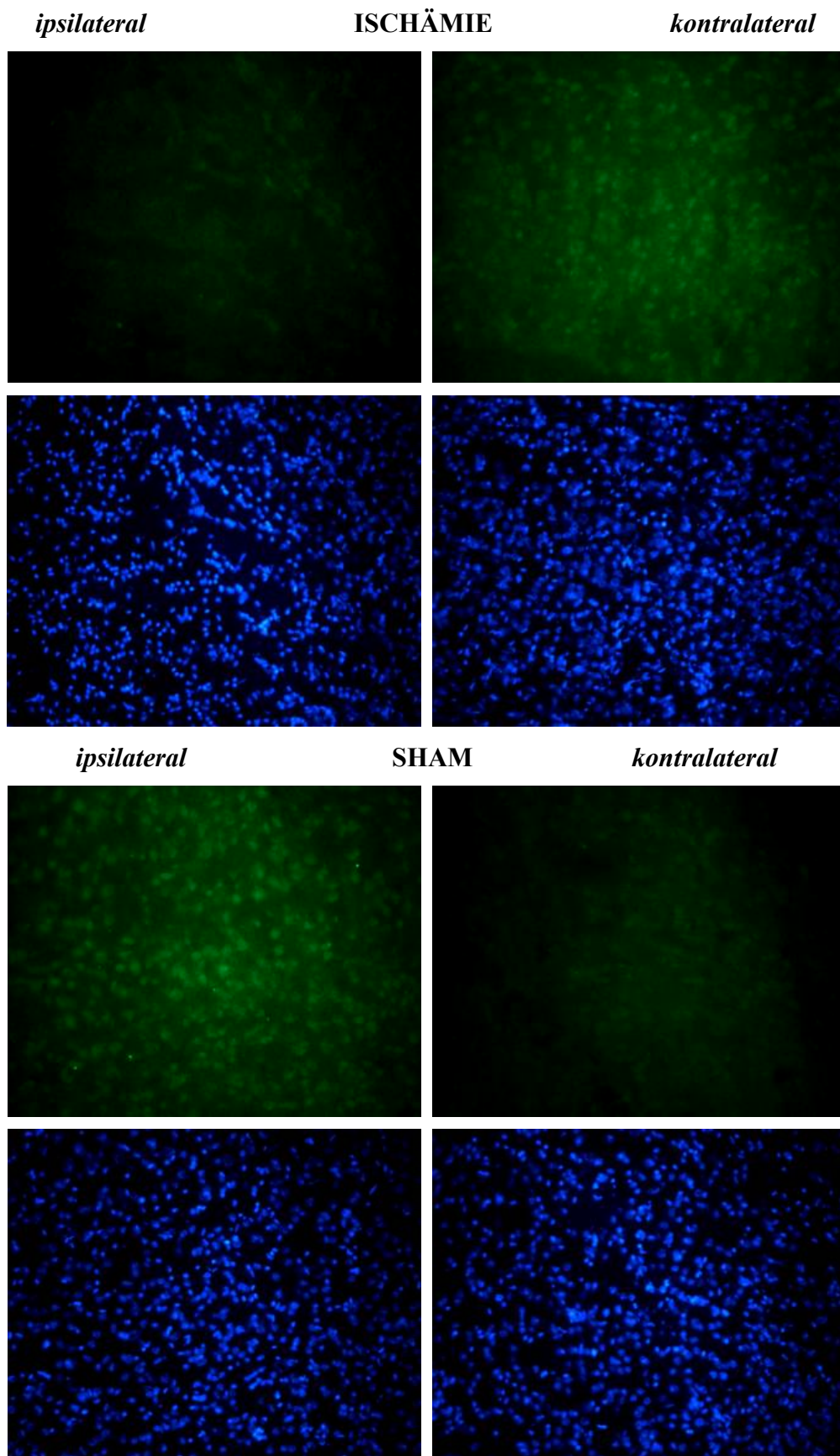


Abb. 3.20 Immunohistochemische Detektion von Plaur. Im ischämischen Tier (oben) ist die kontralaterale Hemisphäre (rechts im Bild) stärker angefärbt als die ipsilaterale. Außerdem ist das Signal-to-Noise-Verhältnis zu schwach. Im Sham-Tier ist eine Seitendifferenz in der Anfärbungsstärke auffällig.

b 6) Immunohistochemische Anfärbung von Tlr2 (Toll like receptor)

Der Tlr2 (toll like receptor 2) konnte zwar nicht eindeutig validiert werden, dennoch wurde er für die immunohistochemische Färbung ausgewählt, da sowohl mit der Affymetrix-GeneChip-Hybridisierung wie auch mit der TaqMan-PCR eine kontinuierliche Hochregulierung von Tlr2 nach einer MCAO zu erkennen ist. Des Weiteren ist bereits bekannt, dass der transmembrane Rezeptor Tlr2 über das Erkennen von endogenen Signalstoffen nekrotischer oder verletzter Zellen eine Entzündungsreaktion auslöst, die bis hin zur Apoptose führen kann (Karikó et al., 2004).

Für die Detektion von Tlr2 verwendete ich Hirnschnitte der Frontalebene einer 48 Stunden perfundierten Maus und färbte sie mit dem primären Antikörper anti-TLR2 (polyclonal rabbit anti-TLR2 (H-175) # sc-10739, Santa Cruz Biotechnology) sowie dem sekundären Antikörper anti-rabbit (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), Molecular Probes, # A11008). Da es sich bei Tlr2 um einen transmembranen Rezeptor handelt, sollte die Anfärbung zellulär sein. Ein zuvor ermittelter FC von 7,39 lässt eine deutlich stärkere Anfärbung der ipsilateralen Hemisphäre erwarten. Abbildung 3.21 zeigt die IHC von Tlr2, wobei in den beiden oberen Reihen das ischämiegeschädigte Tier dargestellt ist. Links ist die ipsilaterale Hemisphäre aufgeführt, rechts die kontralaterale. Das Sham-Tier zeigt eine einheitliche, unspezifische Anfärbung. Die kontralaterale Hemisphäre im ischämischen Tier besitzt das gleiche Erscheinungsbild. Bei der Betrachtung der ipsilateralen Hemisphäre fällt erneut ein diffuser Gewebszustand auf. Er lässt sich einerseits auf die fortgeschrittenen, pathogenen Prozesse zurückführen, andererseits fixierte ich diese Schnitte mit einem Aceton/Methanol-Gemisch, das auch schon in vorangegangenen Experimenten das Gewebe unzureichend schützte. So sind auch bei der Detektion von Tlr2 die Zellen in der Hoechstfärbung teilweise als „verschwommen“ wahrzunehmen.

Die deutlich zu erwartende ipsilaterale Hochregulierung ist nur zu erahnen. Es ist zwar eine spezifische Anfärbung erkennbar, jedoch ist das Signal-to-Noise-Verhältnis sehr klein und muss deshalb weiter verbessert werden. Künftig werde ich versuchen die Spezifität über die Varianz von Inkubationszeiten, -temperaturen und -konzentrationen zu verbessern. Ein weiteres Ziel wird die Verbesserung der Fixierung sein.

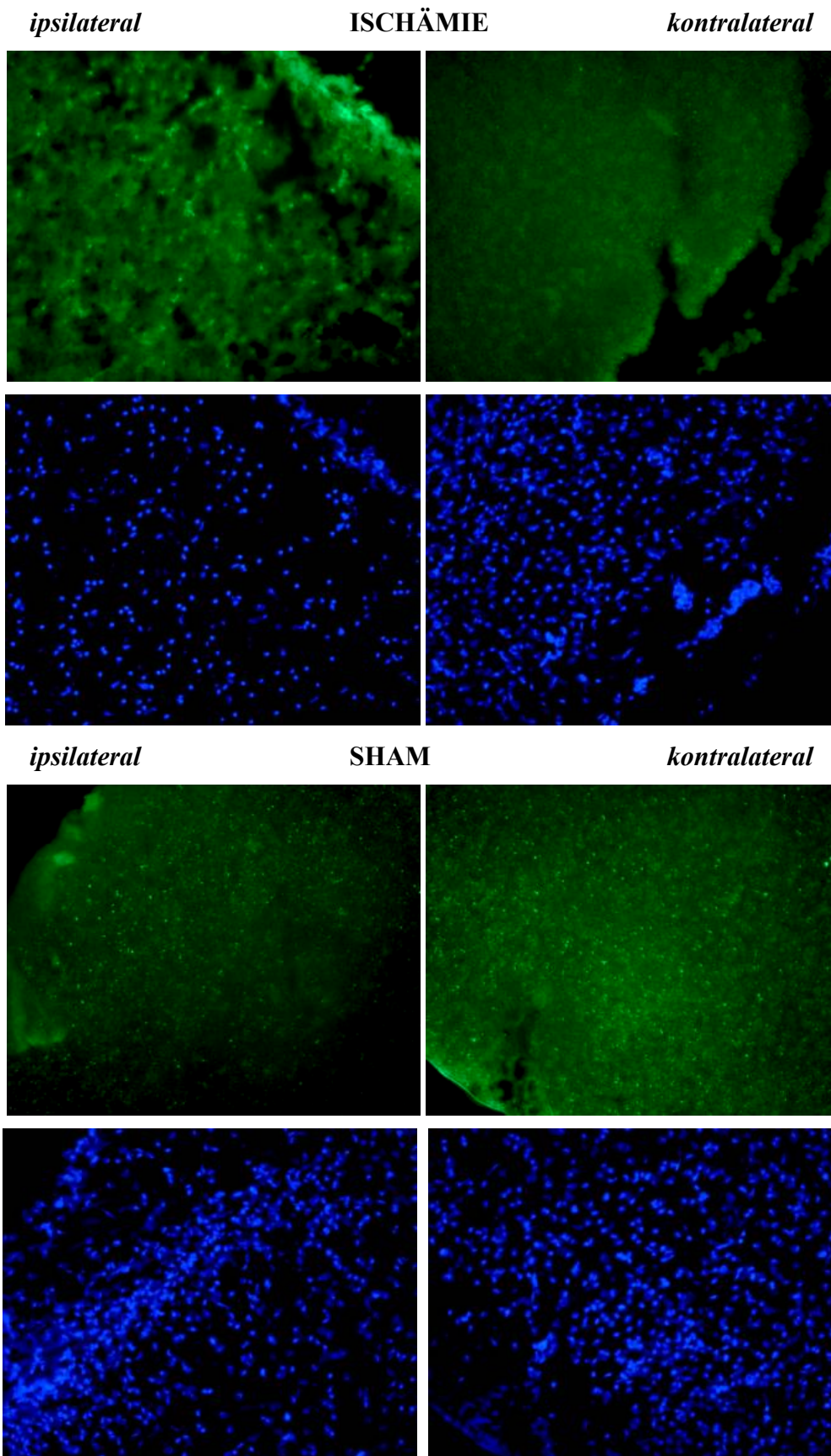


Abb. 3.21 Immunohistochemische Anfärbung von Tlr2. Die obige Abbildung zeigt die IHC eines 48-Stunden-Schnitts mit anti-Tlr2. In den beiden oberen Reihen sind die Anfärbungen des Ischämie-Tiers zu sehen. Die beiden unteren Reihen zeigen das Sham-Tier.

b 7) Zusammenfassung der Immunohistochemie

Mit Hilfe der Zwei-Schritt indirekten Methode, sollten die Proteine Mt2, Blnk, Ccl9, Hmgb1, Plaur und Tlr2 immunohistochemisch nachgewiesen werden. Mit einem Vergleich der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre sollte die zuvor bestätigte Genregulierung auch auf Proteinebene überprüft werden.

Es traten eine Reihe von Schwierigkeiten auf, die noch nicht vollständig behoben werden konnten. So ist bisher noch keine der Proteinfärbungen zufriedenstellend. Zu den Schwierigkeiten gehören das Auffinden eines geeigneten Antikörpers und des Fixierungsmittels, sowie die Bestimmung der Konzentration, Temperaturen und Zeiten sämtlicher experimenteller Schritte.

Zur Detektion von Mt2 und Blnk wurde auf monoklonale Mausantikörper zurückgegriffen. Hierbei resultierte das Anfärbungsmuster aber nicht aus der Bindung des Antigens durch den primären Antikörper, sondern allein aus der Andockung von sekundären Antikörpern an Endothelien. Eine Anfärbung des gewünschten Antigens war erst unter Verwendung eines Mouse-On-Mouse-Kits möglich.

Bei allen Färbungen fiel die schlechte Fixierung des Gewebes auf. Weder eine Postfixierung mit PFA noch mit einem Methanol/Aceton-Gemisch war ausreichend. Versuche mit PFA-perfusionsfixierten Mäusen führten zu einer Verbesserung des Gewebes. Zusätzlich konnte das Signal-to-Noise-Verhältnis im Falle der immunohistochemischen Färbung von Ccl9 deutlich verbessert werden.

Die aufgrund der Genexpressionsdaten zu erwartende ipsilaterale Hmgb1-Herunterregulierung im 12-Stunden-Tier konnte bestätigt werden, die zu erwartende Hochregulierung im 24-Stunden-Tier bisher jedoch nur teilweise. Im Sham-Tier war eine ungleichmäßige Verteilung der Hmgb1-Anfärbung auffällig. Weitere immunohistochemische Färbungen mit dem Endotheloberflächenmarker von Willebrand-Faktor (VWF) mit Hilfe verschiedener Methoden sollte einen methodischen Fehler ausschließen. Auch wenn keine Endothelien angefärbt werden konnten, war das Anfärbungsmuster dennoch gleichmäßig, die Anfärbung mit anti-HBP1 dagegen nicht. Es muss daher von weiteren Störfaktoren ausgegangen werden, die im einzelnen noch ermittelt werden müssen. Eine weitere Erklärung wäre eine ungleichmäßige Verteilung von Hmgb1 im nichtischämiegeschädigten Mäusegehirn.

Ein Nachweis der ipsilateralen Hochregulierung von Plaur war bisher erfolglos. Auch hier fiel eine ungleichmäßige Verteilung von Plaur im Sham-Tier auf.

Die immunohistochemische Detektion von Tlr2 war von einem Teilerfolg gekrönt, allerdings muss das Singal-to-Noise-Verhältnis verbessert werden.

Für einen Erfolg der immunohistochemischen Färbungen müssen weitere Optimierung gelingen. Künftig werde ich mit Schnitten PFA-perfusionsfixierter Mäuse arbeiten. Außerdem werde ich die bestmöglichen Konzentrationen von Antikörper- und Blockierungslösungen sowie die Inkubationszeiten und -temperaturen auffinden.

Ist die Anfärbung Blnk, Ccl19, Plaur, Hmgb1 und Tlr2 gelungen, werden genauere Untersuchungen hinsichtlich der exprimierenden Zelltypen notwendig sein. Dazu werde ich Doppelfärbungen anfertigen, bei denen ich zusätzlich zu den bisherigen Antikörpern auch Antikörper gegen spezifische Zelltypmerkmale einsetzen werde.

c) Analyse von Signalwegen

Um künftig in die pathologischen Prozesse eingreifen zu können, die einer cerebralen Ischämie folgen, ist es wichtig differentiell exprimierte Gene aufzufinden und diese funktionell bedeutenden Signalwegen zuzuordnen. Außerdem ist es von großem Interesse aufzudecken, wie die einzelnen differentiell exprimierten Gene zusammenspielen bzw. sich gegenseitig regulieren. Dieser Vorgang soll es ermöglichen, die genauen molekularen Vorgänge zu verstehen, um sie an geeigneter Stelle zu manipulieren und therapeutisch nutzbar zu machen.

Zur Identifizierung funktionell bedeutender Signalweg nutzte ich verschiedene kommerziell erhältliche Programme. Zu ihnen gehörten PathwayAssist™ von Ariadne Genomics (<http://www.ariadnegenomics.com>), Pathway Analytics von Teranode™ (<http://www.teranode.com>) und Pathway Analysis von Ingenuity™ (<http://ingenuity.com>). Diese Programme greifen auf bereits bekanntes Wissen und Informationen über Wechselwirkungen von Genen zurück, die aus öffentlichen Datenbanken, wie z.B. PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov) stammen.

Zu vielen der differentiell exprimierten Gene ist nur ein sehr begrenztes Wissen vorhanden. Es ist noch unklar zu welchen Signalwegen sie gehören und wie sie zusammenwirken. Für viele Gene war die Annotation zu gering. Deshalb deckte eine Analyse der Signalwege keine neuen Wechselwirkungen oder Regulierungen zwischen den betrachteten Genen bzw. die Zugehörigkeit zu anderen Signalwegen auf, als die für den Schlaganfall bereits bekannten beteiligten Prozesse der Entzündung, Apoptose und Zelldifferenzierung. Daher verzichtete ich im Rahmen meiner Diplomarbeit auf eine weitere detaillierte Analyse der beteiligten Signalwege.

d) Diskussion eigener Ergebnisse bezüglich des aktuellen Standes der Forschung

MT2 ist ein cysteinreiches Protein, dass in allen Geweben der Eukaryonten zu finden ist, hauptsächlich jedoch im Gehirn gebildet wird. Seine Hauptfunktion liegt in dem Entfernen verschiedener Metalle und reaktiver Sauerstoffverbindungen aus dem Zytoplasma. MT2 schützt das zentrale Nervensystem vor den schädlichen Einflüssen beispielsweise der Interleukine und trägt entscheidend zum Lernen und zur Ausbildung der Erinnerungsfunktion bei (Levin et al., 2005). Es wird von Metallen, Glucocortikoiden und Interleukinen induziert (Trendelenburg et al., 2002). Eine ipsilaterale Hochregulierung sowie eine immunohistochemische Detektion von Mt2 nach einer MCAO konnte bereits gezeigt werden (Trendelenburg et al., 2002). Daher sollte Mt2 als zusätzliche Kontrolle dienen, um die Richtigkeit der Expressionsbestimmungen und der Immunohistochemie sicherzustellen. Das Gen konnte zwar mit ++ sehr gut validiert werden [Abbildung siehe Anhang oder Ergebnisse und Diskussion a5)], eine immunohistochemische Färbung ist allerdings aufgrund einer mangelnden Fixierung des untersuchten Gewebes noch nicht zufriedenstellend gelungen.

TLR2 (toll like receptor 2) ist ein Entzündungsmediator, der als Folge eines Schlaganfalls von Mikroglia und Astrozyten gebildet wird (Karikó et al., 2004). Als transmembraner Rezeptor erkennt er Proteine nekrotischer oder verletzter Zellen infolge einer Ischämie und löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus. Dabei aktivieren Toll like Rezeptoren NF- κ B, das anschließend die Transkription proinflammatorische Cytokine induziert und verursachen so eine Inflammation, die schließlich in einer Apoptose enden kann (Karikó et al., 2004, Zhang und Ghosh, 2001). Zu den proinflammatorischen Cytokinen gehören TNF (tumor necrosis factor), IL-1 β (Interleukin-1 β) und IL-6. Sie reduzieren den Blutfluß und erhöhen die Permeabilität der Gefäße. Des weiteren wird die Transkription der induzierbaren NO-Synthase ausgelöst (Zhang und Ghosh, 2001), wodurch der oxidative Stress im ischämischen Gehirn erhöht wird (Bernik et al., 2002). Gemeinsam führen diese Prozesse zu einer deutlichen Verschlechterung der Ischämie und einer Ansammlung von Immunzellen im Gehirn (Karikó et al., 2004).

Zusätzlich zur validierenden TaqMan-PCR führte ich eine TaqMan-PCR für Tnf, Il-1 β und Il-6 durch. Il-6 und Il-1 β sind kaum differentiell reguliert. Tnf zeigt eine deutliche ipsilaterale Hochregulierung zum Zeitpunkt 12 Stunden. Der FC beträgt hier 22, 82. Für den Zeitpunkt 24 Stunden ist eine geringe Regulierung feststellbar (FC=1,38) während

der 48-Stundenwert eine ipsilaterale Hochregulierung um das 11,68fache aufweist. Diese Werte passen zur Regulierung des Tlr2. Abbildung 3.22 zeigt die Korrelation der Expression von Tlr2 und Tnf. Beide zeigen das gleiche zeitliche Muster in ihrer Hoch- und Herunterregulierung. Das bestätigt die in der Literatur beschriebene Hypothese wonach aktivierte Toll like Rezeptoren die Expression von Interleukine wie beispielsweise Tnf induzieren (Karikó et al., 2004). Ein direktes Zusammenwirken beider Moleküle wurde jedoch im Rahmen meiner Diplomarbeit nicht untersucht.

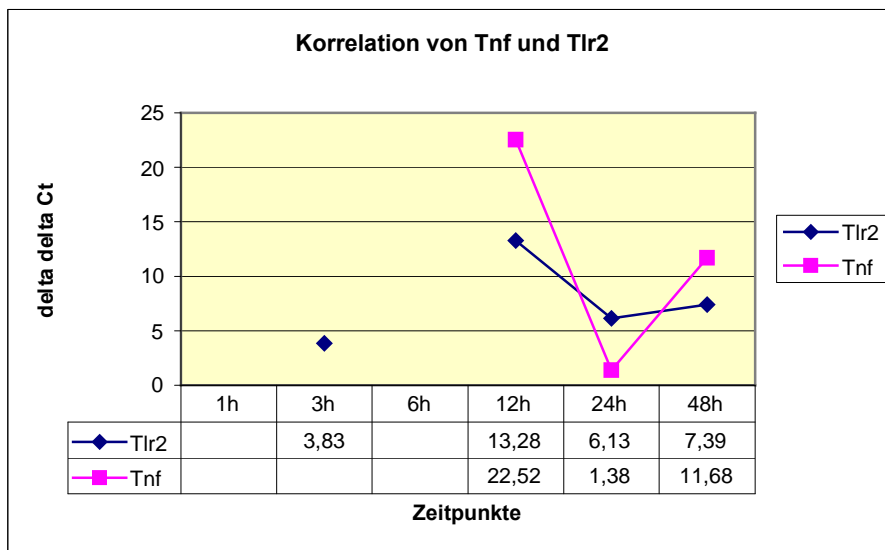


Abb. 3.22 Korrelation der Expression von Tlr2 und Tnf. Die Expression von Tnf wird durch den Tlr2-Signalweg induziert. In der oberen Abbildung ist erkennbar, dass die ipsilaterale Hochregulierung von Tlr2 mit einem Expressionsanstieg von Tnf einhergeht. Für die Untersuchung der zeitlichen Abfolge dieser Regulierung sind die hier gewählten Zeiträume zu groß.

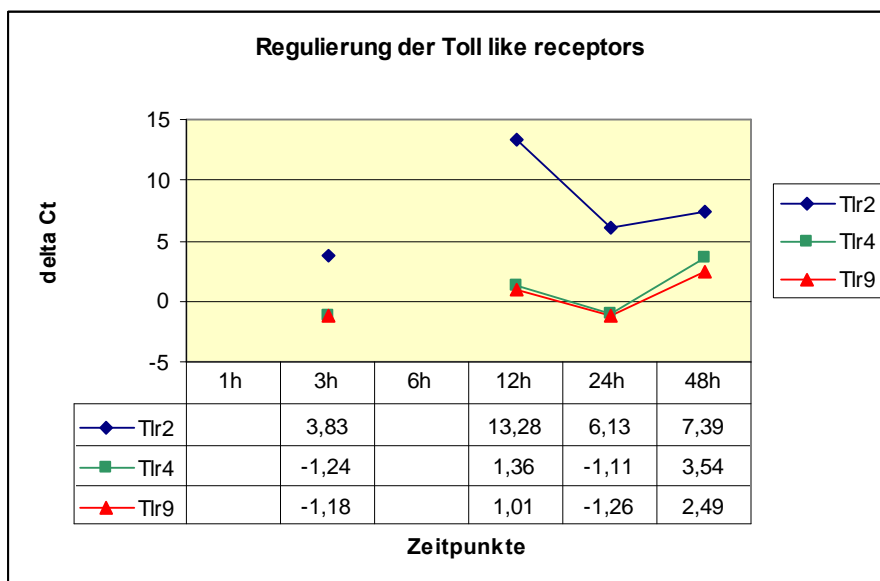


Abb. 3.23 Regulierung der Toll like-Rezeptoren. Wenn auch die Stärke der Toll-like-Rezeptor-Regulierung different ist, so ist doch das zeitliche Muster bei allen drei untersuchten Tlrs gleichförmig.

Ebenso wie Tlr2 tragen auch Tlr4 und Tlr9 zur Entwicklung einer Entzündungsreaktion nach einem Schlaganfall bei. Wie in Abbildung 3.23 erkennbar ist, zeigen sie das gleiche zeitliche Regulationsmuster auf.

Zur Erklärung der beobachteten Expressionsmuster ist folgendes denkbar: Nach einer MCAO kommt es aufgrund einer Mangeldurchblutung im Infarktareal zu nekrotischen Prozessen, die in der Entlassung von nekrotischen Proteinen in den Extrazellularraum münden. Diese Proteine induzieren über das Erkennen durch Tlrs eine Entzündungsreaktion, wobei die Entzündungsreaktion entscheidend für den Abtransport solcher Proteine ist (Karikó et al., 2004). Einer stark vermehrten Anzahl von nekrotischen Proteinen im Extrazellularraum, wie das nach einer Ischämie der Fall ist, wird mit der vermehrten Induktion der Tlr2-, Tlr4- und Tlr9-Expression begegnet. Die Entzündungsreaktion ist heftig, da zum einen die Anzahl der entzündungsauslösenden nekrotischen Proteine hoch ist und zum anderen diese Proteine von einer Vielzahl von Tlr-Proteinen detektiert werden können. So wird beispielsweise das proinflammatorische Cytokin Tnf ipsilateral fast 23fach hochreguliert. Auf den folgenden Abtransport zerstörter Zellen und Zellstoffe und der dadurch verminderten Notwendigkeit der Tlr-Proteinbildung könnte die stark zurückgehende Expression von Tlr zum Zeitpunkt 24 Stunden deuten. Es ist aber auch die Induktion Tlr-expressionsinhibierender Moleküle denkbar.

In der Penumbra kommt es allerdings zu weiterem Zellabsterben aufgrund der anhaltenden Überreaktion bei gleichzeitigem Energiemangel, der Aktivierung proteolytischer Enzyme, der Bildung von Giftstoffen und das Überschießen der inflammatorischen Antwort (siehe Abbildung 1.5 im Teil Einleitung – e) Der Hirnschlag) Der damit verbundene Anstieg führt zu einer Erhöhung der Zelltrümmer im Extrazellularraum, was eine erneute Steigerung der Tlr- sowie der Tnf- Expression zum Zeitpunkt 48 Stunden Reperfusion erklären könnte.

Des weiteren bestimmte ich die Regulation des Interleukins Il-10 mit Hilfe der Taq-Man-PCR. Es wirkt inhibitorisch unter anderem auf die Bildung von Tnf, Il-1 β und Il-6. Il-10 ist normalerweise in der Zelle nicht vorhanden und wird aufgrund der Aktivierung von Toll like-Rezeptoren und Cytokinrezeptoren induziert (Karikó et al., 2004). Jedoch war es über den gesamten untersuchten Zeitraum nicht möglich eine signifikante Il-10-Expression zu detektieren (die Amplifizierungsplots hierzu befinden sich im Anhang, 5. Anhang zur Diskussion eigener Ergebnisse bezüglich des aktuellen Standes der Forschung). Il-10 scheint daher nach einer einstündigen MCAO in der Maus nicht oder erst nach 48 Stunden Reperfusion induziert zu werden. Die Folge könnte eine Verstärkung

der Entzündungsreaktion sein, da inhibitorische Prozesse über IL-10 nicht mehr oder noch nicht greifen.

SOCSs (suppressor of cytokine signaling) werden über die Aktivierung von TLRs und Cytokinen induziert (Karikó et al., 2004) und hemmen ebenfalls die Bildung inflammatorischer Cytokine wie beispielsweise IL-6 und TNF. Für die Validierung der Affymetrix-Hybridisierungen wurde Socs2 ausgewählt. Es konnte sehr gut bestätigt werden (+/+). Abbildung 3.24 zeigt eine initiale Expression von FC=2,5, gefolgt von einem Abfall auf einen FC von knapp über eins (3-12 Stunden). Der anschließende langsame Anstieg der ipsilateralen Expression ab 24 Stunden Reperfusion lässt sich aus dem Anstieg der Tlr-Expression zum Zeitpunkt 12 Stunden erklären. Eine vermehrte Bildung von Toll like-Rezeptoren führt auch aufgrund ihrer Aktivierung zu einer verstärkten Expression von Socs2. Da für Socs3 bereits ein neuroprotectiver Charakter nachgewiesen wurde (Karikó et al., 2004), wäre eine solche Funktion für Socs2 ebenfalls denkbar.

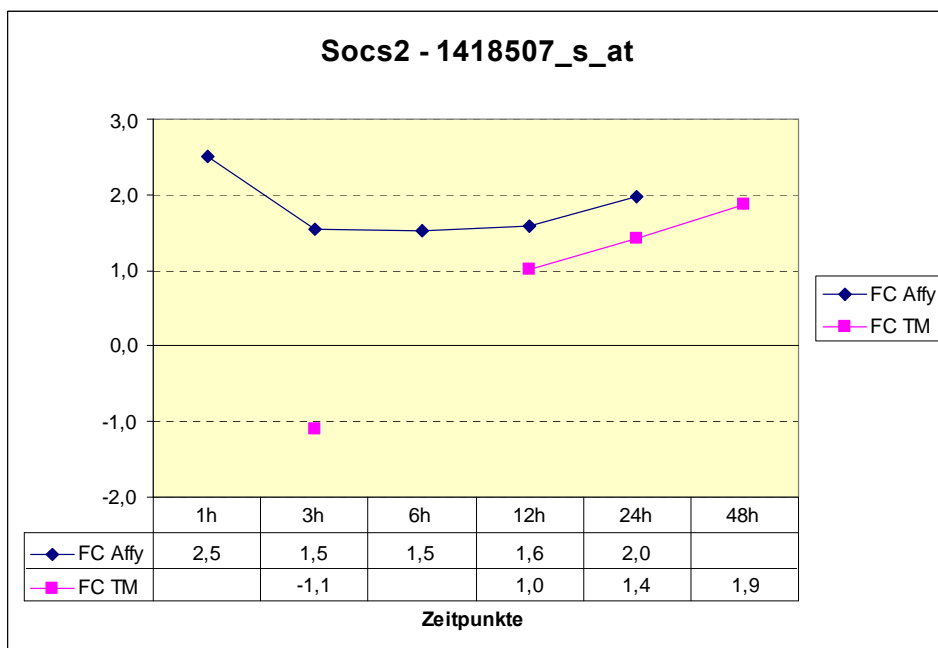


Abb. 3.24 Regulierung des entzündungshemmenden Proteins Socs2. Diese Darstellung der Affymetrix-Hybridisierungs-Werte (Affy) sowie der TaqMan-Werte (TM) zeigen nur eine geringe Hochregulierung des Gens Socs2.

CCL9 (CC chemokine 9), auch bezeichnet als MRP-2 (macrophage inflammatory protein-related protein-2) (Kim et al., 2003) oder MCP-5 (monocyte chemoattractant protein-5) (Abdi et al., 2004), ist ein chemotaktisches Cytokin. Chemokine werden je nach Anzahl und Position ihrer Cysteinreste in vier Familien eingeordnet: CXC, CC, C und CX3C (Yang and Odgren, 2005). CCL9 wird von Leukozyten und Stromazellen sekretiert (Yang and Odgren, 2005). Es bindet und aktiviert spezifische G-proteingekoppelte Rezeptoren auf Leukozyten, Monozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten, die chemoattraktorische Bewegungen dieser Zelltypen auslösen (Abdi et al., 2004, Young et al., 1995). Ccl9 wirkt daher entzündungsfördernd (Young et al., 1995). Außerdem kann CC chemokine 9 als Wachstumsfaktor bei der Angiogenese dienen (Kim et al., 2003), oder die Migration und Differenzierung von beispielsweise Osteoklasten bewirken (Yang and Odgren, 2005).

Die biologische Bildung von CCL9 ist abhängig vom TLR2-signaling (Aravalli et al., 2005). Vergleicht man in der Abbildung 3.25 die Expressionwerte der TaqMan-PCR von Ccl9 und Tlr2, erkennt man, dass beide Gene dem gleichen Regulationsmuster unterliegen. Wie bereits erwähnt, wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit ein direktes Zusammenwirken beider Moleküle nicht untersucht.

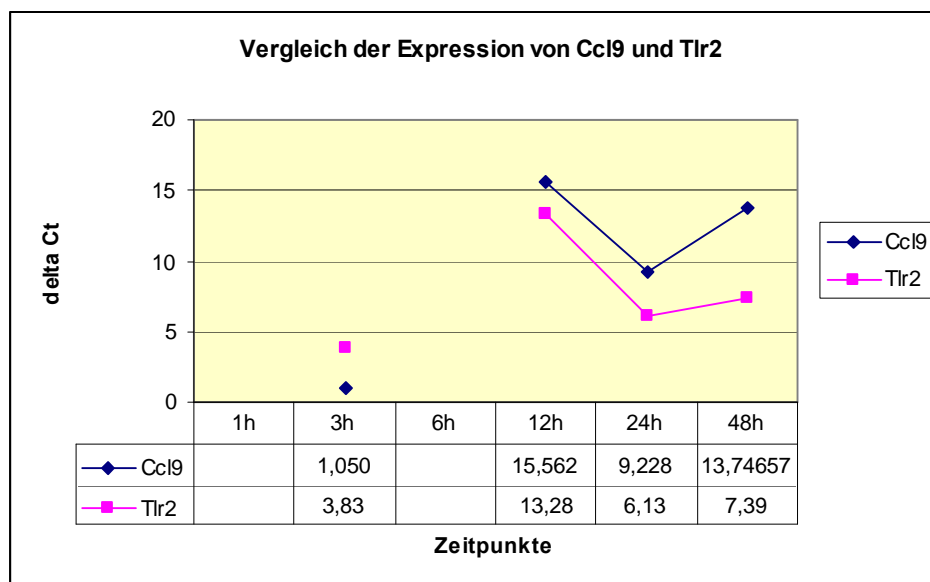


Abb. 3.25 Vergleich der Expression von Ccl9 und Tlr2. Diese Abbildung zeigt, dass beide Gene ähnlich reguliert werden.

HMGB1 (high mobility group box protein 1) besitzt insgesamt drei verschiedene Funktionen. Es dient als Transkriptionsfaktor, wirkt extrazellulär als Cytokin und membranassoziiert als Wachstumsfaktor (Czura et al., 2003). Als Transkriptionsfaktor bindet HMGB1 an AT-reiche DNA-Regionen, löst dort eine Konformationsänderung aus und wirkt sowohl transkriptionsinitiierend als auch transkriptionshemmend. Außerdem kann HMGB1 die Bindung anderer Effektoren an die DNA inhibierend oder aktivierend beeinflussen (Tracey et al., 2001, Ji et al., 1998). HMGB1 ist an der DNA-Reparatur sowie der DNA-Replikation beteiligt. Als membranassoziiertes Molekül fördert HMGB1, das auch als „Amphoterin“ bezeichnet wird, das Neuritenwachstum sowie die Regeneration peripherer Neuronen (Czura et al., 2001, Czura et al., 2003).

Wird HMGB1 in den Extrazellularraum entlassen, reagiert es als Cytokin. Es kann entweder von aktivierten Makrophagen exkretiert werden (Czura et al., 2003) oder aber passiv von nekrotischen Zellen freigegeben werden (Sun and Chao, 2005). Als Cytokin kann HMGB1 den receptor of advanced glycation end products (RAGE) binden und die Bildung von MAPKs und NF- κ B induzieren (Standford et al., 2005). Des Weiteren kann HMGB1 mit TLR2 und TLR4 interagieren und so eine Inflammation auslösen (Park et al., 2006, Czura et al., 2003, Yang et al., 2004). Eine fortgeschrittene Entzündung ist durch den Einsatz spezifischer HMGB1-Inhibitoren umkehrbar (Yang et al., 2004).

Die einem Schlaganfall folgende differentielle Expressierung in der Maus, konnte sehr gut validiert werden (+/+). Hmgb1 ist bis zum Zeitpunkt 24 Stunden Reperfusion ipsilateral herunterreguliert und zeigt erst nach 48 Stunden eine leichte Hochregulierung mit einem Fold Change von 1,43 [Abbildung hierzu findet sich im Anhang und unter a5) Berechnung des Fold Changes]. Es ist denkbar, dass sich dieser Trend fortsetzt und größere FC-Werte resultieren.

Des Weiteren löst HMGB1 die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) aus. iNOS trägt aufgrund der Bildung von oxidativem Stress zum Zelltod bei. Durch Il-10 wird die Expression von iNOS gehemmt (Geming et al., 2005). In dem hier angewandten Mausmodell konnte ich jedoch keine signifikante Il-10-Expression nachweisen. Es ist daher eine weitere Verstärkung des oxidativen Stress aufgrund der fehlenden Inhibition von iNOS denkbar.

Plaur bzw. uPAR (urokinase plasminogen activator receptor) oder CD87 ist ein membranassoziertes Molekül mit einer extrazellulären Serinprotease, das über einen Glykolsylphosphatidylionisitol-Anker an die Membran gebunden ist (Dewerchin et al., 1996, Ragno, 2005). Es kann im ischämischen Gehirn sowohl eine positive Wirkung, wie beispielsweise der Unterstützung der Axonregeneration oder der Angiogenese haben, als auch negative Effekte verursachen. So fördert uPAR das Auflösen des Gewebes und erhöht die Neurotoxizität über die Bildung von Plasmin (Beschorner et al., 2000, Dietzmann et al., 2001). uPar spaltet Plasminogen zu Plasmin und löst dabei eine proteolytische Kaskade aus (Beschorner et al., 2000). Plasmin fördert die Degradation der extrazellulären Matrix und wirkt fibinolytisch (Ragno, 2005). Außerdem fördert uPAR die Zelladhäsion, die Zellmigration von Leukozyten, die Proliferation sowie die Reorganisation des Aktinzytoskelets. uPAR hat daher einen positiven Einfluss auf das tissue remodelling (Beschorner et al., 2000, Dietzmann et al., 2001). Es wird während einer Ischämie von einwandernden Granulocysten, aktivierter Mikroglia und Endothelzellen exprimiert (Beschorner et al., 2000). Eine Herabsetzung der Blut-Hirn-Schranke durch uPAR erleichtert das Einwandern von entzündungsfördernden Leukozyten (Beschorner et al., 2000).

Im Mausmodell einer einstündigen MCAO konnte die Plaur-Expression mit +/- validiert werden. Mit Hilfe des Affymetrix-GeneChips wurde eine langsame Hochregulierung über den gesamten untersuchten Zeitraum festgestellt. Das Maximum liegt mit FC= 3,24 bei 48 Stunden. Wertet man die TaqMan-PCR aus, so erhält man einen deutlicheren Anstieg. Hier lässt sich das Maximum von FC= 26,26 dem Zeitpunkt 12 Stunden zuordnen [die Abbildung des graphischen Vergleichs für das Gen Plaur befindet sich im Anhang und unter Ergebnisse und Diskussion a5)]. Ein Abweichen der beiden Kurven ist eventuell damit zu erklären, dass die TaqMan-PCR quantitativ sensitiver ist als die Affymetrix-Hybridisierung. Ebenso können individuelle Unterschiede der Tiere zum tragen kommen, da für die Affymetrix-Hybridisierung ein anderer Pool an Tieren verwendet wurde, als für die TaqMan-PCR.

BLNK (B-cell linker), das auch bekannt ist als SLP-65, ist ein wichtiger Teil der Signalkaskade von prä-B-Zellen. Es stoppt deren Proliferation und fördert die Differenzierung zu B-Zellen (Köhler, 2005). BLNK interagiert dabei mit dem B-cell receptor (BCR). Die mit BCR assoziierten Kinasen lösen anschließend verschiedene Signalkaskaden aus (Han, 2001) und tragen so zur Proliferation, Apoptose und zum Reifungsstopp

bei (DeFranco, 1997). Um diese Funktion ausführen zu können, ist der B-cell linker mit Hilfe eines Leucin-zippers in der Membran verankert (Köhler, 2005).

Nach einer bzw. drei Stunden Reperfusion konnte nahezu keine differentielle Regulierung von Blnk nachgewiesen werden. Die ipsilaterale Expression steigt nach sechs Stunden mit einem FC von 3,2 an und erreicht ihr Maximum nach zwölf Stunden mit einem FC von 4,8. Der Expressionsanstieg ist möglicherweise mit dem Einwandern von Immunzellen in das Schlaganfallbetroffene Gebiet zu erklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Endzündung ein großen Beitrag zur Pathogenese des Schlaganfalls leistet. So werden Tlr2, Tlr4 und Tlr9 infolge einer MCAO verstärkt exprimiert. Toll like Rezeptoren sind Endzündungsmediatoren, die unter anderem die Expression der proinflammatorischen Interleukine TNF (Karikó et al., 2004, Zhang and Gosh, 2001) und Ccl9 (Aravalli et al., 2005) induzieren, aber auch die Bildung eines entzündungshemmenden Interleukins (Socs2) einleiten (Karikó et al., 2004). Ein anderes inhibitorische Interleukin, das Il-10 (Karikó et al., 2004), konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Eine weitere entzündungsfördernde Wirkung haben chemotaktische Interleukine wie Ccl9. Sie lösen das Einwandern von Leukozyten aus (Abdi et al., 2004, Beschorner et al., 2000, Young et al., 1995), das durch das Herabsetzen der Blut-Hirn-Schranke, aufgrund der Wirkung von Plaur, vereinfacht wird (Beschorner et al., 2000). Die Toll like Rezeptoren werden ihrerseits von Proteinen nekrotischer oder verletzter Zellen aktiviert (Karikó et al., 2004, Zhang and Gosh, 2001). Ein solches Molekül ist Hmgb1, das allerdings auch aktiv als Cytokin abgegeben werden kann (Sun and Chao, 2005, Czura et al., 2003). Weitere Schadensmechanismen zeigten sich in der Bildung der iNOS und der daraus folgenden Erhöhung des oxidativen Stresses (Bernik et al., 2002) sowie der fortgesetzten Gewebeauflösung durch Plaur und der damit verbundenen Entzündungsverstärkung (Beschorner et al., 2000).

Die untersuchten Gene sind jedoch nicht nur gewebeschädigenden Mechanismen zuzuordnen. So wirkt das von Interleukinen induzierte Mt2 schützend auf das Nervensystem (Levin et al., 2005, Trendelenburg et al., 2002). Hmgb1 fördert als membranassoziierter Wachstumsfaktor das Neuritenwachstum und die Regeneration peripherer Neuronen (Czura et al., 2001, Czura et al., 2003). Ccl9 dient als Wachstumsfaktor bei der Angiogenese (Kim et al., 2003).

e) Eignung des Mausmodells

Als Modellorganismen für einen ischämischen Schlaganfall eignen sich Nagetiere, insbesondere Mäuse. Die Induktion einer cerebralen Ischämie in Mäusen ist mit Hilfe der Fadenmethode einfach und schnell durchführbar sowie in großer Stückzahl möglich. Die verschiedenen molekularen Mechanismen zur fortschreitenden Zerstörung von Gehirngewebe lassen sich gut nachstellen. Leider birgt dieses Modell auch einige Fehler. So machen die meisten humanen Schlaganfälle 4,5 bis 14% der ipsilateralen Hemisphäre aus. Sie sind es, die in erster Linie therapeutisch interessant erscheinen, da hier pathogenetische Prozesse potentiell beeinflussbar wären. Im Tiermodell werden dagegen Schlaganfälle zwischen 21 und 45% der ipsilateralen Hemisphäre erzeugt. Da ein Schlaganfall größer als 39 % im Menschen schon schwerwiegende Schäden bis hin zum Tod hervorruft, kann das Mausmodell einer MCAO hinsichtlich der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien fehlerhaft sein (Carmichael, 2005). Außerdem unterscheiden sich die Infarkt-Volumina zwischen verschiedenen Wildtyspezies aber auch innerhalb der gleichen Wildtyspezies (Carmichael, 2005). Gene, die in einer Wildtyspezies eine differentielle Expressierung zeigen, sollten somit sowohl in einem anderen Wildtyp als auch in einer anderen Tierordnung beispielsweise der Primaten überprüft werden.

Die Fadenmethode erlaubt den künstlichen Verschluss eines Blutgefäßes analog zur Ischämie im menschlichen Gehirn. Allerdings kommt es aufgrund der experimentellen Vorgehensweise auch hier zu einer 12%igen Rate von subarachnoiden Gehirnblutungen, die beidseitig zu einem Abfall des Blutflusses führt (Carmichael, 2005). Die in diesem Modell gefundenen differenziell exprimierten Gene könnten so nicht nur durch einen ischämischen Hirnschlag verursacht werden, sondern wurden eventuell durch eine Gehirnblutung induziert. Diese beidseitig verringerte Durchblutung könnte ebenso kontralateral zu einer Veränderung der Genexpression führen. Da die Genexpression der ipsilateralen Hemisphäre der ischämischen Tiere relativ zur kontralateralen Gehirnhälfte untersucht wurde, ist eine Verschiebung des Genexpressionsmusters möglich. Jedoch ist ein Ausgleich der zusätzlichen Genexpression aufgrund der beidseitigen Blutflussabnahme denkbar. Betrachtet man die Genexpression der ipsilateralen Hemisphäre des ischämischen Tiers mit der ipsilateralen Hemisphäre des Sham-Tiers, so führt das zu gleichartigen Überlegungen, da das Sham-Tier identisch präpariert wurde, ausgenommen der Einführung des Fadens. Die Betrachtung der Genexpressionsdaten des ischä-

mischen Tiers relativ zu einem unbehandelten Tier könnte eine mögliche Beeinflussung des Genexpressionsmusters ausschließen.

a) Validierung der Affymetrix-Hybridisierungs-Daten mittels quantitativer real-time PCR (TaqMan Assay)

Es wurden zu Validierungszwecken 150 Gene ausgewählt, deren Expression im Gehirn von Wildtypmäusen bestimmt wurde. Einen Teil der Mäuse wurde zuvor eine einstündige MCAO zugefügt. Es wurden Expressionswerte der ipsilateralen Hemisphäre relativ zur kontralateralen Gehirnhälfte bestimmt und diese Werte anschließend graphisch mit den zu validierenden Affymetrix-Hybridisierungsdaten verglichen. Von den 150 betrachteten Genen konnten 96 sehr gut validiert werden. Das entspricht einem Prozentsatz von 63%. Weitere 34% konnten relativ gut belegt werden. Für 3% bzw. 4 Gene konnte auf keine Bestätigung der Affymetrix-Hybridisierungs-Daten geschlossen werden.

Aus Reproduzierbarkeitsexperimenten ergab sich eine mittlere Abweichung der $\Delta\Delta C_T$ -Werte von $\pm 0,9$ bzw. ein Fold Change-Wert von $\pm 1,87$. Die Anzahl der ermittelten Werte genügt zwar nicht für eine vollständige Fehleranalyse, reicht aber für eine grobe Abschätzung der zu erwartenden Abweichungen aus.

b) Immunohistochemie

Eine immunohistochemische Anfärbung von Mt2, Blnk, Ccl9, Hmgb1, Plaur und Tlr2 mit Hilfe der Zwei-Schritt indirekten Methode, sollte zur Überprüfung der zuvor bestätigten Genregulierung auch auf Proteinebene dienen.

Aufgrund verschiedener Schwierigkeiten ist bisher noch keine der Proteinfärbungen zufriedenstellend. Zu den Schwierigkeiten gehören das Auffinden der passenden Antikörper und des Fixierungsmittels, sowie die Bestimmung der Konzentration, Temperaturen und Zeiten sämtlicher experimenteller Schritte.

Für Detektion von Mt2 und Blnk wurden monoklonale Mausantikörper verwendet. Das Anfärbungsmuster resultierte jedoch nicht aus der Bindung des Antigens durch den primären Antikörper, sondern allein aus der Bindung des sekundären Antikörpers an Endothelien. Eine Anfärbung des gewünschten Antigens war mit diesen Antikörpern erst unter Verwendung eines Mouse-On-Mouse-Kits möglich.

Bei allen Färbungen fiel eine schlechte Fixierungen des Gewebes auf, die weder durch die Verwendung von PFA noch Methanol/Aceton als Postfixierungsmittel vermieden werden konnte. Weitere Optimierungsversuche mit PFA-perfusionsfixierten Mäusen führten zu einer Verbesserung des Gewebes und des Signal-to-Noise-Verhältnis im Falle der immunohistochemischen Färbung von Ccl9.

Die aufgrund der Genexpressiondaten zu erwartende Regulierung von Hmgb1 konnte teilweise bestätigt werden. Im Sham-Tier war eine ungleichmäßige Verteilung der Hmgb1-Anfärbung auffällig. Ein methodischer Fehler konnte mit weiteren immunohistochemischen Färbungen ausgeschlossen werden.

Ein Nachweis der ipsilateralen Hochregulierung von Plaur war bisher noch nicht erfolgreich. Auch hier fiel eine ungleichmäßige Verteilung von Plaur im Sham-Tier auf.

Die immunohistochemische Anfärbung von Tlr2 entsprach teilweise den Erwartungen. Allerdings muss das Singal-to-Noise-Verhältnis verbessert werden.

Für ein Gelingen der immunohistochemischen Färbungen sind weitere Optimierungen notwendig. Künftig werde ich mit Schnitten PFA-perfusionsfixierter Mäuse arbeiten und geeignete Konzentrationen von Antikörper- und Blockierungslösungen sowie von Inkubationszeiten und -temperaturen auffinden.

c) Analyse von Signalwegen

Aufgrund der in öffentlichen Datenbanken zur Verfügung stehenden Informationen über das Zusammenwirken der untersuchten Gene, war es mir mit der verfügbaren Software nicht möglich ihnen neue Wechselwirkungen zuzuordnen, als die die für den Schlaganfall bereits bekannt sind. Hierzu gehören die Entzündung, die Apoptose und die Zelldifferenzierung.

Quellen

- Abdi, Reza; Means, Terry K.; Ito, Toshiro; Smith, Rex Neal; Najafian, Nader; Jurewicz, Molli; Tchipachvili, Vaja; Charo, Israel; Auchincloss, Jr., Hugh; Sayegh Mohamed H.; and Luster, Andrew D.; Differential Role of CCR2 in Islet and Heart Allograft Rejection: Tissue Specificity of Chemokine/Chemokine Receptor Function in vivo, *The Journal of Immunology* 172:767-775, 2004
- Aravalli, Rajagopal N.; Hu, Shuxian; Rowen, Timothy N.; Palmquist Joseph M.; and Lokensgard, James R.; Cutting Edge: TLR2-Mediated Proinflammatory Cytokine and Chemokine Production by Microglia Cells in Response to Herpes Simplex Virus, *The Journal of Immunology* 175: 4189-4193, 2005
- Ariadne Genomics, <http://www.ariadnegenomics.com>
- Bernik, Thomas R.; Friedmann, Steven G.; Ochani, Mahendar; DiRaimo, Robert ; Susarla, Seenu; Czura, Christopher J.; and Tracey, Kevin J.; Cholergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion, *Eastern Vascular Society*, 2002
- Beschorner R., Schluesener HJ, Nguyen TD, Magdolen V, Luther T, Pental I, Mattern R, Meyermann R, Schwab JM, Lesion-associated accumulation of uPAR/CD87-expressing infiltrating granulocytes, activated microglia cells/macrophage and upregulation by endothelial cells following TBI and FCI in humans, *Neuropathol Appl Neurobiol* 26(6):522-7, 2000
- Boenisch, M.S. Thomas; Farmilo, Ph.D. A.J.; *Handbook Immunochemical Staining Methodes* 3rd Edition, DAKO Corporation Carpinteria, CA, USA, DAKO A/S Glostrup, Denmark,
- Carmichael, S. Thomas; *Rodent Models of Focal Stroke: Size, Mechanism, and Purpose*, The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc., 2005
- Critical factors for Successful Real-Time PCR, 01/2004, Quiagen
- Czura CJ, Yang H, Tracey KJ, High mobility group box-1 as a therapeutic target downstream of tumor necrosis factor, *Infect Dis* 187 Suppl 2: S391-6, 2003
- Czura CJ, Wang H, Tracey KJ, Dual roles for HMGB1: DNA binding and cytokine, *J Endotoxin Res.* 7(4):315-21, 2001
- DakoCytomation, General Instructions For Immunohistochemical Staining
- DeFranco, A.L., The complexity of signaling pathways activated by the BCR, *Curr. Opin. Immunol.* 9:296-308, 1997
- DeFranco, the complexity of signaling pathways activated by the BCR, *Curr Opin Immunol* 9(3):296-308, 1997

- Dewerchin M, Van Nuffelen A, Goedele W, Bouché A, Moons L, Carmeliet P, Generation and Characterization of Urokinase Receptor-deficient Mice, The American Society for Clinical Investigation, Inc., Volume 97, Number 3 870-878, 1996
- Dietzmann K, von Bossanyi P, Krause D, Witting H, Mawrin C, Kirches E, Expression of the plasminogen activator system and the inhibitors PAL-1 and PAL-2 in posttraumatic lesions of the CNS and brain injuries following dramatic circulatory arrest: an immunohistochemical study, *Pathol Res Pract.* 196(1):15-21, 2000
- Dirnagl, Ulrich; Iadecola, Constantino; and Moskowitz, Michael; Pathobiology of ischaemic Stroke: an integrated view, *Trends Neurosc.* 22, 391-397, 1999
- Ensembl, http://www.ensembl.org/Mus_musculus
- Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, <http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>
- Gray, Henry und Lewis, Warren H. *Anatomy of the human body* 20th ed., Lea & Febiger, 2000
- Han W., Takano T., He J., Ding J., Gao S, Noda C., Yanagi S., Yamamura H., Role of Blnk in oxidative stress signaling in B cells, *Anti Redox Signal.* 3(&): 1065-73, 2001
- Hara, H., Huang, P.L., Panahian, N., Fishman, M.C., and Moskowitz, M., Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide sythease after transient MCA occlusion, *J.Cereb. Blood Flow Metab.* 16: 605-611, 1996
- Hata, R., Mies, G., Wiessner, C., Fritze, K., Hasselbarth, D., Brinker, G, and Hossmann, K.A. A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: Hemodynamical, biochemical and magnetic resonance immaging, *J.Cereb. Blood Flow Metab.* 18: 367-375, 1998
- <http://www.healthsystem.virginia.edu/internet/biomolec/genechipanalysismethods.cfm>
- Ingenuity™, <http://ingenuity.com>
- <http://www.rs-ti-neu.fr.schule-bw.de/fachalle/bio/lzgehirn/Gehirnaufbau%20und%20Funktion.htm>
- Ji, Yan-Shan; Xu, Qing; Schmedtje; John F. Jr.; Hypoxia Induces High-Mobility-Group Protein I(Y) and Transcription of Cyclooxygenase-2 Gene in Human Vascular Endothelium, American Heart Association, Inc., 1998
- Karikó, Katalin; Weissman, Drew; and Welsch, Frank A.; Inhibition of Toll-like Receptor and Cytokine Signaling – A Unifying Theme in Ischemic Tolerance, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 24:1288-1304, 2004
- Keppler, D., et al., Hepatic canalicular membrane 5 : expression and localization of conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver, *FASEB J.* 11:509-516, 1997

- Kim, Chu-Sook; Kawada, Teruo; Yoo, Hoon; Knon, Byung-Se; Yu, Rina; Macrophage inflammatory protein-related protein-2, a novel CC chemokine, can regulate preadipocyte migration and adipocyte differentiation, *FEBS Letters* 548 125-130, 2003
- Köhler, Fabian; Storch, Bettina; Kulathu, Yogesh; Herzog, Sebastian; Kuppig, Stephan; Reth, Michale; and Jumaa, Hassan; A leucin zipper in the N terminus confers membran association to SLP-65, *nature immunology*, Volume 6 number 2, 2005
- Levin, Edward D.; Perraut, Charles; Pollard, Ninitia; Freedman, Jonathan H.; Metallothionein expression and neurocognitive function in mice, *Physiology and Behavior*, 2005
- Li, Geming; Liu, Wei; Frenz, Dorothy; Cisplatin ototoxicity to the inner ear: A role for HMG1 and iNOS, *NeuroToxicology*, 2005
- Liebermann, D.A. and Hoffmann, B., MyD genes in negative growth control, *Oncogene* 14: 2721-2728, 1998
- Lu, X.-C- May; Williams, Anthony J.; Yao, Changping; Berti, Rossana; Hartings, Jed A.; Whipple, Rebecca; Vahey, Maryanne T.; Polavarapu, Ratna G.; Woller, Kimberly L.; Tortella, Frank C.; and Dave, Jitendra R.; Microarray Analysis of Acute and Delayed Gene Expression Profile in Rats after Focal Ischemic Brain Injury and Reperfusion, *Journal of Neuroscience Research* 77: 843-857, 2004
- Martinon, Fabio; and Tschopp, Jürgen; NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens, *TRENDS in immunology* Vol.26 No.8, 2005
- Meisel, Christian; Schwab, Jan M.; Prass, Konstantin; Meisel, Andreas; and Dirnagl, Ulrich; Central Nervous System Injury-induced Immune deficiency Syndrome, *Nature Reviews Neuroscience AOP*, 2005
- Mergenthaler, Philipp; Dirnagl, Ulrich; and Meisel, Andreas; Pathophysiology vof Stroke: Lessons from Animal Models, *Springer Science+Business Media B.V.*, 2004
- Nagata, Toshihito; Takahashi, Yasuo; Sugahara, Mengumi; Murata, Akiko; Nishida, Yayoi; Ishikawa, Koichi; Asai, Satoshi; Profiling of genes associated with transcriptional responses in mouse hippocampus after transient forebrain ischemia using high-density oligonucleotid DNA array, *Molecular Brain Research* 121 (2004) 1-11, 2003
- Nicholls, Martin, Wallace, Vom Neuron zum Gehirn, *Gustav Fischer Verlag*, 1995
- Nolte, C.H., Jungehülsing, G.J., Villringer, A., *Pathophysiologie der zerebralen Ischämie*, 2002
- Österreichische Gesellschaft für Schlaganfall-Forschung
<http://www.schlaganfall-info.at/info/was.html>
- Park, Jong Sung; Gamboni-Robertson, Fabia; He, Qianbin; Svetkauskaite, Daiva; Kim, Jae-Yeol; Strassheim, Derek; Sohn, Jang-Won; Yamada, Shingo; Maruyama, Ikuro; Banerjee, Anirban; Ishizaka, Akitoshi; and Abraham, Edward; High Mobility Group

- Box 1 Protein interacts with multiple Toll-like receptors, *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C917-24, 2006
- Pfaffl MW, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (9), 2001
- QuantiTect™ Sybr®, Qiagen, August 2003
- Ragno, P.; The urokinase receptor: a ligand or receptor? Story of a sociable molecule, *Cellular and Molecular Life Science*, 2006
- Santa Cruz Biotechnology, inc., product paper of BLNK (2B11): sc-8003, 2005
- Santa Cruz Biotechnology, inc. product paper of MRP2 (H-300): sc-20766
- Santa Cruz Biotechnology, inc., product paper of uPAR (FL-290): sc-10815, 2005
- Schaffer, Mike; *Microarray Normalization and Analysis, Computational Genomics (BE777)*, 2004
- Smith, Dr. Tony; *Der menschliche Körper*, Bechtermünz Verlag, Augsburg, 1997
- Standford AN, Dietzmann K, Sullivan KE, Apoptotic cells, autoantibodies, and the role of HMGB1 in the subcellular localization of an autoantigen, *journal of autoimmunity* 25:264-271, 2005
- Stiftung Deutsche Schlaganfallhilfe <http://www.schlaganfall-hilfe.de>
- Sun NK, Chao CC, The cytokine activity of HMGB1 – extracellular escape of the nuclear protein, *Chang Gung Med J*, 28(10):673-82), 2005
- SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR-Kit Version D, Invitrogen™, January 2003
- Teranode™, <http://www.teranode.com>
- Thews, Mutschler, Vaupel, *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 5. Auflage, 1999
- Tracey, Kevin J.; Czura, Christopher J.; and Ivanova, Svetlana; Mind over immunity, *The FASEB Journal*, Vol 15, 2001
- Trapp, Thorsten; Oláh, Laszlo; Hölker, Irmgard; Besselmann, Michael; Tiesler, Christine; Maede, Keiichiro; and Hossmann, Konstantin-Alexander; GTPase RhoB: An Early Predictor of Neuronal Death after Transient Focal Ischemia in Mice, 2001
- Trendelenburg, George; Prass, Konstantin; Priller, Josef; Kapinya, Kriezian; Polley, Andreas; Muselmann, Claudia; Ruscher, Karsten; Kannbley, Ute; Schmitt, Armin O.; Castell, Stefanie; Wiegand, Frank; Meisel, Andreas; Rosenthal, André; and Dirnagl, U.; Serial Analysis of Gene Expression identifies Metallothionein-II as Major Neuroprotective Gene in Mouse Cerebral Ischemia, *The Journal of Neuroscience*, July 2002

University of Wisconsin – Madison Brain Collection

Vandesompele, Jo; De Preter, Katleen; Pattyn, Filip; Poppe, Bruce; Van Roy, Nadine; De Paepe Anne; and Speleman, Frank; Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biology*, 2002

Wen, Tong-Chun; Peng, Hui; Hata, Ryuji; Desaki, Junzo; Sakanaka, Masahira; Induction of phosphorylated-Stat3 following focal cerebral ischemia in mice, *Neuroscience Letters* 303 153-156, 2001

Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L, Wang H, DiRaimo R, Czura CJ, Wang H, Roth J, Warren HS, Fink MP, Fenton MJ, Andersson U, Tracey KJ, Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1, *Proc Natl Acad Sci USA* 101(1):296-301, 2004

Yang, Meiheng; Odgren, Paul R.; Molecular cloning and characterization of rat CCL9 (MIP-1 γ), the ortholog of mouse CCL9, *Cytokine* 31:94-102, 2005

Youn, B.S., Jang, I.K., Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Elick, T.A., Fraser Jr., M.G., and Kwon, B.S., *J Immunology* 155, 2661-2667

Zhang, Guolong; and Ghosh, Sankar; Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity, *J Clin Invest*, 2001

häufig gebrauchte Abkürzungen

Blnk	–	B-cell linker (Mus musculus)
BLNK	–	B-cell linker (Homo sapiens)
BSA	–	Bovine Serum Albumine
Ccl9	–	chemokin (C-C motif) ligand 9 (Mus musculus)
CCL9	–	chemokin (C-C motif) ligand 9 (Homo sapiens)
Hmgb1	–	high mobility group box protein 1 (Mus musculus)
HMGB1	–	high mobility group box protein 1 (Homo sapiens)
IHC	–	Immunohistochemie
Il-10	–	interleukin 10 (Mus musculus)
iNOS	–	induzierbare NO Synthase
MFC	–	Micro Fluidic Card
Mt2	–	Metallothionein 2 (Mus musculus)
MT2	–	Metallothionein 2 (Homo sapiens)
NGS	–	Normal Goat Serum
PBS	–	Phosphate buffered saline
PFA	–	Paraformaldehyd
Plaur	–	urokinase plasminogen activator receptor (Mus musculus)
PLAUR	–	urokinase plasminogen activator receptor (Homo sapiens)
Tlr2	–	toll like receptor 2 (Mus musculus)
TLR2	–	toll like receptor 2 (Homo sapiens)
TNF	–	tumor necrosis factor (Homo sapiens)
Socs	–	suppressor of cytokine signaling (Mus musculus)
SOCS	–	suppressor of cytokine signaling (Homo sapiens)
wt	–	Wildtyp

Die selbständige und eigenständige Anfertigung versichert an Eides statt.

Berlin, den

Unterschrift