Zelladhäsionsmoleküle und Moleküle der extrazellulären Matrix während der Regeneration im *Nucleus facialis*

DISSERTATION

zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

UNIVERSITÄT KONSTANZ

vorgelegt von

Robert Streif

geboren am 18. März 1968

in Offenburg, Baden (BRD)

August 2001

Dissertation der Universität Konstanz

Datum der mündlichen Prüfung: 29.01.2002

Referent: Prof. Dr.C.A.O. Stürmer

Referent: Prof. Dr. G.W. Kreutzberg

Danksagung

Wie wohl bei jedem Doktoranden, gab es auch bei mir sowohl Zeiten der Euphorie und des Glücks, da alle Versuche gut liefen, wie auch Zeiten der Niedergeschlagenheit, ja der schieren Verzweiflung, da plötzlich nichts mehr ging und die Ergebnisse der einzelnen Versuche sich nicht mehr mit denen vom Vortag vergleichen ließen.
Aber ich hatte zum Glück viele Leute um mich, die mir in meinen Nöten aufmunternde Worte zusprachen und mich so wieder vorangetrieben haben und mir geholfen haben, auch diese Durststrecken erfolgreich hinter mich zu bringen. Bei all diesen Leuten möchte ich mich bedanken und sollte ich jemanden namentlich nicht erwähnen, bitte ich bereits im voraus um Entschuldigung – es soll keine Mißachtung seiner Person oder seines Schaffens sein!

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Professor G.W. Kreutzberg bedanken, der es mir ermöglicht hat, meine ganzen Untersuchungen in seinem Labor durchzuführen und der manch aufmunternde Worte bereit hatte und so wieder motivieren konnte, sich in den nächsten Versuch zu stürzen.
Ebenso großen Dank zolle ich Frau Professor C.A.O. Stürmer, die mich erst auf den Weg zur Neurobiologie gebracht hat. Durch ihre Vorlesungen und Kurse an der Universität Konstanz wurde erst mein Interesse an der Neurobiologie geweckt und geschürt.
Des weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. G. Hager für seine direkte Betreuung meiner Promotion, seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bedanken. Auch seine Zeit, die er in das Korrekturlesen meiner Arbeit investiert hat ist ihm hoch an zu rechnen.
Herrn Dr. F.W. Schwaiger möchte ich für seine unermüdlichen Bemühungen danken, mir und den anderen Doktoranden der Abteilung die Theorie und Praxis molekularbiologischer Methoden nahe zu bringen.
Auch Frau Dr. B. Grimpe danke ich für ihre Hilfe und erklärenden Worte bei der Antikörperherstellung und für ihre Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei den täglichen Problemen.

Ganz wichtig ist mir der Dank an meine Mit-Doktoranden Gabriele Kerber und Alexander Werner, mit denen man sich über gelungene Experimente freuen und, im Falle von mißglückten, sich gegenseitig wieder aufbauen konnte.
Dank auch an Karin Brückner für ihre hervorragende photolabortechnische Arbeit und für ihr herzhaftes Lachen, welches Trübsinn immer verfliegen ließ und an Helma Tyrlas, für ihre Hilfe bei den Zellkulturen.
Eigentlich könnte ich so noch eine Weile weiterdanken und Alle einzeln aufzählen. Um die Sache jedoch abzukürzen möchte ich der ganzen Abteilung danken, für all die geselligen Feiern, sei es nun Geburtstage, Wandertage, Oktoberfeste oder die morgendliche Teerunde. Dies waren die Momente, in denen man abschalten und wieder Energie schöpfen konnte.
Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, welche mir während meines ganzen Studiums und meiner Promotion zur Seite standen und mich ermuntert und unterstützt haben.

ERKLÄRUNG:

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig unter Verwendung der in dieser Arbeit aufgezählten Hilfsmittel und Methoden erstellt und verfaßt zu haben. Alle von mir zitierten Quellen oder wörtlich bzw. inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet und aufgeführt.

München, im Januar 2001

Robert Streif

1. Einleitung 1

1.1 Allgemeine Einführung 1

1.2 F84.1/SC1/BEN/ALCAM 6

1.3 Nr-CAM / Bravo 7

1.4 Phosphacan / Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatase beta/zeta 8

1.5 Dystrophin assoziierter Proteinkomplex (DAPC) 9
1.5.1 α- und β-Dystroglycan 9
1.5.2 Agrin 11
1.5.3 Muskelspezifische Kinase (MuSK) 12

2. Material und Methoden 14

2.1 Versuchstiere und Operationen 14
2.1.1 Durchtrennen des *Nervus facialis* 14
2.1.2 Direkte Kortex Läsionen (traumatische Hirnverletzungen) 15
2.1.3 Ischiasläsionen und Ischiasquetschungen 16
2.1.4 Durchtrennen des Hypoglossus Nerven 16

2.2 Immunhistochemie 17
2.2.1 Perfusion und Gehirnentnahme 17
2.2.2 Kryostatschnitte 17
2.2.3 Antikörperfärbung 18
2.2.4 Mikroskopie 21
2.2.5 Digitale Bildanalyse 21
2.2.5.1 Färbungen mit dem Antikörper F84.1 21
2.2.5.2 Färbungen mit dem Antikörper gegen Nr-CAM 22
2.2.6 Excel Tabellen und angewandte Statistik 23

2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 24
2.3.1 Gewebsentnahme und Aufbereitung 24
2.3.2 Umschreiben der RNA in cDNA: reverse Transkription (RT) 25
2.3.3 PCR (Polymerasen-Ketten-Reaktion) 26
2.3.3.1 Primerentwicklung und Optimierung der PCR-Bedingungen 27
2.3.3.2 Semiquantitative PCR 27

2.4 Klonierung und Sequenzierung 29
2.4.1 Plasmide und kompetente Zellen 29
2.4.2 Klonierung 30
2.4.3 Plasmidpräparation 32
2.4.4. Sequenzierung 32

2.5 *In situ* Hybridisierung 33
2.5.1 Radioaktive *in situ* Hybridisierung 33
2.5.1.1 Probenvorbereitung für Ribosonden 33
2.5.1.3 Denaturierendes Harnstoffgel 35
2.5.1.4 Scintilationsmessung 36
2.5.1.5 Hybridisierung 36
2.5.1.6 Aufbringen der Filmemulsion und Entwicklung der Schnitte 37
2.5.1.7 Mikroskopie und Auswertung 38
2.5.1.8 Radioaktive Markierung der Oligonukleotide 38
2.5.1.9 Hybridisierung mit Oligonukleotid-Sonde 39
2.5.2 nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung 40
2.5.2.1 Gewebsvorbereitung 41
2.5.2.2 Markierung der Ribosonde 41
2.5.2.3 Überprüfung der Markierungsreaktion 41
2.5.2.4 Hybridisierung 41

2.6 Herstellung eines polyklonalen Antikörperserums gegen SC1 44
2.6.1 Kopplung des Peptids an das Trägerprotein 44
2.6.2. Gewinnung von Prä-Immunserum 45
2.6.3 Immunisierung unter Verwendung von Freund's Adjuvants 46

2.6.4 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 46

2.7 Westernblots 47
2.7.1 Gewebsentnahme 47
2.7.2 Isolierung der Fazialis - Kernregion 47
2.7.3 Aufbereitung des Gewebes 48
2.7.4 Protein-Konzentrationsbestimmung 48
2.7.5 Elektrophorese und Proteintransfer 49
2.7.6 Antikörperfärbung und Detektion 50

2.8 Lösungen 51
2.8.1 Puffer 51
2.8.2 Medien 55
2.8.3 Farblösungen 55
2.8.4 Sonstiges 56

3. Ergebnisse 59

3.1 SC1 / ALCAM 59
3.1.1 Immunhistochemie 59
3.1.2 Westernblot 63
3.1.3 Klonierung und Sequenzierung zur Aufklärung der Nukleinsäuresequenz von SC1 65
3.1.4 Polyklonales Antikörperserum gegen SC1/ALCAM 67
3.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 69
3.1.6 radioaktive und nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung 71
3.1.6.1 radioaktive *in situ* Hybridisierung 71
3.1.6.2 nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung 74

3.2 CD6 75
3.2.1 Immunhistochemie 75
3.2.2 Polymerasen-Ketten-Reaktion 76

3.3 Nr-CAM (neuron-glia related cell adhesion molecule) 76
3.3.1 Immunhistochemie 76
3.3.2 Westernblot 80
3.3.3 Polymerase Ketten Reaktion 81

3.4 Dystrophin assoziierter Protein Komplex 83
3.4.1 Dystroglycan 83
3.4.1.1 Immunhistochemie 83
3.4.1.2 Westernblot 85
3.4.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion 86
3.4.2 Agrin 87
3.4.2.1 Immunhistochemie 87
3.4.2.2 Polymerasen-Ketten-Reaktion 88
3.4.3 MuSK – Muskelspezifische Kinase 91
3.4.3.1 Polymerasen-Ketten-Reaktion 91

3.5 Phosphacan / Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatase beta/zeta 91
3.5.1 Immunhistochemie 91
3.5.2 Polymerasen-Ketten-Reaktion 92
3.5.3 *in situ* Hybridisierung 93

4. Diskussion 94

4.1 SC1 und CD6: Ein funktionierender Ligand-Rezeptor Komplex im ZNS? 94
4.1.1 SC1 ist ein regenerationsassoziiertes Oberflächenmolekül 94
4.1.2 Ist CD6 der Bindungspartner für SC1 im Zentralnervensystem der Ratte? 96

4.2 Entwicklungsassoziierte Oberflächen- und extrazelluläre Matrix-Moleküle mit Relevanz zur Regeneration 97
4.2.1 Nr-CAM 97
4.2.2 Phosphacan 98
4.2.3 Dystrophin-assoziierter Proteinkomplex 99
4.2.3.1 Eine Dystroglycan Regulation ist als Folge auf eine ZNS Verletzung nicht nachweisbar 99
4.2.3.2 Agrin 100

4.2.3.3 MuSK – muskelspezifische Kinase 101

5. Zusammenfassung 102

6. Verzeichnis häufig benutzter Abkürzungen 104

7. Literatur 105

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Betrachtet man das zentrale Nervensystem, so besteht es im wesentlichen aus 3 verschiedenen Zelltypen. Dies sind die Neurone, die Mikroglia und die Makroglia. Makroglia läßt sich in Astrozyten und Oligodendrozyten untergliedern (siehe Abbildung 1.1).

Abbildung 1.1 Die verschiedenen Zelltypen im Gehirn und ihre Funktion. Dargestellt sind nomenklatorische, nicht phylogenetische Bezüge.

Neurone und Makroglia entstehen aus gemeinsamen Vorläuferzellen, während sich die Mikroglia wahrscheinlich aus mesodermalen Stammzellen entwickelt.

Diese verschiedenen Zelltypen lassen sich bereits durch ihre Morphologie unterscheiden (Abbildung 1.2 A). Es gibt jedoch auch verschiedene Morphologien des gleichen Zelltypus, abhängig von dem Entwicklungsstadium und der Funktion der entsprechenden Zellen (vergl. Abbildung 1.2 B).

Funktionell bestehen große Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen. Neurone erzeugen elektrische Signale, verarbeiten diese und leiten sie weiter, während die Makroglia Neurone in ihrer Funktion unterstützt. Hierbei sorgen die Oligodendrozyten durch elektrische Isolierung der neuronalen Fortsätze für eine höhere Übertragungsgeschwindigkeit und ermöglichen erst die Weiterleitung des Signals über weite Distanzen. Die Astrozyten versorgen die Neurone mit Nährstoffen, besitzen eine Stützfunktion und können durch Veränderung des

extrazellulären Milieus sogar die neuronale Verarbeitung der Signale beeinflussen. Mikroglia hingegen dient als Immunzelle des zentralen Nervensystems und schützen so das empfindliche Gleichgewicht dieses Zellverbandes vor Infektionen und Entzündungen (vergleiche Abbildung 1.1).

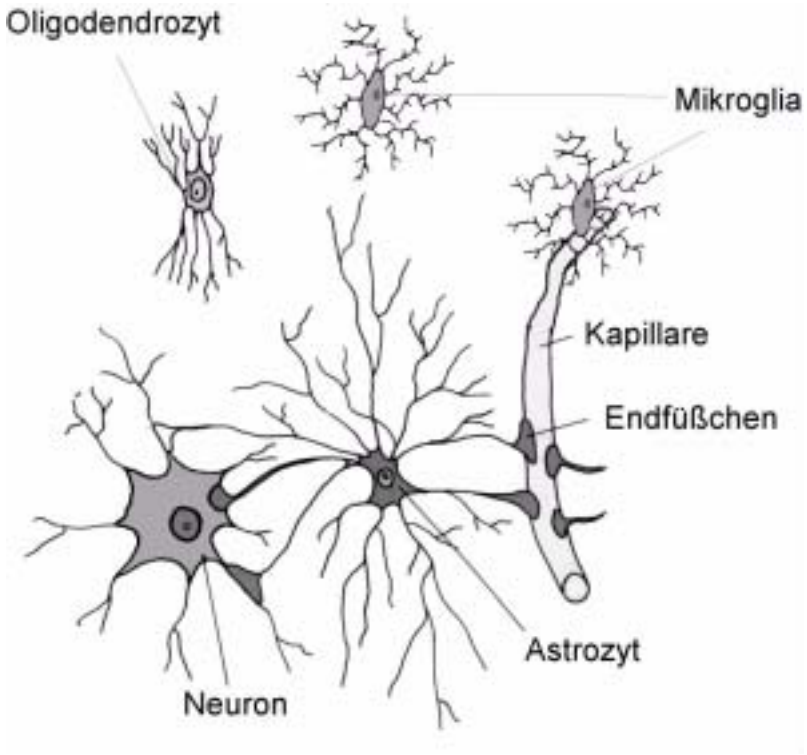

Abbildung 1.2 A Die Zellen des Zentralen Nervensystems. Verändert nach Atwood und MacKay, 1994.

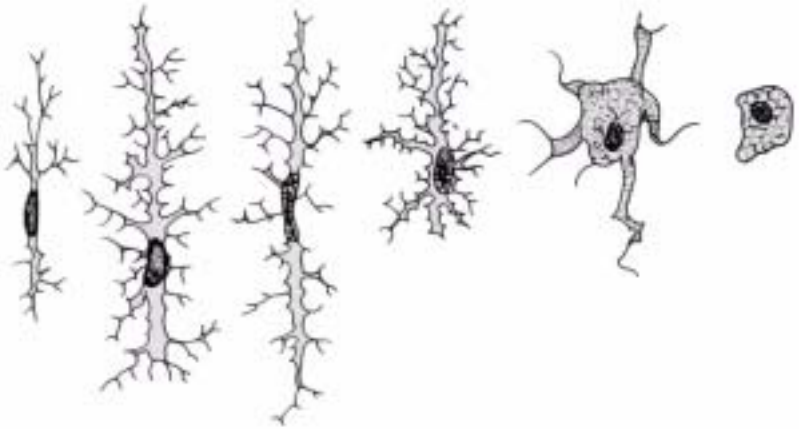

Abbildung 1.2 B Verschiedene Stadien der Mikroglia; von links nach rechts: Umwandlung einer ruhenden Mikroglia in eine aktivierte zum phagozytierenden Endstadium; aus: Kreutzberg, 1996.

Was passiert bei einer Nervenverletzung?

Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem, wo eine Regeneration und somit die Wiedererlangung einer funktionsfähigen Verbindung möglich ist, findet normalerweise im zentralen Nervensystem der Mammalia keine Regeneration statt. Ein dort auftretender Zellschaden ist in der Regel irreparabel.
Es stellt sich nun die Frage, wieso im zentralen Nervensystem keine spontane Regeneration erfolgen kann. Eine mögliche Antwort ist, daß es aufgrund der hohen Neuronendichte und der komplexen Verschaltungen der Neurone leicht zu einer falschen Reinervation im Verlauf der Regeneration kommen könnte und es daher sicherer ist, keine, anstatt einer falschen Regeneration zu ermöglichen.
In Fällen, wo jedoch eine Regeneration möglich ist, zentral oder peripher, findet eine Vielzahl verschiedener Vorgänge in und zwischen den Zellen des Nervensystems statt. Eine besondere Bedeutung haben hierbei die Proteine der extrazellulären Matrix sowie Zelloberflächenproteine, da diese eine wesentliche Rolle bei der Zellmigration, der Strukturveränderung des Zellverbands, der Zellteilung und Zellzahlregulation sowie des axonalen Wachstums spielen.
Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Identifikation von Oberflächenproteinen und Proteinen der Extrazellulären Matrix (ECM), welche während der Regeneration Veränderungen unterworfen sind. Die Untersuchung der Regulation von Bindungspartnern als Folge einer Verletzung des Nerven wurde genutzt, um Wechselwirkungen zwischen den identifizierten Molekülen aufzuzeigen. Als Auswahlkriterium wurde hierbei auf die Expression verschiedener Proteine während der Entwicklung zurückgegriffen. Aus diesen wurde ein Teil der relevant erscheinenden Moleküle ausgewählt und untersucht.
Anhand des folgenden Schemas und der Tabelle soll die Verteilung und die Interaktion dieser Proteine untereinander, soweit bekannt oder vermutet, aufgezeigt werden.

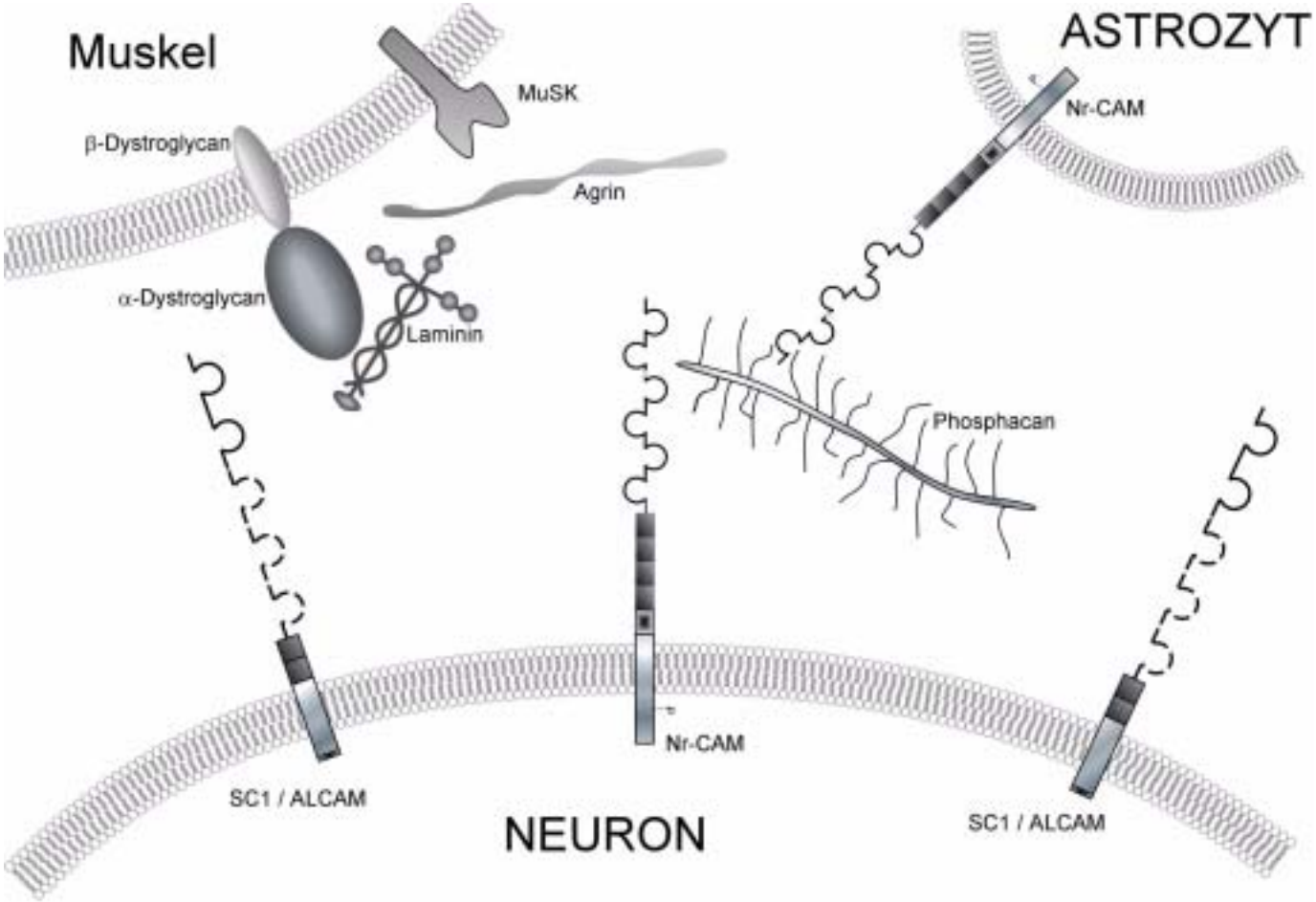

Abbildung 1.3 Verteilung der Oberflächenproteine und der „Extrazellulären-Matrix-Proteine“, soweit bislang bekannt bzw. vermutet.

Protein	Art des Proteins	Exprimiert von	Funktion	Bindungspartner	Art des Proteins
F84.1/SC1/BEN/ ALCAM	Zelladhäsions-molekül der Immunglobulin Superfamilie	Neuronen	Axonale Wegfindung, Bildung des Neuralrohrs	CD6	T-Zell Rezeptor
Nr-CAM/Bravo	Zelladhäsions-molekül der Immunglobulin Superfamilie	Neuronen, Gliazellen	Zellproliferation und Zellwachstum, axonales Wachstum	Contactin (F11, F3); Phosphacan; Axonin-1 (TAG1) Neurofascin	
Phosphacan	Chondroitin Sulfat Proteoglycan	Neuronen	Phosphorylierung	Nr-CAM	Zelladhäs-ionsmolekül
α- und β-Dystroglycan	Rezeptorprotein Transmembran-protein	Muskelzellen, Neuronen	Beteiligt an der Acetylcholin Rezeptor Komplex Bildung; Verbindung des Zytoskelett und der Extrazellulären Matrix	Agrin; Laminin Heparin	ECM Protein
Agrin	ECM Protein	Neuronen, Astrozyten (?)	Zell Interaktion, Synaptogenese (Acetylcholinrezeptor-Clustering)	MuSK, α-Dystroglycan	Rezeptor Prot. Kinase
MuSK (muscle specific kinase)	Rezeptor Protein Kinase	Muskelzellen	Bildung der prä- und postsynaptischen Membran	Agrin	ECM Protein

Im folgenden soll nun näher auf die hauptsächlich untersuchten Proteine und ihre Bindungspartner eingegangen werden.

1.2 F84.1/SC1/BEN/ALCAM

BEN wurde zum ersten Mal von Pourquie et al. (Pourquie et al., 1990) im Huhn beschrieben. Sie fanden das Protein während der Entwicklung in einem kurzen Zeitfenster auf der Zelloberfläche peripher projizierender Neurone, Motoneuronen des Rückenmarks und Gehirns, sowie sensorischen Neuronen der Spinalganglien. Ungefähr zeitgleich wurden ähnliche Proteine von anderen Gruppen unter anderen Namen beschrieben und publiziert, von Tanaka et al. als SC1 (Tanaka et al., 1991) und von Burns et al. als DM-Grasp (Burns et al., 1991). Tanaka fand das Protein auf Motoneuronen des Rückenmarks und auf peripheren Nerven, sowie in anderen Geweben. Das von ihnen gefundene Protein wies hohe Ähnlichkeit mit dem Tumormarker MUC18 (Lehmann et al., 1987) auf. Burns et al. fanden das Protein auf der axonalen Oberfläche von Neuronen des embryonalen Rückenmarks des Huhns. Pourquie et al. konnten kurz darauf die Expression von BEN sowohl auf Neuronen wie auch auf Stammzellen des Blutsystems (Pourquie et al., 1992a; Corbel et al., 1992; Pourquie et al., 1992b) zeigen. Aufgrund der Ähnlichkeit der Sequenzen dieser Proteine sowie ihrem Erscheinungsmuster kam man zu dem Schluß, daß es sich bei diesen 3 Oberflächenmolekülen um das gleiche Protein handelt (Pourquie et al., 1992a). Prince et al. (Prince et al., 1992) fanden ein Protein in Ratte, welches Ähnlichkeit zu SC1/BEN/DM-Grasp aufwies und von ihnen als F84.1 Glykoprotein bezeichnet wurde. Der Antikörper F84.1 markierte motorische und sensorische Neurone des Rückenmarks und Gehirns. Ein weiteres verwandtes oder homologes Protein, Kg-CAM, wurde von Peduzzi et al. (Peduzzi et al., 1994) im zentralen Nervensystem der Ratte entdeckt. Von beiden Proteinen sind jedoch nur wenige Aminosäuren des N-terminalen Endes bekannt. Weitere homologe Proteine in anderen Tierarten wurden gefunden, Neurolin in Goldfisch und Zebrafisch (Paschke et al., 1992; Laessing et al., 1994) und DM-Grasp in Zebrafisch und Maus (Kanki et al., 1994).
Während von den Huhn- und Fisch-Homologen die gesamte Sequenz bekannt war, wurde die Maussequenz erst 1997 vollständig aufgedeckt (Bowen et al., 1997), 2 Jahre nachdem die selbe Arbeitsgruppe bereits das menschliche

Homolog gefunden und unter dem Namen ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) bzw. CD166 beschrieben hatte (Bowen et al., 1995). Von der Rattensequenz sind bislang lediglich 2 kürzere Stücke bekannt und sequenziert (Bruder et al., 1998).

SC1/ALCAM gehört zur Familie der Immunoglobulin-ähnlichen Zelloberflächenproteinen. Ihnen allen gemeinsam ist der prinzipielle Aufbau, bestehend aus einer Anzahl Immunglobulin-ähnlicher Schleifen, gefolgt von mehreren Fibronectin Typ III Sequenzen, die proximal der Immunoglobulin-ähnlichen Strukturen liegen. Sie sind entweder durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Schwanz (GPI) in der Membran verankert oder besitzen eine membrandurchspannende Domäne, mit einem intrazellulären Proteinteil. Diese intrazelluläre Domäne kann aufgrund alternativen RNA-Spleißens stark variieren (Vergleiche hierzu auch Cunningham et al., 1987; Santoni et al., 1989; Furley et al., 1990). Als erstes Protein mit Immunoglobulin-ähnlichen Strukturen wurde das neuronale Zelladhäsionsmolekül N-CAM (Rutishauser et al., 1976) entdeckt, jedoch dauerte es einige Jahre bis das Molekül aufgereinigt (Thiery et al., 1977) und charakterisiert war (Rutishauser und Jessell, 1988; Hoffman et al., 1982; Rutishauser et al., 1983). Von der Ig-Superfamilie ist bekannt, daß sie sowohl homophile als auch heterophile Bindungen eingehen kann. Physiologische Bindungspartner für SC1/DM-Grasp/BEN wurden bislang noch nicht gefunden, jedoch konnte gezeigt werden, daß BEN in der Lage ist, den Rezeptor für ALCAM, CD6, zu binden (Skonier et al., 1997). CD6 wird von Lymphozyten und T-Zellen gebildet und ist in der Reifung und Aktivierung der T-Zellen involviert (Flores et al., 1997). Es gibt Anhaltspunkte in der Literatur, daß CD6 auch von Zellen des Gehirns, vermutlich von Neuronen, gebildet werden könnte (Mayer et al., 1990).

1.3 Nr-CAM / Bravo

Ein weiteres untersuchtes Protein, welches ebenfalls zur Immunglobulin-Superfamilie gehört, ist Nr-CAM (**n**euron-glia **r**elated **c**ell **a**dhesion **m**olecule), auch als Bravo bezeichnet. Es wurde erstmals im Sehsystem des Huhns auf den Fasern auswachsender neuronaler Zellen der Retina entdeckt (de la Rosa et al., 1990). Grumet et al. charakterisierten Nr-CAM und konnten

mehrere alternative Formen des Nr-CAM Moleküls mit einem Molekulargewicht von 145 und 170 KD zeigen (siehe Abbildung 1.4) (Grumet et al., 1991).

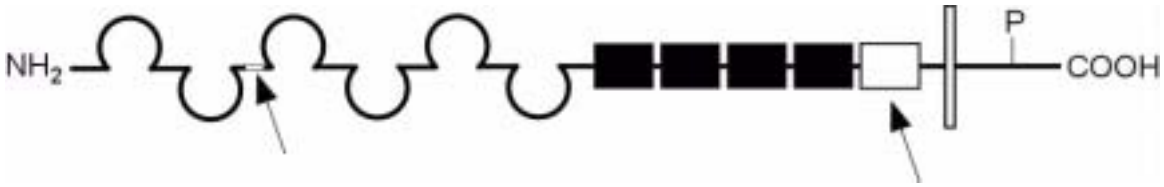

Abbildung 1.4 Schematischer Aufbau von Nr-CAM. Durch Pfeile markiert, zwischen der 2. und 3. Immunglobulinschleife, sowie in der 5. Fibronectin III Gruppe, sind die alternativen Spleißstellen des Moleküls. Der senkrechte weiße Balken markiert den Transmembranbereich.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Struktur und der Proteinverteilung von Nr-CAM mit Ng-CAM (neuron-glia cell adhesion molecule) vermuteten sie eine gleiche Funktion in der Zell-Zell Interaktion während der neuronalen Entwicklung. Die Übereinstimmung der beiden Proteine Nr-CAM und Bravo wurde durch Kayyem et al. (Kayyem et al., 1992) gezeigt, wobei diese jedoch ein dimere Struktur des Proteins, im Gegensatz zur bisher für Nr-CAM angegeben monomeren, gefunden haben, welche bereits für die anderen Familienmitglieder L1 (Faissner et al., 1985) und N-CAM (Burgoon et al., 1991) beschrieben wurde. Über Huhn Nr-CAM ist bezüglich seiner Bindungseigenschaften und seiner Bindungspartner einiges bekannt. So wurde gezeigt, daß Nr-CAM zu homophilen und heterophilen Bindungen in der Lage ist (Mauro et al., 1992) und mit den Proteinen F11 (=contactin) (Morales et al., 1993), Axonin-1 (Stoeckli und Landmesser, 1995; Suter et al., 1995) und Neurofascin (Volkmer et al., 1996) interagiert. Davis et al. zeigten, daß Nr-CAM und Neurofascin, mit dem es eine 70% Übereinstimmung in der zytoplasmatischen Proteinstruktur aufweist, an den Ranvierschen Schnürringen co-exprimiert werden (Davis et al., 1996). Ein weiterer Bindungspartner für Nr-CAM ist Phosphacan (siehe Abschnitt 1.6).

1.4 Phosphacan / Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatase beta/zeta

Phosphacan, ein Chondroitin Sulfat Proteoglycan, ist ein sekretiertes ECM Protein (Maurel et al., 1994) mit einem Molekulargewicht des Kernproteins von 173 kDa, welches dem extrazellulären Teil der membrangebundenen Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatase beta/zeta entspricht (Maurel et al., 1995). Maurel äußerte

die Vermutung, daß es sich um einen möglichen mRNA Spleiß handeln könnte. In der Maus wurde ein Homolog gefunden, welches als DSD-1 Proteoglycan bezeichnet wurde. Für dieses konnte bereits gezeigt werden, daß es fördernden Einfluß auf das Nervenwachstum und Auswachsen hat. Neue Untersuchungen lassen auch auf einen möglicherweise inhibitorischen Effekt schließen(Garwood et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, daß Phosphacan und neuronale Zelloberflächenmoleküle, wie Nr-CAM, miteinander interagieren können.

1.5 Dystrophin assoziierter Proteinkomplex (DAPC)

1.5.1 α- und β-Dystroglycan

Zwei weitere untersuchte Proteine gehören zur Gruppe der Dystrophin-assoziierten Proteinen. Es handelt sich hierbei um α-Dystroglycan und β-Dystroglycan, die zusammen mit weiteren Proteinen den Dystrophin-Glykoprotein Komplex bilden. α- und β-Dystroglycan werden durch eine gemeinsame mRNA codiert und erst nach der Translation in zwei getrennte Proteine gespalten (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). β-Dystroglycan ist ein Membran durchspannendes Protein mit einem Molekulargewicht von 43 kDa, welches extrazellulär das sekretierte 156 kDa α-Dystroglycan und intrazellulär Dystrophin bindet (Ervasti und Campbell, 1991) (Abbildung 1.5).
Extrazellulär konnte eine Bindung von α-Dystroglycan an Agrin (Sugiyama et al., 1994), ein Heparan Sulfat Proteoglycan der ECM (Rupp et al., 1991; Tsen et al., 1995a), gezeigt werden. Da Dystroglycan weiterhin extrazellulär Laminin und intrazellulär Dystrophin bindet, welches wiederum an Aktin bindet, vermutet man in diesem Komplex ein Bindeglied zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett (Fallon und Hall, 1994; Ervasti und Campbell, 1993). Eine andere Funktion des Dystrophin-Glykoprotein Komplexes liegt darin, Agrin zu binden und die Konzentrierung von Acetylcholinrezeptoren im synaptischen Bereich zu unterstützen (Sugiyama et al., 1994). Untersuchungen zeigten, daß die Ausbildung und Verteilung von α–Dystroglycan während der Entstehung der Nerv-Muskel Synapsen dem Muster der Acetylcholin-Rezeptoren folgt (Cohen et al., 1995). Der erste Hinweis, daß α–Dystroglycan ein möglicher Rezeptor für Agrin ist wurde von Fallon und seinen Mitarbeitern erbracht (Ma et al., 1993). Weiterhin

konnte für α–Dystroglycan eine Beteiligung an der Epithelentwicklung gezeigt werden (Durbeej et al., 1995).

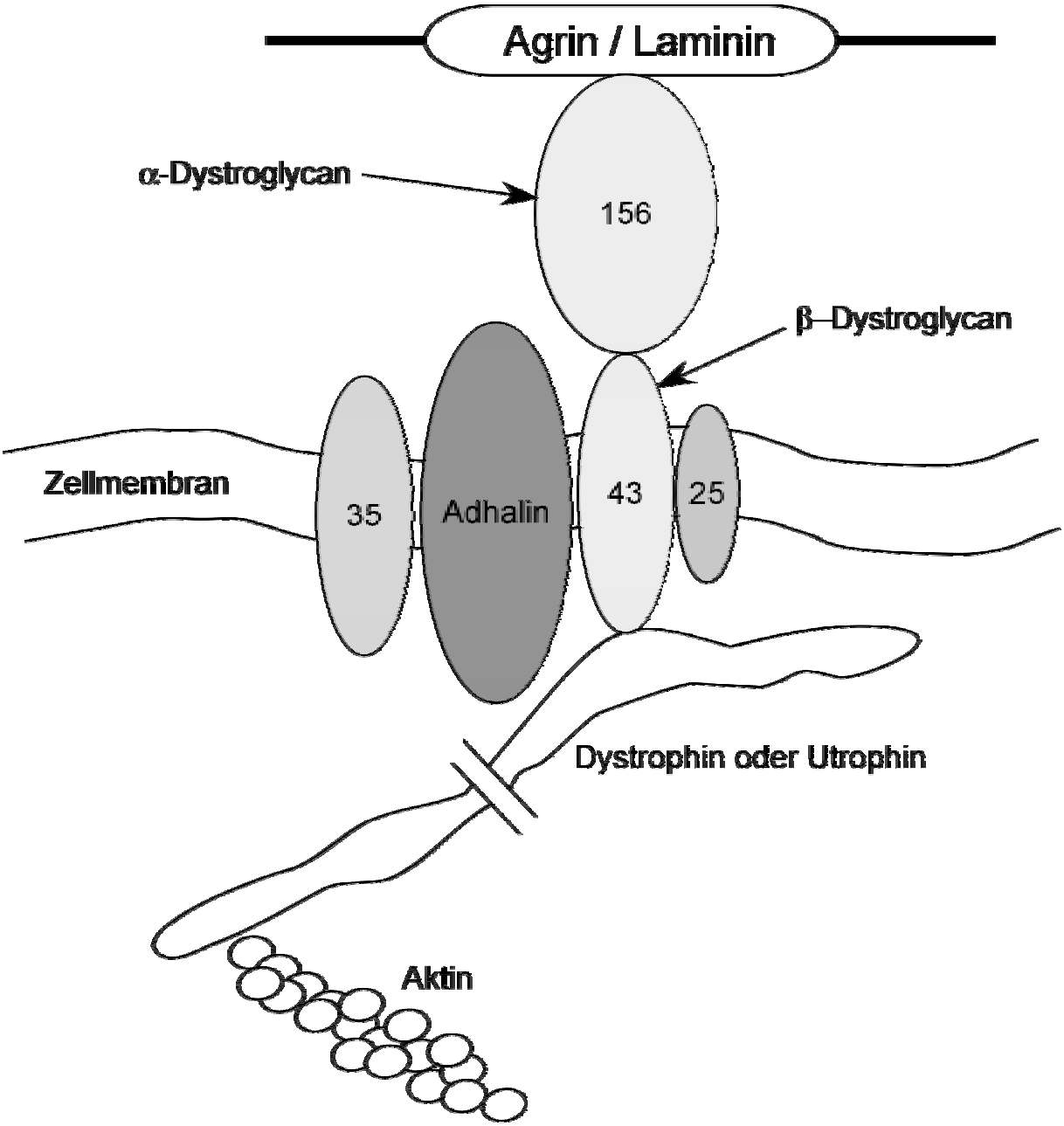

Abbildung 1.5 DAG-Komplex. Die aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül gespleisten Proteine α-Dystroglycan und β-Dystroglycan sind wesentlich am Aufbau des DAG-Komplexes beteiligt. β-Dystroglycan ist Membran durchspannend und bindet intrazellulär Dystrophin bzw. Utrophin. Extrazellulär findet eine Bindung an α-Dystroglycan statt. Dieses bindet an die extrazellulären Matrix Proteine Agrin und Laminin. Abbildung verändert nach Fallon und Hall, 1994.

1.5.2 Agrin

Agrin ist ein Heparan-Sulfat-Proteoglykan, das in den extrazellulären Raum abgegeben wird. Es wurde aufgrund seiner Fähigkeit Acetylcholinrezeptoren während der Entwicklung der Synapsen an der neuromuskulären Endplatte zu konzentrieren, bekannt. Entdeckt und isoliert wurde es erstmals im elektrischen Organ des Fisches *Torpedo californica* (Nitkin et al., 1987) (Godfrey et al., 1984). Bei Agrin handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von über 500kDa. Die Funktion und die Aktivität von Agrin wird über alternatives Splicing variiert (Ferns et al., 1993; Gesemann et al., 1996; Hoch et al., 1994; Ruegg et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, daß die verschiedenen Varianten zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Entwicklung von den einzelnen Zellen gebildet werden (Ma et al., 1995). So ist zum Beispiel für die Bindung an Heparin das 4 Aminosäuren lange Insert nötig (siehe die folgende Abbildung 1.6, Spleißstelle A) (Gesemann et al., 1996). Bislang sind 3 bzw. 4 (in Huhn) Spleißstellen bekannt, die je nach Spezies als X, Y, Z (in Nagetieren) bzw. A, B, C und N (in Huhn) bezeichnet werden. Anhand der folgenden Darstellung (Abbildung 1.6) wird dies näher veranschaulicht.

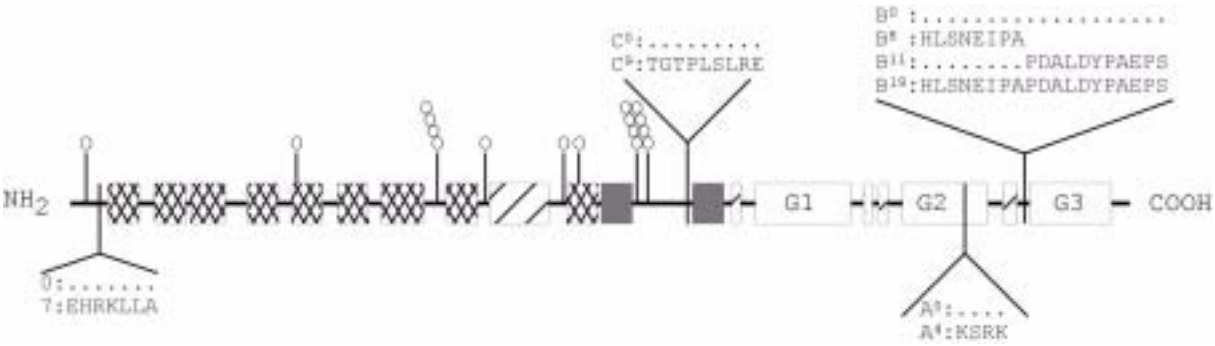

Abbildung 1.6 zeigt die schematische Darstellung von Agrin (Huhn) mit den möglichen Spleißstellen. Durch diese kann die Funktion und Aktivität von Agrin gesteuert werden. Spleiß A in Huhn entspricht Y in Ratte, B entspricht Z und C entspricht X. Der N-terminale Spleiß ist bislang nur für Huhn beschrieben. Verändert nach (Gesemann et al., 1996) und (Deyst et al., 1995).

Agrin wird vor allem in Neuronen gebildet, es gibt jedoch auch eine Variante, die bevorzugt in nicht neuronalen Zellen (Glia- und Muskelzellen) gebildet wird. Dieser Variante fehlen im aminoterminalen Teil des Proteins 7 Aminosäuren.

Bislang ist diese Form nur im Huhn und nicht in Nagern beschrieben (Tsen et al., 1995b).
Eine Hauptfunktion von Agrin während der Synaptogenese ist die Stabilisierung von Acetylcholinrezeptor Klustern und anderen synaptischen Proteinen in der postsynaptischen Membran. Dabei bindet Agrin unter anderem an α–Dystroglycan.

1.5.3 Muskelspezifische Kinase (MuSK)

MuSK ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, ursprünglich als spezifisch für Muskelgewebe (Valenzuela et al., 1995) beschrieben. Es handelt sich hierbei um ein membrandurchspannendes Protein mit mehreren Immunglobulin-ähnlichen Domänen und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Sie wird bereits sehr früh während der Entwicklung gebildet und konzentriert sich speziell an den motorischen Endplatten während der Reifung und des Wachstums des Muskelapparates. Wie durch Mäuse mit einem Defekt in dem für MuSK kodierenden Gen gezeigt werden konnte, ist dieses Protein essentiell für die Ausbildung der motorischen Endplatten. Eine Störung oder gar das Fehlen dieses Proteins führt bei Mäusen zum Tod während der Geburt, da sie nicht in der Lage sind, zu atmen (Glass et al., 1996). Wie gezeigt werden konnte, initiiert MuSK eine Signalkaskade, die zur Bildung der prä- und postsynaptischen Membranstruktur, sowie zur Bildung synapsenspezifischer Proteine führt (DeChiara et al., 1996). Hierbei ist das auslösende Signal für die Kinase die Bindung des extrazellulären Matrixproteins Agrin (Glass et al., 1996). Gillespie et al. konnten zeigen, daß wiederum das Membranprotein Rapsyn für die Aktivierung von MuSK zuständig ist (Gillespie et al., 1996).
Wie Studien am Krallenfrosch *Xenopus laevis* gezeigt haben, ist die Bildung und das Vorkommen von MuSK während der embryonalen Entwicklung nicht nur auf den Bereich der motorischen Endplatten beschränkt. Vielmehr konnte MuSK in Gehirn, Rückenmark und den Augenvesikeln gefunden werden (Fu et al., 1999). Dies führt zu der Vermutung, daß MuSK nicht nur an der Bildung der

neuromuskulären Endplatte, sondern möglicherweise auch an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt sein könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Operationen

Für die Versuche wurden 180 g bis 230 g schwere Ratten des Inzuchtstammes WISTAR aus der Zucht des Tierhauses des Max-Planck-Instituts für Biochemie verwendet. Alle Operationen wurden unter aproxisterilen Bedingungen durchgeführt. Den Ratten wurde 1 bis 2 Stunden vor der Operation das Futter vorenthalten.

2.1.1 Durchtrennen des *Nervus facialis*

Die Tiere wurden durch Inhalationsnarkose mittels Narkoseether betäubt und hinter dem rechten Ohr rasiert. Danach wurde die Haut hinter der Ohrmuschel mit einer Schere geöffnet, das darunterliegende Bindegewebe durchtrennt und der Nerv freigelegt. Der Nerv wurde nun mittels einer Pinzette gehalten, wobei nach leichtem Druck auf den Nerv eine Bewegung der Schnurrhaare zu beobachten war, und beide Äste des Nervs mit einer OP-Schere durchtrennt (vergleiche Abbildung 2.1).

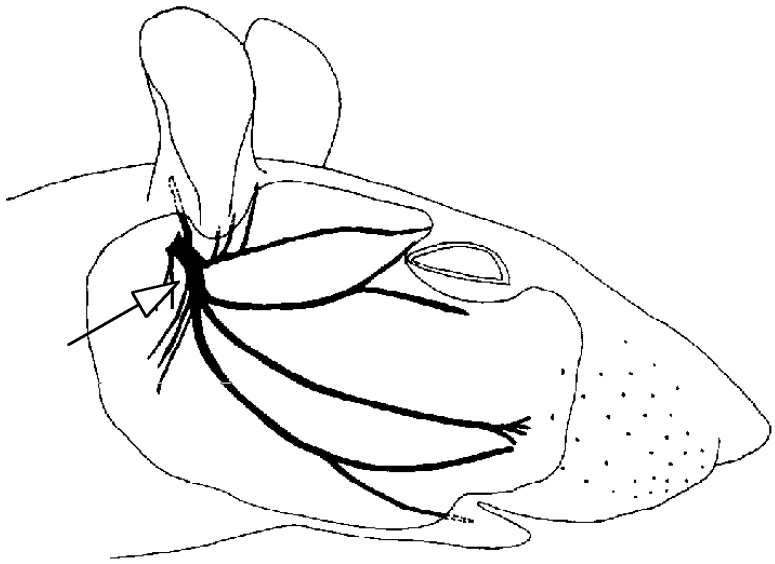

Abbildung 2.1 Verlauf des *Nervus facialis*. Der Pfeil markiert die Läsionsstelle.

Die Operationswunde wurde mit Klammern geschlossen. Nach dem Erwachen der Tiere aus der Narkose wurde der Erfolg der Operation durch eine visuelle

Kontrolle der Schnurrhaare überprüft. Diese durften sich nur noch auf der linken, unoperierten Seite bewegen, nicht jedoch auf der rechten, operierten Seite.

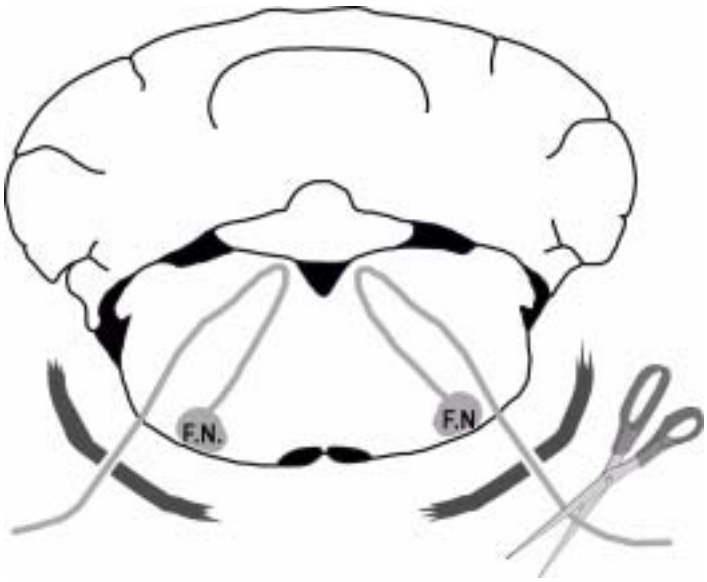

Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Nervdurchtrennung. Wie in der Abbildung gezeigt, wurde jeweils nur der rechte Fazialisnerv distal vom *Foramen stylomastoideum* durchtrennt. Die unverletzte linke Kernregion des diente Nervs als Kontrolle. F.N. bezeichnet den *Nucleus facialis*.

2.1.2 Direkte Kortex Läsionen (traumatische Hirnverletzungen)

Die Operation wurde unter Narkose durchgeführt. Hierzu wurde den Ratten ein Gemisch aus 2 Teilen Ketamin 10% (Wirkstoff Ketaminhydrochlorid, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und 1 Teil Rompun 2% (Wirkstoff Xylazinhydochlorid, WDT, Garbsen, Deutschland) injiziert (0,15 ml auf 100 g Körpergewicht). Nach Kontrolle der Narkosetiefe durch Überprüfung des Rückzieh-Reflexes des Hinterbeines sowie des Liedreflexes wurde der Kopf der Tiere in einen stereotaktischen Apparat (Stoelting, Illinois, USA) eingespannt.

Das Fell wurde nun mit einer Skalpellklinge leicht geöffnet und mittels einer Schere bis kurz vor die Augen und bis in den Nacken hinein aufgeschnitten. Anschließend wurde das Bindegewebe über dem Schädelknochen mittels eines feuchten Wattestäbchens zur Seite geschoben. Von der Nahtlinie der parietalen und interparietalen Schädelknochen ausgehend versetzte man nun den Halter des stereotaktischen Apparates 3,5 mm nach rostral und 4 mm nach lateral, wodurch der Halter über die hippocampale Region der rechten Kortexhälfte gebracht wurde. An dieser Stelle wurde ein ca. 2 mm x 3 mm großes Knochenstück der Schädeldecke mittels eines feinen Knochenbohrers (Stärke 1/012, Meisinger,

Düsseldorf, Deutschland) entfernt und die nun freiliegenden Hirnhäute mit einer feinen Kanüle aufgerissen. Mittels einer am Halter befestigten 1,1 mm Kanüle, deren Spitze mit einer Feile zuvor eingekürzt wurde, wurde nun unter einem Winkel von 1° eine ca. 2 bis 3 mm tiefe Läsion in den sensomotorischen Kortex gesetzt. Nach der Operation wurde das Fell über der Schädeldecke durch mehrere Wundklammer wieder verschlossen und die Tiere in einen Aufwachkäfig mit Wasser und Futter unter einer Wärmelampe gesetzt.

2.1.3 Ischiasläsionen und Ischiasquetschungen

Die Tiere wurden durch Inhalationsnarkose mittels Narkoseether betäubt. Anschließend wurde das Fell über dem rechten Oberschenkel durch einen parallel zum Knochen verlaufenden Schnitt geöffnet. Die Bindegewebsnahtlinie zwischen dem *Musculus biceps* und dem *Musculus gluteus* wurde durchtrennt und der darunterliegende Ischiasnerv freigelegt. Dann wurde der Nerv je nach Experiment entweder für 20 Sekunden gequetscht oder durchtrennt. Die Operationswunde wurde mit Wundklammern geschlossen und die Tiere in einen Aufwachkäfig gesetzt.

2.1.4 Durchtrennen des Hypoglossusnerven

Das Hypoglossus Model weist Ähnlichkeit mit dem Fazialis Model auf. Es handelt sich wieder um ein bilaterales System, d.h., ein Nerv für die linke und ein Nerv für die rechte Körperseite mit den korrespondierenden Kerngebieten im Stammhirn.
Die Tiere wurden, wie bei der direkten Kortexläsion (2.1.2), durch Narkose mit einem Gemisch aus Ketaminhydrochlorid und Xylazinhydrochlorid betäubt. Die Ratte wurde auf den Rücken gelegt und, vom Tier aus rechts neben der Kehle, das Fell durch einen Längsschnitt durchtrennt. Seitlich der Speiseröhre wurde das Bindegewebe unter Vermeidung der Verletzung vitaler Blutgefäße sowie der Speise- und Luftröhre vorsichtig weg gespreizt. Der nun freiliegende Nerv wurde mit einer Pinzette erfaßt und mittels einer OP-Schere durchtrennt. Anschließend wurde das Fell mit Wundklammern wieder verschlossen.

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Perfusion und Gehirnentnahme

In unterschiedlichen Zeitintervallen nach der Operation wurde je 3 Tieren nach Betäubung mit Narkoseäther eine letale Dosis Chloralhydrat (0,8 ml bis 1 ml einer 30% Lösung) in den Bauchraum injiziert. Nach Aussetzen der Atmung wurde der Brustkorb geöffnet und die Tiere über den linken Ventrikel des Herzens zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert. Nach 5 Minuten wurde die Perfusion mit 250 ml einer 1% Paraformaldehydlösung (PFA) in 0,01 M Phosphatpuffer (PBS) fortgesetzt. Nach der Perfusion wurde die Schädeldecke geöffnet und das Gehirn entnommen. Die Gehirne wurden nun in einer 1% PFA-Lösung in 50 ml Falcontubes auf einem Rotor bei 4°C für 1½ h immersionsfixiert. Danach wurden sie über Nacht zur Kryoprotektion in 15% Sucroselösung auf dem Rotor bei 4°C belassen. Die Gehirne wurde am nächsten Tag mittels Kohlendioxid eingefroren und entweder sofort im Kryostat geschnitten oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.2 Kryostatschnitte

Die Gehirne wurden mit einem Leica Kryotom (Model Jung Frigocut 2800E, Leica, Bensheim, Deutschland) geschnitten. Das Stammhirn wurde von caudal her bis zum Erreichen der Fazialis-Kernregion angeschnitten (siehe Abbildung 2.3).

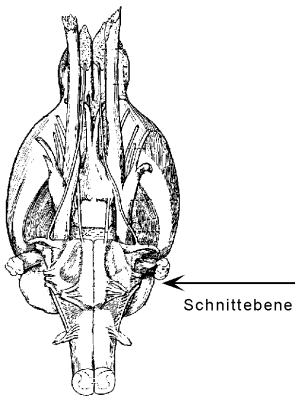

Abbildung 2.3 Ventrale Ansicht eines Ratten Gehirns. Durch den Pfeil ist die Lage des *Nucleus facialis* markiert.

Nach Erreichen der Kernregion wurden 20 µm dicke Gehirnschnitte auf Chromgelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Fazialisregion läßt sich bereits ungefärbt unter dem Binokular durch die Anhäufung der außergewöhnlich großen Motoneurone erkennen.
Zur genaueren Identifikation erfolgte eine Nisslfärbung mit Kresylviolett (siehe Abbildung 2.4). Nach dem Schneiden wurden die Gehirnschnitte entweder sofort gefärbt oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

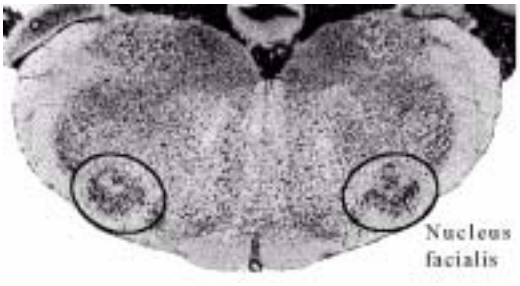

Abbildung 2.4 Kryostatschnitt durch das Stammhirn im Bereich des *Nucleus facialis*. Die Zellkörper der Motoneurone sind deutlich durch die Kresylviolett Färbung zu erkennen.

2.2.3 Antikörperfärbung

Aus statistischen Gründen wurden für jeden Zeitpunkt zwischen 15 und 20 Kryostatschnitte der Fazialiskernregion, jeweils operierte Seite und Kontrollseite, gefärbt. Die Schnitte wurden zunächst 1 bis 2 h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einer Acetonreihe (50%, 100%, 50% für jeweils 5 min) fixiert und entwässert. Nach mehrmaligem Waschen in 0,01 M PBS wurden die primären Antikörper aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.
Am nächsten Tag wurde erneut in 0,01 M PBS gewaschen, bevor mit dem sekundären Antikörper, einem Cy3-Fluorochrom gekoppeltem Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland, 1:400 verdünnt) gegen den primären Antikörper, für 1 h bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen in PBS wurde ein weiterer Cy3-Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland, 1:400 verdünnt) gegen den sekundären Antikörper zur Verstärkung des Signals aufgetragen und wiederum für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dieser Inkubation und erneutem Waschen wurde ein Teil der Schnitte mit einem primären Antikörper gegen Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) zur Identifikation der Astrozyten für 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert (monoklonaler GFAP-Antikörper von Sigma, Deisenhofen, Deutschland, 1:2000 verdünnt; polyklonaler GFAP-Antikörper von Dako, Hamburg, Deutschland, 1:2000

verdünnt). Nach Ablauf dieser Zeit und Waschen in PBS wurde ein sekundärer DTAF-gekoppelter Antikörper (monoklonaler DTAF-Antikörper von Dianova, Hamburg, Deutschland, 1:200 verdünnt; polyklonaler DTAF-Antikörper von Dianova, Hamburg, Deutschland, 1:200 verdünnt) gegen den GFAP-Antikörper appliziert und für 1 h inkubiert. Anschließend wurde gewaschen und die Gehirnschnitte mit Immuno Floure Mounting Medium (ICN Biomedical, Aurora, USA) eingedeckt.

Als Kontrolle wurden Schnitte nur mit Kaninchen- bzw. Mäuseserum und den sekundären Fluorochrom gekoppelten Antikörpern inkubiert, sowie nur mit den sekundären Antikörpern.

Die folgende Tabelle soll einen Überblick über die benutzten primären und sekundären Antikörper geben.

Antigen	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
F84.1 Glykoprotein	F84.1; monoklonales Serum; zur Verfügung gestellt von W. Stallcup	Ziege gegen Maus, Cy3 gekoppelt, IgG H+L, DIANOVA 115-165-003
SC1 / ALCAM	613; polyklonales Serum; zur Verfügung gestellt von C.A.O. Stürmer	Ziege gegen Kaninchen, Cy3 gekoppelt, IgG H+L, DIANOVA 111-165-003
Nr-CAM	Polyklonales Serum; zur Verfügung gestellt von E. Pollerberg	Ziege gegen Kaninchen, Cy3 gekoppelt, IgG H+L, DIANOVA 111-165-003
CD6	T411 und T421, polyklonale Seren, CONNEX;	Ziege gegen Maus, Cy3 gekoppelt, IgG H+L, DIANOVA 115-165-003
Agrin	Agrin707, polyklonales Serum gegen Huhn Agrin, zur Verfügung gestellt von M. Ruegg	Ziege gegen Maus, Cy3 gekoppelt, IgG H+L, DIANOVA 115-165-003
Dystroglycan	Monoklonaler Antikörper, NOVOCASTRA	Ziege gegen Maus, Cy3 gekoppelt, IgG H+L, DIANOVA 115-165-003
Phosphacan / RPTP	Monoklonaler Antikörper gegen Ratte, Hybridoma-Bank Bezeichnung 3F8 (http://www.uiowa.edu/~dshbwww/3f8.html)	Ziege gegen Maus, Cy3 gekoppelt, IgG H+L, DIANOVA 115-165-003
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Monoklonaler Antikörper gegen Maus GFAP, Sigma G-3893	Ziege gegen Maus, DTAF gekoppelt, IgG H+L, DIANOVA 115-015-003
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Polyklonales Serum gegen Kuh GFAP, DAKO 7334	Ziege gegen Kaninchen, DTAF gekoppelt, IgG H+L, DIANOVA 11-015-003

2.2.4 Mikroskopie

Zur Analyse der Schnitte wurde ein konfokales Laser Raster Mikroskop auf Basis eines inversen Forschungsmikroskopes (DM IRB, Firma Leitz, Heidelberg, Deutschland) mit der serienmäßig gelieferten Aufnahmesoftware benutzt.
Es wurden jeweils 20 Ebenen in den 20 µm Gehirnschnitten aufgenommen, was einer optischen Schnittdicke von 1 µm entsprach. Die Auflösung des aufgenommenen Bildes wurde auf 1024 x 1024 Bildpunkte (Pixel) festgelegt. Doppelmarkierungen wurden sequentiell aufgenommen, um so ein Überstrahlen eines Farbstoffes in das Spektrum des anderen („cross talk“) zu minimieren. Zur Rauschminderung und Verbesserung der Bildqualität wurde ein „line-average“ von 8 gewählt, d.h. jede Bildpunktzeile wurde 8 mal hintereinander vom Laser abgefahren, detektiert und daraus das resultierende Einzelbild gemittelt. Bei den so entstandenen Aufnahmen handelt es sich um 8 Bit Grauwertbilder. Diese Aufnahmen wurden nun auf Magneto-optical Disk oder Compact Disk für die weitere Auswertung gesichert.

2.2.5 Digitale Bildanalyse

Zur Bildauswertung wurden zwei verschiedene Systeme benutzt, die weiter unten näher beschrieben werden. Für beide gemeinsam war die Erstellung einer „Maximum Intensity Projektion“[1].

2.2.5.1 Färbungen mit dem Antikörper F84.1

Zur schnelleren Bearbeitung wurde eine Silicon Graphics Workstation mit dem Bildanalyseprogramm ImageSpace™ von Molecular Dynamics verwendet.
Es wurde nun eine “Maximum Intensity Projektion” erzeugt und die markierten Neurone ausgezählt. Positive Motoneurone zeigten eine ringförmige Anordnung der Markierung um ihren Zellkörper. Zur Kontrolle wurde als zweite Methode der

[1] Hierfür wurden die Bildsequenzen von 20 Einzelbildern je 20 µm Schnitt eingelesen. Anschließend sieht ein imaginärer Beobachter senkrecht von oben durch den Bilderstapel hindurch und ermittelt je Punktesäule aus diesen 20 Einzelbildern den Punkt, welcher den höchsten Graustufenwert (0 für schwarz bis 255 für weiß) aufweist und übernimmt ihn in ein neues Bild. Auf diese Weise entsteht ein neues Bild mit den hellsten Grauwerten aller 20 Einzelbilder.

Auswertung mittels der sogenannten Movie-Funktion alle 20 Einzelbilder eingelesen und nacheinander wie ein Film über den Bildschirm abgespielt. Hierdurch wurde sichergestellt, daß störender Hintergrund oder unspezifische Färbungen aus darüber oder darunterliegenden Einzelbildern das momentan betrachtete Bild nicht verfälschen. Die so erhaltene Anzahl markierter Motoneurone wurde nun in einem Diagramm über der Zeit aufgetragen.

2.2.5.2 Färbungen mit dem Antikörper gegen Nr-CAM

Dazu wurde ein Rechner mit dem Bildanalysesystem Optimas™ Version 6.2 (Optimas Corporation Unlimited) eingesetzt. Die Vorteile dieses Bildverarbeitungssystems lagen in der Möglichkeit der Objekterkennung und der einfacheren Handhabung, sowie der Möglichkeit, verschiedene Arbeitsschritte in Makros zusammen zu fassen und die Auswertung zu standardisieren.
Zur Entwicklung der Makros wurden zuerst mehrere Bilder wie folgt manuell analysiert:

- Mittels empirischer Festlegung eines Schwellenwertes („threshhold“) wurden die immunohistochemisch gefärbten Strukturen vom Hintergrund isoliert.
- Durch eine „größer als x und kleiner als y“-Beziehung wurden Motoneurone und Kapillaren sowie Astrozyten separiert. Die Werte für x und y beziehen sich auf die Anzahl der gefärbten Bildpunkte, d.h. die Größe der gefärbten Fläche.
- Falsch positiv erkannte Strukturen wurden manuell de-selektiert.
- Die markierten Motoneurone und Kapillaren wurden aus dem Bild entfernt.
- Durch eine weitere „größer als u und kleiner als v“-Beziehung wurden die Astrozyten von sonstigen markierten Strukturen getrennt markiert.
- Die Markierung wurde nochmals von Hand kontrolliert und korrigiert

Mit diesen „größer als … und kleiner als …“-Beziehungen konnten nun 2 Makros entwickelt werden, das eine um Motoneurone und Kapillaren zu erkennen und das andere um Astrozyten zu erkennen.
Für die Auswertung wurden die Bilderserien eingelesen, eine Maximum Intensity Projektion (MIP) erstellt und ein Median-Filter zur Reduzierung des Rauschens über diese MIP gelegt. Nun wurde visuell eine Schwelle gesetzt, d.h. alle Pixel, die einem bestimmten Grauwertbereich angehörten wurden markiert. Durch diese Bearbeitung wurden die vom Antikörper markierten Zellen und Strukturen vom Hintergrund gelöst. Über ein mit der Software geliefertes Makro wurden nun automatisch Bereiche („area“) errechnet, deren Begrenzung aus Pixel des gleichen Grauwertes bestehen, jedoch nur im Bereich der gewählten Schwelle. Mit den selbstdefinierten Makros wurden anschließend zuerst die Motoneurone aus dem Bild entfernt, um störende Strukturen auszuschließen. Sie wurden in “Regions of Interest” (ROI) umgewandelt und aus dem Bild ausgeschnitten. Noch verbliebene falsch erkannte Strukturen und Zellen wurden zuvor manuell aussortiert. Als nächstes wurden mittels des zweiten Makros die positiven Astrozyten selektiert, wobei wiederum ein visuelle Kontrolle und gegebenenfalls eine manuelle Korrektur erfolgte. Unter die korrigierte Maske wurde die ursprüngliche “Maximum Intensity Projektion” geladen, die Markierungen in ROI’s umgewandelt und von den markierten Bereichen ein Histogram erstellt. Von diesem wurde nun der Mittelwert der Grauwerte und die Summe der Pixel unter dem markierten Bereich in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel™ 97SR-2, Unterschleißheim, Deutschland) übertragen.

2.2.6 Excel Tabellen und angewandte Statistik

Von den Einzelmessungen, die in ein Microsoft Excel™ Datenblatt übertragen wurden, wurde jeweils der Mittelwert aller Einzelmessungen des jeweiligen Zeitpunktes nach Axotomie gebildet und dieser in einer Grafik über der Zeit aufgetragen. Für die Markierung mit dem Antikörper F84.1 wurde zusätzlich das Verhältnis der F84.1 markierten Motoneurone zur Gesamtzahl der Motoneurone in einer Grafik dargestellt. Auch hierbei wurde jeweils der Mittelwert der Anzahl aller Motoneurone, sowie der gefärbten Motoneurone zu dem betreffenden Zeitpunkt

errechnet. Anschließend wurde zu jedem Zeitpunkt das Verhältnis beider Mittelwerte ermittelt und dieses in einer Grafik über der Zeit aufgetragen.
Da in den Grafiken nicht die Einzelwerte sondern deren Mittelwerte aufgetragen wurden, wurde als Fehlerbalken nicht die absolute Standardabweichung, sondern die relative Standardabweichung, auch als Variationskoeffizient bezeichnet (Lorenz, 1992; Kapitel 2.6.6), aufgetragen. Diese gibt ein Maß für die Streuung des Mittelwertes an und berechnet sich wie folgt:

$$Vk = s/x$$

wobei Vk für den Variationskoeffizient, s für die Standardabweichung und x für den Mittelwert steht.

2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um die veränderte Expression der Proteine auf Boten-RNA (mRNA) Ebene zu untersuchen, wurde unter anderem die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gewählt. Für die Untersuchung der während der Regeneration regulierten Proteinen wurden je Zeitpunkt 12 Ratten operiert. Nach verschiedenen Regenerationszeiten wurden die Tiere durch Ätherinhalation getötet, die Gehirne sofort entnommen und mit, in flüssigem Stickstoff gekühltem, Isopentan schockgefroren.
Um die gewebsspezifische Verteilung der mRNA zu untersuchen, wurde den Tieren nach Tötung verschiedene Organe (Thymus, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Muskel) entnommen und schockgefroren. Weiterhin wurden verschiedene Zellkulturen, Mikroglia und Astrozyten, sowie frisch isolierte Rückenmarks-motoneurone benutzt, um die zellspezifische mRNA Expression zu untersuchen.

2.3.1 Gewebsentnahme und Aufbereitung

Die Gehirne wurden in ein Kryotom eingespannt und bis zur Fazialis Kernregion im Stammhirn angeschnitten. Nun wurde die Kernregion der operierten Seite

sowie der Kontrollseite ausgestanzt[2] und in getrennte Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Kerne von jeweils zwei Kontrollseiten und zwei axotomierten Seiten wurden zusammengefaßt. Gesamt-RNA wurde aus diesen Gewebsstücken durch eine abgewandelte Phenol-Chloroform-Methode mittels TRI Reagent™ (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) entsprechend den Herstelleranweisungen gewonnen. Das Gewebe wurde in dem Reagenz durch mechanische Zerkleinerung mittels eines Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) aufgeschlossen. Durch eine anschließende DNAse Behandlung wurde eine Verunreinigung durch genomische DNA ausgeschlossen.
Das Vorgehen bei der RNA-Isolierung aus Organen und Zellkulturen war entsprechend.

2.3.2 Umschreiben der RNA in cDNA: reverse Transkription (RT)

Nach photometrischer Ermittlung des RNA-Gehaltes wurde für die RT 500 ng bis 1 µg Gesamt-RNA in die Reaktion eingesetzt. Als Transkriptions-Initiatoren wurden Random-Hexamere[3] benutzt, um eine möglichst komplette Umschreibung der mRNA zu gewährleisten. Der Reaktionsansatz war wie folgt:

AMV (10 U/µl) (Amersham)	2 µl
Puffer (5x)	4 µl
dNTP's (je 2 mM) (MBI Fermentas)	4 µl
Random Hexamere (0,5 µg/µl) (Promega)	2 µl
RNAsin (40 U/µl) (Promega, Mannheim)	2 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	0,6 µl
DTT (0,1 M)	0,04 µl
Endvolumen: 20 µl, d.h.	1 µg RNA in 5,36 µl H_2O

[2] Als Gewebsstanzer wurde ein Korkbohrer mit einem lichten Durchmesser von 1 mm benutzt. Die Einstichtiefe wurde mittels des Anschlags auf 1 mm begrenzt.
[3] Random Hexamere bestehen aus 6 Nukleinsäuren, die über die ganze mRNA verteilt binden können. Dadurch wird eine über die Länge der mRNA gleichmäßigere und vollständigere Umschreibung des mRNA Stranges in cDNA erreicht, im Vergleich zu OligodT Primern, welche ausschließlich am polyA Ende der mRNA binden und von dort aus mit der Transkription beginnen. Es kann hierbei zu Abbrüchen während der Transkription kommen, wodurch verstärkt cDNA aus dem 3'-Bereich der ursprünglichen mRNA entstehen würde.

Das doppelt destillierte Wasser, die RNA und die Primer wurden in ein Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Reaktionsgefäß auf Eis überführt.
Die restlichen Reagenzien wurden zupipettiert und die mRNA in einem Thermocycler (PTC-225™ MJ Research, Watertown, USA) mit dem folgenden Programm umgeschrieben:

10 min	24°C
50 min	42°C
5 min	95°C

Nach diesem letzten Denaturierungsschritt wird das Reaktionsgefäß aus dem Thermocycler entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C eingefroren.

2.3.3 PCR (Polymerasen-Ketten-Reaktion)

Alle Reaktionen wurden in 0,5 ml dünnwandigen Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler Model PTC-225™ der Firma MJ Research, Watertown, USA durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 12,5 µl, die Reaktionsansätze wurden zusätzlich mit Mineralöl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zum Schutz vor Verdampfung und Volumeneinengung überschichtet. Als Enzym wurde entweder RedTaq™ von Sigma, Deisenhofen, Deutschland oder Taq-Polymerase von Eurobio mit den mitgelieferten Puffern benutzt. Das enzymatisch aktive Zentrum der Taq-Polymerasen wurden durch einen Antikörper (Clontech, Palo Alto, USA) inaktiviert, der durch einen 5 minütigen Denaturierungsschritt bei 94°C zu Beginn einer PCR inaktiviert wurde. Dadurch konnte sicher gestellt werden, daß es zu keiner unspezifischen Amplifikation von cDNA in der Aufheizzeit des Reaktionsgemisches kommen konnte. Die Nukleotide wurden als Gemisch (je 2 mM) von MBI Fermentas, Wilna, Litauen bezogen. Die Primer waren in der Regel 20mere bis 25mere, bezogen von verschiedenen Firmen (Gibco Life Technologies, Rockville, USA; MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland; Interactiva, Ulm, Deutschland). Sie wurden in einer Endkonzentration von 1 nM in die Reaktion eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1,25 µl Sense-Primer
1,25 µl Antisense-Primer

1,25 µl Nukleotid-Gemisch
1,25 µl 10x Reaktionspuffer
1 U Taq-Polymerase
1 µl cDNA
x µl Magnesiumchlorid (Menge abhängig von Primerpaar)
x µl Wasser (auf Endvolumen von 12,5 µl)

2.3.3.1 Primerentwicklung und Optimierung der PCR-Bedingungen

Es wurde versucht die Primer aus rattenspezifischen Sequenzen zu entwickeln. Sofern dies nicht möglich war, da die Rattensequenz nur teilweise oder überhaupt nicht bekannt war, wurde nach einem Vergleich der Sequenz verschiedener Spezies der Bereich für die Primerentwicklung herangezogen, der die höchste Homologie über die verschiedenen Spezies aufwies. Bei der Entwicklung der Primer wurde auf eine Vermeidung palindromer Sequenzen, einen ausgeglichenen G/C zu A/T Gehalt, sowie ein Annealingtemperatur[4] von 67°C geachtet. Nach Auswahl einer geeignet erscheinenden Sequenz wurde diese mit der gesamten Genbank verglichen, um mögliche Kreuzreaktionen mit anderen, nicht verwandten Sequenzen auszuschließen.
Die so gefundenen Primerpaare wurden nun noch auf ihre Reaktionsbedingungen hin optimiert. Hierzu wurden mehrere Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) Konzentrationen im Bereich einer Endkonzentration von 1 mM bis 3,5 mM im Reaktionsansatz, sowie unterschiedlichen Annealingtemperaturen gefahren. Aus dem anschließenden Vergleich der einzelnen Reaktionen wurden die optimalen Bedingungen, d.h. keine Nebenbanden, starke Produktbande ohne Schmier, ermittelt und diese für die weiteren Polymerase-Ketten-Reaktionen mit diesem Primerpaar benutzt.

2.3.3.2 Semiquantitative PCR

Zur semiquantitativen Untersuchung wurden nun für jeden Zeitpunkt 6-fach Bestimmungen der operierten Seite und der Kontrollseite durchgeführt. Als

[4] Als Annealingtemperatur bezeichnet man die Temperatur, bei der die Primer spezifisch an die cDNA binden. Sie errechnete sich gemäß folgender Formel:

Standard und zur Bestimmung des relativen cDNA Gehaltes wurden die einzelnen Proben mit Primern gegen das "Haushaltsgen" Cyclophilin-A, sowie, zur Kontrolle der Operation und der Gewebsextraktion, gegen B50[5] vermessen. Nach erfolgter Reaktion wurden die Proben auf 8%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele wurden danach für ½ Stunde in einer 5 µg/ml konzentrierten Ethidiumbromidlösung in 1x TBE gefärbt. Anschließend wurden die Gele für eine ½ Stunde in Wasser entfärbt. Die Gele wurden mittels einer, an einen Computer angeschlossenen, CCD-Kamera und der Software Bioprint Ver. 96.14 (Vilber Lourmat) aufgenommen und abgespeichert. Zur Messung der integrierten optischen Dichte der einzelnen Banden wurde die Software ImageMaster® VDS Software Version 2.0 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA / Media Cybernetics) herangezogen.

Die oben beschriebene Auswertungsmethode wurde zuvor durch mehrere Gele geeicht und auf ihre Linearität hin untersucht. Hierzu wurde eine Konzentrationsreihe einer cDNA auf ein Gel aufgetragen und gemäß des oben beschriebenen Verfahrens gefärbt, aufgenommen und ausgewertet. Es zeigte sich hierbei, daß unter den vorgewählten Bedingungen eine ausreichende Linearität in Bezug auf den Einbau des Ethidiumbromids in die DNA gewährleistet war.

Die erhaltenen Werte für die optische Dichte der Gelbanden wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel™97SR-2, Unterschleißheim, Deutschland) übertragen. Hier wurde nun der Mittelwert der 6-fach Bestimmungen und die zugehörige Standardabweichung sowie das Verhältnis der operierten Seite zur Kontrollseite ermittelt. Der experimentell ermittelte Seitenunterschied des untersuchten Moleküls wurde dann gegen den cDNA Gehalt der Probe, gemessen durch das Cyclophilinverhältnis, normalisiert.

(G/C-Gehalt x 4 + A/T-Gehalt x 2)-5=Annealingtemperatur der Primer

[5] B50, auch als Gap43 („growth associated phosphoprotein“) bezeichnet, ist ein wachstumsassoziiertes Phosphoprotein, welches während der Entwicklung wie auch der Regeneration exprimiert wird. Nach Facialis Nerv Durchtrennung erfolgt eine Hochregulation im Kerngebiet.

2.4 Klonierung und Sequenzierung

2.4.1 Plasmide und kompetente Zellen

Damit in die Plasmide ein DNA Fragment eingebunden werden konnte, mußten diese erst durch Aufschneiden der Ringform liniearisiert werden. Das hier benutzte System pZErO™-1 besitzt mehrere Restriktionsenzym-Schnittstellen zwischen den Sp6 und T7 Anheftungsstellen (siehe Abbildung 2.5). Im vorliegenden Fall wurde mit EcoR V geschnitten. Hierfür wurde 1 µg des Plasmids mit 10 U des Enzyms EcoR V für 30 bis 60 min verdaut. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform Extraktion der DNA und eine Natriumazetat Fällung aus der wässrigen Phase (vergleiche 2.3.1 bzw. 2.5.1.2). Die in Tris/EDTA Puffer resuspendierten Plasmide wurden dann aliquotiert und bei –80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

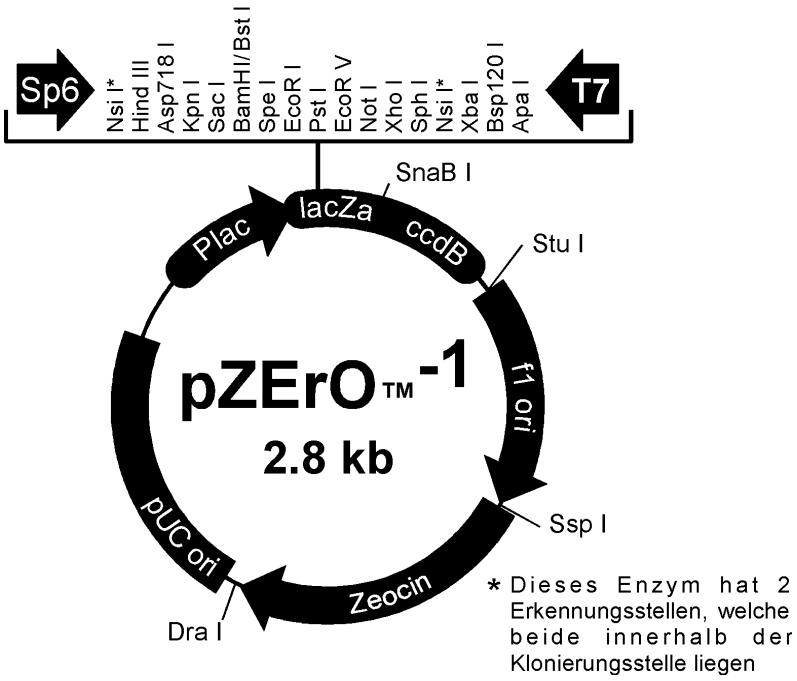

Abbildung 2.5 Ringdarstellung des Vektors mit Klonierungsstelle, Sp6 / T7 Erkennungsstelle und der Zeocin Resistenz, sowie dem Letalgen lacZa, welches bei erfolgreicher Einklonierung des DNA-Fragments nicht mehr exprimiert werden kann.

Zur Herstellung der elektrokompetenten Zellen wurde ein Ausstrich der TOP10F'-Stammzellensuspension (Invitrogen, Groningen, Niederlande) auf eine LB-Agar Platte gemacht. Diese Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 30 ml LB-Medium in einen 250 ml Erlenmeyerkolben gefüllt und mit einer einzelnen Kolonie von der LB-Agar Platte angeimpft. Die Zellen wurden in

einem Schüttelinkubator unter ständiger Bewegung und ausreichender Belüftung bei 37°C über Nacht hoch gezogen. Am Folgetag wurde die dichte Zellsuspension in einen 2 bis 4 Liter fassenden Kolben mit 2 Liter Medium vereint und erneut inkubiert, bis die Zellen eine optische Dichte von 0,5 bis 0,6 (photometrisch ermittelt bei einer Wellenlänge von 550 nm) erreicht hatten. Die Zellösung wurde nun auf 2 vorgekühlte Zentrifugationsgefäße verteilt und für 30 min auf Eis gelagert. Die Lösungen wurden anschließend bei 0°-4°C und 2.000 g für 15 min zentrifugiert und das Pellet in 250 ml sterilem Wasser gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 20 ml eisgekühltem 10% sterilem Glycerol aufgenommen. Es erfolgte nun ein 15 min Zentrifugationsschritt bei 4.000 g. Anschließend wurden die Pellets in 1 ml der 10% Glycerol Lösung aufgenommen, aliquotiert (jeweils 100 µl; ausreichend für 2 Klonierungsreaktionen) und mittels flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei –80°C aufbewahrt.

2.4.2 Klonierung

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten sowie zur Sequenzanalyse wurden jeweils sechs identische PCR Reaktionen mit den spezifischen Primern durchgeführt und vereint. Das Reaktionsprodukt wurde anschließend mit einem PCR Aufreinigungs Kit (Quiagen) von den überschüssigen Primern und freien Nukleotiden getrennt und in 30 µl Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde zum einen photometrisch ermittelt, wie auch auf einem Agarosegel im Vergleich zur Intensität der Markerbanden abgeschätzt.
Als Vektor / Plasmid fand hierbei das pZErO™-1 System von Invitrogen, Groningen, Niederlande Verwendung. Da bei diesem Vektor die Klonierungsstelle gerade geschnitten ist („blunt end“, siehe 2.4.1), war eine Vorbehandlung des PCR-Produktes nötig. Um eine optimale Ligation der in der PCR erhaltenen cDNA mit dem Plasmid zu erreichen, mußten zuerst mögliche Überhänge an den Enden der DNA beseitigt werden. Dies erfolgte durch ein sogenanntes „blunting“ des PCR-Produktes. Der Reaktionsansatz hierfür setzte sich wie folgt zusammen:

2,5 U PFU-Polymerase (Stratagene)
1 µl 10x Reaktionspuffer (Stratagene)
1 µl dNTP’s (je 2mM; MBI Fermentas, Wilna, Littauen)
3-7 µl PCR-Produkt (je nach Konzentration)

auf 10 µl Endvolumen mit Wasser auffüllen.

Es erfolgte eine Inkubation bei 72°C für 30 min. Anschließend erfolgte die Ligation in den Vektor / das Plasmid. Hierfür wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert

2 µl vorbehandeltes PCR-Produkt
0,5 µl rATP (10mM, Stratagene)
1 µl 10x Ligase Reaktionspuffer (Eurogenetec)
1 µl T4-Ligase (Eurogenetec)
0,5 µl pZErO™-1 Vektor (Invitrogen, Groningen, Niederlande)
5 µl Wasser

und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vektoren mit dem Insert wurden nun durch Elektroporation in kompetente Zellen (siehe hierzu 2.4.1) des Stammes *Escherichia coli* eingeschleust. Hierzu wurden 45 µl eisgekühlte Bakteriensuspension mit 2 µl des Plasmidansatzes in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (BioRad) überführt und in einem Gene Pulser (BioRad) kurz unter Spannung gesetzt (2,5 kV, bei einer Kapazität von 45 µF und einem Widerstand von 200 Ohm). Sofort danach wurden die Zellen in 450 µl SOC-Medium aufgenommen und in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß unter ständiger Bewegung für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 100 bis 200 µl der Bakteriensuspension auf vorgewärmten LLB-Agar Platten, die zur Selektion die Antibiotika IPTG, Zeozin™ und Tetrazyklin enthielten, verteilt und bei 37°C im Brutschrank über Nacht gelagert. Aufgrund der Antibiotikagabe und des Letal-Genes im Plasmid durften am nächsten Tag nur Zellkolonien auf den Platten gewachsen sein, die ein Plasmid mit Insert besaßen, da die Antibiotikaresistenz gegen Zeozin auf dem Plasmid lag. Um dies zu überprüfen wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, wobei als Primer Oligonukleotide mit der Sequenz der Sp6 und T7 Bindungsstellen benutzt wurden. Als Vorlage wurden mit einer Pipettenspitze Zellen aus den zu überprüfenden Kolonien genommen und direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 3,5 mM $MgCl_2$, die Bindungstemperatur betrug 64°C, es wurden 34 Zyklen durchlaufen (vergleiche 2.3.3). Anschließend wurde das PCR-Produkt auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen. Anhand der Höhe der Banden im Vergleich zum Größenstandard konnten die Kolonien, welche das Plasmid mit dem richtigen Insert trugen, eindeutig identifiziert werden.

2.4.3 Plasmidpräparation

Um nun ausreichend Fragment zu erhalten wurden die, wie unter 2.4.2 beschrieben, identifizierten positive Klone mittels einer Pipettenspitze in 50 ml Falcon Gefäße mit 20 ml LLB Medium überführt und unter ständiger Bewegung bei 37°C über Nacht hochgezogen. Am nächsten Tag wurde von der Bakteriensuspension 400 µl Lösung abgenommen, mit 100 µl Glycerol vermischt und bei –80°C zur Lagerung eingefroren. Die restliche Suspension wurde in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 3000g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1,8 ml STET-Puffer aufgenommen und gelöst. Das Gemisch wurde in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit 40 µl Lysozym (Boehringer, Mannheim, Deutschland) versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur gefolgt von einem Denaturierungsschritt für 2 min. Das Reaktionsgefäß wurde danach sofort auf Eis abgekühlt und für 20 min bei 4°C mit 10.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 2 neue Reaktionsgefäße überführt und mit 10 µl DNAse-freier RNAse (Konzentration 10 mg/ml) versetzt und bei 37°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurden 80 µl des Ionenaustauschers CTAB beigemischt und für mindestens 5 min bei Raumtemperatur belassen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min bei 10.000g) wurde das erhaltene Pellet in 400 µl einer 1,2 M Kochsalzlösung aufgenommen, für 5 min auf Eis inkubiert und bei 4°C für 10 min mit 10.000g zentrifugiert. Der, das Plasmid enthaltende, Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 1 ml 100% Ethanol zur Fällung der DNA versetzt (mindestens 10 min auf Eis). Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen, luftgetrocknet und dann in 50 µl Tris-HCl (10 mM, pH 7) aufgenommen. Es erfolgte nun eine photometrische Konzentrationsbestimmung der Plasmidlösung (OD=1 bei 260 nm entspricht DNA Gehalt von 50 µg/ml). Diese Plasmide wurde nun einerseits zur Herstellung der Ribosonden für *in situ* Hybridisierungen benutzt (siehe 2.5.1.1), andererseits auch für Sequenzanalysen.

2.4.4. Sequenzierung

Zu Beginn erfolgte noch eine Aufklärung der Sequenz durch radioaktive Nukleotide und manuelles Auslesen der Filme.

Später wurden die neu klonierten Nukleotidstränge im institutseigenen Servicelabor mittels fluorochromen Farbstoffen automatisch sequenziert.
Die so erhaltenen Sequenzen wurden in den Computer eingegeben und mittels eines Sequenzanalyseprogramms (GCG Wisconsin) auf Überlappungen untersucht. Aus diesen Ergebnissen konnten die einzelnen kurzen Sequenzen zur gesamten kodierenden Sequenz zusammengestellt werden.
Ebenfalls wurden so Ähnlichkeiten und Homologien zu anderen Sequenzen gefunden und überprüft.

2.5 *In situ* Hybridisierung

Als weitere Methode zur Detektion der mRNA wurde die *in situ* Hybridisierung benutzt. Vorteil dieser Methode ist ein weiterer Informationsgewinn gegenüber der PCR durch die zelluläre Auflösung des mRNA Signals. Als Sonden wurden entweder ein Ribonukleotid-Fragment von ca. 300 bp Länge oder Oligonukleotide von 30 bis 50 bp Länge benutzt. Ein aus der PCR mit spezifischen Primern gewonnenes DNA-Stück wurde in ein Plasmid (pZErO™-1, Invitrogen, Groningen, Niederlande) kloniert, in Bakterien eingeschleust und exprimiert. Dieses Plasmid diente dann als Vorlage für die Herstellung der markierten Hybridisierungssonden. Zur Vorgehensweise siehe „2.4 Klonierung und Sequenzierung“.

2.5.1 Radioaktive *in situ* Hybridisierung

2.5.1.1 Probenvorbereitung für Ribosonden

Die isolierten Plasmide mit dem einklonierten DNA-Fragment werden nach photometrischer Bestimmung auf eine Endkonzentration von ca. 100 ng/µl verdünnt. Von dieser Verdünnung wird wiederum 1µl für die folgende PCR eingesetzt. Für die PCR wurden modifizierte T7 und Sp6 Primer benutzt (als ZT7 und ZSp6 bezeichnet), die neben der T7 und Sp6 Sequenz noch einen Teil der Plasmidsequenz enthielten. Es wurden nun je Plasmid 4 Reaktionsansätze (vergleiche 2.3.3 PCR; Magnesiumchloridgehalt war 3mM) pipettiert und eine PCR mit 35 Zyklen durchgeführt. Die 4 Ansätze wurden hinterher vereinigt und mit dem QIAquick PCR Purification Kit™ (Quiagen) aufgereinigt. Die Konzentration

des Amplifikationsproduktes wurde photometrisch ermittelt und zusätzlich anhand der Bande im Agarosegel abgeschätzt.

2.5.1.2 Radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde

Für die folgende Markierungsreaktion wurden 200 ng der zuvor gewonnenen DNA in die Reaktion eingesetzt. Diese wurde in 11,5 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) behandeltem Wasser aufgenommen. Weitere Bestandteile des Reaktionsansatzes waren:

2 µl 10 x Puffer (Boehringer, Mannheim, Deutschland)
0,2 µl 1 M Dithiothreitol (DTT) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
1 µl dNTP-Gemisch (G, A, C; je 2 mM) (MBI Fermentas)
3 µl ^{35}S-αUTP Uracil-Tri-Phosphat (Amersham, Freiburg, Deutschl.)
1,5 µl RNAsin (Promega, Mannheim, Deutschland)
0,8 µl SP6 oder T7 RNA Polymerase (Boehringer, Mannheim)

Nach einer Inkubation von 30 Minuten in einem Thermoheizblock bei 37°C wurden die Proben zentrifugiert, nochmals die gleiche Menge an Polymerase zugegeben und für weitere 40 Minuten im Heizblock inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Proben für 10 Minuten auf 65°C erhitzt um die Polymerasen zu inaktivieren. Die DNA wurde anschließend durch einen DNAse Verdau zerstört. Hierzu wurde folgendes zupipettiert:

1,5 µl RNAsin (Promega, Mannheim, Deutschland)
2 µl tRNA (10 mg/ml) (Boehringer, Mannheim, Deutschland)
1 µl RNAse-freie DNAse (1 U; Boehringer)

Der Reaktionsansatz wurde nach Durchmischung für 10 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert.

Anschließend an den DNA-Verdau erfolgte eine Fällung der RNA durch Zugabe von:

0,8 µl 1M DTT
63 ml DEPC-behandeltes H_2O
10 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 oder 4,8
40 µl 5 M Ammoniumacetat
280 µl 100% Ethanol

Nach Durchmischung wurde die Probe für 5 Minuten in ein Trockeneis-Ethanolbad gestellt und anschließend für 15 Minuten bei 4°C mit ca. 10.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet für 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde dann in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

2.5.1.3 Denaturierendes Harnstoffgel

Die so erhaltene Ribonukleotidsonde wurde anschließend auf ihre Sauberkeit, d.h. auf die Anzahl und Stärke der einzelnen Banden, hin überprüft. Dazu wurde entsprechend der folgenden Anleitung ein denaturierenden Polyacrylamidgel gegossen:

46 g Harnstoff
10 ml 10x TBE
15 ml 40% Acrylamidlösung
auf 100 ml mit Wasser auffüllen
100 µl 10% Ammoniumpersulfatlösung
100 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Nachdem das Gel ausreichend polymerisiert war, wurde es für eine ½ Stunde bei konstant 60 W laufen gelassen, um nicht polymerisiertes Acrylamid aus dem Gel zu entfernen. In einer Miktrotiterplatte wurden nun 2 µl Stoplösung (Gibco Life Technologies, Rockville, USA) mit 1 µl der Sonde gemischt und für 2 Minuten bei 99°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und bei konstant 60 W für 1 Stunde aufgetrennt.

Das Gel wurde anschließend auf ein Whatmann Filterpapier aufgelegt und auf einem Vakuumheiztisch getrocknet. Danach wurde über Nacht ein Film aufgelegt und bei Raumtemperatur exponiert. Am nächsten Tag wurde der Film maschinell (Optimax Typ TR, Protec Medizintechnick GmbH) entwickelt und anhand des Bandenmusters die Qualität der Sonde beurteilt.

2.5.1.4 Scintilationsmessung

Zur genauen Ermittlung der Aktivität und der Effizienz des Einbaues des radioaktiven Nukleotides wurde eine Scintillationsmessung vorgenommen. Hierzu wurde 1 µl der Probe mit 5 ml ReadySafe™ Scintillationslösung (Beckmann, Fllerton, USA) gemischt. Die Proben wurden in einem Beckmann Multi-Purpose Scintillation Counter Model LS6500 gemessen. Hieraus konnte nun die Gesamtaktivität der Probe ermittelt und die einzusetzende Menge berechnet werden.

2.5.1.5 Hybridisierung

Die auf silanisierten Objektträger aufgezogenen Gewebsschnitte wurden aus dem –80°C Gefrierschrank entnommen und bei Raumtemperatur kurz getrocknet. Anschließend wurde für 20 Minuten in 4% Paraformaldehydlösung in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (PBS) fixiert. Nach 2-maligem Waschen für je 5 Minuten in 1x PBS wurden die Schnitte für 10 min in einer Proteinase K Lösung (10 µg/ml in 50 mM TrisHCl, 5 mM EDTA pH 8,0) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut in 4% PFA-Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach 2-maligem Waschen in DEPC behandeltem Wasser für 5 Minuten wurden die Schnitte zur Acetylierung der Amino- und Sulfhydrylgruppen in TEA-Puffer (3,7 g Triethanolaminhydrochlorid, 1 ml 5 M Natriumhydroxidlösung (NaOH) auf 200 ml DEPC behandeltem Wasser) mit 0,25% Essigsäure inkubiert. Die Objektträger wurden hierfür in eine Färbeküvette gestellt, die Lösung eingefüllt und mit einem Magnetrührer versehen. Unter leichtem Rühren wurde nun 0,5 ml Essigsäureanhydrid zupipettiert und für 10 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt in PBS wurden die Schnitte durch eine Alkoholreihe geführt. Hierzu wurde für jeweils 5 Minuten in 70%, 90%, 100% Ethanol, Chloroform und nochmals 100% Ethanol inkubiert. Als letzten Schritt wurden die Schnitte 1 bis 2 Stunden an der Luft getrocknet.
Während dieser Trocknungszeit wurde der Hybridisierungsmix vorbereitet. Hierbei rechnete man mit 100 µl Lösung je Objektträger. Der Mix setzte sich wie folgt zusammen:

50% Formamid
10 mM PBS
20 mM Tris HCl pH 7,0
5 mM EDTA pH 8,0
10% Dextransulfat
1x Denhardtsreagenz
0,2% Natriumlauroylsarcosin
500 µg/ml t-RNA
200 µg/ml denaturierte Heringssperma DNA

Die Gewebsschnitte wurden nun zuerst für 1 Stunde mit diesem Hybridisierungsmix ohne radioaktive Sonde in einer feuchten Kammer bei 55°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Sonde in einer Konzentration von 2 Millionen Zerfällen pro Minute (cpm) in 100 µl Hybridisierungsmix auf die Schnitte aufgebracht. Nach Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer bei 55°C, wurde am nächsten Tag für 10 Minuten in 5x Natriumcitratpuffer (SSC), 10 mM DTT bei 55°C gewaschen. Anschließend wurde für 30 Minuten mit 2x SSC, 10 mM DTT, 50% Formamid bei 60°C gewaschen. Durch den nun folgenden RNAse Verdau wurden freie RNA Stränge und unvollständige, unspezifische Hybridisierungen, die durch die Waschschritte nicht entfernt wurden, beseitigt. Dazu wurde DNAse freie RNAse in einer Konzentration von 1 µg/ml in 0,5 M NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7,0 und 1 mM EDTA pH 8,0 gelöst und auf 37°C erwärmt. Die Gewebsschnitte verblieben für 5 Minuten bei 37°C in dieser Lösung und wurden danach bei Raumtemperatur für 10 Minuten in 2x SSC, dann für 10 Minuten in 0,1x SSC gewaschen. Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) für je 5 Minuten. Die Schnitte wurden dann zum Trocknen auf Whatmann™ Filterpapier ausgelegt.

2.5.1.6 Aufbringen der Filmemulsion und Entwicklung der Schnitte

Zum Nachweis des Hybridisierungssignales wurden die Objektträger in der Dunkelkammer unter Rotlicht in flüssige Filmemulsion NTB-2™ (Eastman Kodak Company, New Haven) eingetaucht. Nach Trocknen der Emulsion wurden die Objektträger in Lichtdichte, mit trockenem Kieselgel versehene, Objektträgerkästen gesteckt. Die Deckel wurden zur Sicherheit noch mit

Klebeband umwickelt und die Kästen bei 4°C inkubiert. Durch Testentwicklungen nach 3, 5 bzw. 7 Tagen Exposition wurde die optimal Expositionszeit ermittelt. Die Entwicklung der Schnitte erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers.
Ein Teil der Schnitte wurde anschließend mit Hämalaun gefärbt und danach zusammen mit den restlichen Schnitten nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 95%, 100%), Isopropanol und Xylol in DePeX™ (BDH Laboratory Supplies, Poole, England) eingedeckt.

2.5.1.7 Mikroskopie und Auswertung

Die Schnitte wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop (Leica TCS, Heidelberg, Deutschland; vergl. Abschnitt 2.2.4) im Reflektionsmodus aufgenommen. Hierzu wurden durch den 20 µm Gewebsschnitt 3 Scanebenen im Abstand von 5 µm unter Verwendung eines 10x Immersionsölobjektivs gelegt und aus diesen eine „Maximum Intensity Projection“ (MIP; vergl. Abschnitt 2.2.5) gebildet. Diese MIP wurde in das Bildanalyseprogramm OPTIMAS™ Version 6.2 geladen. Durch ein selbstentwickeltes Makro wurde nun sowohl für die operierte Seite als auch für die Kontrollseite die mittlere Helligkeit für je 10 der markierten Neurone, sowie die Hintergrundshelligkeit für 5 zufällig gewählte Gewebsbereiche bestimmt. Diese Daten wurden in ein Microsoft Excel™ Arbeitsblatt übertragen und dort weiterbearbeitet. Durch ein Excel-Makro wurde zuerst der Mittelwert aus den 5 Einzelmessungen der Hintergrundshelligkeit erstellt und dann jeder einzelne der 10 Werte für die Helligkeit der Motoneurone mit diesem Hintergrundswert korrigiert. Aus den 10 korrigierten Einzelwerten wurde wiederum der Mittelwert gebildet. Zuletzt wurde das Verhältnis aus den Mittelwerten der operierten und der Kontrollseite gebildet.
Aus den Seitenverhältnissen der einzelnen Schnitte wurden nun der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet und in einer Grafik über der Zeit nach Durchtrennen des Fazialisnervs aufgetragen.

2.5.1.8 Radioaktive Markierung der Oligonukleotide

Konnten keine Ribosonden eingesetzt werden, so wurden kurze Oligonukleotide von 30 - 50bp Länge als Sonde benutzt. Mittels des Enzyms Terminale

Transferase wurden hierzu ^{32}P-CTP Moleküle an das 3'-Ende der Sonden angehängt. Der Reaktionsansatz hierzu setzte sich wie folgt zusammen:

4 µl 5x Reaktionspuffer (Boehringer, Mannheim, Deutschland)
3 µl des Oligonukleotides (10pmol Endkonzentration)
3 µl ^{32}Pα–dCTP
3 µl Kobaltchlorid-Lösung $CoCl_2$ (Konzentration 5mM)
6 µl Wasser
1 µl Terminale Transferase (25U/µl)

Dieser Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl TE pH 8.0 gestoppt. Nach Zugabe von 1 µl tRNA wurden 2 µl für die Scintilatormessung abgenommen.
Nach Zugabe von 20 µl 5 M Natriumacetatlösung und 150 µl 100% Ethanol wurde in einem Trockeneis-Ethanol-Bad für 15 min gefällt. In einer Hettich Tischzentrifuge bei 12000 Umdrehungen und 4°C wurde die markierte Sonde für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, um die restlichen Salze zu entfernen. Nach Trocknen des Pellets wurde dieses in 20 µl TE pH 8.0 aufgenommen und hiervon 1 µl für die Scintilationsmessung abgenommen (vergleiche 2.5.1.4).
Aus dem Verhältnis der Scintilatormessung vor und nach der Fällung ließ sich die Effizienz der Markierungsreaktion, d.h. der angehängten radioaktiven Nukleotide bestimmen. Sie lag im Bereich von 20 bis 70%.

2.5.1.9 Hybridisierung mit Oligonukleotid-Sonde

Es wurden die gleichen Gewebsschnitte wie unter 2.5.1.5 beschrieben verwendet. Nach 10 min Fixierdauer in 4% Paraformaldehydlösung in 1x PBS wurden die Schnitte 2 mal für je 5 min in 2x SSC bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte wie bereits unter 2.5.1.5 beschrieben eine Azetylierung der Gewebsschnitte. Vor der Dehydrierung der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70, 96, 100, 100% Ethanol für je 2 Minuten) wurden diese noch zweimal für je 5 min in 2xSSC gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte an

der Luft getrocknet. Der Hybridisierungsmix setzte sich wie folgt zusammen (je Objektträger wurden 100 µl aufgetragen):

4x SSC
20% Formamid
5x Denhardt's Reagenz
50 mM TrisCL pH 7,0
1% SDS (Sodiumdodecylsulfat)
100 µg/ml Heringssperma
100 µg/ml tRNA
5 mM EDTA
1 mM Natriumpyrophosphat
10% Dextransulfat

Die Hybridisierung wurde wie bei den Ribosonden in einer feuchten Kammer bei konstanter Temperatur über Nacht durchgeführt. Pro Schnitt wurden 1 Million counts aufgebracht. Allerdings wurde aufgrund der kürzeren Sondenlänge eine niedrigere Hybridisierungstemperatur gewählt. Diese lag je nach Sonde zwischen 32° C und 42° C.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte in 1x SSC, 0,1% SDS, 1 mM Natriumpyrophosphat 3 mal für je 15 min gewaschen. Anschließend wurden einige Probeschnitte genommen, entwässert und für ½ Stunde auf eine Phosphoimagerplatte aufgelegt. Diese wurde ausgelesen und abhängig von der Stärke des Signals wurden die anderen Schnitte nochmals gewaschen oder direkt in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

Nach Lufttrocknung der Schnitte wurden sie mit flüssiger Filmemulsion überzogen und bei 4°C im Kühlschrank in lichtdichten Behältern inkubiert. Durch Probeentwicklungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beschichtung mit der Filmemulsion wurde die optimale Expositionszeit ermittelt (vergleiche 2.5.1.6).

2.5.2 nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung

Das Prinzip der nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierungen entsprach dem der radioaktiven. Als Marker wurde anstatt des radioaktiv markierten UTP, ein mit Digoxigenin markiertes Uridintriphosphat (UTP) benutzt.

2.5.2.1 Gewebsvorbereitung

Im Gegensatz zur radioaktiven Hybridisierung, bei der das Gewebe auf silanisierte Objektträger aufgezogen wurde, wurden hier silanisierte, runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 15 mm benutzt. Hierdurch wurde eine Inkubation der Schnitte in 24 Loch Kulturschalen ermöglicht.

2.5.2.2 Markierung der Ribosonde

Wie bereits erwähnt wurde zur Markierung der Sonde Digoxigenin-markiertes Uridintriphosphat benutzt. Die Markierungsreaktion erfolgte gemäß der Herstellervorschrift des DIG RNA Markierungskits (DIG RNA Labeling Kit Sp6/T7; Boehringer, Mannheim, Deutschland). Es wurde jedoch statt des Transkriptionsvektors mit der eingeschleusten DNA die aus einer Plasmid-PCR hochamplifizierte DNA (vergleiche Abschnitt 2.5.1.1) als Vorlage in die Markierungsreaktion eingesetzt.

2.5.2.3 Überprüfung der Markierungsreaktion

Die Menge an markierter Sonde wurde über DIG Teststreifen bestimmt. Als Vergleich dienten Teststreifen mit einer standardisierten DIG Menge. Die Bestimmung des Gehalts an markierter RNA wurde entsprechend der Herstellervorschrift (Boehringer, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

2.5.2.4 Hybridisierung

Das Gewebe wurde auf den Deckgläsern bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte für 10 Minuten eine Fixierung in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS, gefolgt von 2 je 5 minütigen Waschschritten in PBS. Nach einer Inkubation in Proteinase K (2,5 µg/ml in PBS) wurde erneut in PBS gewaschen und in PFA fixiert. Der anschließende Waschschritt erfolgte in 2x Natriumcitratpuffer (SSC). Vor dem Auftragen der Sonde erfolgte eine Prä-Hybridisierung für 2 Stunden bei 55°C in einer Lösung aus 50% Formamid, 2x SSC und 10mM Dithiothreitol (DTT) in DEPC-behandeltem Wasser. Die

Hybridisierungsprobe wird in einer Konzentration von 50-150 ng/ml in Hybridisierungspuffer, bestehend aus 50% Formamid, 2x SSC, 1 mg/ml t-RNA und 10% Dextransulfat, für 10 Minuten auf 90°C erwärmt und danach sofort auf Eis abgekühlt. Nach Absaugen der Prä-Hybridisierungslösung wurde die Sonde aufgetragen und über Nacht bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sonde abgesaugt und einmal mit 2x SSC bei Raumtemperatur gewaschen. Der folgende Waschschritt erfolgte bei 55°C für 80 Minuten in Prä-Hybridisierungspuffer, daran anschließend erfolgte ein RNA Verdau (vergl. 2.5.1.5) gefolgt von mehreren Waschschritten in PBS.
Nun wurde für eine Stunde mit Blockierungslösung (Boehringer, Mannheim, Deutschland) inkubiert, bevor ein anti-DIG-Antikörper (Boehringer), alkalische Phosphatase gekoppelt, in einer 1:1000 Verdünnung in Blockierungslösung aufgetragen wurde. Nach 2 Stunden Inkubation wurde mehrmals in PBS gewaschen und die Schnitte in einem Puffer aus 0.1 M Tris-HCl, pH 9,5 und 0,1 M $MgCl_2$ äquilibriert. Zur Detektion wurde nun BM Purple™ (Boehringer, Mannheim, Deutschland), eine Farblösung die nach Umsetzung durch die alkalische Phosphatase zu einem blauschwarzen Niederschlag führt, im Dunkeln für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C aufgetragen. Durch visuelle Kontrolle kann der Fortschritt der Farbreaktion beobachtet werden. Nach Beendigung der Reaktion wurde 3 mal für 15 Minuten in PBS gewaschen und die Schnitte in Mowiol 4-88™ (Hoechst, Strasbourg, Frankreich) eingedeckt.

<u>Übersicht über die Lösungen für ISH:</u>

5x PBS

36g NaCl
9,3 g $Na_2HPO_4x2H_2O$
2,15 g KH_2PO_4
auf 1000 ml mit doppelt destilliertem Wasser (ddH_2O) auffüllen, 1000 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) zugeben, über Nacht mischen und am nächsten Tag zur Inaktivierung des DEPC's autoklavieren

20x SSC

175,3 g NaCl
88,2g Na_3citrat
auf 1000 ml mit doppelt destilliertem Wasser (ddH_2O) auffüllen, 1000 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) zugeben, über Nacht mischen und am nächsten Tag zur Inaktivierung des DEPC's autoklavieren

PBST / SSCT

PBS bzw. SSC in DEPC-behandeltem Wasser. Diesem wird noch das Detergenz Tween 20 in einer Endkonzentration von 0.1% zugesetzt

4% Paraformaldehyd

20 g Paraformaldehyd werden in 500 ml PBS (erwärmt auf 60-65°C) durch Zugabe von konzentrierter Natronlauge (NaOH) aufgelöst. Diese Lösung wird filtriert und der pH-Wert auf 7,4 mittels Salzsäure (HCl) eingestellt.

Prähybridisierungsmix

50% Formamid
2xSSC (entsprechende Menge aus 20x Vorratslösung nehmen)
10 mM Endkonzentration Dithiothreitol (DTT)
Lösungen bzw. Substanzen werden mit DEPC-behandeltem Wasser zum entsprechenden Endvolumen aufgefüllt

Hybridisierungsmix

50% Formamid
2x SSC
1 mg/ml t-RNA
10% Dextransulfat
Dextransulfat und t-RNA in 2x SSC auflösen, erst dann das Formamid zugeben

RNAse Puffer

0,5 M NaCl
10 mM Tris pH 7.0
1 mM EDTA pH 8.0

Blockierungslösung für anti-DIG-Antikörper Färbung

2% Schafserum
2% Ziegenserum
2 mg/ml BSA
0,05% Natriumazid in PBS / PBST

Puffer 3

0,1 M Tris-HCl, pH 9.5
0,1 M $MgCl_2$

2.6 Herstellung eines polyklonalen Antikörperserums gegen SC1

Als Antigen wurde ein 15 Aminosäuren langes Peptid des aminoterminalen Bereichs der neu aufgeklärten Sequenz für Ratten SC1/ALCAM benutzt. Bei der methodischen Durchführung hielt ich mich eng an die Versuchsbeschreibung in „Current Protocols in Molecular Biology“, Wiley & Sons.

2.6.1 Kopplung des Peptids an das Trägerprotein

Als Träger für das als Antigen wirkende Peptid wurde das Protein KLH (keyhole limpet hemocyanin) ausgewählt. Grund für die Wahl dieses Proteins war die geringe Verwandtschaft sowohl zu den zu immunisierenden Kaninchen, als auch zu den späteren Versuchstieren. Das Peptid wurde unter Zuhilfenahme von m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccimide Esther (MBS), welches amino- und

carboxyterminale Schwefelgruppen des Peptids mit Lysinseitenketten im Trägerprotein verbindet, an das Trägerprotein gebunden.
Hierzu wurden 10 mg des Trägerproteins in 0,5 ml 0,1 M Phosphat Puffer mit 50 µl MBS versetzt und unter ständiger Bewegung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Verhältnis MBS zu Trägerprotein sollte 27:1 betragen. Anschließend wurde die Lösung über PD-10 Säulen aufgereinigt und in 0,6 ml Fraktionen aufgefangen. Von diesen Fraktionen wurde die Absorption bei 280 nm gemessen und so der erste Protein Peak ermittelt, welcher den MBS/KLH Komplex enthielt. Alle Fraktionen dieses Peaks wurden wieder vereint.
10 µmol des Peptides wurden mit einer 20 mM EDTA-Lösung verdünnt und mit dem MBS/KLH Komplex vereint (Endkonzentration von 1 mg/ml). Diese Lösung wurde nun für vier Stunden bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre kontinuierlich gerührt und anschließend bei 4°C über Nacht gegen PBS dialysiert. Am nächsten Morgen wurde mit frischem PBS für weitere vier Stunden dialysiert.
Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine BSA Eichkurve erstellt und eine Doppelbestimmung der Proteinkonzentration des gekoppelten Peptides durchgeführt. Hierfür wurde der BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce gemäß deren Versuchsprotokoll verwendet. Da für die Immunisierung eine Gesamtproteinmenge von 1 mg benötigt wird, wurden entsprechende Aliquots abgefüllt und bei -20°C eingefroren.

2.6.2. Gewinnung von Prä-Immunserum

Vor der ersten Immunisierung wurde den Kaninchen Blut abgenommen. Dieses diente als Kontrolle der erfolgreichen Immunisierung, wie auch zur Überprüfung der Spezifität des Antiserums in den Versuchsreihen. Das abgenommene Blut wurde in weitlumige Kunststoffgefäße überführt, für 4h bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C bis zur Koagulation der zellulären Bestandteile des Blutes aufbewahrt. Gelegentlich wurde der Blutkuchen mit einem Holzspatel von der Gefäßwand abgelöst. Das so erhaltene Serum wurde vorsichtig abgenommen, für 10 Minuten bei 2700g abzentrifugiert und der Überstand aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung weggefroren.

2.6.3 Immunisierung unter Verwendung von Freund's Adjuvants

Zur ersten Immunisierung wurde komplettes Freund's Adjuvants (CFA) benutzt. Vor Gebrauch ist dieses zu schütteln, um eine einheitliche Dispersion der hitze-inaktivierten Myobakterien (*Myobacterium tuberculosis*) sicher zu stellen. Anschließend wurden CFA und das gekoppelte Peptid im Verhältnis 1:1 gemischt. Um eine homogene Emulsion, welche für eine erfolgreiche Immunisierung unerläßlich ist, zu erhalten, wurde das Gemisch luftfrei in eine Spritze aufgesogen und diese über ein spezielles Kupplungsstück mit einer weiteren Spritze verbunden. Durch wechselseitiges Drücken der Spritzenstempel wurde das Gemisch zu einer homogenen, milchigen Emulsion. Diese wurde nun dem Kaninchen an mehreren Stellen über die Flanke verteilt unter die Haut (subkutan) gespritzt.
Nach 10 bis 14 Tagen wurde dem Kaninchen aus der Ohrvene Blut entnommen und daraus Serum gewonnen (vgl. 2.6.2). Dieses Serum wurde nun in einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) auf den Gehalt an spezifischen Antikörpern gegen das Peptid bzw. das Trägerprotein KLH hin untersucht.
Im Zeitraum von 4 bis 8 Wochen nach der ersten Immunisierung wurde die erste Auffrischung durchgeführt. Hierzu wurde anstelle des kompletten Adjuvant's das inkomplette Freundsche Adjuvants (IFA) benutzt, welches in der Zusammensetzung bis auf die inaktivierten Myobakterien mit dem CFA identisch ist. 10 bis 14 Tage nach der Auffrischung wurde erneut Blut entnommen und Antiserum gewonnen. Der Antikörpergehalt (Titer) und die Spezifität wurde wieder durch einen ELISA überprüft. War der Titer hoch genug und die Antikörperreaktion spezifisch, wurde das Herz des Kaninchen punktiert und das Blut zur Serumgewinnung aufgefangen. War der Titer noch zu gering, wurde eine weitere Immunisierung mit dem Antigen und IFA in 2 - 3 Wochen Intervallen mit Kontrolle des Titers vorgenommen.

2.6.4 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Für den ELISA Test wurden die Vertiefungen sogenannter Mikrotiterplatten (Immunolate Maxisorp 96, NUNC, Rochester, USA) mit dem Peptid, dem an das

Trägerprotein gekoppeltem Peptid, dem Trägerprotein allein und zur Kontrolle BSA bzw. Wasser beschichtet. Hierzu wurden in die Plattenvertiefungen jeweils 100 ng des Peptids / Proteins, gelöst in 100 µl Wasser, vorgegeben und bei 4°C über Nacht auf der hydrophoben Kunststoffoberfläche absorbiert. Am nächsten Tag wurden die Vertiefungen mit TBS/TWEEN (0,15 M NaCl; 20 mM Tris-HCl, ph 7,2; 0,05 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Nun wurde das zu testende Antiserum in einer Verdünnungsreihe mit TBS/TWEEN in die Vertiefungen gegeben und 1 h inkubiert. Danach wurde 5 mal mit TBS/TWEEN gewaschen und mit 100 µl eines zweiten Antikörpers (Peroxidase-konjugierte Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Fraktion, 1:3000 mit TBS/TWEEN verdünnt) für 40 min inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit TBS/TWEEN wurde die grüne Farbreaktion mit je 100 µl einer Lösung aus 10 ml 0,1 M Citratpuffer (pH 4,0), 500 µl Substratlösung (21,9 mg 2,2'Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)/ml H_2O) und 150 µl 30%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30 min inkubiert und zur Dokumentation fotografiert. Weiterhin wurde die Farbreaktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen. Aus den so erhaltenen Werten konnte die maximale Antikörperverdünnung abgeleitet werden.

2.7 Westernblots

2.7.1 Gewebsentnahme

Die Gehirne wurden frisch entnommen und in, mit flüssigem Stickstoff gekühltem, Isopentan tiefgefroren. Danach wurden sie entweder sofort im Kryostat weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

2.7.2 Isolierung der Fazialis - Kernregion

Das Verfahren zur Isolierung der Fazialis Kernregion entsprach dem unter 2.3.1 beschriebenen Verfahren.

2.7.3 Aufbereitung des Gewebes

Das Gewebe wurde mit 80 µl Lysispuffer in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen mechanisch aufgelöst. Die Proben wurden dann für circa 20 Minuten auf Eis gestellt und anschließend ungelöste Bestandteile in einer Kühlzentrifuge bei 4°C für 15 Minuten mit 10.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde nun abgenommen und in neuen Eppendorftubes bei -80 C eingefroren.
Der Lysispuffer setzte sich wie folgt zusammen:

50 mM	Hepes, pH 7,5
150 mM	Natriumchlorid (NaCl)
1,5 mM	Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)
5 mM	Ethylenglycol-bis-aminoethylether (EGTA)
10%	Glyzerin
1%	Triton X-100

Unmittelbar vor Benutzung wurden dem Lysispuffer noch folgende Chemikalien in folgender Endkonzentration beigegeben:

2 mM	Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)
10 µg/ml	Aprotinin
10 µg/ml	Leupeptin
1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

2.7.4 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinmenge der Proben wurde nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). 2 µl der Probe wurden mit 998 µl Wasser versetzt. Für den Blindwert wurden 2 µl des Lysispuffers mit Wasser gemischt. Zu diesen Lösungen wurden nun je 250 µl Protein Assay Farbstoffkonzentrat (Bio-Rad, München, Deutschland) zugegeben und mittels eines Spektrophotometers (Pharmacia LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer, San Francisco, USA) die Absorption der Proben gemessen. Als Standard diente eine definierte Kälberserumalbumin-Konzentrationsreihe, mit der das Photometer zuvor geeicht worden war.

2.7.5 Elektrophorese und Proteintransfer

Aufgrund des Molekulargewichtes der Antigene wurden Laufgele mit einem Acrylamidgehalt von 6% und Sammelgele mit einem Acrylamidgehalt von 4% benutzt. Hierfür wurde das Gelsystem Mighty Small II der Firma Hoefer eingesetzt.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Lämmli-Puffer im Verhältnis 1:1 versetzt und für 3 Minuten bei 95°C denaturiert. Der Lämmli-Puffer wurde 3-fach konzentriert wie folgt angesetzt:

187,5 mM	Trishydroxymethylaminomethan (Tris), ph 6,8
6%	Natriumlaurylsulfat (SDS)
30%	Glyzerin
0,01%	Bromphenolblau
15%	β-Mercaptoethanol

Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis gestellt, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Als Längenmarker wurde ein biotinylierter Längenmarker, hoher Bereich (New England BioLabs, Beverly, USA) benutzt. Die Proben wurden in einem Laufpuffer aus

250 mM	Glycin
25 mM	Tris, ~pH 8
0,1%	SDS

für 1 bis 2 Stunden bei konstant 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf Westran PVDF Transfermembran 0,2 µm oder Nitrozellulose Membran 0,2 µm (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) unter Benutzung einer SemiDry Blotting Apparatur (BioRad, München, Deutschland) übertragen. Hierzu wurden die Gele kurzzeitig in den Transfer Puffer, bestehend aus

2,9 g Glycin
5,8 g Tris
0,73 g SDS
200 ml Methanol; auf Endvolumen von 1l mit Wasser aufgefüllt,

gelegt und auf der Transfermembran angeordnet. Die Membranen wurden entsprechend der Herstellerangaben vorbehandelt. Membran und Gel wurden nun zwischen mehrere, in Puffer angefeuchteten, Lagen Whatman™ Papier

(Maidstone, England) in die Transfer-Apparatur eingespannt. Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran dauerte 2 bis 3 Stunden bei einer Stromstärke von ca. 0,8 mA/cm^2. Zur Kontrolle der Effizienz des Transfers und der Auftrennung der Proteine wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt.

2.7.6 Antikörperfärbung und Detektion

Als Vorbereitung für die Antikörperinkubation wurden die Blots über Nacht bei Raumtemperatur in einer 5% Milchpulverlösung in Tris-Tween Puffer (TBST; 10x TBST: 10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) inkubiert. Nach mehrfachem Waschen in TBST am nächsten Tag wurde mit dem primären Antikörper für mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Detektion wurde nach erneutem Waschen ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur appliziert. Danach wurde gründlich in TBST gewaschen, bevor die Membran für 1 Minute in ECL™ western blotting detection reagent (ECL: enhanced chemiliminescents; Amersham, Freiburg, Deutschland)[6] gemäß den Herstellerangaben inkubiert wurde. Die Membran wurde nach Inkubation in ECL™ in Saran™ Folie eingewickelt und unterschiedlich lang (30 sek, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 10 min) in einer Filmkassette auf Hyperfilm™-ECL (Amersham, Freiburg, Deutschland) exponiert. Der Film wurde anschließend maschinell entwickelt (Optimax Typ TR, Protec Medizintechnik GmbH).

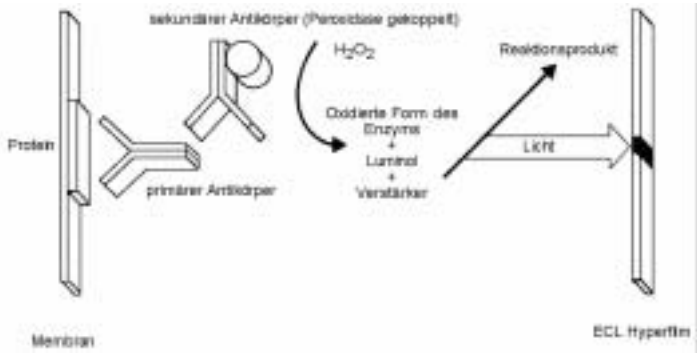

Abbildung 2.6 Funktionsweise der Chemolumineszenez mit ECL™ (Amersham).

[6] Dieses Detektionsreagenz enthält Luminol, welches durch die Peroxidase in einen angeregten Zustand überführt wird. Unter Lichtemission fällt nun Luminol zurück in seinen Ausgangszustand (siehe Abbildung 2.4). Diese Chemolumineszenz kann auf Film detektiert werden.

2.8 Lösungen

Hier noch einmal, soweit nicht bereits in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt, ein Überblick über die benutzten Lösungen. Für alle Experimente und Lösungen wurde entweder Wasser aus einer Reinstwasseranlage (USF Seral Deutschland, Ransbach-Baumbach) oder mit DEPC (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) behandeltes Wasser verwendet. Zusätzlich wurden die Lösungen nach dem Ansetzen autoklaviert und die benötigten Mengen steril entnommen. Ebenso wurden entsprechende Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und sonstige Hilfsmittel, falls benötigt, vor Gebrauch autoklaviert oder sterilisiert.
Soweit nicht anderst erwähnt, wurden alle Chemikalien von Sigma, Deisenhofen, Deutschland bezogen.

2.8.1 Puffer

PBS/BSA/Natriumazid:

0,01M PBS (pH 7,4)
0,1% BSA;
0,05% NaN_3

Ladepuffer für Agarosegele:

0,125 g Bromphenolblau
0,125 g Xylencyanol FF
13 ml Glycerol
35 ml H_2O lösen

Verdünnungspuffer für Taq-Polymerase:

20 mM Tris (pH 8)
100 mM KCl
0,1 mM EDTA
1 mM DTT
87 % Glycerol
0,5 % NP40
0,5 % Tween-20

in H_2O lösen; bei -20 °C lagern

5 x PBS (phosphate buffer saline):

36 g NaCl

7,4 g Na_2HPO_4

2,15 g KH_2PO_4

in 1 l H_2O lösen; autoklavieren

Proteinase-K Puffer:

50 mM Tris HCl, pH 7

5 mM EDTA pH 8,0

in H_2O

RNAse-Puffer:

0,5 M NaCl

10 mM Tris HCl pH 7,0

1 mM EDTA pH 8,0

in H_2O

0,5 M EDTA, pH 8:

186,1 g EDTA-Disodiumsalz

ca. 20 g NaOH-Plätzchen (pH 8,0 einstellen)

in 800 ml H_2O lösen

auf 1 l auffüllen, autoklavieren

SDS-Elektrophoresepuffer für Westerngele:

250 mM Glycin

25 mM Tris HCl, pH 8,0

0,1 % SDS

STET:

8 % Sucrose

0,1 % TritonX100

50 mM EDTA

50 mM Tris HCl pH 8,0
in H_2O

20 x SSC (standard sodiumcitrat):

175,3 g NaCl
88,2 g Sodiumcitrat
in 800 ml H_2O lösen
pH auf 7,0 einstellen
auf 1 l auffüllen

10 x TAE:

48,4 g Tris HCl, pH 7,0
11,42 ml Eisessig
40 ml EDTA (0,25 M)
mit H_2O auf 1 l auffüllen

10 x TBE:

109 g Tris
55 g Borsäure
40 ml EDTA, 0,5 M, pH 8
mit H_2O auf 1 l auffüllen

10 x TBST:

10 mM Tris HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
0,05 % Tween-20

TE (Tris-EDTA):

10 mM Tris HCl pH 8,0
1 mM EDTA, pH 8,0
in H_2O

Tris HCl (1 M):

121,1 g Tris

in 800 ml H_2O lösen

pH mit konz. HCl auf den gewünschten Wert einstellen,

auf 1 l auffüllen

Transblot-SD-Puffer:

2,9 g Glycin

5,8 g Trisbase

0,73 g SDS

200 ml Methanol

mit H_2O auf 1 l auffüllen

Tritonlysispuffer:

50 mM Hepes, pH 7.5

150 mM NaCl

1.5 mM MgCl2

5 mM EGTA (Boehringer, Mannheim, Deutschland)

10 % Glyzerin

1 % Triton X-100

Lösung bei 4 C lagern

direkt vor Anwendung zugeben:

2 mM Na3VO4

10 µg/ml Aprotinin

10 µg/ml Leupeptin

1 mM PMSF

3 x Lämmli-Puffer:

187,5 mM Tris HCl, pH 6,8

6 % SDS

30 % Glyzerin

0,01 % Bromphenolblau

15 % β-Mercaptoethanol

2.8.2 Medien

LLB-Medium:

10 g Trypton oder Pepton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
200 µl 5 M NaOH

LLB-Agar:

15 g LLB-Agar
mit LLB-Medium auf 1 l auffüllen,autoklavieren

2.8.3 Farblösungen

Coomassie-Brilliantblau:

Lösung A:

90 % Methanol
0,3 % Coomassie-Brilliantblau R250
in H_2O

Lösung B:

1 % Kupfer(II)sulfat*5 H_2O
20 % Essigsäure

Lösungen A und B vor Gebrauch 1:1 mischen

Coomassie-Entfärber:

10 % Essigsäure
25 % Methanol
0.5 % Kupfer(II)sulfat*5 H_2O
in H_2O

Hämalaun:

1 g Hämatoxylin

0,2 g Natriumjodat ($NaJO_3$)

50 g Kalialaun $KAl(SO_4)_2$ x 12 H_2O

unter schütteln in 800 ml H_2O lösen

50 g Chloralhydrat ($Cl_3CCH(OH)_2$)

1g krist. Zitronensäure

auf 1 l auffüllen, gut verschlossen im Dunkeln lagern und vor Gebrauch filtrieren

Ponceau-S-Lösung:

0,5 % Ponceau-S

1 % Essigsäure

in H_2O

2.8.4 Sonstiges

Chromgelatine:

1,0 g Gelatine

0,1 g Kaliumchrom III sulfat

in erwärmtem Wasser unter Rühren lösen abkühlen lassen und vor Gebrauch filtrieren

30 % Chloralhydrat:

30 g Chloralhydrat in 100 ml H_2O lösen; lichtgeschützt lagern

10 % APS:

10 g Ammoniumpersulfat 100 ml H_2O

5 M Ammoniumacetat:

385 g Ammoniumacetat

in 800 ml H_2O lösen

auf 1 l mit auffüllen, filtrieren

Acrylamidgele, 8%ig (10 Minigele für PCR-Elektrophorese):

88,11 ml H_2O

37,33 ml 30 % Acrylamid

14 ml 10 x TBE

280 µl TEMED (N,N,N`,N`-Tetramethyldiamin)

280 µl 10% APS

1 Stunde polymerisieren lassen

Denhardt´s Reagenz:

5 g Ficoll (Typ 400, Pharmacia, San Francisco, USA)

5 g Polyvinylpyrrolidone (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

5 g BSA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

in 500 ml H_2O lösen; bei -20 °C lagern

Hybridisierungsmix:

50 % Formamide

20 mM TrisHCl, pH 7,0

5 mM EDTA, pH 8,0

10 mM PBS

10 % Dextransulfat

1x Denhardt's Reagenz

0,2 % N-Laurylsarcosine

0,5 mg/ml tRNA

Natriumacetat, 3 M:

24,7 g Natriumacetat

in 100 ml H_2O lösen

pH 5,2 mit Essigsäure einstellen

10 % SDS:

100 g Sodiumdodecylsulfat

in 1 l H_2O leicht erwärmen und unter Rühren lösen

Fixierer F24:

240 g Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$ * 5 H_2O)
10 g Natriumsulfit (Na_2SO_3) wasserfrei
25 g Natriumdisulfit ($Na_2S_2O_5$) wasserfrei
500 ml Wasser 50°C
mit kaltem Wasser auf 1 l auffüllen

Westerngele (für 5 Minigele):

Trenngel, 15 % (niedriger prozentige Gele entsprechend)

30 ml Polyacrylamid, 30 %
22,5 ml Tris HCl, pH 8,8
6,27 ml H_2O
600 µl SDS, 10 %
600 µ APS, 10 %
30 µl TEMED

Sammelgel, 3 %

4 ml Polyacrylamid, 30 %
5 ml Tris HCl, pH 6,8
29,34 ml H_2O
800 µl SDS, 10 %
800 µl APS, 10 %
60 µl TEMED

Eindeckmittel Moviol™(Hoechst)

5 g Moviol™ 4-88 (Hoechst, Strasbourg, Frankreich)
20 ml PBS, 10mM
16h kontinuierlich rühren, bis sich Moviol gelöst hat
10 ml Glyzerin zugeben
16h rühren, 15 min bei 4000 rpm abzentrifugieren, ph Wert auf 8-8,5 einstellen
150 µl 10% Natriumazid zugeben, mischen, aliquotieren und bei -20°C bis zum Gebrauch aufbewahren.

3. Ergebnisse

3.1 SC1 / ALCAM

3.1.1 Immunhistochemie

Mittels der Antikörper F84.1 (zur Verfügung gestellt von W. Stallcup) und 613 (zur Verfügung gestellt von C.A.O. Stürmer) war es möglich, die Zellmembran von Motoneuronen im Fazialiskern zu markieren. Des weiteren färbten die Antikörper stark das Neuropil und Kapillaren.

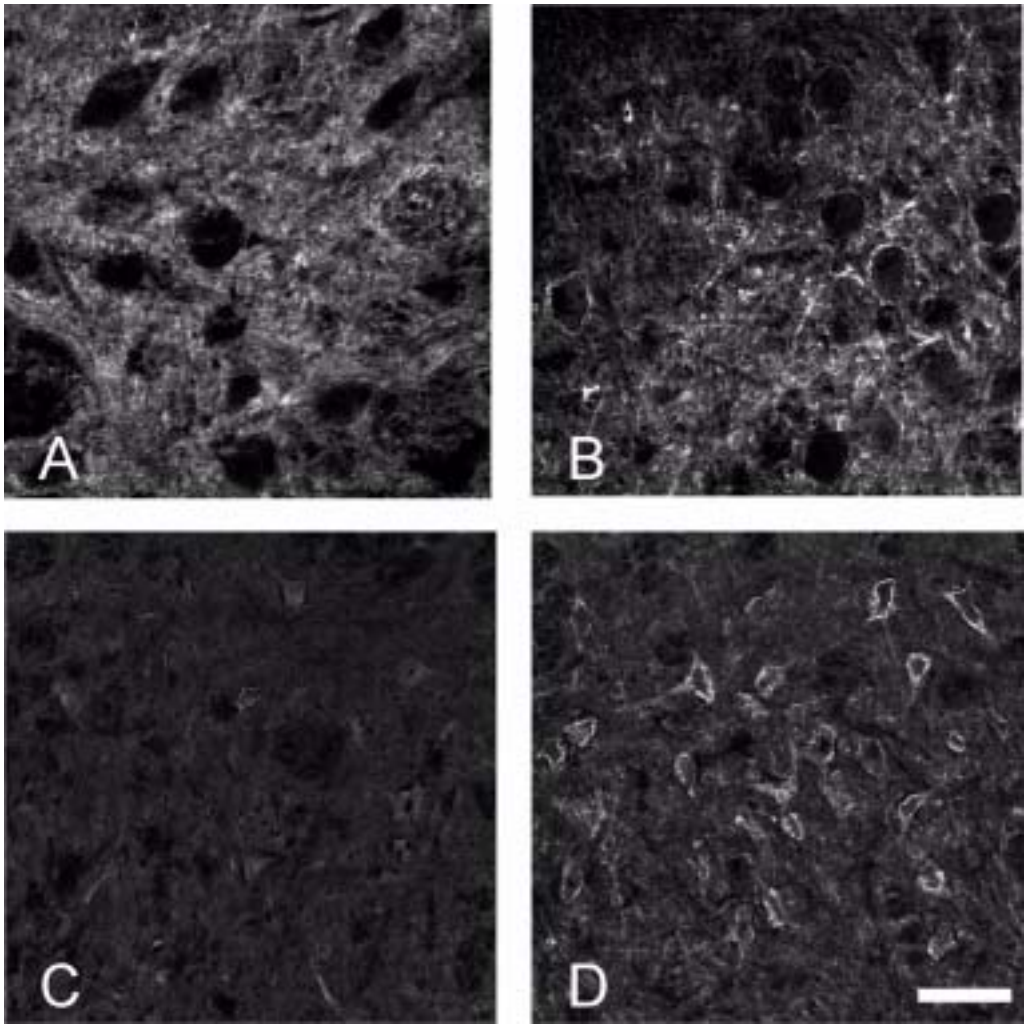

Abbildung 3.1 Konfokale Aufnahmen immunhistochemischer Untersuchungen des *Nucleus facialis* mit den Antikörpern F84.1 und 613. A und B: Der Antikörper F84.1 färbt die Zellmembran von Motoneuronen, das Neuropil und die Kapillaren. C und D: Mit dem Antikörper 613 erhält man ein identisches Färbungsmuster, wobei das Neuropil schwächer gefärbt ist. A und C: Kontrollseite des Nukleus; B und D: operierte Seite, 7 Tage nach Durchtrennung des Fazialisnervs ist eine erhöhte Expression von SC1 Protein auf der operierten Seite sichtbar. Größenbalken in D entspricht 50 µm.

Durch 3-dimensionale Rekonstruktionen konfokaler Mikroskopaufnahmen konnte gezeigt werden, daß die Markierung der Motoneurone ausschließlich auf die Zelloberfläche beschränkt war. Der Antikörper F84.1 wurde erstmals von Stallcup (Stallcup et al., 1985) beschrieben. Es handelt sich hierbei um einen rattenspezifischen monoklonalen Antikörper, welcher ein Glykoprotein auf motorischen und sensorischen Neuronen im sich entwickelnden Nervensystem erkennt. Bei dem Antikörper 613 handelt es sich um ein polyklonales Serum, welches durch Immunisierung eines Kaninchens mit Zellmembranfragmenten von SC1 bildenden cos-Zellen hergestellt wurde.

Betrachtet man nun die Proteinexpression mittels des Antikörpers F84.1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Durchtrennung des *Nervus facialis*, so läßt sich bereits an Tag 1 nach Axotomie ein signifikanter Unterschied zwischen der operierten Seite und der Kontrollseite feststellen.

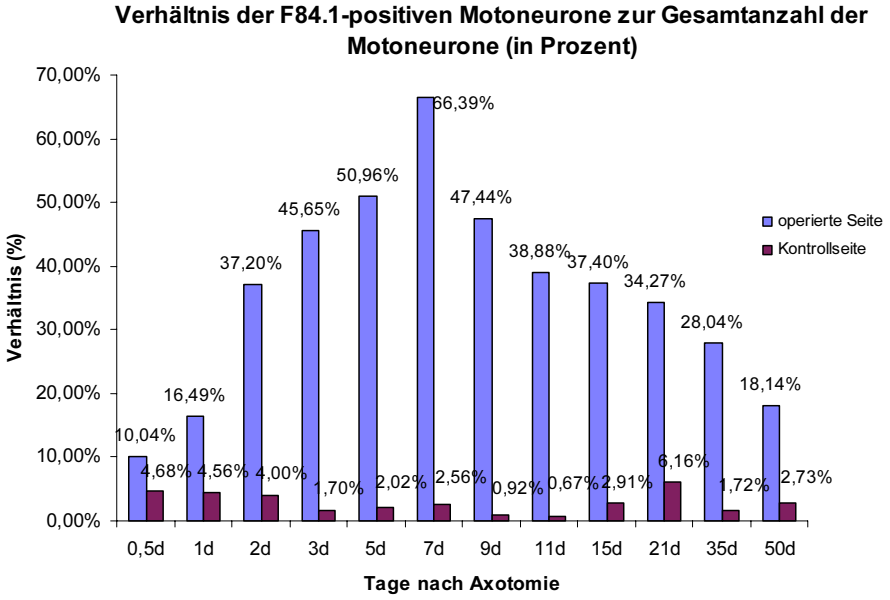

Abbildung 3.2 Verhältnis der Motoneurone mit stark erhöhter F84.1 Glykoprotein Expression auf der Zellmembran zur Gesamtanzahl der Motoneurone im *Nucleus facialis* zu verschiedenen Zeitpunkten nach Axotomie. Aufgetragen sind die operierte Seite und die Kontrollseite zu den verschiedenen Zeitpunkten; die Anzahl aller gezählter Motoneurone ist gleich 100% gesetzt. Am Maximum (Tag 7) zeigen ca. 66% der Motoneurone im ausgezähltem Ausschnitt des Fazialiskerns ein positives Signal.

An Tag 7 erreicht die Proteinexpression ihr Maximum. Ungefähr 66% der Motoneurone im Kerngebiet sind zu diesem Zeitpunkt immunpositiv für das Protein. An Tag 50 nach Axotomie konnte noch immer eine erhöhte Anzahl an

gefärbten Motoneuronen auf der operierten Seite im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet werden (Abbildung 3.2).

Ausgewertet wurden für diesen Zeitverlauf pro Zeitpunkt jeweils 10 bis 20 Kryostatgewebsschnitte mit 20 µm Dicke von je 6 Tieren. Diese wurden nach immunhistochemischer Behandlung mittels eines konfokalen Lasermikroskops (Leica TCS4D) aufgenommen und die Anzahl aller Motoneurone sowie die Zahl der immunpositiven Neurone ermittelt. Wie bereits erwähnt, ist die Färbung mit dem Antikörper F84.1 punktuell unterbrochen um den Zellkörper des Motoneurons herum. Je nachdem, wie das Motoneuron angeschnitten wurde (entweder beim Schneiden am Kryostat oder während der Bildaufnahme), kann auch nur ein Teil dieser Membranfärbung gesehen werden und nicht die komplette Zellmembran des Motoneurons. Daher ist es notwendig, bei der Auswertung nicht nur die "Maximum Intensity Projektion" (MIP), sondern die komplette Bilderserie heran zu ziehen, da es bei der MIP passieren kann, daß ein gefärbtes Motoneuron durch das ebenfalls stark gefärbte, darüber oder darunter liegende Neuropil überdeckt wird und daher als falsch negativ gewertet würde (vergl. Schema in Abb. 3.3).

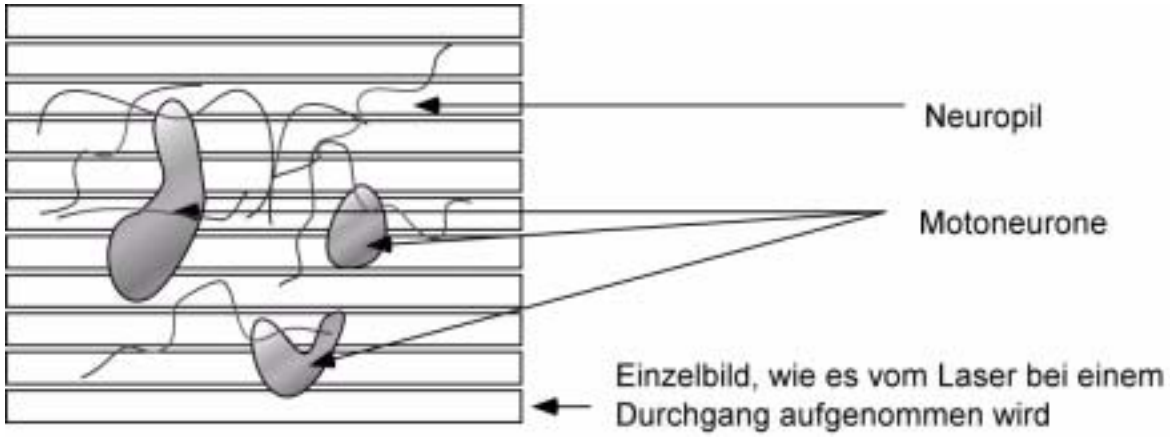

Abbildung 3.3 Schematische Zeichnung der Entstehung einer konfokalen Laseraufnahme. Die Rechtecke stellen die gescannten Einzelbilder dar, die runden Strukturen symbolisieren die Motoneurone und die geschwungenen Linien Nervenfasern und Kapillaren. Jedes Einzelbild entsteht bei einem Laserdurchgang in einer definierten z-Achse; die obere und untere Begrenzung des Gesamtscans wird vorgegeben, ebenso die Anzahl der Einzelbilder, woraufhin die Dicke der Einzelbilder automatisch gewählt wird. Ein Stark gefärbtes Neuropil kann nun in einer MIP (siehe Text) ein darunter liegendes Motoneuron so stark überstrahlen, daß es bei der anschließenden Auswertung als falsch negativ erkannt würde.

Genauso können andere gefärbte Strukturen, wie Kapillaren, als falsch positive Strukturen erscheinen, da sie ebenfalls nur teilweise in der MIP erscheinen und aufgrund der Färbung des Neuropils nicht komplett zu sehen sind. In Abbildung 3.4 wurden nun die 2 verschiedenen Auswertemethoden zusammen aufgetragen,

um die Unterschiede und somit die Notwendigkeit dieser differenzierten Bildauswertung zu verdeutlichen.

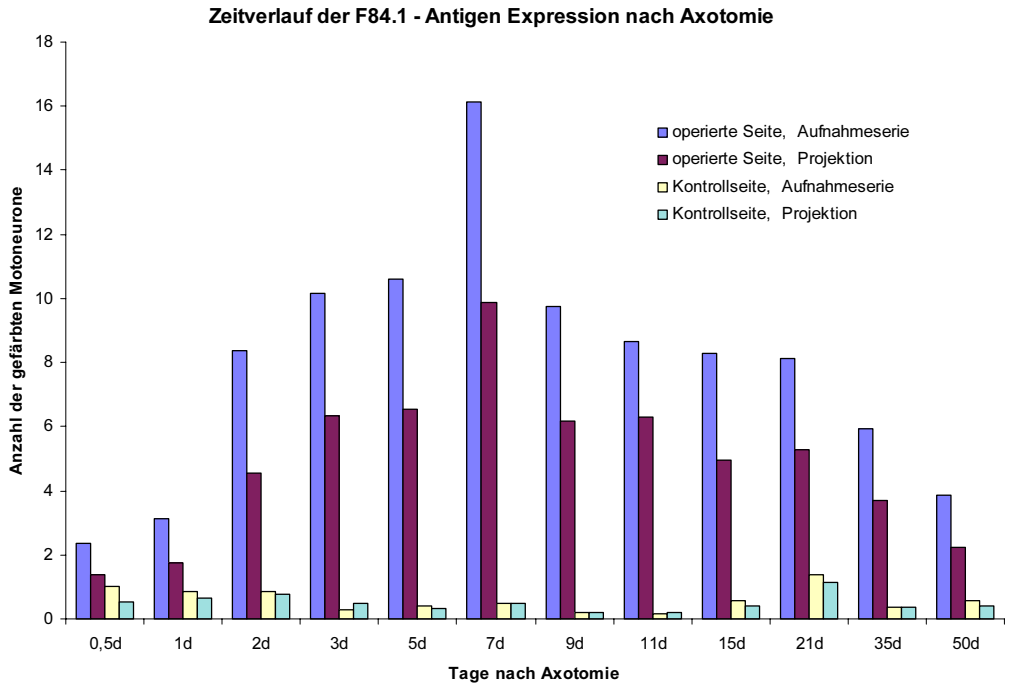

Abbildung 3.4 Vergleich der beiden Auswertungsmethoden zur Färbung mit dem Antikörper F84.1. Aufgetragen ist die Anzahl der F84.1 markierten Motoneurone zu verschiedenen Zeitpunkten nach Axotomie. Zu jedem Zeitpunkt ist die Anzahl der gefärbten Neurone auf 2 verschiedene Arten ermittelt worden:
a) die Einzelbilder wurden nacheinander, wie ein Film, geöffnet und die markierten Neurone gezählt
b) es wurde eine MIP erstellt und von dieser die markierten Neurone ausgezählt.
Hierbei zeigte sich, daß in der 2. Methode generell weniger positive Motoneurone erkannt wurden. Der tendenziöse Zeitverlauf wurde jedoch durch beide Methoden korrekt wieder gegeben. Die Fehlerbalken gen die Standardabweichung an.

Wie bereits oben beschrieben, kommt es zu falsch negativen Motoneuronen, wenn man lediglich die “Maximum Intensity Projektion” zur Auswertung heranzieht. Der Unterschied kann über 33% betragen (siehe Abbildung 3.4, Tag 7). In der Tendenz läßt sich dies auch auf der Kontrollseite, d.h. falsch positiv erkannte Motoneurone, beobachten, wobei hier der Unterschied jedoch nicht so groß ist. Bereits nach 12 Stunden kann man eine Zunahme der gefärbten Motoneurone auf der operierten Seite erkennen. Die Zunahme der F84.1-positiven Motoneurone erreicht ihr Maximum 7 Tage nach der Nervdurchtrennung. Die Expression von F84.1-Glykoprotein / SC1 sinkt jedoch schnell wieder ab. Bereits an Tag 9 liegt weniger Antigen als an Tag 5 vor. Innerhalb von 2 Monaten fällt die Expression wieder auf Basalwerte ab.

Färbungen mit einem selbst hergestellten polyklonalen Antikörperserum gegen einen aminoterminalen Sequenzabschnitt (vergleiche Abschnitt 3.1.3), bestätigten

das Färbemuster der beiden anderen Antikörper. Auch dieser Antikörper färbt die Zellmembran der Motoneurone, jedoch färbt er auch sehr stark das Zytoplasma und das Neuropil. Im Vergleich zu den beiden anderen Antikörpern erzeugte dieses Serum einen höheren Hintergrund.

3.1.2 Westernblot

Der Antikörper F84.1 färbt nicht nur die regenerierenden Motoneurone, sondern auch das umliegende Neuropil stark an. Inwieweit es sich hierbei ebenfalls um exprimiertes F84.1 Glykoprotein handelt oder um eine Kreuzreaktion mit einem anderen Protein / Proteinen konnte nicht geklärt werden.
Im Westernblot (Abbildung 3.5) erkennt man eine Vielzahl von markierten Banden verschiedener Größe. F84.1-Glykoprotein hat ein Molekulargewicht zwischen 90 kDa und 105 kDa (Prince et al., 1992). Auf den Westernblots konnte jedoch im Bereich dieses Molekulargewichts lediglich in der Kontrolle von einem Proteinextrakt an Tag 7 eine Bande bei ca. 95 kDa ausgemacht werden. Diese Bande findet sich sonst in keiner Kontrolle oder operierten Seite wieder. Allen gemeinsam ist eine Bande bei ca. 130 kDa die zu den unterschiedlichen Zeitpunkten und zwischen operierter Seite und Kontrollseite unterschiedlich ausfällt. Jedoch ist insofern keine Konstanz in dem Unterschied, als die Bande mal auf der operierten Seite und mal auf der Kontrollseite stärker ist. In der Kontrollseite des zweiten Gehirns an Tag 9 nach Axotomie ist zusätzlich eine Bande bei ca. 170 kDa auszumachen, die schwach auch in der Kontrolle an Tag 7 zu erkennen ist. Die anderen Banden bei 68, 55 und 45 kDa sind für alle Proben gleich.

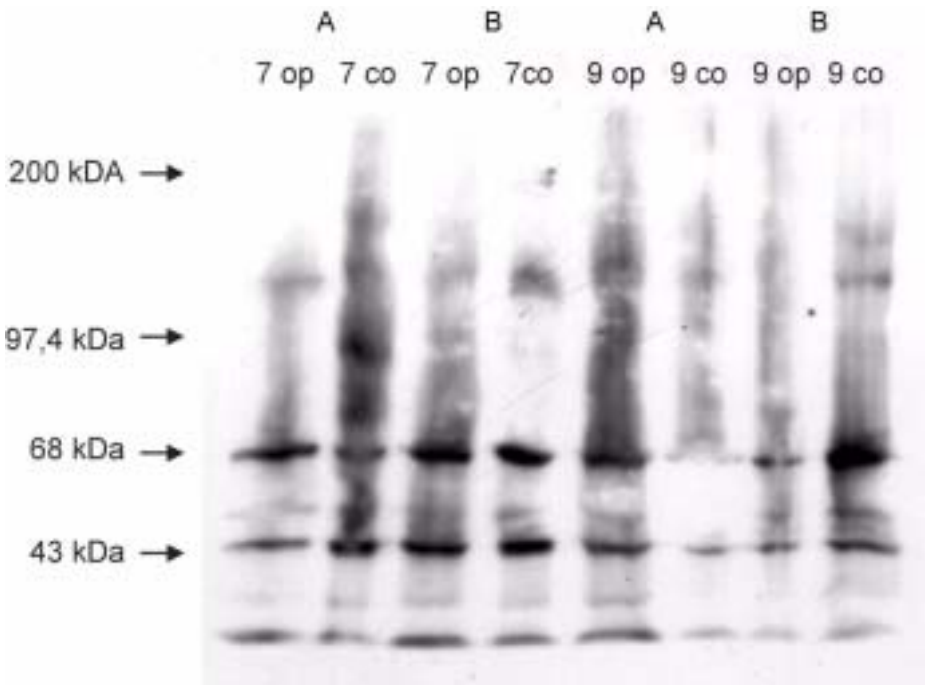

Abbildung 3.5 Westernblot mit dem Antikörper gegen F84.1. Eine spezifische Bande entsprechend dem Molekulargewicht ist lediglich in der Kontrolle von Tier A 7 Tage nach Axotomie zu erkennen. Hier ist bei ca. 95 kDa eine Bande zu sehen.

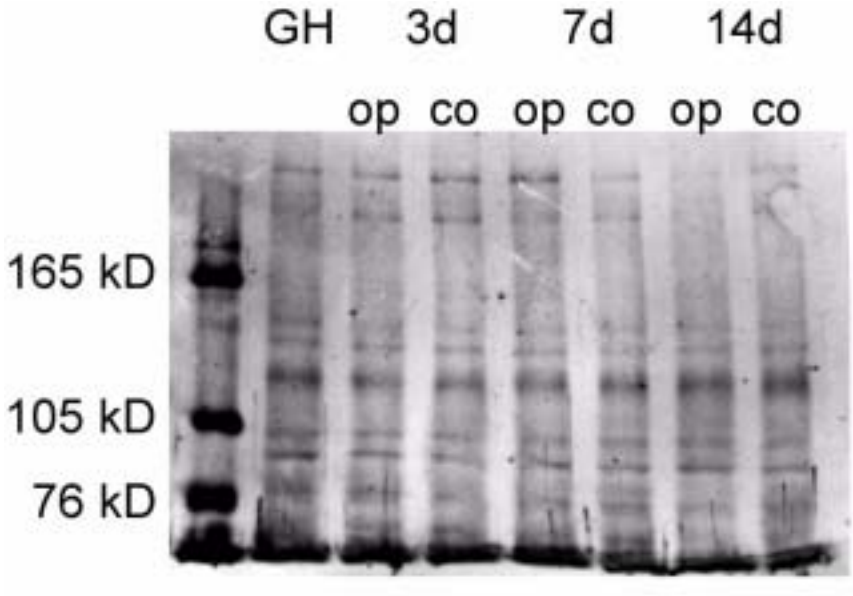

Abbildung 3.6 Westernblot mit dem Antikörper 613. Neben mehreren Banden sind auch zwei Banden auf der zu erwartenden Höhe zwischen 90 und 105 kDa (Prince et al., 1992) zu erkennen. Diese Bande zeigt jedoch keinen Unterschied in ihrer Intensität zwischen axotomierter und intakter Seite.

Westernblot Untersuchungen mit den Antikörpern 613 und dem selbst hergestellten Antikörperserum anti-SC1 ergaben ebenfalls kein klares Bild.

Der Antikörper 613 erkannte zwar eine Bande auf der zu erwartenden Höhe, jedoch zeigte diese keinerlei Seitenunterschied oder Regulation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Durchtrennung des Nervs. Färbungen mit dem Serum anti-SC1

zeigten keinerlei Markierungen auf den Gelen. Auch hier läßt sich keine Aussage über eine etwaige stärkere Expression von SC1 / ALCAM nach Axotomie treffen.

3.1.3 Klonierung und Sequenzierung zur Aufklärung der Nukleinsäuresequenz von SC1

Durch Klonierungsschritte und anschließende Sequenzierungen konnte die bislang unbekannte Basensequenz für Ratten SC1 / ALCAM ermittelt werden.
Hierzu wurden verschieden lange DNA Fragmente unter Benutzung von Primern, welche aus den ansequenzierten carboxy- und aminoterminalen Enden eines aus dem Rückenmark von Rattenembryonen Woche 13 gewonnenen mRNA Fragmentes (zur Verfügung gestellt von T.M. Jessel), sowie aus der bekannten Huhn- und Maussequenz entwickelt wurden, durch die Polymerasen-Ketten-Reaktion gewonnen, aufgereinigt und in Plasmide eingefügt. Diese Plasmide wurden dann durch Elektrotransformation in kompetente Bakterien eingeschleust und diese auf selektierenden Petrischalen plattiert. Nach Selektion der positiven Klone wurden diese gepickt und in entsprechendem Nährmedium hochgezogen. Bei ausreichender Zelldichte erfolgte die Plasmidpräparation und die Sequenzierung der enthaltenen DNA Stücke.
Die so erhaltenen Sequenzen wurden nun mit Hilfe eines Computerprogramms (GCG, Wisconsin Package) auf überlappende Bereiche hin untersucht und die Reihenfolge der Einzelsequenzen entsprechen gelegt und diese miteinander verbunden. Durch dieses Vorgehen war es möglich, eine 1956 Basenpaar lange neue Sequenz zu ermitteln. Durch Vergleich dieser Sequenz mit der Genbank zeigte sich eine hohe Homologie zu den Sequenzen von Maus und Mensch “Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule” (ALCAM), sowie Huhn SC1/BEN/DM-Grasp. Es zeigte sich jedoch, daß im 3’-Bereich eine Variation besteht. So ergaben die Vergleiche der sequenzierten kurzen DNA-Stränge untereinander und mit den Genbanksequenzen, 2 SC1 Sequenzen, die sich durch ein 39 Basen langes DNA-Stück unterschieden. Die Sequenz lautet wie folgt:

```
CACAAGCGAG CGGGCCCCGT CGGCGACGAC GCCCCCTCCT GCGGCGTGGA CTTTGTCGGT
GGCCTTCTAG GAGGAGGAAT ATGGCATCTA AAGGGTCCCC TTCTTGCCGT CTGGTTTTCT
GCCTCTTGAT CTCCGCCGCG GTCCTCAGAT TAGGCCTCGG ATGGTACACT GTCAACTCAG
CATACGGAGA TACCATTGTC ATGCCTTGCA GACTGGATGT ACCTCAGAAC CTCATGTTTG
```

GCAAATGGAA ATATGAAAAG CCTGATGGGT CCCCAGTATT TATTGCATTC AGATCTTCTA
CAAAGAAAAG TGTGCAGTAT GATGATGTAC CAGAGTACAA GGACAGACTG AGCCTCTCAG
AAAACTACAC TCTGTCTATC AACAATGCAA AGATCAGTGA CGAAAAGAGA TTTGTGTGCA
TGCTAGTGAC CGAGGACAAC GTGTTTGAGG CACCTACCCT GGTCAAGGTG TTCAAGCAAC
CATCTAAACC TGAAATTGTA AACAGAGCAG CGTTTCTTGA AACAGAGCAG CTAAAAAAGT
TAGGTGACTG CATTTCAAGA GACAGTTACC CAGACGGCAA CATCACGTGG TATAGGAATG
GGAAAGTGCT ACAGCCTGTT GATGGAGAGG TGTCCATACT TTTTAAAAAG GAAATTGATC
CAGGTACTCA GTTGTATACC ATGACTTCCT CCTTGGAGTA CAAGACAACC AAGTCTGACA
TACAAATGCC ATTCACCTGT TCTGTGACAT ATTATGGACC TTCGGGCCAG AAAACAATTT
ATTCTGAACA AGCAATCTTT GATATTTACT ATCCTACAGA GCAGGTGACA ATACAAGTAC
TGCCACCAAA AAATGCCATC AAAGAAGGGG ACAACATCAC CCTTCAGTGC TTGGGGAATG
GCAACCCACC TCCTGAGGAG TTCATGTTTT ACTTACCAGG GCAGGCTGAA GGCATAAGAA
GCTCAAACAC TTACACACTG ACAGACGTGA GACGCAATGC CACCGGGGAC TACAAATGTT
CTCTCATCGA CCAAAGAAAC ATGGCAGCTT CAACAACCAT CACTGTTCAC TACTTGGATT
TATCCTTAAA CCCAAGTGGG GAAGTGACCA AGCAGATCGG TGATACCCTG CCTGTGTCTT
GCACAATATC TGCAAGTAGG AATGCAACTG TGGTGTGGAT GAAGGATAAC ATCAGGCTCC
GATCTAGTCC ATCCTTTTCT AGTCTTCATT ATCAGGGTGC TGGGAACTAT GTCTGTGAAA
CTGCTCTTCA GGAGGTTGAG GGACTGAAGA AAAGGGAGTC GCTGACCCTC ATCGTAGAAG
GAAAACCTCA AATCAAAATG ACAAAGAAAA CTGATCCCAG TGGACTGTCT AAGACTATAA
TCTGCCATGT AGAAGGGTTT CCAAAGCCAG CTATACAGTG GACCATTACC GGCAGTGGAA
GCGTCATAAA CCCAAGAGAG GAGTCTCCTT ATATTAATGG CAGGTATTAT AGGAAAATTA
TCATTTCCCC TGAGGAGAAT GTTACATTAA CTTGCACAGC AGAAAACCAA CTGGAGAGAA
CAGTAAACTC CCTGAATGTC TCTGCGAATG AAAACAGAGA AAAGGTGAAT GACCAGGCCA
AACTAATTGT GGGCATTGTG GTTGGTCTCC TCCTCGCCGC CCTCGTCGCC GGTGTCGTCT
ACTGGCTGTA CATGAAGAAA TCGAAAACTG CATCAAAACA TGTAAACAAG GACCTTGGTA
ATATGGAGGA GAATAAAAAG CTAGAAGAAA ACAATCACAA AACAGAAGCC TAAGAGAGGA
GTTGTTTAGA TGTCCTGAGA AAAAAAACAT ATAAAGAAAT TGAAGCATGA ACGTGGATGT
ATTAAGACAT ATACAAAGAC AATGACAGCA ATTCATGGTT CAAGTATTA

Dargestellt ist die Sequenz ohne Insert. Die zweite Sequenz besitzt ein 39 Basen Insert an der mit einem grauen Kästchen markierten Stelle. Das Insert liegt zwischen den beiden Adenosinen und lautet:

TAAGTATTCC AGAACACGAT GAGGCAGACG ATATAAGTG

Untersuchungen mit Hilfe von Sequenzanalyseprogrammen (GCG), wie sich diese Variation auf die Sekundärstruktur auswirkt, ergaben keinen direkten Unterschied in der Struktur bezüglich der möglichen antigenen Strukturen. Jedoch handelt es sich bei den ausgespleißten Basen um Triplets, die für stark hydrophobe

Aminosäuren kodieren, wodurch die Vermutung nahe liegt, daß die Tertiärstruktur durch diese Aminosäuren wesentlich beeinflußt wird.
Weiterhin ergaben diese Untersuchungen, daß die für die Bindung zwischen ALCAM und CD6 essentiellen Aminosäuren in Ratten SC1 / ALCAM zu 100% konserviert sind. Dies stimmt wieder mit Befunden von Skonier (Skonier et al., 1997) überein, die eine Bindung des Huhnhomologs BEN an CD6 zeigen konnten.
Diese neue Sequenz diente im folgenden auch für die weiteren Untersuchungen. So wurden die Primer für die PCR-Reaktionen zur Untersuchung der gewebsspezifischen und der regenerations-abhängigen Expression der SC1 mRNA aus dieser neuen Sequenz gewonnen. Ebenso wurden die Ribosonden und die Oligonukleotide aus dieser Sequenz entworfen.

3.1.4 Polyklonales Antikörperserum gegen SC1/ALCAM

Aus der neu entdeckten Sequenz wurde ein 15 Aminosäuren langes Stück des N-Terminus zur Immunisierung eines Kaninchen ausgewählt. Das vor der ersten Immunisierung gewonnene Präimmunserum, sowie die Seren nach der ersten bzw. zweiten Wiederholungsimmunisierung wurden zuerst auf ihre Spezifität und den Antikörpergehalt in einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) getestet. Zusätzlich wurde noch der monoklonale Antikörper F84.1 gegen das zur Immunisierung benutzte Antigen getestet.
Das Präimmunserum war weder mit dem Peptid, noch mit dem Trägerprotein immunreaktiv (Abbildung 3.7). Dadurch konnte gezeigt werden, daß spätere Immun-Reaktionen auf die Immunisierung zurück zu führen waren und nicht auf eine bereits vor der Immunisierung erfolgte unspezifische Entzündungsreaktion. Auch Kälberserumalbumin war immunnegativ. Bereits nach der ersten Wiederholungsimmunisierung bestand eine hohe Immunreaktivität des Serums. Am stärksten war diese gegen das reine Peptid. Nur unwesentlich schwächer war die Reaktion mit dem Peptid-Trägerprotein Komplex. Auch das reine Trägerprotein KLH wurde durch das Antiserum erkannt, jedoch in deutlich geringerem Maße als der Komplex oder das reine Peptid. Mit BSA (Kälberserumalbumin) gab es nur mit den höchsten Antiserum-Konzentrationen in geringem Maße eine Farbreaktion. Eine weitere Wiederholungsimmunisierung konnte die Wirkung des Antikörpers nochmals um den Faktor 5 erhöhen. Dies bezog sich auf die Reaktion mit dem

Peptid, dem Peptid-Trägerprotein Komplex sowie auf das Trägerprotein allein, jedoch nicht auf BSA als Kontrollsubstanz. Hier erfolgte nach wie vor keine bzw. nur mit der höchsten Konzentration eine Reaktion.

Der Antikörper F84.1 erkannte weder das zur Immunisierung benutzte Peptid, noch eine der anderen Substanzen.

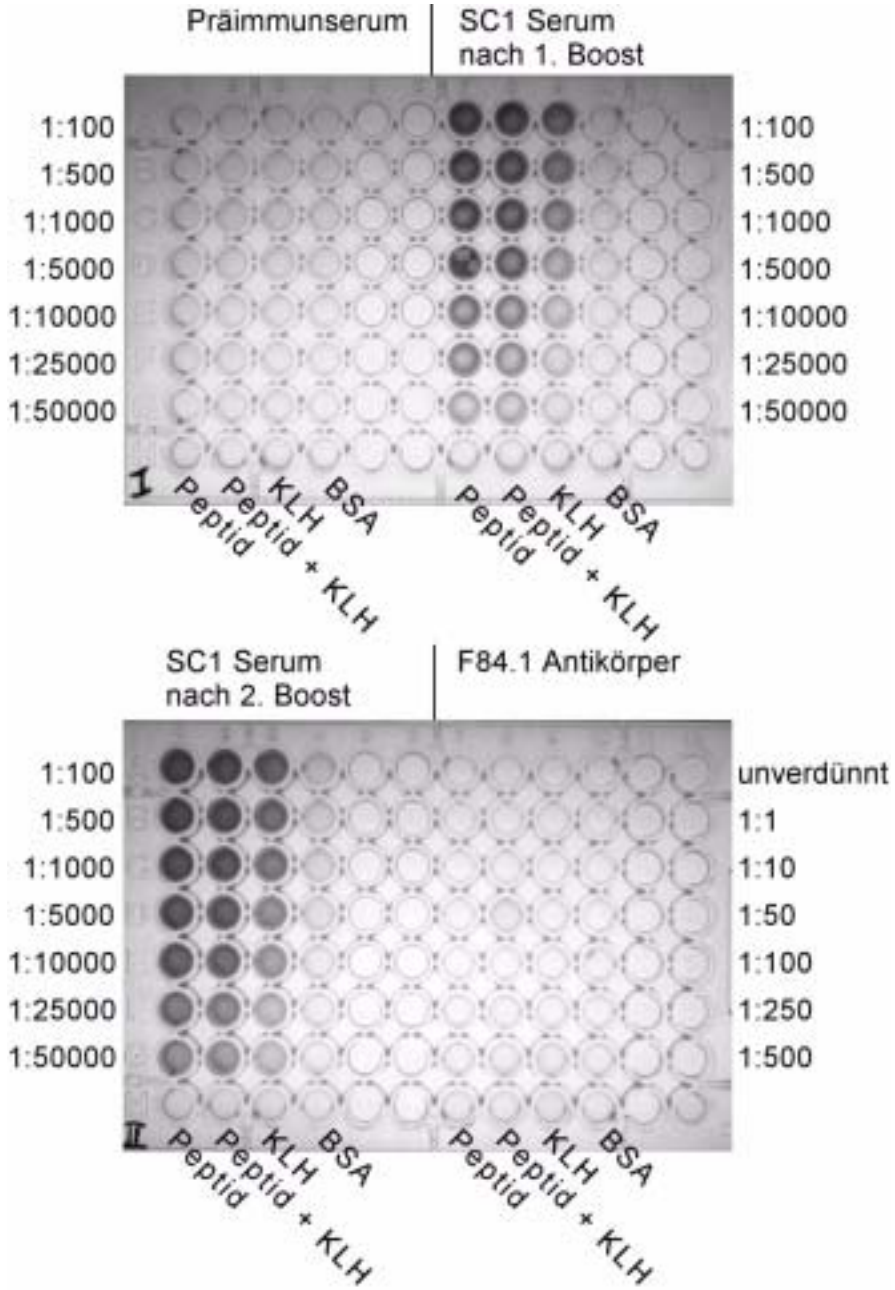

Abbildung 3.7 ELISA für den selbsthergestellten Antikörper gegen Ratten SC1 und den Antikörper F84.1. Gezeigt sind die Untersuchung des Präimmunserums, sowie die Titterbestimmung nach der 1. und 2. Wiederholungsimmunisierung für den SC1 Antikörper. Für F84.1 wurde die Spezifität gegen das zur Immunisierung benutzte Peptid getestet.

3.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Unter Benutzung von Primern, welche aus der neu aufgedeckten Sequenz gebildet wurden, war es durch Polymerase-Ketten-Reaktion (im weiteren als PCR bezeichnet) nun möglich, die Zelltypen-spezifische Verteilung von SC1 zu ermitteln.

Hierbei zeigte sich, daß SC1 nicht nur im Nervensystem sondern auch von Zellen verschiedener Gewebe bzw. Zellkulturen gebildet wird (vergleiche Abbildung 3.8).

So konnte SC1 bezogen auf das Nervensystem im Gehirn, in Zellkulturen von Motoneuronen und Mikroglia, sowie im Ischiasnerv nachgewiesen werden. Weiterhin war es möglich SC1 im Gewebe von Lunge, Leber, Niere, Milz, Thymus, sowie in Lymphozyten Zellkultur nachzuweisen.

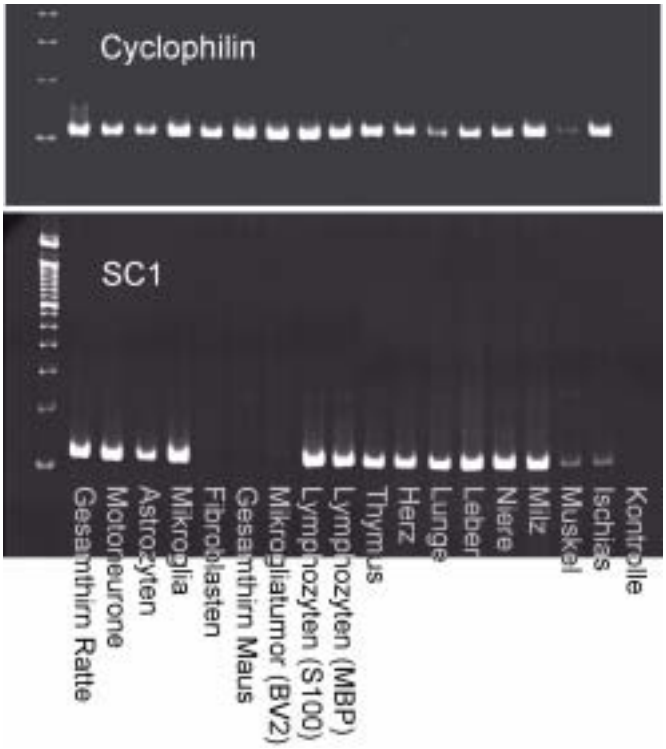

Abbildung 3.8 Zell und Gewebespezifische Verteilung der mRNA für SC1. Als Standard für die Gesamtmenge an cDNA sind die Cyclophilinwerte mit angegeben.

Zeitreihenuntersuchungen mit Hilfe von PCR zur veränderten Gentranskription von SC1/ALCAM während der Regeneration zeigten jedoch keinen Unterschied in der mRNA Menge (respektive cDNA Menge) des Fazialiskerns. Dies war insofern verwunderlich, als die immunhistochemischen Untersuchungen eine deutlich Hochregulation auf Proteinebene gezeigt hatten. Aus diesem Grund wurde mit einem Primerpaar, welches beide Varianten der mRNA erkennen kann, d.h. ein

Primer 5' von der Spleißstelle und der Gegenprimer 3' von der Spleißstelle, weitere Untersuchungen durchgeführt.

Hierbei zeigte sich, daß beide Varianten ungefähr gleich stark in Gesamthirn exprimiert sind, ansonsten bevorzugt die um 39 Basen längere Form, außer in frisch isolierten Motoneuronen. Dort ist deutlich die kürzere Form stärker vorhanden (Abbildung 3.9).

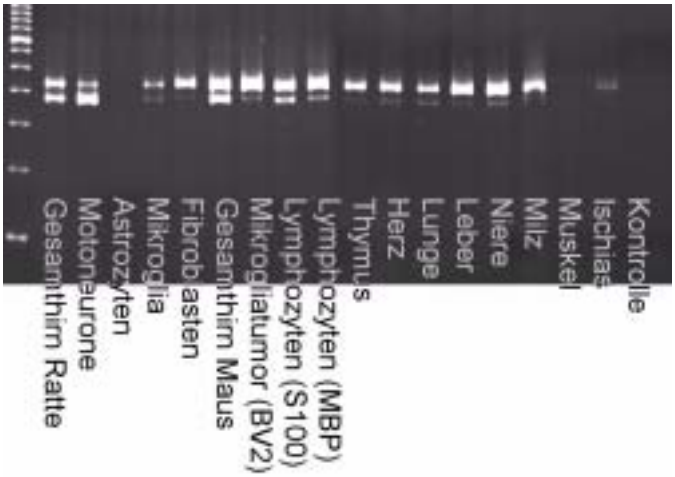

Abbildung 3.9 Zell- und gewebetypische Verteilung der beiden SC1-Varianten. Deutlich ist die starke Dominanz der längeren Form zu erkennen. Lediglich in Gesamthirn, Ratte und Maus, sind beide Varianten in etwa gleich stark. Im Gegensatz dazu ist in frisch isolierten Motoneuronen deutlich die kurze Variante dominant.

Dies legt die Vermutung nahe, daß bevorzugt die kurze Variante während der Regeneration reguliert sein könnte. Daher wurden Untersuchungen mit dem gleichen Primerpaar an aus regenerierenden Fazialiskernen gewonnenen cDNA angestellt. Hierbei zeigte sich, daß die lange Variante durch die Regeneration nach Durchtrennung des *Nervus facialis* in ihrer Ausprägung nicht verändert ist. Anders mit der kurzen Variante, die im Vergleich zur Kontrollseite eine deutliche Erhöhung in der Intensität auf dem Gel aufwies (Abbildung 3.10)

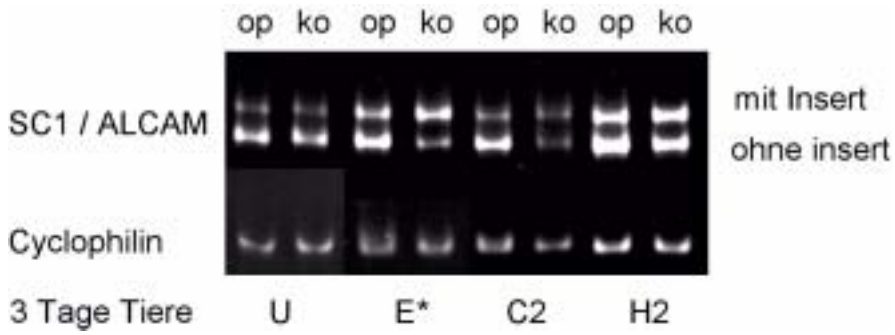

Abbildung 3.10 Unterschied in der Expression der beiden SC1/ALCAM Varianten während der Regeneration des Fazialis Nervs. Die lange Variante (=mit Insert) ist durch die Regeneration nicht beeinflußt, während die kurze Variante (=ohne Insert) in deutlich höherem Maße gebildet wird.

Aufgrund der instabilen PCR und der limitierten Anzahl möglicher Primerkombinationen war die Regulation der kurzen Variante nur deskriptiv nachweisbar.

3.1.6 radioaktive und nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung

Aus der neu klonierten Sequenz wurde nun ein 300 bp langes RNA Fragment für die radioaktive Hybridisierung ausgewählt. Für die nicht-radioaktiven Hybridisierungen wurde als Ausgang das Plasmid mit der Sequenz aus E13 Rückenmark genommen (siehe 3.1.2).

3.1.6.1 radioaktive *in situ* Hybridisierung

Ribosonden

Als Marker für die Ribosonden wurde mit radioaktivem Schwefel markiertes Uridin-5'-Triphosphat (^{35}S-UTP) benutzt. Die Veränderung der Menge an Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) im Bereich des Fazialiskerns zu verschiedenen Zeitpunkten nach Durchtrennung des motorischen Gesichtsnervs (*Nervus facialis*) wurde nun mit dieser Ribosonde untersucht. Dazu wurden die entwickelten Gewebsschnitte mittels eines konfokalen Laser Mikroskops im Reflektionsmodus aufgenommen und unter Benutzung der Bildanalysesoftware OPTIMAS ™ 6.2 die mittlere Helligkeit der Silberkörner über den Motoneuronen ermittelt. Es wurden hierbei pro Zeitpunkt je mindestens 5 Gewebsschnitte von mindestens 3 verschiedenen Tieren aufgenommen und ausgewertet. Anschließend wurde die mittlere Helligkeit der Motoneurone der operierten Seite zu der mittleren Helligkeit der Motoneurone der Kontrollseite ins Verhältnis gesetzt und über der Zeit aufgetragen.

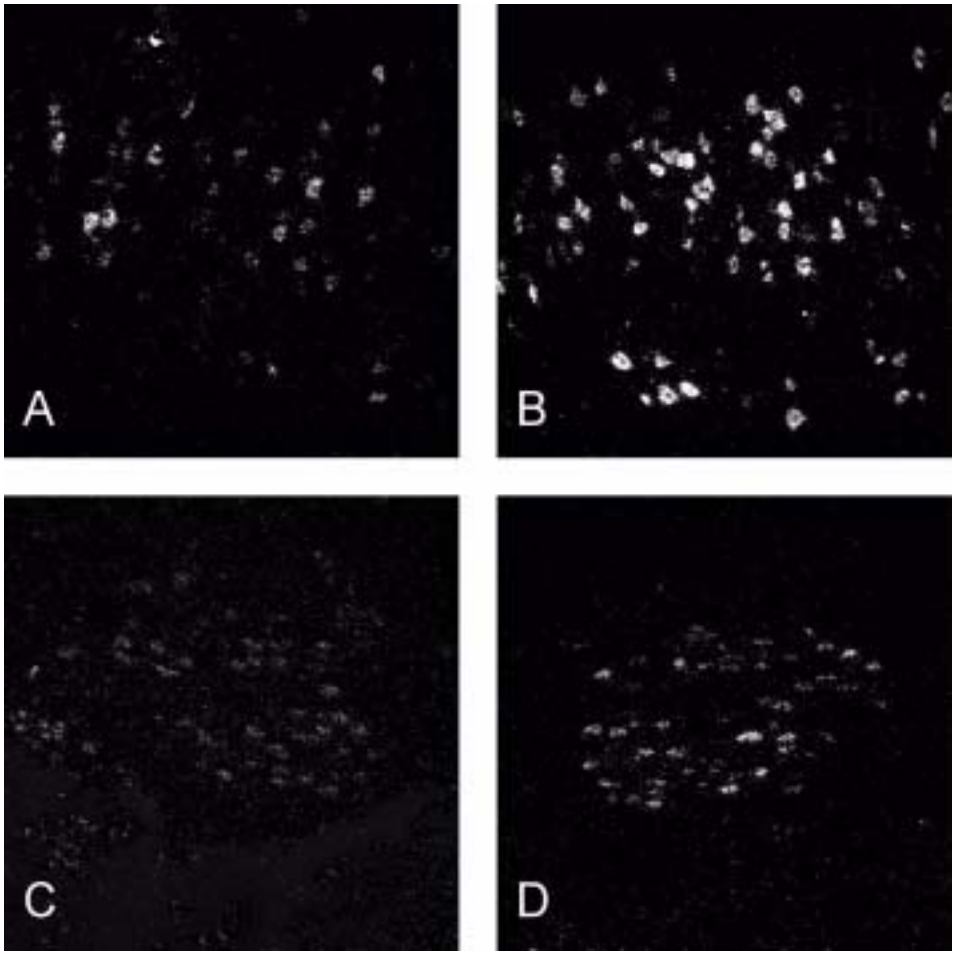

Abbildung 3.11 Radioaktive in situ Hybridisierung mit einer Sonde gegen SC1. Abbildung A und B: Fazialis Kernregion, 3 Tage nach rechter Nervdurchtrennung, A axotomierte Seite, B Kontrollseite; C und D: Hypoglossus Kerngebiet, 3 Tage nach rechter Nervdurchtrennung, C axotomierte Seite, D Kontrollseite. Deutlich ist bei beiden Versuchsmodellen die erhöhte Anzahl der positiven Motoneurone auf der operierten Seite zu erkennen.

Wie man in Abbildung 3.12 erkennen kann, ist die Menge an mRNA bereits nach einem Tag deutlich erhöht. An Tag 3 nach Durchtrennung des Fazialisnervs liegt die größte Menge an mRNA vor, mehr als die doppelte Menge im Vergleich zum intakten Nerv. Die Menge an mRNA sinkt dann stetig im Verlauf der Regeneration ab, bis sie nach 56 bis 84 Tagen wieder den ursprünglichen Wert erreicht. Diese Zeitdauer entspricht auch in etwa dem Zeitrahmen, welcher für die Wiederherstellung der neuronalen Verbindung zum Zielgebiet des Nervs nötig ist.

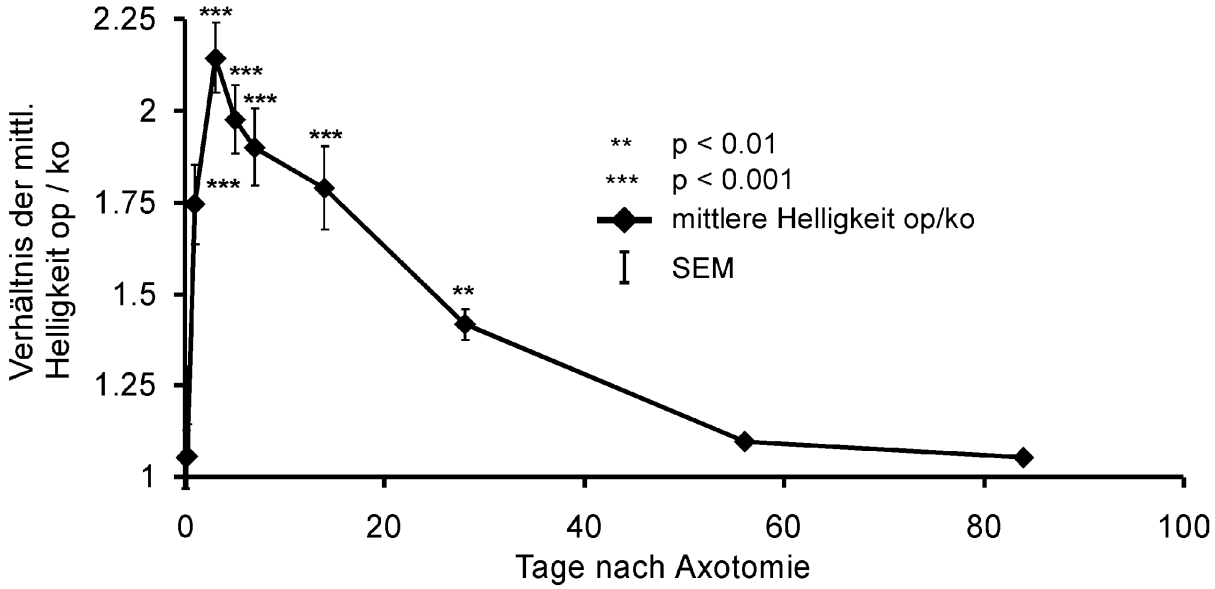

Abbildung 3.12 Zeitverlauf der SC1 mRNA Zunahme nach Axotomie. Augetragen sind die Mittelwerte der Verhältnisse der mittleren Helligkeiten der operierten Seite zu der Kontrollseite über der Zeit nach Durchtrennung des Nervs.

Oligo-Sonde

Um die Spleißvarianten zu untersuchen wurden mit radioaktivem Phosphor markierte Nukleotide (^{32}P-CTP) an die Oligosonden angehängt (siehe 2.4.1.9). Die Sonden wurden so gewählt, daß jeweils die kurze und die lange Variante von SC1 erkannt wurde.

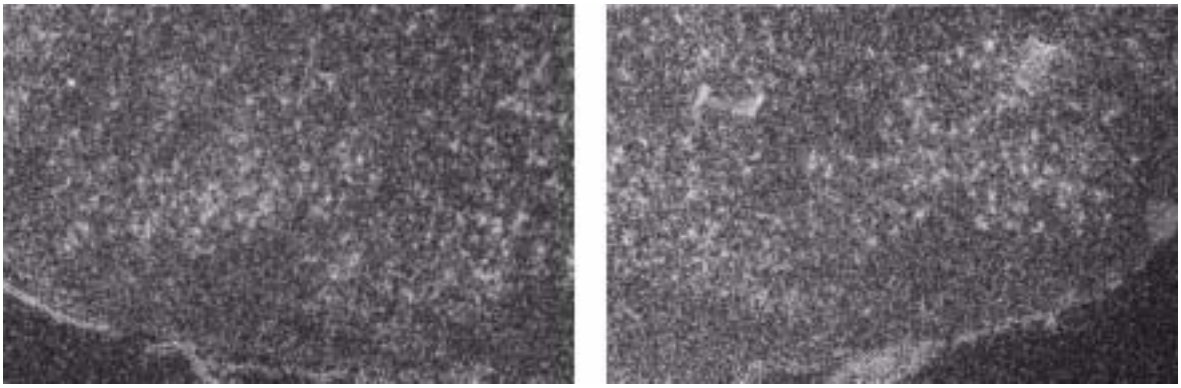

Abbildung 3.13 Radioaktive *in situ* Hybridisierung mit einer Oligonukleotidsonde spezifisch gegen die lange SC1 Sequenz. Deutlich sind die markierten Motoneurone zu erkennen. Es war jedoch nicht möglich, einen Seitenunterschied in der Intensität des Signals fest zu stellen.

Wie in Abbildung 3.13 zu sehen, zeigt die Sonde für die lange SC1 Variante ein deutliches Signal auf den Motoneuronen im *Nucleus facialis*. Es konnte allerdings keine Regulierung gezeigt werden. Die Stärke des Signals war auf der operierten Seite und auf der Kontrollseite gleich. Auch im Hypoglossus oder in direkten

Läsionen des sensomotorischen Kortex konnte keine Veränderung in der Stärke des Signals festgestellt werden.
Aufgrund der Kürze des Inserts war es nicht möglich eine Oligonukleotid Sonde zu konstruieren, mit der eine spezifische Hybridisierung hätte beobachtet werden können.

3.1.6.2 nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung

Als Sonde wurde hierbei eine Ribosonde mit Digoxigenin-gekoppeltem Uridin-5'-triphosphat (DIG-UTP; DIG RNA labelling Mix, Boehringer Mannheim) benutzt. Der Nachweis erfolgte über eine enzymatische Umsetzung eines Farbstoffes, welche eine Niederschlagsbildung zur Folge hatte. Hierfür wurde ein Anti-Digoxigenin Antikörper mit gekoppelter Phosphatase verwendet. Für die nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung wurden nur exemplarisch zu verschiedenen Zeitpunkten Gewebsschnitte inkubiert. Es erfolgte keine quantitative Auswertung dieser Aufnahmen.
Wie man in Abbildung 3.14 erkennen kann, ist die Anzahl der gefärbten Motoneurone auf der operierten Seite im Vergleich zur Kontrollseite deutlich erhöht.

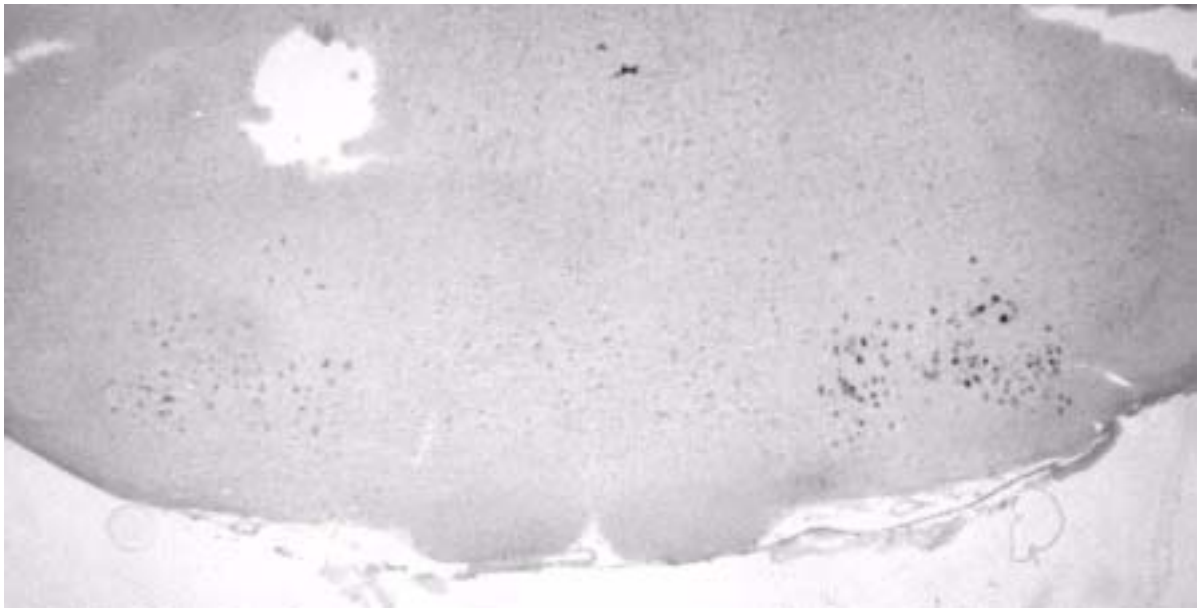

Abbildung 3.14 Aufnahme einer nichtradioaktiven *in situ* Hybridisierung. Gezeigt ist ein Gewebsschnitt durch das Stammhirn auf Höhe der Fazialiskerne, 3 Tage nach Durchtrennung des rechten Nervs. Durch ein Loch markiert die intakte linke Seite. Deutlich sind die markierten Motoneurone sowohl auf der Kontrollseite, als auch auf der operierten Seite zu erkennen.

3.2 CD6

3.2.1 Immunhistochemie

Wie bereits erwähnt, konnte eine hohe Homologie der neuen Rattensequenz von SC1 zu CD166 / ALCAM gezeigt werden. Ein bekannter Rezeptor für ALCAM ist CD6, ein auf Lymphozyten und T-Zellen exprimiertes Protein, welches an der Reifung und Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist (Flores et al., 1997). Nachdem die Bindung von BEN an CD6 bereits gezeigt werden konnte (Mayer et al., 1990), lag die Vermutung nahe, daß möglicherweise CD6 auch der Rezeptor für SC1 / ALCAM im Gehirn sein könnte. Daher wurde versucht, durch immunhistochemische und molekularbiologische Methoden eine Expression von CD6 zu zeigen.

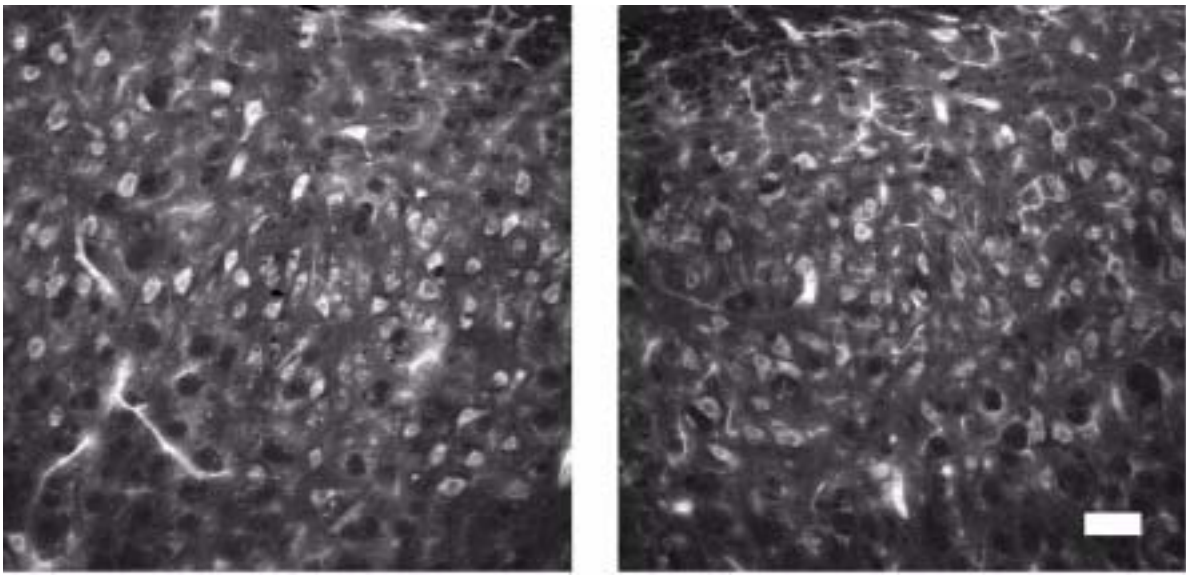

Abbildung 3.15 Immunhistochemische Färbung des *Nucleus facialis* 7 Tage nach Nervdurchtrennung mit dem Antikörper T421 (Connex). Gezeigt ist eine MIP von 20 Einzelbildern. Links die intakte, rechts die axotomierte Seite. Deutlich gefärbt sind Kapillaren und manche Motoneurone. Größenbalken entspricht 100 µm.

Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern gegen CD6 (T421 und T411, Anti-Hund CD6, Connex; Anti-Mensch CD6, Cymbus) zeigten eine Markierungen von Kapillaren und einzelnen Motoneuronen im Bereich des Fazialiskerns. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Stärke des Signals zwischen beiden Kerngebieten festgestellt werden.

Mit einem Antikörper (T421) war es möglich, eine Färbung von Kapillaren und kleineren Zellstrukturen im Thymus von Neugeborenen Ratten zu zeigen. Der Zelltyp wurde nicht identifiziert (Abbildung 3.16).

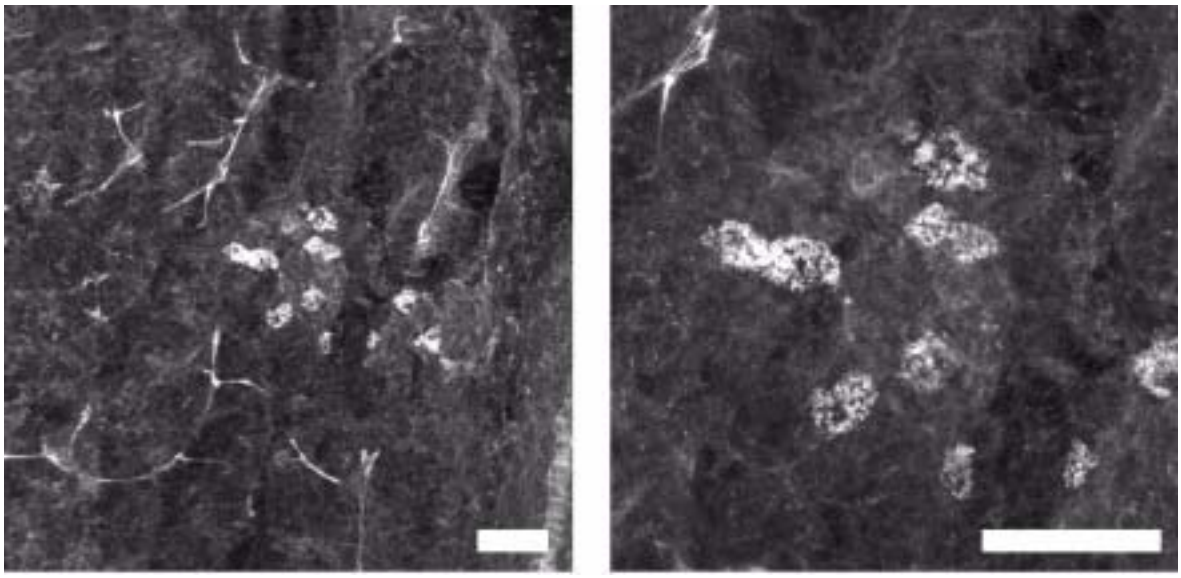

Abbildung 3.16 Färbung des Thymus neugeborener Ratten mit dem Antikörper T421 (Connex) gegen CD6. Gefärbt sind Kapillaren und kleinere Zellen. Größenmaßstab entspricht 50 µm.

3.2.2 Polymerasen-Ketten-Reaktion

Mit PCR war es nicht möglich, einen Hinweis auf das Vorkommen von CD6 im Gehirn zu finden. Es wurden mehrere Primerpaare unter verschiedensten Bedingungen ausgetestet (Annealingtemperatur und Magnesiumchlorid-konzentration, sowie verschiedene cDNA's aus unterschiedlichen Geweben), es konnte jedoch keine Expression gefunden werden. Waren die Bedingungen zu unspezifisch, kam es zu vielen Nebenbanden, waren sie spezifischer bezüglich der Salzkonzentration und der Primerbindungstemperatur (Annealingtemperatur) wurde kein Produkt amplifiziert.

3.3 Nr-CAM (neuron-glia related cell adhesion molecule)

3.3.1 Immunhistochemie

Der Antikörper gegen Nr-CAM zeigte eine deutliche Färbung folgender Strukturen:

- Astrozyten auf der operierten und der unoperierten Seite

- Kapillaren und Blutgefäße auf der operierten und der unoperierten Seite
- Motoneurone auf der operierten und auf der unoperierten Seite

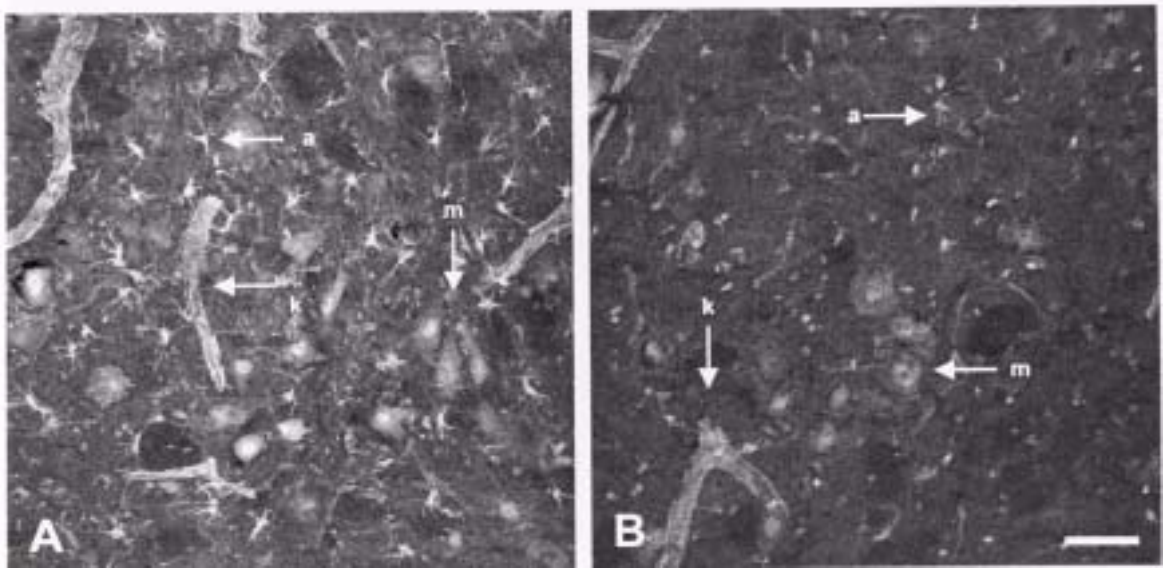

Abbildung 3.17 Immunhistochemie mit dem Antikörper gegen Nr-CAM. Gefärbt wurden Kryostatschnitte, 7 Tage nach Axotomie. Gezeigt ist links die operierte Seite (A) und rechts die Kontrollseite (B) der Fazialis Kernregion. Durch den Antikörper wurde auf beiden Seiten folgende Strukturen gefärbt: Astrozyten (a), Kapillaren (k) und Motoneurone (m).

Einen Unterschied im Färbemuster während der Zeitreihe zwischen der operierten Seite und der Kontrollseite des Stammhirnes konnte man in der Markierung für Nr-CAM auf Astrozyten beobachten. Nach 7 Tagen waren Zellkörper und Fortsätze der Astrozyten gefärbt (siehe Abbildung 3.17).

Als Kontrolle wurden Färbungen nur mit dem sekundären Antikörper sowie, anstelle des primären Antikörpers, mit Kaninchenserum und den sekundären Antikörpern durchgeführt. Gewebsproben, welche mit Kaninchenserum inkubiert wurden, zeigten schwache Färbung von Kapillaren und Motoneuronen aufwiesen. Schnitte, auf denen nur der sekundäre Antikörper, ohne Serum, aufgetragen wurde, wiesen ebenfalls eine Kapillarfärbung, jedoch keine Färbung der Motoneurone auf.

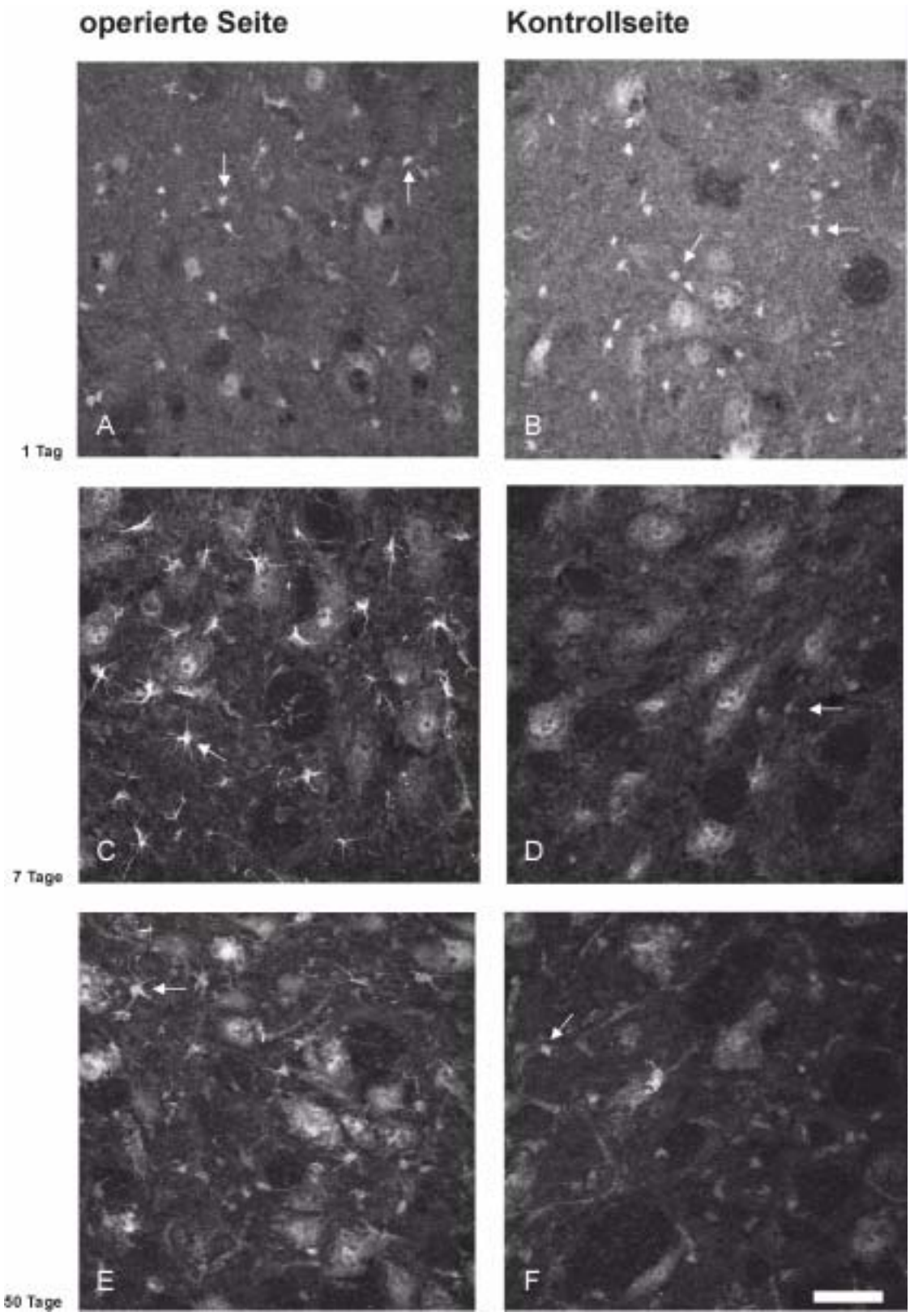

Abbildung 3.18 Färbungen der Fazialiskernregion mit einem Antikörper gegen Nr-CAM zu verschiedenen Zeitpunkten nach Durchtrennung des Nervs. Die Pfeile markieren im Text näher erläuterte Strukturen. Größenmaßstab entspricht 50 µm.

In Abbildung 3.18 ist der Zeitverlauf mit 3 wichtigen Zeitpunkten dargestellt. An Tag 1 nach Axotomie weisen sowohl die operierte Seite (A) als auch die

Kontrollseite (B) ein fast identisches Färbemuster auf. Manche Astrozyten zeigen schon eine leichte Färbung gegen Nr-CAM an der Basis ihrer Fortsätze, der Großteil jedoch zeigt lediglich die gleiche Färbung wie die Kontrollseite. Ein zur Kontrollseite fast identisches Färbemuster konnte man durch Inkubation mit Kaninchenserum erreichen. An Tag 7 ist deutlich die starke Färbung der Astrozytenfortsätze auf der operierten Seite (C) im Gegensatz zu der Kontrollseite (D) zu erkennen. Die Kontrolle zeigt lediglich die serumtypische Färbung. 50 Tage nach Axotomie sind immer noch Astrozytenfortsätze Nr-CAM positiv (E), jedoch sind es deutlich weniger Fortsätze und diese sind auch nicht mehr so stark gefärbt. Die Kontrollseite zeigt ein nach wie vor unverändertes Färbemuster.

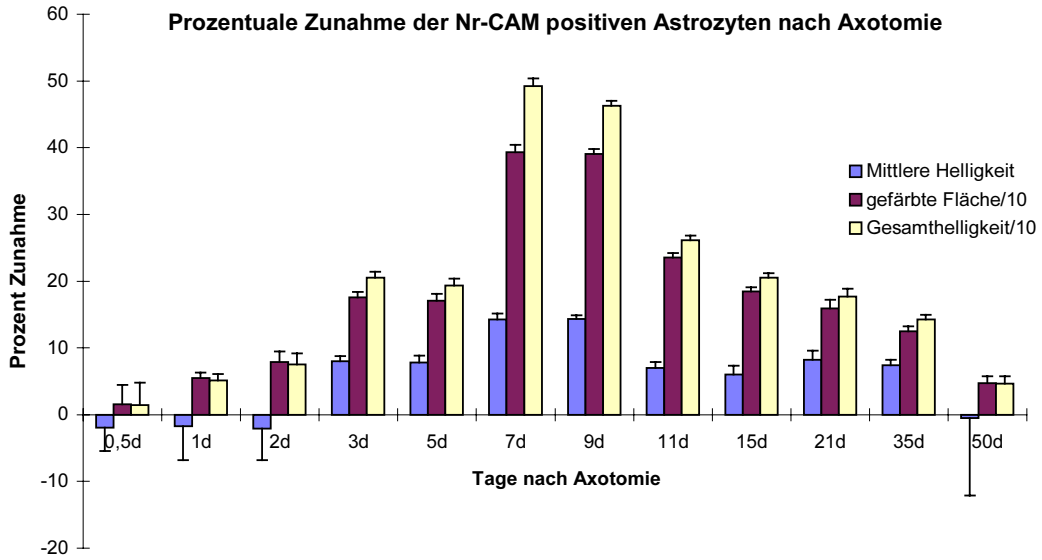

Abbildung 3.19: In der Grafik ist die Expression von Nr-CAM auf Astrozyten über der Zeit aufgetragen. Hierbei wurden die Mittelwerte der mittleren Helligkeit der Färbung, der Anzahl der gefärbten Bildpunkte, sowie der Gesamthelligkeit (als Produkt der anderen zwei Parameter) zu den entsprechenden Zeitpunkt aufgetragen. Als Maß für die y-Achse wurde das Verhältnis der operierten Seite zur Kontrollseite in Prozent gewählt. Die Fehlerbalken geben die relative Standardabweichung (=Variationskoeffizient) an, ein Maß, wie sehr der Mittelwert streut.

In Abbildung 3.19 ist nun die veränderte Expression von Nr-CAM über der Versuchsdauer aufgetragen. Es wurden jeweils die Mittelwerte der mittleren Helligkeit, der gefärbten Fläche sowie der Gesamthelligkeit aufgetragen. Der Fehlerbalken gibt die relative Standardabweichung wieder. Man kann erkennen, daß unter Berücksichtigung der relativen Standardabweichung die mittlere Helligkeit bis einschließlich 2 Tage nach Axotomie gleich null ist. Spätestens ab Tag 3 jedoch ist eine deutliche Zunahme, hier 8 % über Kontrolle, der Immunreaktivität für Nr-CAM erkennbar. Die Zunahme der mittleren Helligkeit

zeigt eine stärkere Fluoreszenz auf gleicher Fläche, d.h. eine größere Anzahl von Nr-CAM Protein je gleicher Fläche. Die Immunreaktivität pro Fläche nimmt bis Tag 7 stetig zu und erreicht hier ihr Maximum mit rund 14 % Zunahme. Danach sinkt die Menge von Nr-CAM Protein wieder bis Tag 50 ab. Unter Berücksichtigung der relativen Standardabweichung kann hier eine Kontinuität angenommen werden.
Bei der Anzahl der gefärbten Bildpunkte ist bereits nach 12 Stunden (1,5 % über Kontrolle) eine Zunahme erkennbar. Diese ist stetig steigend bis Tag 7 (17,6 %). Danach fällt sie bis Tag 50 (rund 5 %) auf einen Wert, gering über dem Ausgangswert, ab. Diese Beobachtung läßt sich durch eine Flächenvergrößerung der gefärbten Struktur, also der Astrozyten, erklären. Wie in Abbildung 3.18 ersichtlich, sind an Tag 7 die Fortsätze der Astrozyten stärker als an Tag 1 oder an Tag 50 gefärbt (siehe Abbildung 3.18, Abbildung C im Vergleich zu A und E).
Man muß also zwischen einer Zunahme der Nr-CAM Moleküle je Flächeneinheit der Zelloberfläche, sowie insgesamt einer Zunahme der Nr-CAM tragenden Zelloberfläche unterscheiden. Über die Zeit gesehen zeigt sich, daß zuerst mehr Nr-CAM Protein auf dem Zellkörper erscheint und sich dann weiter auf die Fortsätze erstreckt. Nach Tag 7 reduziert sich wieder die Menge an Nr-CAM Protein auf den Astrozytenfortsätzen.
Wie man anhand einer Doppelmarkierung mit dem Nr-CAM Antikörper und einem Glial Fibrilary Acidic Protein Antikörper (GFAP) sehen kann, sind es jedoch nicht alle Astrozyten, die dieses Expressionsmuster für Nr-CAM zeigen. Viele der GFAP-positiven Astrozyten zeigen keine Nr-CAM Expression. Diejenigen, welche sowohl Nr-CAM als auch GFAP positiv sind, zeigen nicht auf allen Fortsätzen eine Nr-CAM Expression. Lediglich auf einem Teil der Fortsätze kann man auch eine Nr-CAM Markierung erkennen. Sehr stark ist die Nr-CAM Markierung jedoch auf dem Zellkörper zu erkennen, im Gegensatz zur GFAP Markierung, die sich mehr auf die Fortsätze beschränkt.

3.3.2 Westernblot

Aufgrund der Ergebnisse der Immunhistochemie war eine stärkere Bande auf der operierten Seite zu erwarten.
Auf Westernblots konnte mit einem Antikörper gegen Nr-CAM Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 80, 105, 140 bis 165 und um 200 kDa erkannt werden

(Kayyem et al., 1992) (Grumet et al., 1991). Auch mit dem hier benutzten Antikörper konnten diese Banden erkannt werden. Es konnte jedoch kein deutlicher Unterschied zwischen den Kontrollseiten und den zugehörigen operierten Seite im Verlauf der Regeneration gezeigt werden.

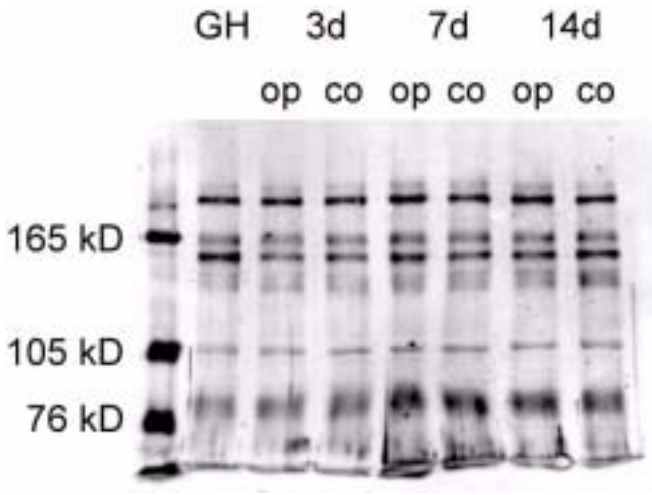

Abbildung 3.20 Westernblot-Färbung mit dem Antikörper gegen Nr-CAM; das Gel hatte einen Acrylamidgehalt von 6 %, dargestellt sind die operierte Seite (op) und die Kontrollseite (co) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Axotomie; detektiert wurde die Chemolumineszenz auf Hyperfilm ECL™.

Insgesamt konnte keine Aussage über eine Zunahme der Konzentration von Nr-CAM auf Grundlage der Westernblot-Ergebnisse getroffen werden. Die dem Molekulargewicht von Nr-CAM entsprechenden Banden wiesen keinen Unterschied in ihrer Stärke zwischen operierter Seite und Kontrollseite auf.

3.3.3 Polymerase Ketten Reaktion

Nachdem durch immunhistochemische Methoden das Vorkommen und die Regulation von Nr-CAM auf Astrozyten im Fazialiskern gezeigt werden konnte, wurde nun versucht, dies mittels PCR zu bestätigen.

Da die beschriebene Ratten Sequenz von Nr-CAM zu kurz war, um Primer für die Polymerasen Ketten Reaktion zu entwickeln, mußte auf die Nr-CAM Sequenzen anderer Spezies zugegriffen werden. Es wurde daher versucht, die Primer in Bereiche zu legen, die hohe Homologien zu den bekannten Human bzw. Maussequenzen aufwiesen. Wie mit diesen Primern gezeigt werden konnte, ist Nr-CAM mRNA sehr weit verbreitet und wird von einer Vielzahl von Zellen und in einigen Geweben gebildet (siehe Abbildung 3.21).

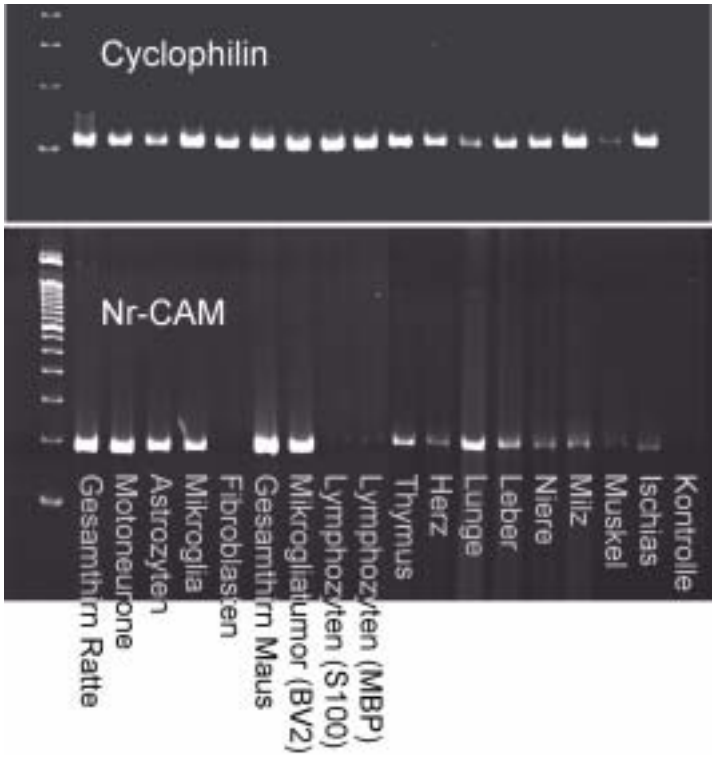

Abbildung 3.21 Zell und Gewebespezifische Verteilung der mRNA für Nr-CAM. Als Standard für die Gesamtmenge an cDNA sind die Cyclophilinwerte mit angegeben.

Unter den gegebenen PCR Bedingungen war es jedoch nicht möglich, eine statistisch relevante Aussage über die Regulation von Nr-CAM während der Regeneration des Fazialisnervs zu machen. Deskriptiv war eine tendenzielle Erhöhung der Expression an Tag 3 zu erkennen. An Tag 3 war zum Teil eine 2fache Hochregulation zu erkennen (siehe Abbildung 3.22), an den Zeitpunkten zuvor und danach jedoch keine Regulation. Mit den cDNA's anderer Tiere zum gleichen Zeitpunkt (3 Tage) war zum Teil keine bzw. nur eine schwache Hochregulation der umgeschriebenen mRNA zu erkennen.

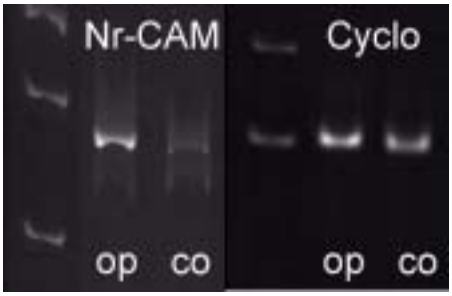

Abbildung 3.22 Exemplarisch 3 Tage nach Durchtrennung des Fazialisnervs. Links ist die Expression von Nr-CAM aufgetragen (mit Standard), rechts die von Cyclophilin als cDNA-Gehalt Standard.

3.4 Dystrophin assoziierter Protein Komplex

3.4.1 Dystroglycan

Wie bereits erwähnt, gibt es zwei Formen von Dystroglycan, ein α-Dystroglycan, welches sekretiert wird und im extrazellulären Bereich vorliegt und ein β-Dystroglycan, welches membrangebunden ist (siehe 1.3).

3.4.1.1 Immunhistochemie

Verwendet wurde ein kommerzieller Antikörper gegen das membrangebundene β-Dystroglycan (Novacastra). Dieser Antikörper färbte massiv Kapillaren im Bereich des Fazialiskerns an, jedoch war auch eine punktförmige Markierung der Motoneurone zu erkennen. Diese Markierung war jedoch nicht auf Motoneurone der regenerierenden Seite beschränkt, sondern in gleichem Maße auf der Kontrollseite zu beobachten. Aufgrund des Färbemusters des Antikörpers war es nicht möglich zu entscheiden, ob es sich hierbei um eine spezifische Markierung der Neurone handelt (siehe Abbildung 3.23).

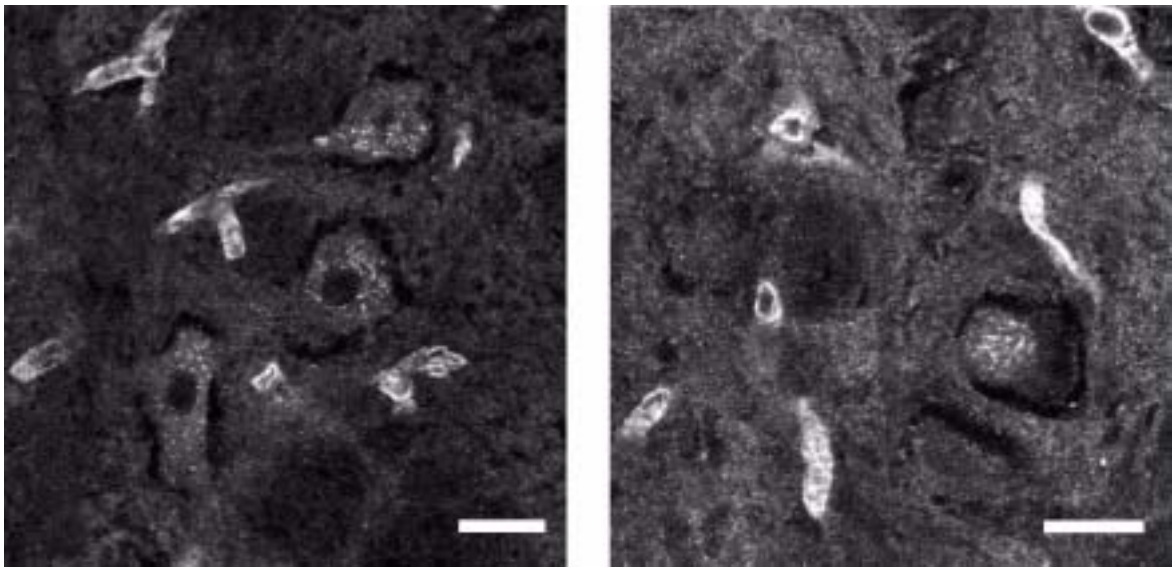

Abbildung 3.23 Immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen β-Dystroglycan. Links ist die Kontrollseite, rechts die operierte Seite dargestellt. Markiert sind jeweils die Blutkapillaren sowie, punktuell, die Zellkörper der Motoneurone. Größenbalken entspricht 25 µm.

Um nun die zellspezifische Expression von Dystroglycan näher zu untersuchen, wurden Färbungen von Zellkulturen (Astrozyten und Mikroglia) angefertigt. Diese

zeigten ebenfalls ein punktförmiges membranständiges Färbemuster (Abbildung 3.24).

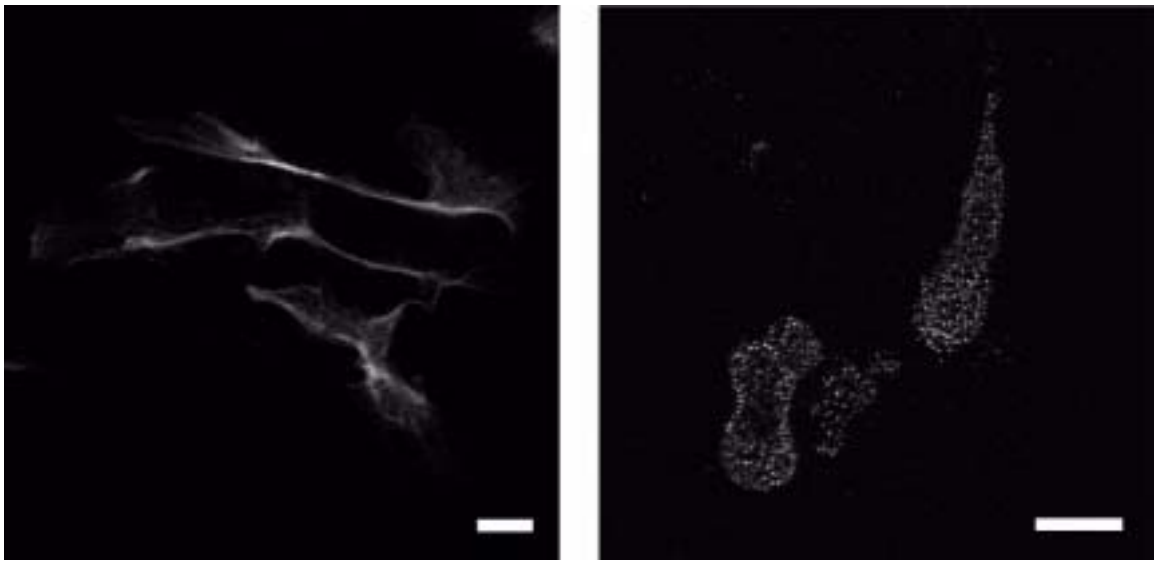

Abbildung 3.24 Immunhistochemische Färbung von Astrozyten und Mikroglia Zellkulturen mit einem Antikörper gegen β-Dystroglycan. Konfokale Aufnahme. Links Astrozyten Zellkultur, rechts Mikroglia Zellkultur. Größenbalken 25 µm.

Es wurde nun versucht, die Funktionalität und Spezifität des Antikörpers in Ratte durch Kontrollfärbungen von quergeschnittenen Muskelfasern und von Herzmuskel zu überprüfen. Dies war insofern wichtig, als es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen menschliches Dystroglycan handelte. Wie aus Abbildung 3.25 zu erkennen, kreuzreagierte der Antikörper auch mit Ratten β-Dystroglycan.

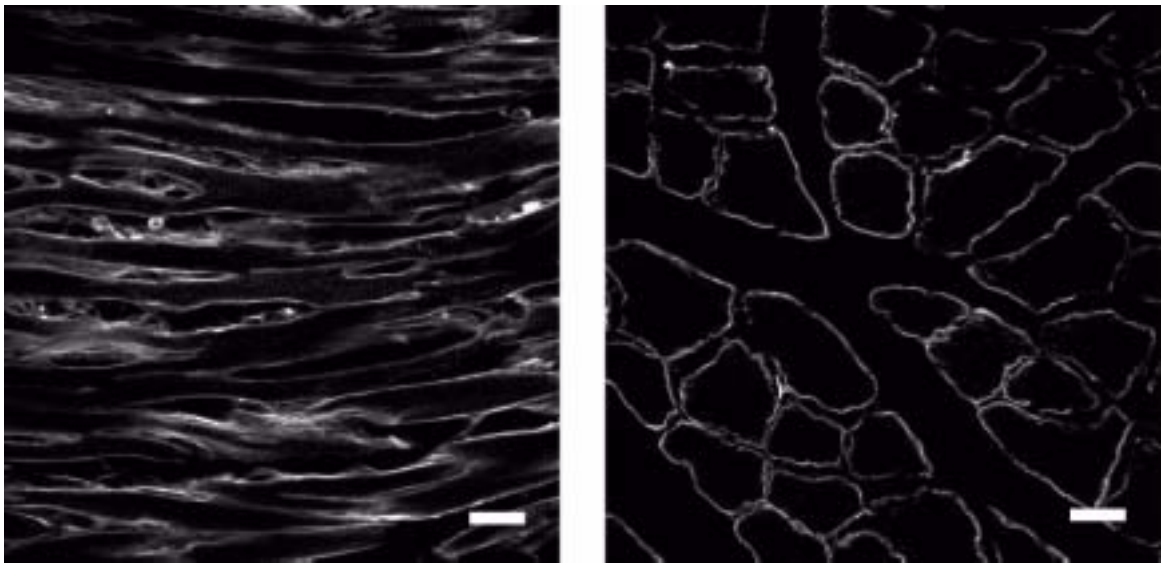

Abbildung 3.25 Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen β-Dystroglycan. Links quergeschnittener Herzmuskel, rechts quergeschnittener *Musculus biceps*. Größenbalken entspricht 25 µm.

Das Markierungsmuster des Antikörpers im Muskelgewebe entsprach der Erwartung für ein Membran-durchspannendes Protein (siehe Abschnitt 1.3). Die Färbung ist auf die Membran beschränkt, es gibt keine unspezifische Färbung des Zytoplasmas oder der Zellkerne, was in Abbildung 3.25 rechts deutlich zu erkennen ist.

3.4.1.2 Westernblot

Da auf Gewebsschnitten mit dem Antikörper gegen β-Dystroglycan keine Regulation gezeigt werden konnte, wurde nun versucht, diese mit Westernblots zu untersuchen.

Wie in Abbildung 3.27 zu sehen, erkennt der Antikörper auf Blots eine spezifische Bande auf der Höhe von 43 kDa, was dem Molekulargewicht von β-Dystroglycan entspricht. Aufgetragen waren Proteinextrakte aus verschiedenen Geweben um die Funktionalität des Antikörpers im Westernblot zu überprüfen. Hierzu wurde wie bereits bei der immunhistochemischen Untersuchung Muskelgewebe (Herz und Hinterlaufmuskel), als auch innere Organe und Gehirn ausgewählt. Deutlich ist die spezifische Bande bei 43 kDa in allen Geweben zu erkennen.

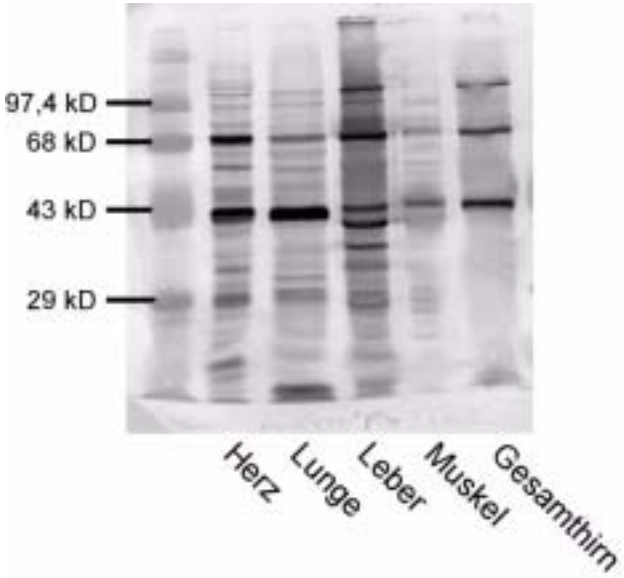

Abbildung 3.27 Westernblot mit einem Antikörper gegen β-Dystroglycan. Aufgetragen sind die Proteinextrakte verschiedener Organe und Gewebe um die Funktionalität des Antikörpers zu testen. In allen Geweben ist bei 42 kDa, dem Molekulargewicht von β-Dystroglycan eine deutlich Bande zu erkennen.

Untersuchungen mit Proteinextrakten aus den Fazialiskernregionen zeigten keinen deutlichen Seitenunterschied und bestätigten somit die immunhistochemischen Befunde. Die Bande erscheint leicht nach oben verschoben, was aber auf ein Laufartefakt zurück zu führen sein dürfte.

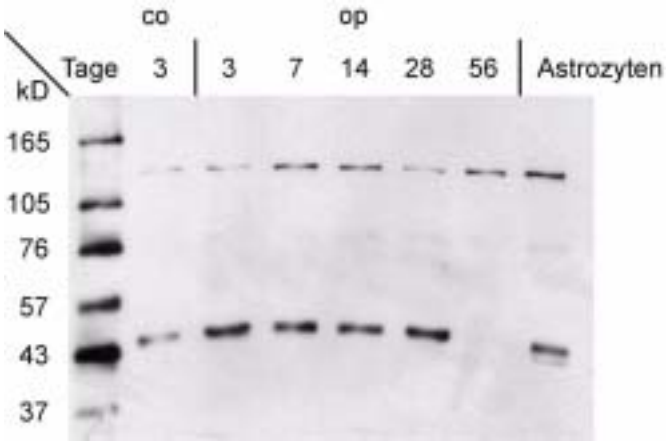

Abbildung 3.28 Westernblot mit einem Antikörper gegen β-Dystroglycan. Aufgetragen sind die Proteinextrakte der Fazialiskernregion zu verschiedenen Zeitpunkten nach Axotomie, sowie Astrozyten Zellkultur Proteinextrakt.

3.4.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Um nun die immunhistochemischen Befunde zu überprüfen, wurden Primer aus der bekannten Maussequenz für Dystroglycan entwickelt. Wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe Abschnitt 1.3), werden α-Dystroglycan und β-Dystroglycan durch eine gemeinsame mRNA kodiert. Diese enthält die Information für ein Vorläuferprotein, welche in die 2 besagten Proteine gespalten wird. Es ist daher also nicht möglich, Primer spezifisch für α-Dystroglycan oder β-Dystroglycan herzustellen. Die Primer erkennen die mRNA welche für beide Proteine kodiert. Daher wird hier im folgenden nur noch von Dystroglycan die Sprache sein und keine Unterscheidung mehr getroffen werden.

Mit diesen Primern konnte gezeigt werden, daß Dystroglycan von einer Vielzahl an Zellen und Geweben gebildet wird (siehe Abbildung 3.26). Dies wurde ja bereits für das Nervensystem beschrieben (Snyder et al., 1996). Aber auch in anderen Geweben war Dystroglycan in deutlichen Mengen vorhanden.

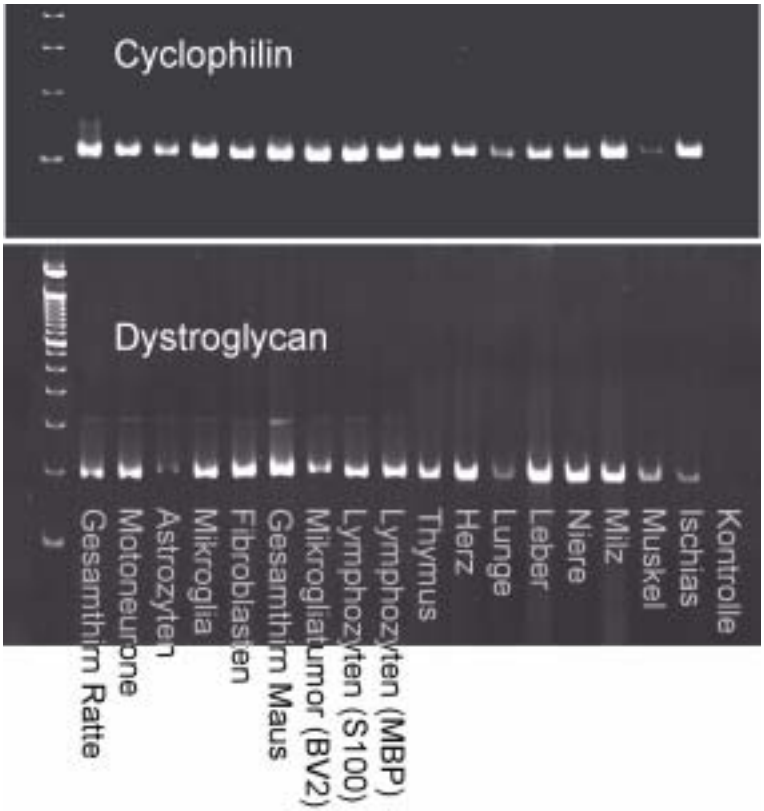

Abbildung 3.26 Zell und Gewebespezifische Verteilung der mRNA für Dystroglycan. Als Standard für die Gesamtmenge an cDNA sind die Cyclophilinwerte mit aufgetragen.

Untersuchungen der Fazialis Kernregion zeigten ein starkes Vorhandensein von mRNA, jedoch war es nicht möglich einen Unterschied zwischen der regenerierenden und der intakten Seite zu sehen.

3.4.2 Agrin

3.4.2.1 Immunhistochemie

Unter Verwendung eines polyklonalen Antikörperserums gegen das vollständige rekombinante Huhnprotein war es möglich, die Expression von Agrin auf Neuronen und Astrozyten zu zeigen. Nach Axotomie ist eine erhöhte Immunreaktivität für Agrin auf Astrozyten zu verzeichnen.

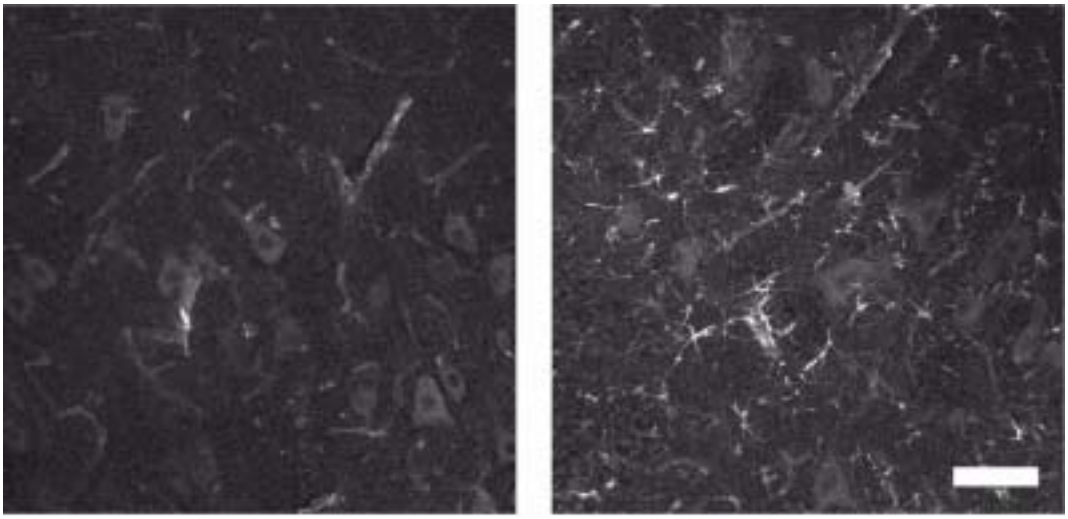

Abbildung 3.29 Immunhistochemie des *Nucleus facialis* 7 Tage nach Axotomie. Links die unoperierte Seite, rechts die operierte Seite. Deutlich ist die erhöhte Immunreaktivität der Astrozyten zu erkennen. Größenbalken entspricht 100 µm.

Die Motoneuronen im Fazialiskern zeigten keinerlei Veränderung in ihrer Immunreaktivität für Agrin.

3.4.2.2 Polymerasen-Ketten-Reaktion

Aufgrund der vielen Spleißvarianten von Agrin gestalteten sich Untersuchungen zur Expression oder Regulation des Moleküls nach Axotomie äußerst schwierig. Es mußten für alle Spleißstellen (3 in Nagern bzw. 4 im Huhn, siehe hierzu Kapitel 1.5 der Einleitung) Primer entwickelt werden, die spezifisch nur diese eine Variante erkannten. Hierzu wurden die Primer so gewählt, daß sie entweder innerhalb des Spleißes oder direkt über der Spleißstelle lagen.

Bezüglich der Funktion der verschiedenen Agrin Varianten wurden inzwischen einige Erkenntnisse gewonnen. So ist bekannt, daß für die Bindung von Heparin das 4 Aminosäuren große Insert an Stelle A (=Y) notwendig ist. Für die Acetylcholin-Rezeptor Anhäufung ist wiederum das 8 Aminosäurenstück an der Stelle B (=Z) nötig (Gesemann et al., 1996). Die folgende Tabelle soll nun eine Übersicht über das Vorkommen der Varianten im Gehirn bzw. in verschiedenen Zellkulturen geben, wie es mit den Primern gefunden wurde.

Spleiß-stelle	Insert (AA)	Gesamt-hirn	Moto-neuron	Astro-zyten	Mikro-glia	MG-Tumor	Fibro-blasten
N-Term.	0	1	1	1	1	1	0
	7	1	1	1	1	1	0
	alle						
X-Spleiß	0	1	1	1	1	1	0
	9						
	alle	3?	3?	1	1	1	?
Y-Spleiß	0	1	1?	1	1	1?	0
	4	1	1	0	0	0	0
	alle	2	1	1	1	1	0
Z-Spleiß	0	1	1	1	1	1	0
	8	1	1	0	0	0	0
	11	1	1	1?	1?	0	0
	19	1	1	0	0	0	0
	alle	4	4	1	1	1	0

Es zeigt sich, daß alle Varianten im Zentralen Nervensystem vorkommen, auch die N-terminale Variante ohne Insert, die ja in Huhn als bevorzugt nicht-neuronal beschrieben wird (Tsen et al., 1995b). Vergleicht man die Immunhistochemie mit den PCR Daten, so zeigt sich, daß die Immunreaktion der Motoneurone auf keine bestimmte Variante zurück zu führen ist. Vielmehr werden alle Agrinspleiße von den Motoneuronen ausgebildet. Es gibt allerdings Unterschiede in der Stärke der Expression. So ist zum Beispiel die Y_4-Variante in Motoneuronen viel stärker ausgebildet als die Y_0-Variante.

Anders sieht es jedoch mit den Astrozyten aus. Hier läßt sich die Expression auf die Variante Y_0Z_0 (A_0B_0) eingrenzen. Alle anderen Varianten zeigten keine deutliche Bande in der PCR. Bei der Z_{11} Variante war unter Verwendung verschiedener Primerpaare eine deutliche Bande in Astrozyten- und Mikrogliazellkulturen zu sehen. Jedoch war diese nicht immer in allen PCR-Reaktionen nachweisbar.

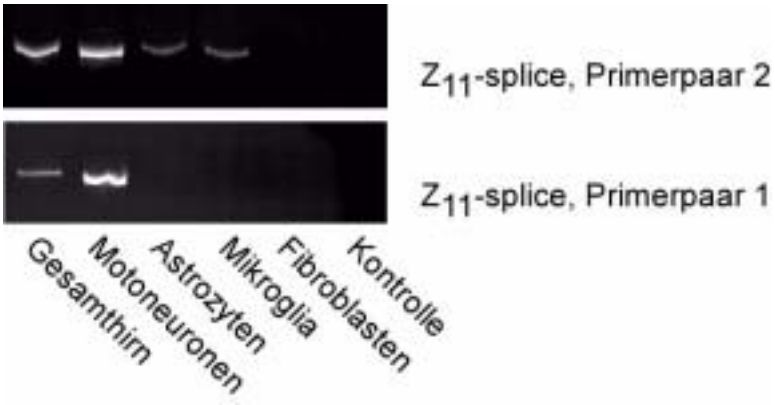

Abbildung 3.30 Z11-Spleiß mit 2 verschiedenen Primerpaaren liefert unterschiedliche Ergebnisse.

Primerpaare, welche diese Banden in Astrozyten und Mikroglia nicht zeigten wiesen jedoch ein deutliches Signal in Gesamthirn und Motoneuronen auf (siehe Abbildung 3.30). Daher ist eine eindeutige Aussage über das Vorkommen der Z_{11}-Variante in Astrozyten und Mikroglia Zellkultur nicht möglich. Nachdem die Bande in Astrozyten mit dem Primerpaar für die Z_{11}-Variante jedoch sensitiv auf verschiedene Magnesiumchloridkonzentrationen war und auch keine unspezifischen Nebenbanden dadurch auftauchten, scheint es sich hierbei um eine spezifische Bande zu handeln. Für eine Übersicht über die Z-Varianten ohne Berücksichtigung der speziellen Z_{11} Situation siehe auch Abbildung 3.31.

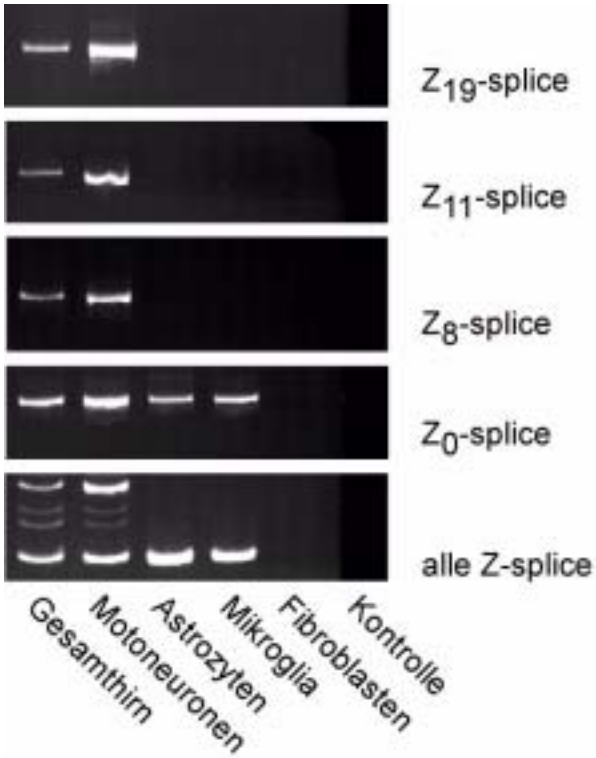

Abbildung 3.31 zeigt die Expression der verschiedenen Z-Varianten in unterschiedlichen Zellen und Geweben. In dieser Abbildung ist die oben erwähnte Situation des Z_{11}-Spleißes nicht berücksichtigt.

Versuche, eine Regulation der Agrinexpression während der Regeneration mittels PCR zu zeigen, waren nicht erfolgreich. Es waren deutlich Signale auf der operierten Seite wie auch auf der Kontrollseite zu erkennen, jedoch war kein statistisch signifikanter Unterschied vorhanden.

3.4.3 MuSK – Muskelspezifische Kinase

3.4.3.1 Polymerasen-Ketten-Reaktion

Trotz Benutzung verschiedener Primerpaare gegen MuSK war es nicht möglich, eine Expression von mRNA im Zentralnervensystem nachzuweisen. Für die Entwicklung der Primer wurde die rattenspezifische Sequenz benutzt, so daß von einer Spezifität der Primer ausgegangen werden konnte. Alle Primer lagen innerhalb der kodierenden Sequenz. Versuche, die Sensitivität durch Einbau radioaktiver Nukleotide (^{32}P) zu erhöhen, ergaben ebenfalls keine positiven Befunde bei normal stringenten Versuchsbedingungen bezüglich des Vorhandenseins von MuSK mRNA. Wurde die Stringenz weiter verringert (höhere Salzkonzentration, Annealingtemperatur weit unterhalb der errechneten Temperatur), so kam es zu massiven Nebenbanden, einschließlich möglicher „richtiger“ Banden, d.h. diese lagen auf der erwarteten Höhe im Gel.
Es gab keinen Anhaltspunkt für das Vorkommen von MuSK im Zentralnervensystem der Ratte.

3.5 Phosphacan / Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatase beta/zeta

3.5.1 Immunhistochemie

Mit einem Antikörper gegen Phosphacan war es nicht möglich, eine spezifische Färbung im Fazialiskern zu erhalten. Der Antikörper färbte das gesamte Neuropil einheitlich an. Die Zellkörper der Motoneuronen waren ausgespart.

3.5.2 Polymerasen-Ketten-Reaktion

Untersuchungen mit Primern gegen Phosphacan zeigten ein nahezu identisches Verbreitungsmuster (vergleiche hierzu Abbildung 3.32 und Abbildung 3.21) der Phosphacan mRNA im Vergleich zu der von Nr-CAM, einem möglichen Bindungspartner (siehe auch 1.6).

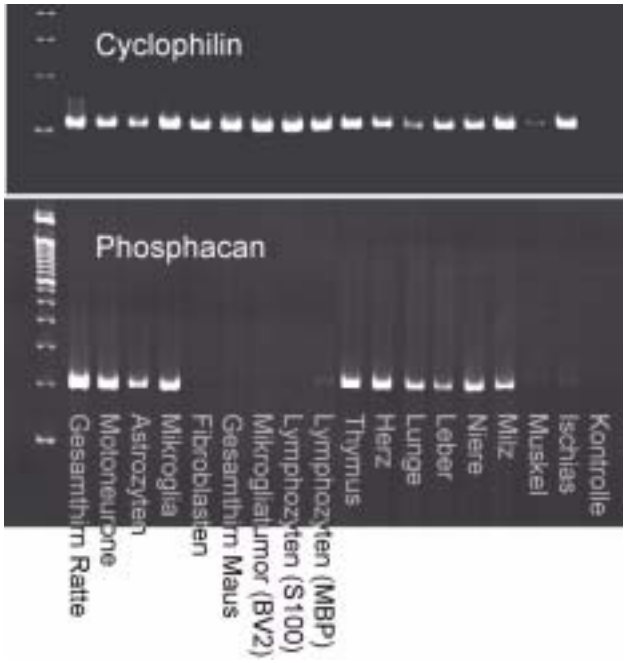

Abbildung 3.32 Zell und Gewebespezifische Verteilung der mRNA für Phosphacan. Als Standard für die Gesamtmenge an cDNA sind die Cyclophilinwerte mit angegeben.

Betrachtete man die Veränderung in der mRNA im Bereich des Fazialiskerns, so schien es, wie bei Nr-CAM, zu einer Hochregulation zu kommen. Jedoch war auch hier aufgrund des Verlaufs der PCR-Reaktion lediglich eine deskriptive Aussage möglich (siehe hierzu Abbildung 3.33).

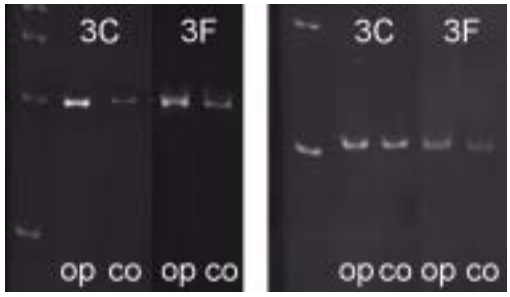

Abbildung 3.33 Acrylamidgel der elektrophoretischen Auftrennung des Produktes einer PCR mit spezifischen Primern für Phosphacan bzw. Cyclophilin. Links: Phosphacan, 2 unterschiedliche Tiere 3 Tage nach Operation, jeweils die operierte Seite und die Kontrollseite; Rechts: Cyclophilin. Tier 3C zeigt eine 2 bis 3 fache Erhöhung des cDNA Gehaltes auf der operierten Seite, bezogen auf die Ausgangsmenge an cDNA (Verhältnis des cDNA Gehaltes für Cyclophilin), Tier 3F hingegen keine.

3.5.3 *in situ* Hybridisierung

In situ Hybridisierungen mit einer Ribonukleotidsonde zeigten das Vorkommen von Phophacan mRNA vorwiegend in kleineren Zellen, Astrozyten und/oder Mikroglia, sowie vereinzelt auch auf Motoneuronen. Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied in der Stärke des Signals zwischen rechter und linker Seite des Stammhirns festgestellt werden. Zum Teil war eine Zunahme der positiven Zellen in manchen Gewebsschnitten zu beobachten (siehe Abbildung 3.34), in anderen wiederum kein Unterschied zwischen den beiden Seiten.

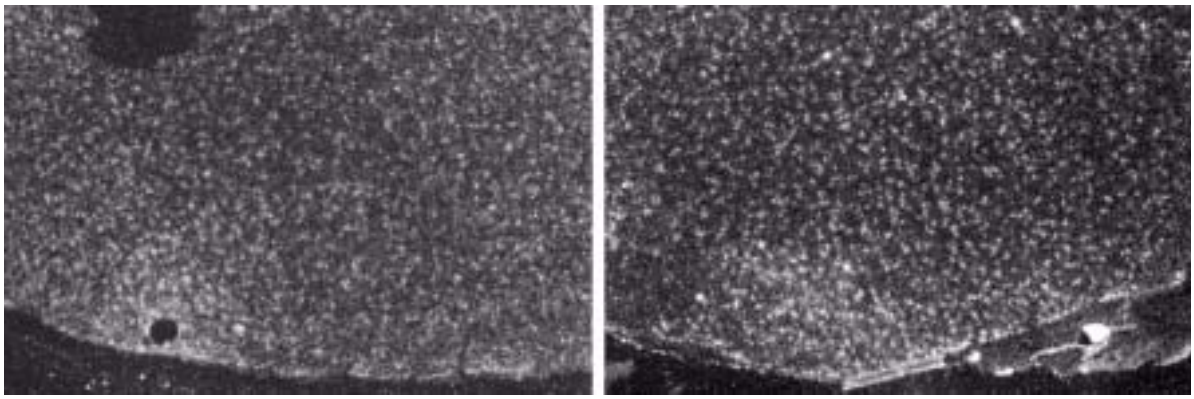

Abbildung 3.34 Radioaktive *in situ* Hybridisierung mit einer Sonde gegen Phosphacan. Links die Kontrollseite, rechts die axotomierte Seite, 3 Tage nach Nervdurchtrennung. Deutlich ist das Signal sowohl im Fazialiskern als auch sonst im Stammhirn zu sehen. Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalaun zur Kernfärbung zeigte, daß vorwiegend kleinere Zellen und vereinzelt Motoneurone das Signal tragen.

Ein Vergleich mit den PCR Ergebnissen legt die Schlußfolgerung nahe, daß es sich bei den Phosphacan exprimierenden Zellen um Mikroglia handeln könnte.

4. Diskussion

4.1 SC1 und CD6: Ein funktionierender Ligand-Rezeptor Komplex im ZNS?

4.1.1 SC1 ist ein regenerationsassoziiertes Oberflächenmolekül

Bei SC1 handelt es sich um ein Zelladhäsionsmolekül, welches ursprünglich im Zentralnervensystem von Huhn entdeckt und beschrieben wurde (Pourquie et al., 1990;Tanaka et al., 1991;Burns et al., 1991). Später wurde auch das menschliche Homolog ALCAM gefunden. Das Maushomolog wurde parallel zu meiner Arbeit identifiziert und charakterisiert (Bowen et al., 1997; Bowen et al., 1995).
In Ratte waren bislang nur 2 kurze Stücke der Sequenz im 5' und 3' Bereich bekannt. In der vorliegenden Arbeit war es nun möglich, die kodierende Sequenz für Ratten SC1/ALCAM aufzuklären und durch immunhistochemische und molekularbiologische Methoden eine Regulation dieses Proteins während der Regeneration des Nerven auf Motoneuronen zu zeigen. Weiterhin wurde eine zweite Variante von SC1 entdeckt, die durch alternatives Spleißen generiert wird. Die unterschiedliche Ausprägung dieser Varianten in verschiedenen Zelltypen wurde untersucht.
Durch Klonierungs- und Sequenzierungsschritte wurde die bislang unbekannte Sequenz für Ratten SC1 aufgedeckt. Wie sich zeigte, war die Homologie zu Maus und Mensch ALCAM, sowie zu Ratten HB2 und Mensch MEMD deutlich höher als zu Huhn SC1 / DM-Grasp bzw. Fisch Neurolin.

Abbildung 4.1 Homologievergleich der Sequenzen von SC1 und ALCAM. Das bekannte 3'-Ende von Maus DM-Grasp zeigt 99% Identität zu Maus ALCAM (hier nicht gezeigt).

Inwieweit es sich bei Ratten SC1 um ein eigenes Protein handelt, oder um eine Spleißvariante von Ratten HB2 oder Ratten ALCAM, von dem bislang lediglich

eine kurze Sequenz im 5' und 3' während dieser Arbeit entdeckt wurde, oder gar das gleiche Protein, ist ungeklärt. Hier wären Bindungs- und Blockierungsstudien zur weiteren Klärung nötig. Für eine nahe Verwandtschaft oder Identität der beiden Proteine spricht allerdings die hohe Ähnlichkeit im Bereich der möglichen antigenen Strukturen der neu entdeckten SC1 Sequenz, der Maus ALCAM und der menschlichen ALCAM Sequenz, wie aus Abbildung 5.2 zu erkennen.

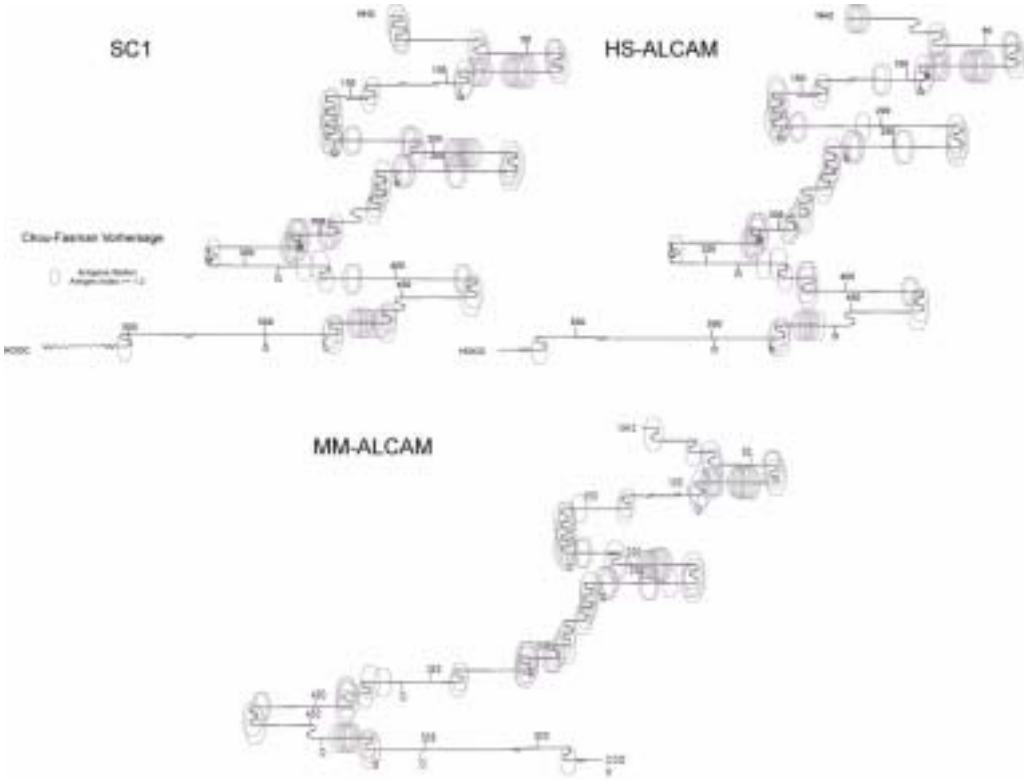

Abbildung 5.2 Chou-Fasman Vorhersage über die antigenen Strukturen in Peptiden. Deutlich ist die hohe Übereinstimmung in den potentiell antigenen Strukturen zwischen den verschiedenen Peptiden zu erkennen. Diese Vorhersage gibt Aufschluß über Peptidstrukturen, die aufgrund der Proteinfaltung sowohl für Antikörper wie auch Bindungspartner zugänglich sind und somit charakteristisch für ein Protein sind.

Mit Hilfe der Antikörper F84.1 und 613 wurde eine Hochregulation von SC1 Protein auf denervierten Motoneuronen während der Regeneration des Nerven gezeigt. Diese Färbung wurde durch ein selbst hergestelltes polyklonales Antikörperserum bestätigt, jedoch war hier ein deutlich höherer Hintergrund und zusätzlich unspezifische Markierungen zu verzeichnen.

Speziell Westernblots mit dem Antikörper F84.1 zeigten das für SC1 spezifische Bandenmuster (Prince et al., 1992).

Jedoch war es nicht möglich mittels Westernblots die Regulation zu bestätigen. Dies korreliert mit den PCR Befunden für SC1. Auch hier konnte deutlich das Vorhandensein von SC1 im Fazialis-Kerngebiet gezeigt werden, wobei jedoch mit

Primern aus dem 5' Bereich wiederum keine Regulation gezeigt werden konnte. Eine Regulation zeigte sich erst bei semiquantitativen PCR's mit Primern für die neu entdeckte kürzere Spleißvariante von SC1. Diese um 39 Basenpaare verkleinerte Spleißvariante wurde während der Sequenzierung von SC1 durch das Auftreten von Klonen mit unterschiedlicher Sequenz identifiziert. Sie kommt in den meisten neuronalen Zellen sowie verschiedensten Geweben vor (Abbildung 3.9) und ist in Motoneuronen die dominierende Variante. Damit ist sie vermutlich die für die Regeneration wichtige Form von SC1. Aufgrund der dominierenden Expression der kurzen Variante in Motoneuronen konnte mit einer beide Varianten erkennenden Sonde mittels *in situ* Hybridisierung eine Hochregulation von SC1 mRNA nach Axotomie des Fazialisnervs in den Motoneuronen gezeigt werden. Eine spleißspezifische Sonde für die lange Variante von SC1 zeigte in Übereinstimmung mit den bisherigen Befunden keine Regulation.
Die kurze Spleißvariante von SC1 scheint also die für die Regeneration des Nervs funktionelle Variante zu sein. Legt man die Hypothese zugrunde, daß Oberflächenmoleküle, welche während der Entwicklung eine wichtige Rolle spielen auch während der Regeneration nach Verletzung eine Funktion übernehmen, so stellt sich hier auch umgekehrt die Frage, ob die kurze Spleißvariante nicht die funktionell wichtige Form von SC1 während der Entwicklung ist. Ist die kurze Spleißvariante auch an der Entwicklung beteiligt oder ist sie eine ausschließlich mit der neuronalen Regeneration assoziierte Variante des Proteins? Kommt die kurze Variante während der Entwicklung vor oder wird sie ausschließlich im Falle einer neuronalen Schädigung im Verlauf der Regeneration gebildet? Vergleichende Studien sollten helfen, diese Fragen zu beantworten.

4.1.2 Ist CD6 der Bindungspartner für SC1 im Zentralnervensystem der Ratte?

Von anderen Gruppen konnte gezeigt werden, daß nicht nur ALCAM, sondern auch das SC1 Homolog BEN in der Lage ist an CD6 zu binden (Skonier et al., 1997). Hierbei wurde gezeigt, daß die ALCAM–CD6 bindungsrelevanten Aminosäuresequenzen auch in BEN hoch konserviert sind. Eben diese Sequenzen sind auch zu 100% in Ratten SC1 zu finden. Untersuchungen über

eine funktionelle physiologische Bindung sind jedoch noch nicht unternommen worden.
Daher lag die Vermutung nahe, daß CD6 auch ein funktioneller Rezeptor für SC1 im Zentralnervensystem sein könnte.
Immunhistochemie mit Antikörper gegen CD6 zeigten keine Regulation in Antwort auf Läsionen, wobei jedoch die Spezifität des detektierten Signals nicht nachgewiesen werden konnte. Vereinzelt wurden Motoneurone, Kapillaren und kleinere Zellstrukturen in Gehirn und anderen Geweben durch verschiedene Antikörper gegen CD6 gefärbt.
Mit PCR, unter sehr sensitiven Bedingungen, war es nicht möglich, ein Vorkommen von CD6 mRNA im Gehirn zu zeigen, obwohl mehrere Primerpaare unter verschiedensten Bedingungen gestestet wurden. Dabei muß allerdings bedacht werden, daß als Ausgangssequenz für das Primerdesign die Maussequenz für CD6 herangezogen werden mußte, da die Rattensequenz nicht bekannt war.
Da bisherige Untersuchungen zum Vorkommen von CD6 im Gehirn keine eindeutigen Ergebnisse liefern konnten, stellt sich die Frage, ob die für die ALCAM-CD6 Bindung relevanten Aminosäuresequenzen nicht eine generelle Bindungssequenz auch für andere Bindungspartner darstellen.

4.2 Entwicklungsassoziierte Oberflächen- und extrazelluläre Matrix-Moleküle mit Relevanz zur Regeneration

4.2.1 Nr-CAM

Nicht nur im Zentralnervensystem sondern auch in einer Vielzahl von Organen konnte das Vorhandensein von Nr-CAM gezeigt werden (Abbildung 3.21).
Immunhistochemie zeigte das Vorkommen von Nr-CAM auf Astrozyten im Fazialiskern. Während der Regeneration der denervierten Motoneurone kommt es zu einer Verstärkung der Nr-CAM Expression auf Astrozyten. Wie bereits unter 3.3.1 näher ausgeführt, kommt es sowohl zu einer Zunahme an Protein wie auch zu einer Ausweitung des Proteins auf die Fortsätze der Astrozyten. Diese Zunahme erreicht ihren Höhepunkt an Tag 7 nach Nervdurchtrennung. Sowohl die Markierungsintensität wie auch die markierte Fläche fällt danach wieder bis Tag

50 auf Basalwerte ab. Das Vorhandensein von Nr-CAM im Gehirn wurde durch Westernblotanalysen bestätigt. Mit PCR war es nur möglich, diese Befunde deskriptiv zu zeigen.
Prinzipiell muß man beim Vergleich von Proteindaten (Immunhistochemie, Westernblot) mit Sequenzdaten (PCR, Northern) besonders bei Oberflächenmolekülen die Regulationsmechanismen der Translation sowie die „Turnover"-Zeiten des Proteins und der mRNA berücksichtigen. Zum Beispiel führt der verstärkte Schutz der mRNA vor Abbau zu einer höheren Verweildauer in der Zelle, wodurch die mRNA öfters translatiert werden kann.
So ist bei Zelloberflächenmolekülen durchaus zu erwarten, daß sich eine Erhöhung der Proteinkonzentration nicht in einer Erhöhung der mRNA Menge widerspiegeln muß. Ebenso kann die Effizienz der Translation erhöht werden. Auf Proteinseite wiederum kann auch der Turnover des Proteins verlängert werden, was zu einer Akkumulation des Proteins führen würde.

4.2.2 Phosphacan

Phosphacan entspricht dem extrazellulären Teil der Rezeptor-Typ Protein Tyrosin Phosphatase zeta. Von dieser konnte gezeigt werden, daß sie mit Neuronen und neuronalen Zelladhäsionsmolekülen interagiert (Maurel et al., 1994) und durch Verletzung des Gehirns induziert wird (Snyder et al., 1996). Eines dieser interagierenden neuronalen Zelloberflächenmolekülen ist das hier untersuchte Nr-CAM (unveröffentlichte Daten, zitiert in Margolis und Margolis, 1997).
Wie im Ergebnisteil bereits erwähnt, konnte auf Proteinebene keine Aussage zur möglichen Regulation von Phosphacan gemacht werden, da der Antikörper keine spezifische Markierung zeigte.
Untersuchungen zum Vorkommen von Phosphacan mRNA zeigten ein nahezu identisches Verbreitungsmuster zu Nr-CAM, einem möglichen Bindungspartner. Ebenso wie Nr-CAM ist auch Phosphacan nach Verletzung des Nerven im Kerngebiet hochreguliert. Dies konnte durch die Polymerasen-Ketten-Reaktion gezeigt werden. Auch mit *in situ* Hybridisierung war es möglich, die Expression von Phosphacan zu zeigen und in einigen Fällen auch eine Zunahme der Signal-tragenden Zellen. Diese Regulation war jedoch statistisch nicht signifikant zu belegen. Worin dies begründet liegt kann allerdings nicht erklärt werden. Eine

Möglichkeit wären instabile PCR Bedingungen. Es lag keine Degradation der Primer vor, da mit neu resuspendierten Primern sowohl eine Hochregulation als auch keine Regulation beobachtet werden konnte. Ebenso waren in der *in situ* Hybridisierung im gleichen Versuchsansatz sowohl regulierte wie unregulierte Schnitte zu beobachten.

4.2.3 Dystrophin-assoziierter Proteinkomplex

4.2.3.1 Eine Dystroglycan Regulation ist als Folge auf eine ZNS Verletzung nicht nachweisbar

Immunhistochemische Untersuchungen konnten nur für β–Dystroglycan durchgeführt werden. Hier zeigte der gegen menschliches Protein gerichtete Antikörper eine spezifische Reaktion im Muskelgewebe von Ratte, die mit dem in der Literatur beschriebenen Färbemuster übereinstimmt. Man kann daher davon ausgehen, daß die zu beobachtende Färbung spezifisch ist und der Antikörper mit Ratten Dystroglycan kreuzreagiert. Ebenfalls markiert wurden Astrozyten und Mikroglia aus Zellkultur, sowie Kapillaren und Motoneurone des Fazialiskerns. In Gewebsschnitten war jedoch keine Färbung glialer Strukturen zu erkennen.
Die deutliche Bande im Westernblot, sowohl aus Fazialisgewebe als auch aus Astrozytenzellkultur, läßt allerdings den Schluß zu, daß es sich bei der punktförmigen Markierung des Parenchyms in der Immunhistochemie um eine spezifische Färbung handeln könnte. Ähnliche Färbemuster sind zum Beispiel für das Dystroglycan bindende ECM Molekül Laminin bekannt (Liesi et al., 1995)
PCR Daten zeigten die starke Verbreitung von Dystroglycan-mRNA in vielen Geweben. So wurden die immunhistochemischen Daten bezüglich der glialen Expression bestätigt, wobei es sich fast ausschließlich um eine mikrogliale Bildung von Dystroglycan zu handeln scheint. Auch in der Fazialisregion war eine hohe Menge an mRNA vorhanden, es zeigte sich jedoch kein Seitenunterschied in der Expression während der Regeneration. Dystroglycan scheint also während der Regeneration nicht signifikant reguliert zu sein.
Als weiterer Hinweis konnte in unserem Labor mittels PCR gezeigt werden, daß auch die neuronale Variante von Dystrophin im ZNS nicht reguliert wird. Dieses deckt sich mit den hier gefundenen Ergebnissen zu Dystroglycan. Daß es sich bei

der astrozytären Markierung in der Immunhistochemie gegen Dystroglycan um ein spezifische Signal handelt, wird durch die Tatsache gestützt, daß die, im Vergleich zu der neuronalen Variante nur in geringer Konzentration vorkommende, muskuläre Form des Dystrophins auf Astrozyten hochreguliert wird.

4.2.3.2 Agrin

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen war es möglich die Expression von Agrin im Fazialiskern zu zeigen. Nach Axotomie kam es zu einer erhöhten Immunreaktivität reaktiver Astrozyten. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob es sich hierbei um von Astrozyten selbst produziertes Agrin, und/oder um über den DAPC (Dystrophin assoziierte Protein Komplex) an die Astrozyten gebundenes freies Agrin handelt.
Um nun näher das Vorkommen der verschiedenen Spleißvarianten zu untersuchen, wurden für diese spezifische Primerpaare designt. Wie sich zeigte ist die Y_0Z_0 (A_0B_0) Variante als einzigste auf Astrozyten vorhanden, während alle Varianten von Motoneuronen gebildet wurden.
Dies legt die Vermutung nahe, daß es sich bei der auf Astrozyten zu beobachtenden Immunreaktivität um diese Agrinvariante handelt.
Es war jedoch nicht möglich, mittels PCR die Regulation, wie sie durch die Immunhistochemie gezeigt wurde, im Bereich des Fazialiskerns zu bestätigen. Andererseits aber konnte in unserem Labor mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung eine Verminderung der mRNA für Agrin auf Motoneuronen als Antwort auf die Nervdurchtrennung beobachtet werden.
Auf der anderen Seite konnte mit spleißspezifischen Primern keine ausreichend stabile PCR entwickelt werden, die eine spleißspezifische Untersuchung der Agrin mRNA Regulation ermöglicht hätte. Diese gegenläufige Expression von Agrin ist eine mögliche Erklärung dafür, daß mittels allgemeiner Agrinprimer keine Regulation gezeigt werden kann, da sich das erhöhte astrozytäre Signal gegen das verminderte neuronale aufhob.

4.2.3.3 MuSK – muskelspezifische Kinase

Die Identifizierung aller anderen Komponenten des Agrin-DAPC Systems legte die Frage nahe, ob nicht auch MuSK als Element postsynaptischer Strukturen im Gehirn synthetisiert wird.
Trotz Verwendung der rattenspezifischen Sequenz zur Entwicklung der MuSK Primerpaare war es nicht möglich, eine Expression im Zentralnervensystem nachzuweisen. MuSK ist ein Bindungspartner für Agrin, der wesentlich an der Bildung und Funktion der motorischen Endplatte beteiligt ist (Glass et al., 1996). Die Vermutung war, daß MuSK auch im Zentralnervensystem vorkommen und als Bindungspartner für Agrin dienen könnte. Wie diese Untersuchung jedoch gezeigt hat, kommt MuSK aller Wahrscheinlichkeit nach nicht im ZNS vor.
Die Untersuchungen dieser Arbeit, zusammen mit anderen Untersuchungen aus diesem Labor, stellen die grundsätzliche Frage nach der Funktion des Agrin-DAPC Komplexes im ZNS. Das generelle Vorkommen der Proteine des Agrin-DAPC Systems nicht nur im Nervensystem sondern auch in verschiedensten Organen, legt die Vermutung nahe, daß es sich an der neuromuskulären Endplatte um eine funktionelle Spezialisierung dieses Komplexes handelt, dem ansonsten eine mehr allgemeine Funktion in der Stabilisierung des Zellverbandes zukommt. In letzter Konsequenz stellt sich die Frage, ob dem Agrin-DAPC System im ZNS überhaupt eine analoge Funktion zur neuromuskulären Endplatte zukommt.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die veränderte Expression von Proteinen aus der Gruppe der Zelloberflächenmoleküle und der extrazellulären Matrix während der Nervenregeneration im Zentralnervensystem untersucht. Diese Proteine sorgen durch ihre Interaktion für eine Kommunikation der Zellen untereinander und sorgen für eine Stabilisierung und Strukturierung des Zellverbandes im Gewebe. Kommt es zu einer Beschädigung dieser Struktur so sind es Proteine aus diesen Gruppen, die maßgeblich an der Wiederherstellung des Grundzustandes beteiligt sind und somit bei der Wiedererlangung eines funktionellen Zustandes mitwirken.
Um nun nähere Informationen zu erhalten wurden Untersuchungen sowohl auf Proteinebene mittels Immunhistochemie und Westernblotuntersuchungen, als auch auf mRNA Ebene mittels PCR und *in situ* Hybridisierungen unternommen.
Proteine aus der Immunglobulinsuperfamilie zeigten hierbei eine regenerationsassoziierte Veränderung ihrer Expression.
So konnte mittels Immunhistochemie gezeigt werden, daß SC1/ALCAM Protein nach Nervdurchtrennung auf Motoneuronen hochreguliert wird. Westernblotstudien bestätigten das Vorhandensein von SC1/ALCAM im Fazialiskern. Weiterhin konnte die bislang unbekannte Sequenz für Ratten SC1/ALCAM aufgeklärt werden und darüber hinaus das Vorhandensein einer neuronalen regenerationsassoziierten Spleißvariante gezeigt werden. Diese neuronale Lokalisation wurde durch *in situ* Hybridisierungen bestätigt. Der für ALCAM bekannte Rezeptor CD6 konnte im Gehirn weder auf Protein noch auf mRNA Ebene definitiv nachgewiesen werden. Dies führt zu der Schlußfolgerung, daß eine SC1/ALCAM-CD6 Wechselwirkung im Gehirn nicht stattfindet und ein anderes Protein als Rezeptor oder Bindungspartner für SC1/ALCAM fungiert.
Für das Zelloberflächenmolekül Nr-CAM konnte ebenfalls gezeigt werden, daß es zu einer erhöhten Proteinbildung nach Nervenläsion kommt. Hierbei war es möglich, mittels Antikörperfärbungen immunpositive Astrozyten zu zeigen. Auf mRNA Ebene konnte dies deskriptiv bestätigt werden. Der mögliche Bindungspartner Phosphacan zeigte ein identisches Verbreitungsmuster, wie durch PCR gezeigt werden konnte. Jedoch war hier keine Regulation in Abhängigkeit von der Regeneration zu erkennen.

Proteine des Dystrophin-assoziierten Proteinkomplexes (DAPC) zeigten unterschiedliche Expressionsmuster als Folge der neuronalen Läsion.
So konnte das Vorkommen von β–Dystroglycan sowohl durch Immunhistochemie als auch durch PCR gezeigt werden, jedoch war keine Reaktion auf die Axotomie zu beobachten.
Im Gegensatz hierzu konnte für Agrin eine erhöhte Immunreaktivität auf Astrozyten als Folge des neuronalen Traumas beobachtet werden. Wie die PCR Daten für die verschiedenen Spleißvarianten vermuten lassen, handelt es sich hierbei um die Y_0Z_0 (A_0B_0) Variante, welche als einzige auf Astrozyten gefunden werden konnte. Konträr dazu zeigten Motoneurone des Fazialiskerns eine verringerte Expression an mRNA nach Axotomie, wie durch *in situ* Hybridisierung gezeigt werden konnte.
Für MuSK, einem weiteren Molekül des DAPC-Systems, welches speziell am Vorgang des Acetylcholinrezeptor-Clusterings an der synaptischen Endplatte im Muskel beteiligt ist, konnte ein Vorhandensein im Zentralnervensystem nicht gezeigt werden. Aufgrund dieser Befunde muß die Vorstellung über den DAPC im Zentralnervensystem neu überdacht werden.
Durch diese Arbeit war es mir möglich, die veränderte Ausbildung verschiedener Proteine aus der Gruppe der Zelloberflächenmoleküle und der extrazellulären Matrix nach Nervenläsion aufzuzeigen und somit deren mögliche Beteiligung am Regenerationsprozeß zu demonstrieren. Weiterhin konnte ich durch diese Arbeit zeigen, daß im peripheren Nervensystem bekannte Proteinwechselwirkungen im Zentralnervensystem nicht nachweisbar sind und es somit dort zu funktionellen Wechselwirkungen mit anderen als Bindungspartner bislang nicht beschriebenen, Proteinen kommen muß.

6. Verzeichnis häufig benutzter Abkürzungen

Hier eine Übersicht der am häufigsten benutzten Abkürzungen. Alle Abkürzungen wurden bereits in der Arbeit im entsprechenden Kontext erklärt.

ALCAM	Activated leukocate cell adhesion molecule
CDNA	Kopie-Desoxyribonukleinsäure
CFA	Komplettes Freundsches Adjuvants
DAG	Dystrophin-assoziiertes Glykoprotein
DAPC	Dystrophin-assoziierter Proteinkomplex
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
ECM	Extrazelluläre Matrix
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
MIP	maximum intensity projection
MuSK	muskelspezifische Kinase (muscle specific kinase)
Nr-CAM	neuron-glia related cell adhesion molecule
Op	Operation
op	operiert
PBS	Natriumphosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehyd
ROI	region of interest
RT	Reverse Transkription
SSC	Natriumcitratpuffer
U	Unit, aktive Einheit eines Enzyms

7. Literatur

1. Atwood, H. L and MacKay, W. A. Neurophysiologie. 1994. Stuttgart, New York, Schattauer.

2. Bowen MA, Bajorath J, D'Egidio M, Whitney GS, Palmer D, Kobarg J, Starling GC, Siadak AW, Aruffo A (1997) Characterization of mouse ALCAM (CD166): the CD6-binding domain is conserved in different homologs and mediates cross-species binding. European Journal of Immunology 27: 1469-1478.

3. Bowen MA, Patel DD, Li X, Modrell B, Malacko AR, Wang WC, Marquardt, Neubauer M, Pesando JM, Francke U (1995) Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. J Exp Med 181: 2213-2220.

4. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

5. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP (1998) Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. J Bone Miner Res 13: 655-663.

6. Burgoon MP, Grumet M, Mauro V, Edelman GM, Cunningham BA (1991) Structure of the chicken neuron-glia cell adhesion molecule, Ng-CAM: origin of the polypeptides and relation to the Ig superfamily. J Cell Biol 112: 1017-1029.

7. Burns FR, von Kannen S, Guy L, Raper JA, Kamholz J, Chang S (1991) DM-GRASP, a novel immunoglobulin superfamily axonal surface protein that supports neurite extension. Neuron 7: 209-220.

8. Cohen MW, Jacobson C, Godfrey EW, Campbell KP, Carbonetto S (1995) Distribution of alpha-dystroglycan during embryonic nerve-muscle synaptogenesis. J Cell Biol 129: 1093-1101.

9. Corbel C, Cormier F, Pourquie O, Bluestein HG (1992) BEN, a novel surface molecule of the immunoglobulin superfamily on avian hemopoietic progenitor cells shared with neural cells. Experimental Cell Research 203: 91-99.

10. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury REd (1987) Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. Science 236: 799-806.

11. Davis JQ, Lambert S, Bennett V (1996) Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. J Cell Biol 135: 1355-1367.

12. de la Rosa EJ, Kayyem JF, Roman JM, Stierhof YD, Dreyer WJ, Schwarz U (1990) Topologically restricted appearance in the developing chick retinotectal

system of Bravo, a neural surface protein: experimental modulation by environmental cues [published erratum appears in J Cell Biol 1991 Mar;112(5):1049]. J Cell Biol 111: 3087-3096.

13. DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, Thomas S, Kinetz E, Compton DL, Rojas E, Park JS, Smith C, DiStefano PS, Glass DJ, Burden SJ, Yancopoulos GD (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. Cell 85: 501-512.

14. Deyst KA, Ma J, Fallon JR (1995) Agrin: toward a molecular understanding of synapse regeneration. [Review] [81 refs]. Neurosurgery 37: 71-77.

15. Durbeej M, Larsson E, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Roberds SL, Campbell, KP, Ekblom P (1995) Non-muscle alpha-dystroglycan is involved in epithelial development. J Cell Biol 130: 79-91.

16. Ervasti JM, Campbell KP (1991) Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. Cell 66: 1121-1131.

17. Ervasti JM, Campbell KP (1993) A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. J Cell Biol 122: 809-823.

18. Faissner A, Teplow DB, Kubler D, Keilhauer G, Kinzel V, Schachner M (1985) Biosynthesis and membrane topography of the neural cell adhesion molecule L1. EMBO J 4: 3105-3113.

19. Fallon JR, Hall ZW (1994) Building synapses: agrin and dystroglycan stick together. [Review] [46 refs]. Trends in Neurosciences 17: 469-473.

20. Ferns MJ, Campanelli JT, Hoch W, Scheller RH, Hall Z (1993) The ability of agrin to cluster AChRs depends on alternative splicing and on cell surface proteoglycans. Neuron 11: 491-502.

21. Flores MV, Atkins D, Wade D, O'Sullivan WJ, Stewart TS (1997) Inhibition of Plasmodium falciparum proliferation in vitro by ribozymes. J Biol Chem 272: 16940-16945.

22. Fu AKY, Smith FD, Zhou H, Chu AH, Tsim KWK, Peng BH, Ip NY, Neuromuscular j, Receptor tk (1999) Xenopus muscle-specific kinase: molecular cloning and prominent expression in neural tissues during early embryonic development. Eur 11: 373-382.

23. Furley AJ, Morton SB, Manalo D, Karagogeos D, Dodd J, Jessell TM (1990) The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. Cell 61: 157-170.

24. Garwood J, Schnadelbach O, Clement A, Schutte K, Bach A, Faissner A (1999) DSD-1-Proteoglycan is the mouse homolog of Phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. J Neurosci 19: 3888-3899.

25. Gesemann M, Cavalli V, Denzer AJ, Brancaccio A, Schumacher B, Ruegg MA (1996) Alternative splicing of agrin alters its binding to heparin, dystroglycan, and the putative agrin receptor. Neuron 16: 755-767.

26. Gillespie SK, Balasubramanian S, Fung ET, Huganir RL (1996) Rapsyn clusters and activates the synapse-specific receptor tyrosine kinase MuSK. Neuron 16: 953-962.

27. Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, Ryan TE, Gies DR, Shah S, Mattsson K, Burden SJ, DiStefano PS, Valenzuela DM, DeChiara TM, Yancopoulos GD (1996) Agrin acts via a MuSK receptor complex. Cell 85: 513-523.

28. Godfrey EW, Nitkin RM, Wallace BG, Rubin LL, McMahan UJ (1984) Components of Torpedo electric organ and muscle that cause aggregation of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. J Cell Biol 99: 615-627.

29. Grumet M, Edelman GM (1988) Neuron-glia cell adhesion molecule interacts with neurons and astroglia via different binding mechanisms. J Cell Biol 106: 487-503.

30. Grumet M, Mauro V, Burgoon MP, Edelman GM, Cunningham BA (1991) Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. J Cell Biol 113: 1399-1412.

31. Hoch W, Campanelli JT, Harrison S, Scheller RH (1994) Structural domains of agrin required for clustering of nicotinic acetylcholine receptors. EMBO J 13: 2814-2821.

32. Hoffman S, Sorkin BC, White PC, Brackenbury R, Mailhammer RR (1982) Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. J Biol Chem 257: 7720-7729.

33. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP (1992) Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. Nature 355: 696-702.

34. Kanki JP, Chang S, Kuwada JY (1994) The molecular cloning and characterization of potential chick DM-GRASP homologs in zebrafish and mouse. J Neurobiol 25: 831-845.

35. Kayyem JF, Roman JM, de la Rosa EJ, Schwarz U, Dreyer WJ (1992) Bravo/Nr-CAM is closely related to the cell adhesion molecules L1 and Ng-CAM and has a similar heterodimer structure. J Cell Biol 118: 1259-1270.

36. Kreutzberg GW (1996) Microglia – a sensor for pathological events in the CNS. Trends in Neurosciences 19: 312-318.

37. Laessing U, Giordano S, Stecher B, Lottspeich F, Stuermer CAO (1994) Molecular characterization of fish neurolin: a growth-associated cell surface protein and member of the immunoglobulin superfamily in the fish retinotectal system with similarities to chick protein DM-GRASP/SC-1/BEN. Differentiation 56: 21-29.

38. Lehmann JM, Holzmann B, Breitbart EW, Schmiegelow P, Riethmuller G, Johnson JP (1987) Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. Cancer Res 47: 841-845.

39. Liesi P, Hager G, Dodt HU, Seppala I, Zieglgansberger W (1995) Domain-specific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum. J Neurosci Res 40: 199-206.

40. Lorenz, R. J. Biometrie - Grundbegriffe der Biometrie. [3. Auflage]. 1992. Stuttgart; Jena; New York, Gustav Fischer Verlag.

41. Ma E, Morgan R, Godfrey EW (1995) Agrin mRNA variants are differentially regulated in developing chick embryo spinal cord and sensory ganglia. J Neurobiol 26: 585-597.

42. Ma J, Nastuk MA, McKechnie BA, Fallon JR (1993) The agrin receptor. Localization in the postsynaptic membrane, interaction with agrin, and relationship to the acetylcholine receptor. J Biol Chem 268: 25108-25117.

43. Margolis RU, Margolis RK (1997) Chondroitin sulfate proteoglycans as mediators of axon growth and pathfinding. [Review] [45 refs]. Cell Tissue Res 290: 343-348.

44. Maurel P, Meyer-Puttlitz B, Flad M, Margolis RU, Margolis RK (1995) Nucleotide sequence and molecular variants of rat receptor-type protein tyrosine phosphatase-zeta/beta. DNA Seq 5: 323-328.

45. Maurel P, Rauch U, Flad M, Margolis RK, Margolis RU (1994) Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 2512-2516.

46. Mauro VP, Krushel LA, Cunningham BA, Edelman GM (1992) Homophilic and heterophilic binding activities of Nr-CAM, a nervous system cell adhesion molecule. J Cell Biol 119: 191-202.

47. Mayer B, Funke I, Seed B, Riethmuller G, Weiss E (1990) Expression of the CD6 T lymphocyte differentiation antigen in normal human brain. J Neuroimmunol 29: 193-202.

48. Morales G, Hubert M, Brummendorf T, Treubert U, Tarnok A, Schwarz U, Rathjen FG (1993) Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. Neuron 11: 1113-1122.

49. Nitkin RM, Smith MA, Magill C, Fallon JR, Yao YM, Wallace BG, McMahan UJ (1987) Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ. J Cell Biol 105: 2471-2478.

50. Paschke KA, Lottspeich F, Stuermer CAO (1992) Neurolin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration. J Cell Biol 117: 863-875.

51. Peduzzi JD, Irwin MH, Geisert EE, Jr. (1994) Distribution and characteristics of a 90 kDa protein, KG-CAM, in the rat CNS. Brain Res Mol Brain Res 640: 296-307.

52. Pourquie O, Coltey M, Thomas JL, Le Douarin NM (1990) A widely distributed antigen developmentally regulated in the nervous system. Development 109: 743-752.

53. Pourquie O, Corbel C, Le Caer JP, Rossier J, Le Douarin NM (1992a) BEN, a surface glycoprotein of the immunoglobulin superfamily, is expressed in a variety of developing systems. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 5261-5265.

54. Pourquie O, Hallonet ME, Le Douarin NM (1992b) Association of BEN glycoprotein expression with climbing fiber axonogenesis in the avian cerebellum. J Neurosci 12: 1548-1557.

55. Prince JT, Hishiyama A, Healy PA, Beasley L, Stallcup WB (1992) Expression of the F84.1 glycoprotein in the spinal cord and cranial nerves of the developing rat. Developmental Brain Research 193-201.

56. Ruegg MA, Tsim KW, Horton SE, Kroger S, Escher G, Gensch EM, McMahan, UJ (1992) The agrin gene codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution. Neuron 8: 691-699.

57. Rupp F, Payan DG, Magill-Solc C, Cowan DM, Scheller RH (1991) Structure and expression of a rat agrin. Neuron 6: 811-823.

58. Rutishauser U, Grumet M, Edelman GM (1983) Neural cell adhesion molecule mediates initial interactions between spinal cord neurons and muscle cells in culture. J Cell Biol 97: 145-152.

59. Rutishauser U, Jessell TM (1988) Cell adhesion molecules in vertebrate neural development. [Review]. Physiological Reviews 68: 819-857.

60. Rutishauser U, Thiery JP, Brackenbury R, Sela BA, Edelman GM (1976) Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. Proc Natl Acad Sci U S A 73: 577-581.

61. Santoni MJ, Barthels D, Vopper G, Boned A, Goridis C, Wille W (1989) Differential exon usage involving an unusual splicing mechanism generates at least eight types of NCAM cDNA in mouse brain. EMBO J 8: 385-392.

62. Skonier JE, Bowen MA, Aruffo A, Bajorath J (1997) CD6 recognizes the neural adhesion molecule BEN. Protein Sci 6: 1768-1770.

63. Snyder SE, Li J, Schauwecker PE, McNeill TH, Salton SR (1996) Comparison of RPTP zeta/beta, phosphacan, and trkB mRNA expression in the developing and adult rat nervous system and induction of RPTP zeta/beta and phosphacan

mRNA following brain injury. Brain Res Mol Brain Res Molecular Brain Research. 40: 79-96.

64. Stallcup WB, Beasley LL, Levine JM (1985) Antibody against nerve growth factor-inducible large external (NILE) glycoprotein labels nerve fiber tracts in the developing rat nervous system. J Neurosci 5: 1090-1101.

65. Stoeckli ET, Landmesser LT (1995) Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. Neuron 14: 1165-1179.

66. Sugiyama J, Bowen DC, Hall ZW (1994) Dystroglycan binds nerve and muscle agrin. Neuron 13: 103-115.

67. Suter DM, Pollerberg GE, Buchstaller A, Giger RJ, Dreyer WJ, Sonderegger P (1995) Binding between the neural cell adhesion molecules axonin-1 and Nr-CAM/Bravo is involved in neuron-glia interaction. J Cell Biol 131: 1067-1081.

68. Tanaka H, Matsui T, Agata A, Tomura M, Kubota I, McFarland KC, Kohr B, Lee A, Phillips HS, Shelton DL (1991) Molecular cloning and expression of a novel adhesion molecule, SC1. Neuron 7: 535-545.

69. Thiery JP, Brackenbury R, Rutishauser U, Edelman GM (1977) Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. J Biol Chem 252: 6841-6845.

70. Tsen G, Halfter W, Kroger S, Cole GJ (1995a) Agrin is a heparan sulfate proteoglycan. J Biol Chem 270: 3392-3399.

71. Tsen G, Napier A, Halfter W, Cole GJ (1995b) Identification of a novel alternatively spliced agrin mRNA that is preferentially expressed in non-neuronal cells. J Biol Chem 270: 15934-15937.

72. Valenzuela DM, Stitt TN, DiStefano PS, Rojas E, Mattsson K, Compton, DL, Nunez L, Park JS, Stark JL, Gies DR, Thomas S, Lebeau MM, Fernald AA, Copeland NG, Jenkins NA, Burden SJ, Glass DJ, Yancopoulos, GD (1995) Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage – expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. Neuron 15: 573-584.

73. Volkmer H, Leuschner R, Zacharias U, Rathjen FG (1996) Neurofascin induces neurites by heterophilic interactions with axonal NrCAM while NrCAM requires F11 on the axonal surface to extend neurites. J Cell Biol 135: 1059-1069.