

Untersuchung der differentiellen Genexpression in sensorischen und motorischen Nervenästen des peripheren Nervensystems

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Chem. Meliha Karsak
geboren am 19.4.1971 in Neustadt a. Rbge.

2001

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferentin: Prof. Dr. Melitta Schachner

Tag der Promotion: 16. Februar 2001

Anneme ve babama

1. Zusammenfassung.....	0
1.1 Abstract.....	1
1.2 Schlagworte.....	1
2. Einleitung.....	2
2.1 Schwann-Zellen in der Entwicklung und der Regeneration.....	3
2.2 Entwicklungs- und regenerationsassoziierte Moleküle	6
2.2.1 Cytokine.....	6
2.2.2 Zelladhäsionsmoleküle.....	6
2.3 Präferenzielle Motorische Reinnervation (PMR).....	8
2.4 Rolle von Kohlenhydraten in der Regeneration des PNS.....	9
2.4.1 Das HNK-1-Kohlenhydrat.....	9
2.4.2 PSA-NCAM.....	10
2.5 Erkrankungen des PNS: Neuropathien und neuromuskuläre Atrophien.....	11
2.6 Methoden zur Identifizierung differenzieller Genexpression.....	13
2.7 Zielsetzung der Arbeit: Untersuchung der differenziellen Genexpression	
in sensorischen und motorischen Nervenästen des Femoralis.....	14
3. Material und Methoden.....	15
3.1 Puffer und andere Verbrauchsmaterialien.....	15
3.1.1 Vektoren.....	16
3.1.2 Antikörper.....	16
3.1.3 Oligonukleotide.....	16
3.2 Mikrobiologische Methoden.....	17
3.2.1 Allgemeine Arbeiten mit Bakterien.....	17
3.2.2 Transformation kompetenter Bakterien	17
3.2.3 Plasmid-Isolierung.....	17
3.3 DNA-Techniken.....	17
3.3.1 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	17
3.3.2 RT-PCR.....	18
3.3.3 Herstellung der internen Standards für die quantitative RT-PCR.....	20
3.3.4 5'-RACE PCR mit dem Marathon-Kit (Clontech).....	20
3.3.5 Mutationsscreening.....	21
3.3.6 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	21
3.3.7 Agarosegelelektrophorese von DNA.....	21
3.3.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	21
3.3.9 Restriktionsverdau von DNA	22
3.3.10 Dephosphorylierung von DNA.....	22
3.3.11 Mikrodialyse von DNA.....	22

3.3.12 Ligation von DNA-Fragmenten	22
3.3.13 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	22
3.3.14 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren.....	23
3.3.15 Ethanol-fällung von Nukleinsäuren.....	23
3.4 RNA: Molekularbiologische Methoden.....	23
3.4.1 Arbeiten mit RNA.....	23
3.4.2 Präparation von Gesamt-RNA.....	23
3.4.3 Isolierung von mRNA.....	24
3.4.4 DNase-Behandlung.....	24
3.4.5 cDNA-Synthese, Reverse Transkription.....	24
3.4.6 RNA-Gelelektrophorese und RNA-Transfer (Northern Blot).....	25
3.4.7 Hybridisierung von Northern Blots.....	25
3.4.8 In vitro Transkription.....	26
3.5 Differential Display.....	27
3.5.1 Entnahme und Vorbereitung des zu untersuchenden Gewebes.....	27
3.5.2 RNA-Präparation (siehe Abschnitt 3.4.1).....	28
3.5.3 DNase-Verdau (siehe Abschnitt 3.4.4).....	28
3.5.4 cDNA-Synthese	28
3.5.5 Differential Display PCR.....	28
3.5.6 Gelelektrophoretische Auftrennung im denaturierenden Polyacrylamid- Harnstoffgel.....	29
3.5.7 Ausschneiden der Banden, Elution der cDNA, Reamplifikation und Klonierung.....	29
3.5.8 Sequenzierung und Sequenzanalyse der klonierten cDNA-Fragmente.....	30
3.6 In-situ-Hybridisierung.....	30
3.6.1 Herstellung der Gefrierschnitte.....	30
3.6.2 Acetylierung.....	30
3.6.3 Prähybridisierung.....	30
3.6.4 Dipping.....	31
3.7 Zellbiologische Methoden.....	31
3.7.1 Trypsinieren von Zellen.....	32
3.7.2 Einfrieren von Zellen.....	32
3.7.3 Revitalisierung von Zellen.....	32
3.7.4 Transiente Transfektion.....	32
3.8 Biochemische Methoden.....	32
3.8.1 Herstellung von Homogenaten aus Zellkulturzellen.....	32
3.8.2 Fraktionierung von Zellkulturzellen.....	33
3.8.3 Präparation von Hirnhomogenaten.....	33

3.8.4 Proteinreinigung über die Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose.....	33
3.8.5 Herstellung von Peptidantikörpern.....	33
3.8.6 Proteinbestimmung.....	34
3.8.7 Fällung von Proteinen.....	34
3.8.8 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
3.8.9 Gelfärbung mit Coomassie.....	35
3.8.10 Western Blot-Analyse.....	35
3.9 Indirekte Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen.....	35
3.10 Indirekte Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten.....	36
3.11 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	36
3.12 Datenbankanalysen.....	37
4. Ergebnisse.....	38
4.1 Differential Display Screening	38
4.2 Verifizierung der differentiellen Expression.....	40
4.2.1 Untersuchungen mittels RT-PCR.....	41
4.2.2 Herstellung interner Standards für die kompetitive RT-PCR.....	42
4.2.3 Kompetitive RT-PCR zur Untersuchung differentieller Expression von G3-1, G3-2, G3-3 und NG4-1.....	43
4.2.4 Northern Blot-Analyse zur Untersuchung der differentiellen Expression.....	44
4.2.5 Semiquantitative RT-PCR an regenerierten Ratten-Femoralisnerven.....	46
4.3 Weitere Charakterisierungen des Fragmentes G3-1 (SPARC)	47
4.3.1 Identifizierung von SPARC.....	47
4.3.2 Immunologische Untersuchung der SPARC-Expression im <i>N. femoralis</i>	48
4.4 Klonierung und Charakterisierung des m1-Gens	51
4.4.1 Klonierung der vollständigen cDNA von m1 durch Datenbank- und PCR-Analysen.....	51
4.4.2 Untersuchung der m1 mRNA-Expression; Charakterisierung der mRNA-Expression im Multiple Tissue Northern Blot (MTN ^R) und Multiple Tissue Array (MTE TM).....	56
4.4.3 Untersuchungen der m1-mRNA-Expression durch in-situ-Hybridisierungen an Embryonen und am adulten Gehirn.....	58
4.4.4 Untersuchung der Protein-Expression; Herstellung und Charakterisierung eines Peptid-Antikörpers.....	61
4.4.5 Überprüfung der Antiseren durch Western Blot-Analyse.....	61
4.4.6 Spezifität des anti-m1-Antikörpers.....	61
4.4.7 Transiente Transfektion	62

4.4.8 Subzelluläre Lokalisation des m1-Proteins; Zellfraktionierung von CHO-Zellen.....	63
4.4.9 Immunzytochemische Untersuchungen zur m1-Protein Expression.....	65
4.4.10 Untersuchung der Gewebeverteilung des m1-Protein im PNS und ZNS.....	65
4.4.11 Gibt es eine menschliche Erkrankung, für die das m1-Gen verantwortlich ist?.....	69
4.4.12 Aufklärung der genomischen Struktur des m1-Gens.....	69
4.4.13 Chromosomale Lokalisation des m1-Gens.....	70
4.4.14 Untersuchungen des m1-Gens als Kandidatengen für Krankheiten auf dem Chromosom 11q.....	71
5. Diskussion.....	74
5.1 Methoden zum Screenen differenzieller Expression.....	74
5.2 Bewertung des Differential Display Screens.....	77
5.3 Verifizierungsexperimente zur Überprüfung der differentiellen Expression.....	79
5.3.1 RT-PCR Analysen.....	79
5.3.2 Northern Blot-Analyse.....	80
5.4 Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz mit dem anti-m1-Antikörper und dem anti-SPARC-Antikörper am N. femoralis.....	81
5.5 Identifizierung von SPARC, einem entwicklungs- und regenerationsassoziiertem Protein im Nervensystem.....	83
5.6 Ergebnisse der Klonierung und Charakterisierung des m1-Gens.....	85
5.6.1 m1-mRNA-Expressionsmuster durch Northern und Dot Blot-Analyse sowie in-situ- Hybridisierung.....	85
5.6.2 m1-Proteinexpression.....	87
5.6.3 Untersuchung des m1-Gens als Kandidatengen für Krankheiten auf Chromosom 11q23.....	89
6. Ausblick.....	91
7. Literaturverzeichnis.....	92
8. Anhang.....	99

1. Zusammenfassung

Krankhafte Veränderungen im peripheren Nervensystem (PNS) sind häufig irreversibel bzw. resultieren oft lediglich in einer inkompletten Wiederherstellung der Funktion des betroffenen Nerven. Die Erforschung der molekularen Grundlagen der Regeneration im PNS versprechen eine verbesserte Therapie peripherer Neuropathien, wobei insbesondere die Optimierung der Spezifität der Regeneration z. B. im Sinne einer präferenziellen motorischen Reinnervation (PMR) von Interesse ist. In der vorliegenden Arbeit wurden differenziell exprimierte Gene in sensorischen und motorischen Nervenästen des PNS gesucht, die für die PMR wichtig sein könnten.

An Kalbs-Femoralisnerven wurden im Differential Display acht Genfragmente identifiziert, die im motorischen Ast stärker exprimiert waren. Bei einem dieser Gene handelte es sich um SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*), welches auch in regenerierten Mausnerven im Verhältnis von ca. 4:5 vermehrt im motorischen Ast identifiziert wurde (Kollaboration mit der Firma LION Bioscience AG). SPARC kodiert ein extrazelluläres Glycoprotein mit wichtigen Funktionen in der Embryo- und Morphogenese. Das Protein wurde mit spezifischen Antikörpern im PNS in der endoneuralen Scheide, im Zytoplasma nicht-myelinisierender Schwann-Zellen und in Axonen lokalisiert, was eine Beteiligung des Proteins an der Regeneration möglich macht. Die zweifach unabhängig gefundene differenzielle Expression von SPARC konnte in Kalb- und Mausnerven mit Hilfe weniger sensitiver Techniken wie der RT-PCR, dem Northern Blot und der Immunhistochemie nicht nachgewiesen werden, sodass u. U. lediglich eine sehr diskrete differenzielle Expression von SPARC für die Spezifität der Regeneration von Bedeutung ist. Die weiteren sieben Genfragmente, die im Differential Display gefunden wurden, ließen sich keinem bekannten Gen zuordnen. Ausgehend von einem der Fragmente wurde ein Gen (m1) vollständig im Menschen und der Maus kloniert und detailliert charakterisiert. Beide Proteine bestehen aus 229 Aminosäuren (32 kDa) und sind zu 98% identisch. Das humane Gen ist 10,5 kb groß, besitzt sieben kodierende Exone und liegt beim Menschen auf Chromosom 11q23. Das Gen wurde als Kandidatengen für zwei verschiedene, auf 11q lokalisierte neurologische Krankheiten getestet (CMT4B und SMARD). Direktsequenzierungen von PCR-Fragmenten der kodierenden Region von m1, zeigten bei Patienten keine ursächlichen Mutationen. Die mRNA-Expression wurde mit Northern- und Dot Blot-Analysen sowie *in-situ*-Hybridisierungen untersucht. Das Transkript wurde vom frühen embryonalen Stadium bis zum adulten Individuum ubiquitär detektiert. Ein Peptid-Antikörper wurde generiert. Seine Spezifität wurde im Western Blot getestet. Die subzelluläre Lokalisation im Zellkern konnte durch Zellfraktionierung und Immunzytochemie bestimmt werden. Im PNS wurde m1 in den Zellkernen der Schwann-Zellen, im Perineurium und im Axon identifiziert. Das m1-Protein wurde auch im Rückenmark und im Gehirn in der postnatalen Entwicklung und im adulten Stadium entdeckt. Wie bei SPARC konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen sensorischen und motorischen Ästen nachgewiesen werden, sodass eine mögliche Beteiligung von m1 an der spezifischen Nervenregeneration bis jetzt nicht bewiesen werden konnte. Die extrem hohe, evolutionäre Konservierung von m1 mit identifizierten Orthologen z. B. in *Drosophila melanogaster* und *C. elegans* legt jedoch eine wichtige Funktion von m1 in grundsätzlichen Vorgängen nahe.

1.1 Abstract

Disorders affecting the peripheral nerve are often irreversible or may just result in an incomplete functional regeneration. The better understanding of the molecular mechanisms underlying regenerative processes in the peripheral nervous system (PNS) may be helpful to improve therapeutic approaches. This may be especially true for the optimization of the specificity of regeneration as for example found in the preferential motor reinnervation (PMR). In this study, a differential gene expression between sensory and motor branches of the PNS should be analyzed to identify genes involved in PMR.

In a differential display screen of femoral nerves of four days old calves, eight gene fragments with increased expression in the motor branch were found. One fragment could be identified as SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine). A parallel approach using regenerated mouse nerves, also showed a higher expression of SPARC in the motor branch in a ratio of 5:4 (collaboration with LION bioscience AG). SPARC is an extracellular glycoprotein serving important functions in embryo- and morphogenesis. The localization of SPARC in the endoneurium, the cytoplasm of non-myelinating Schwann cells, and axons suggests its involvement in regenerative processes. Although no differential expression of SPARC could be shown in calf and mouse nerves applying less sensitive methods like RT-PCR, northern blot hybridization and immunohistochemistry, a moderate difference of SPARC expression may be important for the specificity of regeneration.

The remaining seven gene fragments did not belong to known genes. Starting from one fragment, a novel human gene (m1) and its mouse orthologue were cloned and characterized. Both encode for proteins of 229 amino acids (32 kDa) and are 98% identical to each other. The human gene spans about 10.5 kb of genomic sequence, contains 7 exons, and is localized on chromosome 11q23. The m1-gene was tested as candidate gene for two different neurological diseases (CMT4B and SMARD) mapped to 11q. The coding region of m1 did not show any causative mutations making an involvement of m1 in disease pathogenesis unlikely.

The tissue expression of m1 was analyzed by northern and dot blot hybridization. The transcript could be detected ubiquitously throughout development and in the adult state. An antibody against m1 was generated. Its specificity was tested in western blots. A nuclear localization of the m1-protein was shown by cell fractionation and immunocytochemistry. In the PNS, m1 was detected in the nucleus of Schwann cells, the perineurium and the axons. The m1-protein was also present in the spinal cord and brain during postnatal development and in the adult state. Since no significant differences in m1-expression in sensory versus motor branches could be detected, a possible involvement of m1 concerning specific regeneration remains unclear. Further highly conserved m1 orthologues were identified in *Drosophila melanogaster* and *C. elegans* suggesting a role of m1 for basic physiological processes.

1.2 Schlagworte

PNS, Regeneration, Differential Display

PNS, regeneration, differential display

2. Einleitung

Die Aufklärung der molekularen Reaktionen auf eine Verletzung im Nervensystem gehört zu den großen Herausforderungen und wichtigen Fragestellungen in der modernen Neurobiologie. In den letzten Jahrzehnten versuchte die Forschung, die Signalmechanismen für neuronales Überleben und Neuritenwachstum sowohl im zentralen Nervensystem (ZNS) als auch im peripheren Nervensystem (PNS) zu verstehen und darüberhinaus den Einfluss einer Verletzung auf diese Mechanismen zu überprüfen. Es ist schon lange bekannt, dass das PNS prinzipiell zu einer posttraumatischen Regeneration befähigt ist, während das ZNS hierzu nicht in der Lage ist. Ein langfristiges Ziel des Forschungsinteresses ist es, irreversible und häufig verheerende Folgen einer ZNS-Verletzung wie das Rückenmarkstrauma oder den Schlaganfall zu überwinden und eine vollständig funktionstüchtige Wiederherstellung von Verletzungen im PNS zu erreichen.

Verletzungen von peripheren Nerven sind sehr häufig. In den Vereinigten Staaten beispielsweise treten jährlich 15 Millionen Verletzungen der oberen Extremitäten auf (Kreiger et al., 1981). Von diesen zeigen 40.000 eine Verletzung peripherer Nerven, wobei 20.000 operativ behandelt werden müssen. Trotz großer Fortschritte in der Mikrochirurgie wird aber bisher bei nur etwa 10% der operierten Erwachsenen eine vollständig funktionstüchtige Wiederherstellung der Nerven erreicht (Brushart, 1998). Unter vollständig funktionstüchtiger Wiederherstellung versteht man hierbei im wesentlichen, dass motorische Axone den ursprünglich innervierten Muskel und sensible Axone das ehemals versorgte Hautareal reinnervieren würden. Ist dies nicht der Fall und innerviert z.B. ein sensibler Nerv einen Muskel, kommt es zu Fehlfunktionen bzw. Funktionsausfällen.

Um dies zu verhindern, ist es von besonderem Interesse, die Prinzipien der spezifischen peripheren Reinnervation zu erforschen. Hierbei ist die Entdeckung der so genannten präferenziellen motorischen Reinnervation (PMR) nennenswert (Abschnitt 2.3). Wenn die molekularen Mechanismen dieses Phänomens bekannt wären, könnten die Erkenntnisse für die Entwicklung bzw. Optimierung einer spezifischen Therapie benutzt werden.

Das neuronale Überleben ist die Grundvoraussetzung für die Regeneration. Es wird durch eine Reihe von extrinsischen trophischen Faktoren, wie Neurotrophinen, Cytokinen und Wachstumsfaktoren, ermöglicht. Zusätzlich muss das Neuron selbst in einen Wachstumsmodus umschalten und wachstumsassoziierte Proteine wie z. B. GAP-43 (*growth-associated protein 43*), Aktin und Tubulin, aber auch Neuropeptide und Cytokine exprimieren.

Neben der intrinsischen Regenerationsfähigkeit der Axone sind auch nicht-neuronale Faktoren bzw. Zellen maßgeblich an der Regeneration beteiligt, wobei hier im Wesentlichen die Schwann-Zellen zu nennen sind. Als Schwann-Zellen bezeichnet man die Zellen, die die Axone umhüllen und somit im direkten Kontakt mit ihnen stehen. Die Funktion der Schwann-Zellen für die Axone ist vielfältig und beinhaltet z.B. eine

mechanische Schutzfunktion und eine trophische Funktion. Weiterhin sind die Schwann-Zellen bedeutend für die Regeneration: So produzieren diese Zellen nach einer Läsion z.B. erhöhte Mengen bestimmter Zelloberflächenmoleküle und extrazellulärer Matrixproteine (Abschnitt 2.2.2) sowie neurotrophe Faktoren und deren Rezeptoren (Abschnitt 2.2.1).

In der hier vorgelegten Untersuchung wurde nach differenziell exprimierten Genen zwischen sensorischen und motorischen Nervenästen des PNS gescreent, um weitere Hinweise zur molekularen Aufklärung der PMR zu erhalten. Denn es ist gut möglich, dass solche unterschiedlich exprimierten Gene eine Rolle in der spezifischen Regeneration spielen. Im Folgenden wird nun detailliert auf verschiedene Aspekte der Funktion der Schwann-Zellen eingegangen, da diese die Grundlagen für die durchgeführten Experimente bilden. Dieses schließt die Rolle der Schwann-Zellen in der Entwicklung und der Regeneration (Abschnitt 2.1), die bekannten daran beteiligten Moleküle (Abschnitt 2.2) sowie krankhafte Veränderungen der Schwann-Zell-Funktion ein (Abschnitt 2.5).

2.1 Schwann-Zellen in der Entwicklung und der Regeneration

Schwann-Zellen bilden die Glia im PNS. Sie sind eng mit den Axonen verbunden und können in verschiedenen Erscheinungsformen vorkommen. Es gibt myelinbildende und nicht myelinbildende Schwann-Zellen (Abb.1) . Beide Zellformen entstehen in der Entwicklung aus einer gemeinsamen glialen Vorläuferzelle. Diese Vorläuferzellen sind flache Zellen, die bereits die auswachsenden Axone begleiten. Sie lagern sich an die Seiten der Axonbündel und teilweise bereits an einzelne Axone an. Durch verstärkte Zellteilung trennen die glialen Zellen einzelne Axongruppen vom Hauptstrang und bilden somit Axon-Schwann-Zell-Familien (Jessen and Jessen, 1990). Bei der weiteren Entwicklung sterben einige Axone, und die Anzahl der Glia nimmt sowohl absolut als auch relativ weiter zu. Teilweise gibt es bereits Axone, die separat von einer Schwann-Zelle umhüllt sind. Erst in diesem Stadium bilden die glialen Zellen eine Basallamina aus. Dadurch wird ein direkter Kontakt zu den Axonen ermöglicht. Wenn die Bildung der Basallamina verhindert wird, ist die gesamte Weiterentwicklung von Schwann-Zellen blockiert (Bunge et al., 1986). Die Verbindung von Schwann-Zellen mit Axonen in Ischiasnerven von Ratten liegt bereits bei der Geburt vor (Jessen and Jessen, 1990). Im späteren Verlauf werden die Schwann-Zellen, die eine Gruppe von Axonen umhüllen, zu nicht-myelinisierenden und die Schwann-Zellen, die nur ein Axon umhüllen, zu myelinisierenden Schwann-Zellen.

Die Myelinisierung erfolgt erst, wenn die Axone ihre Zielorgane erreicht haben. Es ist möglich, durch molekulare Signale eine nicht-myelinisierte Faser in eine myelinisierte zu konvertieren (Jessen and Jessen, 1990). Als molekulare Marker, die in nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen und den Vorläuferzellen exprimiert werden, sind z.B. der NGF-Rezeptor (*nerve growth factor receptor*), NCAM (*neural cell adhesion molecule*) und L1 zu nennen, wohingegen z.B. P0, MBP (*myelin basic protein*) und MAG (*myelin associated glycoprotein*) nur in myelinisierenden Schwann-Zellen vorkommen.

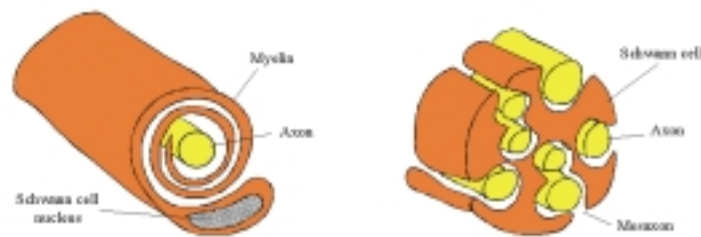


Abb. 1; Darstellung einer myelinisierenden und nicht-myelinisierenden Schwann-Zelle. Die Myelinschicht einer myelinisierenden Schwann-Zelle isoliert ein einzelnes Axon, sodass die Rate der elektrischen Reizweiterleitung erhöht wird. Durch das konzentrische Umwickeln der Schwann-Zellmembran um ein Axon, wird das Myelin gebildet. Dagegen umfassen nicht-myelinisierende Schwann-Zellen mehrere Axone. Hier erfolgt eine Invagination der Axone in oberflächliche Mulden des Schwann-Zell-Zytoplasmas.

Was passiert nun, wenn ein Nerv im adulten Individuum z.B. durch ein traumatisches Ereignis geschädigt wird? Bereits vor über einem Jahrhundert wurde die Fähigkeit der peripheren Nerven zur Regeneration und zum Reinnervieren des Zielorgans entdeckt.

Dabei ist die funktionelle Wiederherstellung schwächer, wenn eine Läsion in der Nähe des Zellkörpers erfolgt, als wenn die Beschädigung im entfernten Axon stattfindet (Fu and Gordon, 1997). Eine Beschädigung kann dabei z.B. eine Quetschung (*crush*) oder eine Durchtrennung (Transektion) des Nerven sein. Der Unterschied zwischen diesen Verletzungen besteht darin, dass bei einer Quetschung die Verbindung zwischen dem proximalen Ende (zum neuronalen Zellkörper hin) und dem distalen Ende (zum Zielorgan hin) des Nerven durch die endoneurale Scheide weiterhin gegeben ist. Bei einer vollständigen Durchtrennung des Nerven ist die Reinnervation oft verhindert und am Nervenende tritt häufig ein Neurom auf (Stoll and Muller, 1999). In beiden Läsionsarten kommt es zur Wallerschen Degeneration, d.h. die distalen Nervenenden verkümmern. Wenn die neuronalen Zellkörper nicht verletzt werden, kommt es bei der Wallerschen Degeneration für kurze Zeit zu einem Ausfluss des Axoplasmas. Dann zieht sich das Axon zurück und das Axoplasma scheint das verletzte Axon abzudichten. Durch diese Stauung des axonalen Materials kommt es zu einem Anschwellen des Axons (Dyson, 1995). Die Spitze des proximalen Stumpfes und der gesamte distale Bereich sind gekennzeichnet durch eine Myelinolyse und den Abbau des axonalen Zytoskeletts (Dyson, 1995). Dieser Vorgang wird vermutlich durch einen Ca^{2+} -Einstrom in die beschädigten Axone hervorgerufen. Die hohe Ca^{2+} -Konzentration führt wahrscheinlich zu einer Aktivierung von Proteasen, die für die Zerstörung der axoplasmatischen Mikrotuben und der Neurofilamente verantwortlich sind (Schlaepfer, 1974). Der Myelinabbau erfolgt in der charakteristischen Perlkette, den Myelin-*ovoids*, wobei die lamellaren Trümmer und die Lipidtröpfchen durch Phagozytose entfernt werden. Es wurde allerdings beobachtet, dass der Myelinabbau schon vor dem Erscheinen von Makrophagen beginnt (Stoll et al., 1989). Vermutlich erfolgt eine Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Phospholipase A_2 (PLA $_2$) in den Schwann-Zellen (Paul and Gregson, 1992), die für den Lipidabbau verantwortlich sein könnte.

Durch die phagozytotische Aktivität der Makrophagen wird das Myelin im distalen Stumpf entfernt und hierdurch erst eine Regeneration des Nerves ermöglicht. So wurde gezeigt, dass nicht-degradierte distale Nervenenden und Myelin inhibitorisch auf die Regeneration und das Neuritenwachstum wirken (Brown et al., 1991; Langley and Anderson, 1904). Als inhibierende Moleküle scheinen Myelinproteine wie z.B. MAG in Frage zu kommen (Schafer et al., 1996). Die vakante endoneurale Scheide des distalen Stumpfes dient als „Leitfaden“ für neu auswachsende Schwann-Zellen und regenerierende Axone.

Ganz allgemein wird bei der Regeneration auf molekulare Mechanismen zurückgegriffen, die schon bei der embryonalen Entwicklung zu beobachten sind. In der Regeneration ist es von besonderer Wichtigkeit, ob die Basallamina der Schwann-Zellen noch als Verbindung zwischen dem proximalen und den distalen Nervenenden vorhanden ist, wie bei einem *crush*, oder getrennt ist, wie bei einer Transektion. Im proximalen Stumpf entstehen durch erneute Zellteilung nach einem *crush* nicht-myelinbildende Schwann-Zellen, die sich während der Migration an der Basallamina orientieren. Für diesen Prozess sind zunächst Faktoren notwendig, die die Proliferation der Schwann-Zellen stimulieren. Diese mitogenen Substanzen können von den Trümmern der Wallerschen Degeneration stammen, also vom Axon oder Myelin (Baichwal and DeVries, 1989). Auch Cytokine wie TGF- β (*transforming growth factor beta*) wirken wachstumsfördernd (Ridley et al., 1989). Außerdem werden gliale Wachstumsfaktoren, z.B. GGF (*glial growth factor*) und Neureguline in regenerierenden sensorischen und motorischen Systemen stark exprimiert (Cohen et al., 1992). Es werden so genannte Büngner'sche Banden aus aneinander gereihten Schwann-Zellen gebildet (Fu and Gordon, 1997). Das Wiederauswachsen der Neuriten erfolgt in diese Rohre (Cajal, 1928). Die molekulare Grundlage für diese axonale Regeneration entlang der Schwann-Zellen bilden die Adhäsionsmoleküle. Laminin als Hauptkomponente der Basallamina der Schwann-Zellen und auch die Zelladhäsionsmoleküle NCAM, L1 und N-Cadherin auf der Zelloberfläche der glialen Zellen fördern das Neuritenwachstum (Bunge and Hopkins, 1990; Miragall et al., 1989). Des Weiteren exprimieren die Schwann-Zellen im distalen Stumpf verstärkt neurotrophe Faktoren wie NGF, BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) und CNTF (*ciliary-derived neurotrophic factor*) (Korsching, 1993).

2.2 Entwicklungs - und regenerationsassoziierte Moleküle

2.2.1 Cytokine

Die Familie der Cytokine ist eine große, heterogene Gruppe von Proteinen, die an der Aktivierung von immunologischen und inflammatorischen Reaktionen beteiligt sind und damit das Überleben von Neuronen unterstützen. Cytokine sind unter anderem Interleukine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Neurotrophine (Ebadi et al., 1997; Frostick et al., 1998).

Die Neurotrophine wie NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 (*neurotrophin 3 bzw. 4/5*) binden an hoch-affine Rezeptor-Tyrosinkinasen, an die Trks und einen niedrig-affinen NGF-Rezeptor, p75 (Lindsay et al., 1994). Alle Neurotrophine (bis auf NT-3) werden im distalen peripheren Nervenende nach einer Läsion hochreguliert (Funakoshi et al., 1993). Auch der niedrig-affine NGF-Rezeptor p75 ist nach einer Verletzung in Motoneuronen stark exprimiert.

Die Schwann-Zellen im distalen Bereich exprimieren ebenfalls den NGF-Rezeptor p75, wodurch eine Akkumulation von Neurotrophinen erfolgen kann, die so den Trk-Rezeptoren der regenerierenden Axone angeboten werden können (Taniuchi et al., 1988). Neurotrophine haben einen Einfluss auf die Regenerationsrate von Nerven (Spector et al., 1993). Der Einfluss von Neurotrophinen auf die Regeneration scheint indirekt durch Verstärkung der Migration von nicht-neuralen Zellen (Anton et al., 1994) und einen verbesserten Blutfluss aufgrund erhöhter Angiogenese (Santos et al., 1991) zustandezukommen.

Das Neurotrophin NGF steigert neben seiner direkten trophischen Wirkung unter anderem auch die Expression des Zelladhäsionsmoleküls L1 in regenerierenden Axonen (Friedlander et al., 1986) und kultivierten Schwann-Zellen (Seilheimer and Schachner, 1987), wodurch eine erhöhte Adhäsion und somit ein verbessertes Wachstum zustande kommt.

2.2.2 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle sind sowohl für Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen als auch zwischen Zelle und der sie umgebenden Matrix verantwortlich. Auch im peripheren Nervensystem sind diese Moleküle für die Adhäsion zwischen Axon und Axon, Axon und Schwann-Zelle und Axon und extrazellulärer Matrix beteiligt und regulieren somit das Neuritenwachstum in den distalen Stumpf. Diese Ligand-Rezeptor-Aktionen können entweder zu adhäsiven bzw. neuritenwachstumsfördernden Reaktionen in der Zelle als auch zu repulsiven Antworten, die Zellinteraktionen und Neuritenwachstum verhindern können, führen. Es existieren drei Haupt-Proteinfamilien, zu denen viele neurale Zelladhäsionsmoleküle gehören. Die erste Familie ist die Familie der Ca^{2+} -abhängigen Cadherine, wie z.B. das N-Cadherin (neurales Cadherin). Ca^{2+} -abhängige Cadherine liegen an der Oberfläche benachbarter Zellen und halten diese durch homophile

Wechselwirkungen zusammen (Bixby et al., 1988; Kemler, 1992). Die meisten Zellen besitzen außerdem Ca^{2+} -unabhängige Zell-Zell-Adhäsionssysteme, die vorwiegend aus Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie) bestehen (Edelman, 1987). Diese Ig-artigen Zelladhäsionsproteine wie MAG, L1 und NCAM verbinden die Zellen durch homophile und heterophile Wechselwirkungen. Die dritte Familie wird von Integrinen gebildet, die aus Heterodimeren bestehen und Interaktionen zwischen der Zelloberfläche und Molekülen in der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Fibronectin und Tenascin-C, vermitteln (Albelda and Buck, 1990; Pesheva et al., 1987).

Wie bereits im Abschnitt über Schwann-Zellen beschrieben wurde, werden die Ig-artigen Proteine L1 und NCAM hauptsächlich von nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen exprimiert und MAG nur von myelinisierenden Schwann-Zellen. MAG wirkt auf das Neuritenwachstum inhibierend (Schafer et al., 1996). L1 und NCAM werden dagegen auch stark im Wachstumskegel der regenerierenden Axone exprimiert (Martini and Schachner, 1988) und sind wichtig bei der Interaktion zwischen den regenerierenden Axonen und den Schwann-Zellen im endoneuralen Rohr des distalen Stumpfes. *In vitro*-Experimente zeigten, dass Antikörper gegen L1 und NCAM das Neuritenwachstum stark inhibieren (Bixby et al., 1988; Kleitman et al., 1988; Seilheimer and Schachner, 1988). Auch der Antikörper gegen N-Cadherin kann das Neuritenwachstum einschränken (Neugebauer et al., 1988). N-Cadherin ist insbesondere stark in den Membranen lokalisiert, an denen der Kontakt zwischen Axonen oder Axon und Schwann-Zelle herrscht (Shibuya et al., 1995). Die Adhäsionsproteine der extrazellulären Matrix werden von Schwann-Zellen und Fibroblasten synthetisiert und sezerniert. *In vivo* Experimente zeigten, dass z.B. Laminin essenziell für das axonale Auswachsen von peripheren Nerven durch künstliche Silikon- und Kollagen-Rohre ist (Kauppila et al., 1993). Tenascin-C ist normalerweise um die Ranvier'schen Schnürringe und im Perineurium lokalisiert. Nach einer Läsion wird das Molekül im gesamten distalen Stumpf, am Ende des proximalen Stumpfes und im Bereich zwischen beiden Nervenenden stark exprimiert (Martini et al., 1990). Tenascin ist ein wichtiges Protein in der Wallerschen Degeneration und der Proliferation der Schwann-Zellen. Vermutlich wird die Tenascin-C Expression stimuliert, sobald der Kontakt von der Schwann-Zelle zum Axon nicht mehr vorhanden ist (Martini, 1994).

2.3 Präferenzielle Motorische Reinnervation (PMR)

Regenerierende motorische Axone reinnervieren bevorzugt den motorischen distalen Nervenast nach einer Läsion. Dieses Phänomen wird als PMR (präferenzielle motorische Reinnervation) bezeichnet.

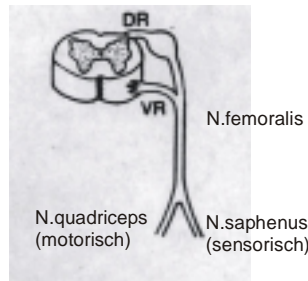


Abb. 2; Der N. femoralis ist ein peripherer Nerv. Die Zellkörper der Nerven befinden sich in den Ganglien im ZNS (VR - *ventral root*. In den VR-Ganglien befinden sich die Motoneurone; DR – *dorsal root*. In den DR-Ganglien befinden sich die sensorischen Neurone). Aus den Nervenzellen entspringen die Nervenläufer, die im oberen Bereich den noch „gemischten“ Nerv bilden. Weiter distal verzweigt sich der N. femoralis in zwei Äste, einen motorischen Nervenast (N. quadriceps) und einen sensorischen Nervenast (N. saphenus).

Zur Untersuchung dieser PMR wird der Nervus Femoralis wegen seiner optimalen anatomischen Charakteristika benutzt (Abb.2). Der periphere Nerv besteht im proximalen Bereich gleichermaßen aus sensorischen und motorischen Axonen. Er trennt sich im weiteren Verlauf in einen rein sensorischen Nervenast, dem Saphenusnerv, und einen motorischen Nervenast, den Nervenläufern in den Quadriceps-Muskel. Dieser zum größten Teil motorische Nervenast wird im weiteren als N. quadriceps bezeichnet. Experimente zur spezifischen Regeneration können am N. femoralis hervorragend durchgeführt werden. Wird eine Läsion im ungetrennten Femoralisnerv vorgenommen, haben die auswachsenden Neuriten die gleiche Auswahl an distalen motorischen wie auch sensorischen Nervenenden. Durch verschiedene Läsionsexperimente an der Maus konnte gezeigt werden, dass die motorischen Axone des Femoralis bevorzugt die alten motorischen Nervenwege reinnervieren (Brushart, 1988).

Die *Pruning*-Hypothese ist eine Möglichkeit dieses Phänomen zu erklären. Dabei wird die Annahme gemacht, dass regenerierende motorische und sensorische Neuriten jeweils Kollaterale in beide distalen Nervstümpfe auswachsen lassen. Der Unterschied zwischen beiden Neuriten ist dabei, dass die motorischen Neuriten, die in das „richtige“ (motorische) Nervenende gelangt sind, unterstützt und zum Axon aufgebaut werden. Die Nervenwüchse, die in das „falsche“, also sensorische, Ende gelangt sind, werden dagegen vernachlässigt und gehen allmählich ein. Die sensorischen Neuriten unterliegen im Gegensatz dazu keiner Selektion (Brushart, 1993). Daraus wird gefolgert, dass Schwann-Zellrohre eine spezifische Identität aufweisen, die von den regenerierenden motorischen Axonen erkannt wird und somit einen Einfluss auf deren Verhalten hat. Als molekularer Unterschied zwischen beiden Nervenästen des Femoralis konnte das HNK-1-Kohlenhydrat identifiziert werden. Es wird hauptsächlich in den motorischen Nervenästen

exprimiert (Low et al., 1994) und hat einen Einfluss auf die PMR (Martini et al., 1994) (Abschnitt 2.4.1).

2.4 Rolle von Kohlenhydraten in der Regeneration des PNS

2.4.1 Das HNK-1-Kohlenhydrat

Das Kohlenhydrat wurde durch einen von Abo und Balch (Abo and Balch, 1981) beschriebenen monoklonalen IgM-Antikörper entdeckt. Dieser erkennt ein Epitop auf humanen *natural killer cells*, wodurch es den Namen HNK-1 bekam (Kruse et al., 1984). Das HNK-1-Kohlenhydrat ist ein Trisaccharid, das aus einer 3'-sulfatierten Glucuronsäure und einer Lactosaminygruppe besteht (Voshol et al., 1996). Es wird auf vielen neuronalen Zellerkennungsmolekülen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert, wie P0 (Bollensen and Schachner, 1987), MAG (McGarry et al., 1983), NCAM (Faissner, 1987), L1 (Gennarini et al., 1990), F3/F11/Contactin (Kruse et al., 1984), aber auch auf Integrinen (Pesheva et al., 1987), einigen Proteoglycanen (Gowda et al., 1989) und den extrazellulären Matrixmolekülen Tenascin-C und Tenascin-R (Kruse et al., 1985). Da nicht alle Zellerkennungsmoleküle grundsätzlich mit dem HNK-1-Kohlenhydrat ausgestattet sind, muss es eine zeitliche Regulation der Kohlenhydratsynthese geben, die von der Synthese des Proteinrückgrates unabhängig ist (Schachner and Martini, 1995).

Das HNK-1-Kohlenhydrat scheint an einer Vielzahl unterschiedlicher Zellerkennungsprozesse beteiligt zu sein, die unter anderem die embryonale Entwicklung und die Regeneration des Nervensystems betreffen. Die Zell-Zell-Adhäsion durch Adhäsionsmoleküle kann auch über homophile Bindungen des HNK-1-Kohlenhydrats erfolgen, wie man es z.B. bei NCAM (Cole and Schachner, 1987) oder P0 (Griffith et al., 1992) findet. Auch das extrazelluläre Matrixmolekül Laminin kann über das HNK-1-Epitop mit Glycoproteinen und Glycolipiden interagieren (Hall et al., 1995; Mohan et al., 1990). Diese Wechselwirkungen sind für die Adhäsion von Kleinhirnneuronen und Astrocyten aus der Maus an Laminin mit verantwortlich (Hall et al., 1993). Weitere Bindungspartner des Laminins sind HNK-1 exprimierende Integrine (Pesheva et al., 1987), die die Adhäsion von Neuralleistenzellen an Laminin über dieses Kohlenhydrat vermitteln (Lallier and Bronner-Fraser, 1991).

Die Rolle des HNK-1-Kohlenhydrats in der Regeneration wurde insbesondere am Femoralisnerv untersucht (Martini et al., 1994). Dabei zeigte sich, dass das HNK-1-Kohlenhydrat selektiv von myelinisierenden Schwann-Zellen exprimiert wird, die die Motoraxone und die ventrale Spinalwurzel umgeben, nicht aber von myelinisierenden Schwann-Zellen, die die sensorischen Axone und die dorsale Spinalwurzel umgeben (Martini et al., 1988). Das HNK-1-Kohlenhydrat kann im kompakten Myelin und der Basallamina an der Zelloberfläche von Schwann-Zellen nachgewiesen werden (Martini et al., 1988). Dieser Bereich ist für das erneute Wachstum von Motoraxonen, z.B. nach

Läsionen, von Bedeutung. Man kann Neuritenwachstum der Motoneurone im Zellkultursystem durch ein HNK-1-haltiges Substrat steigern, während das HNK-1-Kohlenhydrat auf das Neuritenwachstum der sensorischen Neurone keinen Einfluss hat (Schachner et al., 1995). *In vivo* konnte in Läsionsexperimenten am N. femoralis gezeigt werden, dass der HNK-1-Antikörper die PMR der motorischen Axone aufheben kann (Martini et al., 1994). HNK-1 spielt also offenbar eine wichtige Rolle in der PMR (Martini et al., 1994).

Die bekannten Träger des HNK-1-Kohlenhydrates in den Schwann-Zellen, die die motorischen Axone umgeben, sind das MAG und zwei Glycolipide (Low et al., 1994). Es zeigte sich, dass Schwann-Zellen, die vorher mit Motoraxonen assoziiert waren, ein „Gedächtnis“ zur Expression des HNK-1-Kohlenhydrates besitzen, das nach einer Läsion des peripheren Nerven und beim erneuten Auswachsen der motorischen Axone aktiviert wird (Martini et al., 1994).

2.4.2 PSA-NCAM

Ein weiteres Kohlenhydrat, das in der Entwicklung und der Regeneration eine Rolle spielt, ist die Polysialinsäure (PSA). PSA hat als lineares, helikales Homopolymer (n=8 bis über 100 Sialinsäure-Monomere) von α -2,8-verknüpfter Sialinsäure (Finne and Mäkelä, 1985; Livingston et al., 1988) eine bemerkenswert einfache und ungewöhnliche Struktur. Bei Säugetieren kommt PSA hauptsächlich am neuronalen Zelladhäsionsmolekül (NCAM) vor, besonders in sich entwickelnden Geweben wie dem Gehirn (Finne, 1982) und der Muskulatur (Dubois et al., 1994). PSA-NCAM wird von auswachsenden Axonen während der Entwicklung und der Regeneration exprimiert. Auch Schwann-Zellen sind in immunologischen Untersuchungen PSA-NCAM positiv, sobald sie an ein auswachsendes Axon angrenzen (Zhang et al., 1995). Die PSA am NCAM wandelt das Protein in ein anti-adhäsives Molekül um, vermutlich durch sterische Behinderung von (z.B. homophilen) Zell-Zell-Interaktionen. Das Kohlenhydrat hat auch einen Einfluss auf das Bündeln von Axonen. Sobald es z.B. stärker auf der Muskeloberfläche exprimiert wird, ist die Axon-Axon-Interaktion schwächer, wodurch es Nervenfasern ermöglicht wird, sich in Richtung des Muskels zu verzweigen (Carratu et al., 1996). Es konnte bisher nicht gezeigt werden, dass die PSA einen Einfluss auf die spezifische Regeneration von Nervenfasern hat.

2.5 Erkrankungen des PNS: Neuropathien und neuromuskuläre Atrophien

Die Identifizierung von Molekülen, die für die Entwicklung und auch für das Überleben von peripheren Nerven wichtig sind, ist auch im Hinblick auf neuronale Erkrankungen von besonderem Interesse. Häufig führen Mutationen in den zugehörigen Genen zu Erkrankungen des PNS. Daher ist es auch möglich über eine Erkrankung und deren Phänotyp Rückschlüsse auf die Genfunktion zu schließen.

Beispielsweise sind erbliche Neuropathien durch Mutationen ausgelöste, chronische Erkrankungen peripherer Nerven, die oft durch abnorme Bildung von Myelinscheiden oder deren Degeneration gekennzeichnet sind. Sie führen zur Muskelatrophie, sensiblen Störungen und Skelettdeformationen. Zu den bislang betroffenen Genen zählen unter anderem drei Myelingene (PMP22, P0, Cx32) und ein Transkriptionsfaktor (EGR2). Erbliche Neuropathien sind mit einer Häufigkeit von ca. 1:2500-5000 relativ häufig in der westlichen Welt. Die meisten peripheren Neuropathien werden nach den Erstbeschreibern, den Neurologen J.M. Charcot, P. Marie und H.H. Tooth, als CMT-Neuropathie bezeichnet. Weitere Neuropathien sind das klinisch und pathologisch schwerere Déjérine-Sottas-Syndrom (DSS), die congenitale Hypomyelinisierung (CH) und die hereditäre Neuropathie mit Neigung zur Drucklähmung (HNPP) (Suter and Snipes, 1995).

Das „periphere Myelin-Protein 22“ (PMP22) ist ein Membranprotein, das drei Transmembrandomänen und eine vierte lipophile Domäne hat, die in der Plasmamembran endet oder gerade noch in das Zytoplasma ragt (Snipes and Suter, 1995). P0 gehört zur Ig-Superfamilie und ist das am häufigsten vorkommende Myelinprotein. Es besitzt außer einer Ig-Domäne noch eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne. Das Protein ist zu homophilen Interaktionen befähigt und spielt dadurch eine wesentliche Rolle bei der Myelinkompaktierung. Es hat auch eine wichtige Funktion bei der Myelinerhaltung. Das dritte, mit erblichen Neuropathien assoziierte Gen, ist das Tunnelprotein Connexin 32 (Cx32). Connexine bilden in der Zellmembran zirkulär angeordnete Hexamere. Durch Anlagerung solcher Hexamere angrenzender Zellen bilden sie Membranporen (gap-junctions) (Nelis et al., 1999). Das erst kürzlich identifizierte, für Neuropathien verantwortliche vierte Gen ist der Zink-Finger-Transkriptionsfaktor Early Growth Responsive Gen 2 (EGR2). Es ist homolog zum Nagerprotein krox20 (Nelis et al., 1999).

Für alle Gene sind unterschiedliche Mutationen in den Patienten entdeckt worden, die verschieden starke Neuropathien hervorrufen (Carenini and Martini, 2000).

Die Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine meist autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die durch einen Verlust von Motoneuronen, Muskelschwund und –schwäche gekennzeichnet ist. Die Krankheit kommt mit einer Häufigkeit von 1:10.000 bei Neugeborenen vor (Czeizel and Hamula, 1989) . Verschiedene SMA-Typen werden anhand eines zeitlichen Verlaufs und des Grades des motorischen Funktionsverlustes in der postnatalen Entwicklung eingeteilt (Schrack et al., 1997). Bisher bekannte SMA-Gene sind

die SMN-Gene 1 und 2 (*survival motor neuron*). SMN spielt eine Rolle im generellen zellulären Mechanismus des mRNA-Spleißens. Es interagiert mit dem snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein particle*) und bildet einen Komplex mit SIP1 (*survival of motor neurone interacting protein*). Das SMN2-Gen ist hoch homolog zum SMN1-Gen. Es unterscheidet sich vom SMN1-Gen, außer durch einen Basenpaaraustausch in der Promotorregion und intronische Sequenzen (Monani et al., 1999), nur durch fünf Basenpaare im translatierten Bereich, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen (Lefebvre et al., 1995). In SMA-Patienten wurden diverse Mutationen der SMN-Gene entdeckt, die z.B. von einzelnen Punktmutationen bis zu ganzen Deletionen des SMN1-Gens reichen.

2.6 Methoden zur Identifizierung differenzieller Genexpression

In den letzten Jahren wurden verschiedene Techniken entwickelt, um differenziell exprimierte Gene zu identifizieren (Carulli et al., 1998; Wan et al., 1996). Diese Techniken besitzen verschiedene Vor- und Nachteile und werden je nach Zielsetzung der differenziellen Analyse unterschiedlich eingesetzt. Ein klassischer Ansatz ist die Untersuchung durch differenzielle Hybridisierung von cDNA-Banken, die aus verschiedenen Geweben oder Zellen hergestellt werden. Eine Weiterführung dieser Methode ist die Anwendung von cDNA-*Microarrays* (DNA-Chip), um differenzielle Genexpression in großem Maßstab zu analysieren. Sequenzorientierte Ansätze wie EST- (*expressed sequence tag*) Sequenzanalysen oder SAGE (*serial analysis of gene expression*) untersuchen die relative Expressionshäufigkeit von mRNAs über statistische Auswertungen von Sequenzdaten, haben jedoch den Nachteil, aufgrund des hohen Kostenaufwands nur von staatlich oder industriell finanzierten Großprojekten angewendet werden zu können. Subtraktive Hybridisierungstechniken (SSH) und Differential Display (DD) sind zwei weitere Methoden zur Analyse differenzieller Genexpression, welche einen geringen Aufwand erfordern und daher häufiger angewendet werden. Die Methode des DD basiert auf der vergleichenden Analyse verschiedener cDNA-Populationen durch semiquantitative PCR und wurde von Liang und Pardee 1992 entwickelt (Liang and Pardee, 1992).

Sowohl mit subtraktiver Hybridisierung als auch im DD können häufig, aber auch selten vorkommende mRNAs differenziell exprimierter Gene identifiziert werden. Die Methode des DD hat gegenüber subtraktiven Hybridisierungstechniken einige Vorteile. Erstens kann mit weniger Ausgangsmaterial gearbeitet werden. Zweitens können sowohl hoch- als auch herunterregulierte Gene identifiziert werden, was bei subtraktiven Hybridisierungstechniken nicht, bzw. nur durch wiederholte Anwendung der Methode möglich ist. Drittens können parallel verschiedene cDNA-Populationen mehrerer Gewebeproben durch die DD RT-PCR analysiert werden, während bei der subtraktiven Hybridisierung immer nur ein cDNA-Populations-Paar untersucht wird. Nachteile des DD ist ein hoher Anteil an falsch-positiven Signalen, die durch Unterschiede im Ausgangsmaterial oder durch PCR-Unregelmäßigkeiten entstehen können. Darüber hinaus wird die Identifizierung der Gene nicht von der Häufigkeit der mRNA, sondern von der Sequenz der *random*-Primer bestimmt.

Zur Identifizierung unterschiedlich exprimierter Gene im sensorischen und motorischen Nervenast des bovinen N. femoralis wurde wegen der Vorteile des DD gegenüber der subtraktiven Hybridisierung diese Methode verwendet. In weiteren Untersuchungen mit dem industriellen Kooperationspartner LION Bioscience AG wurden die Analysen zur differenziellen Genexpression in regenerierten Maus-Femoralisnerven durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurde auch die subtraktive Hybridisierung (SSH) und das SAGE-Protokoll verwendet.

2.7 Zielsetzung der Arbeit: Untersuchung der differentiellen Genexpression in sensorischen und motorischen Nervenästen des Femoralis

Das Ziel dieser Arbeit war es, Gene zu identifizieren, die an der spezifischen Regeneration von motorischen gegenüber sensorischen Nervenästen in peripheren Nerven beteiligt sind. Grundlage hierfür ist die Entdeckung der PMR (*preferential motor reinnervation*), d.h. dass regenerierende motorische Axone bevorzugt den Muskel und/oder Muskelnerv reinnervieren. Eine Theorie zur Erklärung dieses Phänomens ist die *Pruning*-Hypothese; regenerierende motorische Axone erzeugen eine Anzahl von kollateralen Auswüchsen, welche gleichermassen zufällig den alten sensorischen wie auch den motorischen Nervstumpf reinnervieren. Durch molekulare Signale kann der motorische Nerv erkennen, welche Neuriten in das „falsche“ sensorische Nervenende gelangt sind, und läßt diese Ausläufer verkümmern. Nur der Ausläufer, der im „richtigen“ motorischen Weg angelangt ist, wird unterstützt und zum Axon aufgebaut. Ein sensorisches Neuron und seine Ausläufer können dagegen nicht zwischen beiden Zielen unterscheiden.

Ein bekannter molekularer Unterschied zwischen den beiden Nervenästen des Femoralisnervs ist das HNK-1-Kohlenhydrat, das nur auf den Schwann-Zellen der myelinisierten motorischen Nervenfasern zu finden ist. Träger dieses Kohlenhydrats sind neben zwei Glycolipiden vor allem Zelladhäsionsmoleküle wie das MAG (*myelin associated glycoprotein*), die besonders wichtig bei der Zelloberflächenerkennung in der Entwicklung und der Regeneration sind. Die vorliegende Studie sollte durch Identifizierung von in beiden Ästen unterschiedlich exprimierten Genen zur Entdeckung weiterer Moleküle beitragen, die an der PMR beteiligt sein könnten. Hierzu wurde die Differential Display-Methode angewandt. Da viele molekulare Mechanismen während der Entwicklung und der Regeneration gleich sind, wurde für diese Untersuchung der Femoralisnerv von jungen Kälbern verwendet. Im Anschluss an das Screening der sensorischen und motorischen Nervenäste wurde eines der identifizierten Gene im Rahmen dieser Dissertation charakterisiert.

3. Material und Methoden

3.1. Puffer und andere Verbrauchsmaterialien:

<u>Acetylierungspuffer:</u>	0,1M Triethanolamin, pH 8,0, 0,025% Essigsäureanhydrid
<u>Denaturierungslösung:</u>	1,5M NaCl, 0,5M NaOH
<u>50x Dehnhardt´s:</u>	1% Ficoll, 1% Polyvinylpirrolidon, 1% BSA
<u>10x DNA-Probenpuffer:</u>	40% Glycerin, 0,03% Bromphenolblau, 125mM EDTA
<u>Formamidprobenpuffer:</u>	98% Formamid, 10mM EDTA, pH 8,0, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF
<u>20x Hybridisierungssalze:</u>	3M NaCl, 0,1M PIPES, 0,1M EDTA pH 6,8
<u>Hybridisierungspuffer für <i>in-situ</i>-Hybridisierung:</u>	50% entionisiertes Formamid, 5x
<u>Hybridisierungssalze:</u>	5x Dehnhardt´s, 0,2% SDS, 10mM DTT, 10% Dextransulfat, 250µg/ml Hefe tRNA (Roche)
<u>LB-Agar:</u>	15g/l Agar (GIBCO BRL) in LB-Medium
<u>LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):</u>	10g/l Peptone 140 (GIBCO BRL), 5g/l Hefeextrakt (GIBCO BRL) , 10g/l NaCl, pH auf 7-7,4 mit 1M NaOH
<u>10x MOPS:</u>	0,4M MOPS, 0,1M Natriumacetat, 10mM EDTA pH 7,0
<u>Neutralisierungslösung:</u>	1,5M NaCl, 0,5M Tris-HCl pH 7,4
<u>10x PBS:</u>	1,5M NaCl, 81mM Na ₂ HPO ₄ , 17,39mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,5
<u>10x PBS-Morphologie:</u>	1,36M NaCl, 0,1MNa ₂ HPO ₄ , 27mM KCl, 18mM KH ₂ PO ₄
<u>Prähybridisierungspuffer für <i>in-situ</i>-Hybridisierung:</u>	50% entionisiertes Formamid, 5x Hybridisierungssalze, 5x Dehnhardt´s, 0,2% SDS, 10mM DTT, 10% Dextransulfat, 250µg/ml Lachsspermien DNA (Stratagene), 250µg/ml Hefe tRNA (Roche)
<u>RNase A-Puffer für <i>in-situ</i>-Hybridisierung:</u>	1mM EDTA, 0,5M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH7,5), 40µg/ml RNaseA
<u>RNA-Probenpuffer:</u>	50% Glycerin, 1mM EDTA, pH 8,0, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF
<u>50x TAE:</u>	2M Tris, 50mM EDTA, 5,7% Essigsäure
<u>10x TBE:</u>	1,8M Tris, 0,89M Borsäure, 40mM EDTA, pH 8,0
<u>10x TBS:</u>	0,5M Tris, 1,5M NaCl, pH 7,4
<u>TE:</u>	10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8
<u>10x SDS Laufpuffer:</u>	0,25M Tris, 1,9M Glycin, 1% SDS
<u>20x SSC:</u>	3M NaCl, 0,3M Trinatriumcitrat, pH 7,5
<u>Waschlösung 1 für ExpressHybTM Hybridisierung:</u>	2x SSC, 0,05% SDS
<u>Waschlösung 2 für ExpressHybTM Hybridisierung:</u>	0,1x SSC, 0,1% SDS

3.1.1 Vektoren

pBluescript KS; universeller Klonierungsvektor (Stratagene)

pCRII-TOPO; Klonierungsvektor für PCR-Produkte (Invitrogen)

pEGFP-C3 und pIRES2-EGFP; eukaryontische Expressionsvektoren mit GFP (Invitrogen)

pcDNA3.1 c-myc/his +A; eukaryontischer Expressionsvektor mit 6xHis- und c-myc-Tag (Invitrogen)

pQE 30 von Qiagen; prokaryontischer Expressionsvektor mit 6xHis-Tag (Qiagen)

3.1.2 Antikörper

Anti-SPARC aus Kaninchen

R.Timpl, Martinsried München

Anti-L1 aus Ratte

M.Schachner, Hamburg

Anti-HNK-1 (412) aus Ratte

M.Schachner, Hamburg

Anti-m1 aus Kaninchen

M.Schachner, Hamburg

Anti- α -Tubulin aus Maus

Sigma-Aldrich

Sekundäre Antikörper gekoppelt mit Fluoreszenzmarkern (Cy2, Cy3, Cy5, TRITC und FITC) und HRP wurden von der Firma Dianova bezogen.

3.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von den Firmen Metabion und MWG synthetisiert.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Allgemeine Arbeiten mit Bakterien

Bakterienkulturen von verschiedenen E.coli-Stämmen wurden durch einen fraktionierten Ausstrich auf Agaroseplatten ausplattiert, die zur Selektion des reinen E.coli-Stammes entsprechende Antibiotika enthielten. Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert. Um eine Stationärkultur anzuzüchten, wurden 5 ml Nährmedium plus Antibiotikum mit einer Einzelkolonie von einer Stammpatte oder mit einem Transformationsansatz in einem Reagenzglas angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Größere Stationärkulturen wurden in einem 1l Erlenmeyerkolben plus 200 ml Selektivnährmedium mit 1 ml einer stationären Flüssigkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln angezogen. Zur dauerhaften Lagerung der reinen plasmidtragenden Bakterienstämme wurde 1ml einer Stationärkultur mit 400µl einer sterilen 50% Glycerinlösung vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und als Gefrierkultur bei -80°C gelagert.

3.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation des E.coli-Stammes DH5α wurden 100 µl kompetente Bakterien mit Plasmid-DNA (50-100µg) oder einem halben Ligationsansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (1min, 42°C), Abkühlen (2min, 0°C) und Zugabe von 450µl vorgewärmten LB-Medium wurde 1h bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde auf LB/Amp-Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert.

3.2.3 Plasmid-Isolierung

Die Plasmid-DNA aus den über-Nacht-Kulturen (ü.N.) wurden mit den Kits GFX Micro Plasmid Präparationskit von Amersham Pharmacia, Midi und Maxi-Kits von Qiagen laut Protokoll der Hersteller isoliert.

3.3 DNA-Techniken

3.3.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Mit Hilfe der PCR können ausgehend von einem DNA-*template* spezifische DNA-Sequenzen in vitro vervielfältigt werden. Diese Amplifikation gliedert sich in drei sich wiederholende Schritte. Beginnend mit dem Denaturierungsschritt werden die DNA-Doppelstränge bei 95°C voneinander getrennt. Diese Trennung ist notwendig, damit zwei spezifische Oligonukleotide, deren Sequenz komplementär zum jeweiligen 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts ist, im anschließenden *Annealing* an die *template*-DNA binden können. Die spezifische Oligonukleotid-Bindung wird durch Absenken der Temperatur erreicht, wobei die optimale *Annealing*-Temperatur von der Länge der Oligonukleotide und ihrem AT/GC-Verhältnis bestimmt wird. In einem Polymerisationsschritt werden ausgehend von den gebundenen Oligonukleotiden die

komplementären Einzelstränge durch eine thermostabile DNA-Polymerase bei 72°C aufsynthetisiert. Durch Wiederholung des Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Polymerisation wird der spezifische DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert. Für die PCR des Differential-Displays (Reamplifikation) wurden in einem 50µl Reaktionsansatz 4µl des Eluats, 5µl 10x PCR-Puffer, 3,6µl 25mM MgCl₂, 2,5µl 1mM dNTPs, 5µl 10µM *anchor*-Primer, 5µl 10mM *random*-Primer und 0,2µl Taq-Polymerase (Perkin Elmer) vermischt.

Das Temperatur- und Zeitprofil der einzelnen Schritte ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts sowie der Sequenz der eingesetzten Oligonukleotide und muss dementsprechend variiert werden. Die PCR-Reaktionen wurden in den PCR-Maschinen PTC-200 (MJ-Research) oder dem Eppendorf Gradientencycler durchgeführt. Letztere PCR-Maschine ermöglicht das parallele Austesten verschiedener Annealingtemperaturen. Im Durchschnitt wurde für die Amplifikation eines 1000bp langen Bereichs folgendes PCR-Programm verwendet: nach einer Vorinkubation von 2min bei 95°C wurde ein Zyklus mit 1min bei 95°C (Denaturierung), 45sec bei Oligonukleotiden-abhängigen Temperaturen (Annealing, 55-68°C) und 1 min bei 72°C (Polymerisation) 25-40 mal wiederholt. Abschließend wurde ein 5 minütiger Polymerisationsschritt bei 72°C durchgeführt und die Proben auf 4°C heruntergekühlt.

Bei Verwendung der HotStarTaq-Polymerase von Qiagen wurde die Vorinkubation auf 15min erhöht, um die Polymerase zu aktivieren.

3.3.2 RT-PCR

Bei der RT-PCR wird statt der Doppelstrang-DNA einzelsträngige cDNA (siehe Reverse Transkription) als *template* in einer konventionellen PCR eingesetzt. Durch RT-PCR wurde auf semiquantitativer Ebene, mit Verwendung von GAPDH als Kontrolle, die differenzielle Expression der Kandidaten-Gene getestet.

Die RNA wurde unter Verwendung des oligo-dT23-Primers in drei verschiedenen Ansätzen revers transkribiert. Die Ansätze haben sich dabei in der Menge der eingesetzten RNA (25ng, 50ng und 100ng pro 20µl Ansatz) voneinander unterschieden. Von diesen Ansätzen wurde jeweils 1µl für die anschließende PCR eingesetzt.

GAPDH diente als *housekeeping* Gen zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge, der Qualität der reversen Transkription und der PCR-Güte. Für die unterschiedlich langen Genfragmente wurden zwei verschieden lange GAPDH-Kontrollen (123bp und 399bp) verwendet.

Die Produkte der N. saphenus und der N. quadriceps RT-PCR wurden nebeneinander im Agarosegel aufgetragen. Die Intensität der Banden nach Ethidiumbromid-Färbung wurde als Messwert für die vorhandene RNA-Menge benutzt. Die unterschiedliche Menge an eingesetzter RNA sollte in der GAPDH-Kontrolle als Intensitätsunterschied der Banden erkennbar sein.

Die quantitative RT-PCR ist eine Methodik, die zur Mengenbestimmung einer mRNA in einer Probe genutzt werden kann. Dazu müssen die Reaktionsbedingungen für jedes zu untersuchende Fragment so eingestellt sein, dass die Menge des erhaltenen PCR-Produktes durch die exogene Zugabe eines cRNA-Standards aufgrund der Produktbandenintensität bestimmt werden kann. Für die Detektion der PCR-Produkte kann entweder die densitometrische Messung der Bandenstärke nach Ethidiumbromid-Färbung, die Messung von eingebauten radioaktiven Nukleotiden mit Hilfe eines Szintillationszählers oder auch die Messung von eingebauten fluoreszierenden Nukleotiden durch einen Light-Cycler benutzt werden. Als Richtwert für die erhaltenen PCR-Produkte wird ein Standard verwendet.

Für die Verifizierung der unterschiedlichen Genexpression im sensorischen und motorischen Nervenast des N. femoralis sollte die quantitative RT-PCR mit einem internen cRNA-Standard als Kompetitor angewendet werden. Die Auswertung erfolgte durch densitometrische Bestimmung der Bandenintensität nach Anfärbung mit Ethidiumbromid.

Für die quantitative RT-PCR wurden interne Kompetitor-Standards (siehe unten) benutzt. Die PCR-Bedingungen wurden jeweils ausgetestet. Dazu wurden Parameter beachtet, die Einfluss auf den Verlauf der RT-PCR nehmen könnten, d.h. Art und Konzentration der Enzyme, die MgCl₂- und Primerkonzentration sowie der Einfluss der DMSO-Zugabe. Außerdem musste die *Annealing*-Temperatur für jede cDNA-Amplifikation angepasst werden.

Primersequenz für bovines GAPDH:

primer gapdh /up (5'-CTGCTTTTAATTCTGGCAAAG-3')
 primer gapdh/dn123 (5'-CCTTGACTGTGCCGTTGAAC-3')
 primer gapdh/dn399 (5'-CAGGAGGCATTGCTGACAATC-3')

Ausgewählte Primer für die Amplifizierung der Genfragmente:

Fragment A3-2:	Primer NA3-4/up (5'-ACAGGTGAGCTACCTGCAGG-3') Primer NA3-4/dn (5'-CATATCGGTATCACCCATTT-3')
Fragment G3-1:	Primer G3-1a/up (5'-CCGTGGCAAGAGTTTGCATG-3') Primer G3-1a/dn (5'-GATCTTTCAGTCGCTAGCATG-3')
Fragment G3-2:	PrimerG32a/up(5'-GCAGATGATCCACTAACAGATGAGG-3') Primer G3-2a/dn (5'-CCTGAAGTCACGGTTTCGAACC-3')
Fragment G3-3:	Primer G3-3a/up (5'-CAATTGCTGTTACCAGAGGG-3') Primer G3-3a/dn (5'-CCTGACGATCAGATAATCAACTCG-3')
Fragment NG4-1:	Primer NG4-1a/up (5'-CATAGGGTCACAAGATTAGCTTC-3') Primer NG4-1a/dn (5'-GTCAGAATGGGGTATCTGAG-3')
Fragment A4-8:	Primer A4-8a/up (5'-GTCCTTTATAAAGACCATAGC-3') Primer A4-8a/dn (5'-CCAAGCACCTACTCTTTAATCAG-3')

3.3.3 Herstellung der internen Standards für die quantitative RT-PCR

Für die interessanten Genfragmente wurden interne Standards erzeugt, d.h. es wurden Klone hergestellt, die die gleiche Sequenz beinhalten wie die zu untersuchenden Fragmente, aber um ca. 15-30 Nukleotide verkürzt wurden. Für diese Methode wurde der Seamless-Cloning Kit von Stratagene verwendet. In dieser Methode wird das Restriktionsenzym *Eam1104* benutzt, dessen Schnittstelle außerhalb der Erkennungssequenz liegt. Es wurden Primer konstruiert, die die *Eam1104*-Restriktionserkennungsstelle beinhalten. Hierbei wurde beachtet, dass das Enzym ein Nukleotid am oberen Strang in 3'-Richtung und vier Nukleotide am unteren Strang in 5'-Richtung nach der Erkennungssequenz schneidet. Die Genfragmente wurden mit diesen Primern amplifiziert, wobei gleichzeitig ein modifiziertes dCTP (das 5-Methyldeoxycytosin) eingebaut wurde. Diese Inkorporation von m5-dCTP diente zum Schutz bereits existierender interner *Eam1104*-Erkennungsstellen, denn das Enzym kann dieses modifizierte Nukleotid nicht erkennen. Durch die Fähigkeit des Enzyms einige Basen nach der Erkennungsstelle das DNA-Fragment zu schneiden, konnte ein beliebig großer Bereich innerhalb der amplifizierten Genfragmente entfernt werden. Es resultierte ein Produkt mit 5'-Überhang, in dem die Enzymschnittstelle lag. Durch diese *sticky-ends* konnte eine gerichtete Ligation durchgeführt werden, wodurch eine „nahtlose“ Verbindung im Genfragment entstand.

Der Kit wurde nach Protokoll des Herstellers angewandt und wurde für folgende Genfragment-Standards benutzt:

Primersequenzen:

Fragment A4-8:	A4-8/-26 up (5'-ATGCTCTTCACGTGGGGGGAATAAAATCAAA-3')
	A4-8/-26 dn (5'-ATGCTCTTCAACGAAAGTTTATGAGTCTGCAC-3')
Fragment G3-1:	G3-1/-33 up (5'-ATGCTCTTCAGGGAGGTGAACGAGTTCTCAG-3')
	G3-1/-33 dn (5'-ATGCTCTTACCCATGCAAACCTTTGCCACGG-3')
Fragment G3-2:	G3-2/-22up(5'ATGCTCTTCAGGCTGAAGAGCAGGCCAGGAAGG3')
	G3-2/-22 dn (5'-ATGCTCTTCAGCCAGCTCGGCAAGAAGAGCTG-3')
Fragment G3-3:	G3-3/-36 up (5'-ATGCTCTTCAGGGACCTCTGAACCTCGTGAAC-3')
	G3-3/-36 dn (5'-ATGCTCTTACCCAAAGCAAGTACCCACCC-3')
Fragment NG4-1:	NG4-1/-22 up(5'-ATGCTCTTCACCCTCAGATACCCATTCTGAC-3')
	NG4-1/-22 dn(5'-ATGCTCTTCAGGGTACTAAATGCCATAAGCAC3')

3.3.4 5'-RACE PCR mit dem Marathon-Kit (Clontech)

Für die full-length Klonierung eines neuen Gens wurde der Marathon-Kit benutzt. Das Protokoll entspricht dem der Hersteller. Ausgehend von der mRNA (Ischias, bovin) und der mRNA (Plazenta, human) wurde nach der Erst- und Zweitstrang-cDNA-Synthese der Adaptor *blunt-end* ligiert. Es resultierte eine adaptorligierte doppelsträngige cDNA-Bank, welche für beliebige 5'-RACE und auch 3'-RACE-Experimente verwendet werden konnte. Zur Klonierung des humanen m1 wurde der Primer cDNArück benutzt.

3.3.5 Mutationsscreening

Zum Testen der genomischen Patienten-DNA wurden die Exone amplifiziert, auf ein Agarosegel aufgetragen und aus dem Gel eluiert. Die Produkte wurden vom 5'- und vom 3'-Ende mit den PCR-Primern sequenziert und ausgewertet.

Primer für die Exon-Amplifizierung von m1:

Exon1:	Primer m1cDNAhin (5'-TAATGGCGTCTGTATGATCTT-3')
	Primer Intron 6rück (5'-GTCTTTGGCTATAACCAGAA-3')
Exon2:	Primer Intron 6hin (5'-CCAGTATGGATATTGATTAATAC-3')
	Primer Intron 5rück (5'-GATAAGTGACATAACTCAAACAT-3')
Exon3:	Primer Intron 5hin (5'-GTCTCATTCCCTGAATTGTCT-3')
	Primer Intron 4rück (5'-GTACAGCTCACATCAATCTG-3')
Exon4:	Primer Intron 4hin (5'-GAGTTCACTGTGGATAATGC-3')
	Primer Intron 3rück (5'-GCACTGAGGTCAGGGCTATA-3')
Exon5:	Primer Intron 3hin (5'-GACTTTCTTAGGGTGATACG-3')
	Primer Intron 2rück (5'-GACACGGCAAAGGAGATTTTC-3')
Exon6:	Primer Intron 2hin (5'-TTGAACCCAGAGTTAAAATA-3')
	Primer Intron 1rück (5'-GCTATCCAACCTATAATCTG-3')
Exon7:	Primer Intron 1hin (5'-CATGTTGAGCATCTTTCTGT-3')
	Primer cDNArück (5'-GATCCTTTACGTTTTACAGTCTTT-3')

3.3.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Der CONCERT PCR Purification Kit von GIBCO BRL wurde protokollgemäß zur Aufreinigung von PCR-Produkten verwendet.

3.3.7 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA wurde in horizontalen Agarosegelen in Elektrophoresekammern von BioRad in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurde eine Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 3% (w/v) gewählt. Der zu analysierende Ansatz wurde in dem entsprechenden Volumen des 10x DNA-Probenpuffers aufgenommen und in die Probenaschen des Agarosegels pipettiert. Die Dauer der Elektrophorese bei einer Spannung von 70-100 Volt richtete sich nach den Erfordernissen der jeweiligen Trennung.

Anschließend wurden die Gele in einem 10⁻³%-igem Ethidiumbromid-Bad (in 1x TAE-Puffer) gefärbt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht (365nm Leuchtplatte) mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Herolab E.A.S.Y.).

3.3.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA mit dem CONCERT Rapid Gel Extraction Kit von GIBCO BRL erfolgte laut Protokoll des Herstellers.

3.3.9 Restriktionsverdau von DNA

Die zu schneidende DNA wurde mit dem 1,5fachen der berechneten Restriktionsenzymmenge für 1-2h der Vorschrift des Herstellers entsprechend (Puffer und Temperatur) inkubiert. Die verwendeten Enzyme stammten von den Firmen New England Biolabs, Roche und Hybaid AGS. Bei gleichzeitigem Verdau mit mehreren Enzymen wurden die dafür veränderten Enzymmengen nach Empfehlung des Herstellers eingesetzt. War ein Parallelverdau aufgrund der notwendigen Pufferbedingungen nicht möglich, wurde sequentiell verdaut und zwischen den Restriktionen eine Hitzeinaktivierung (20min, 60°C) des ersten Enzyms sowie eine Säulenaufreinigung (CONCERT PCR Purification Kit von GIBCO BRL) des Reaktionsansatzes durchgeführt.

3.3.10 Dephosphorylierung von DNA

An der zu ligierenden linearisierten Vektor-DNA mit komplementären (*sticky*) oder stumpfen (*blunt*) Enden wurde durch eine Dephosphorylierungsreaktion der 5'-terminale Phosphatrest entfernt, um eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern. 5–15µg DNA wurden in einem 50µl-Ansatz zusammen mit 1 Einheit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Roche) und 5µl 10x Reaktionspuffer für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase 30min bei 65°C deaktiviert und durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion von der DNA getrennt. Die DNA wurde anschließend durch eine Ethanol-fällung ankonzentriert oder in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel isoliert.

3.3.11 Mikrodialyse von DNA

Bis zu 50µl des DNA-haltigen Reaktionsansatzes oder der zu dialysierenden DNA-Lösung wurden auf einen Mikrodialysefilter (Durchmesser 13mm, Porengröße 0,025µm von Millipore) pipettiert, der in einer Petrischale auf bidestilliertem Wasser (bzw. 10% Glycerin-Lösung) schwamm. Nach 30min wurde der dialysierte Ansatz abgenommen und entsprechend weiterverwendet.

3.3.12 Ligation von DNA-Fragmenten

In einem möglichst kleinen Volumen wurden 50-75ng Vektor-DNA mit der dreifachen molaren Menge an Fragment-DNA in Ligationspuffer mit T₄-DNA-Ligase (1U) inkubiert (3h bei RT oder ü.N. bei 16°C).

3.3.13 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Spezifische DNA-Fragmente einer Länge von 150-1500bp wurden mit Hilfe des MegaprimeTM-Kits (Amersham Pharmacia) unter Zugabe von α³²P-dCTP (NEN, Amersham) radioaktiv markiert. Der Reaktionsansatz wurde über eine Gelchromatographie-Säule (ProbeQuant-G50 von Amersham Pharmacia) von nicht

eingebauten Nukleotiden gereingt. Die radioaktiv markierte DNA wurde als spezifische Sonde zur Detektion von mRNA in Northernblots verwendet.

3.3.14 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Um Reaktionsenzyme von DNA- oder RNA- Proben zu trennen, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde der entsprechende Reaktionsansatz auf 100µl mit H₂O aufgefüllt und mit 100µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; Roth) gut gemischt. Durch einen Zentrifugationsschritt (14000rpm, 3min) konnte eine Phasentrennung erreicht werden. Die DNA bzw. RNA enthaltende wässrige Oberphase wurde abgenommen und zur Entfernung von Phenolresten mit 100µl Chloroform gemischt und zur Phasentrennung erneut zentrifugiert (14000 rpm, 3min). Die Oberphase wurde abgenommen und die darin enthaltene DNA bzw. RNA durch eine Ethanol-fällung präzipitiert.

3.3.15 Ethanol-fällung von Nukleinsäuren

Um Doppelstrang-DNA, einzelsträngige Oligonukleotide oder RNA aus einem großen Volumen zu konzentrieren, wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Dazu wurde die Probe mit 1/10 Vol. 3M Natriumacetat pH 5,3 und 2Vol. 97% Ethanol versetzt, gemischt und mindestens 1h bei -20°C inkubiert. Die Nukleinsäure wurde in einem Zentrifugationsschritt (30min, 14000rpm, 4°C, Kühlzentrifuge Centrifuge 5417, Eppendorf) präzipitiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10min, 14000rpm, 4°C, Kühlzentrifuge). Das Pellet wurde getrocknet und in einer gewünschten Menge Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260nm. (Doppelstrang-DNA: o.D. 1 entspricht 50µg/ml; Oligonukleotide: o.D. von 1 entspricht 20µg/ml; RNA: o.D. von 1 entspricht 40µg/ml)

3.4 RNA: Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Arbeiten mit RNA

Jegliche Arbeiten mit RNA müssen unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt werden. Arbeitsplatz und Pipetten wurden mit 70% Ethanol und 0,1M NaOH-Lösung gereinigt, Pipettenspitzen und Eppendorfgläser wurden bei 120°C autoklaviert, Glaswaren bei 200°C mindestens 8h gebacken und alle verwendeten Lösungen (außer aminhaltige Verbindungen) mit Diethylpyrocarbonat (DEPC 0,001%ig eingesetzt) behandelt und anschließend autoklaviert.

3.4.2 Präparation von Gesamt-RNA

Total-RNA aus verschiedenen Geweben wurde mit Hilfe und nach Anleitung des RNeasy Mini bzw. Midi Kits (Qiagen) gewonnen. Für besonders zähes Gewebe wurde eine

Variation des Protokolls angewendet, dabei wurde nach Zugabe des Lysispuffers und Homogenisieren ein 20minütiger Proteinase K-Verdau zwischengesetzt. Periphere Nerven wurden grundsätzlich unter Stickstoff-Kühlung im Mörser zu Pulver zerrieben. Die Ausbeute der RNA-Isolierung war für dieses Gewebe höher bei Benutzung des Trizol Reagenz (GIBCO BRL). Die Präparation erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Die extrahierte RNA wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

3.4.3 Isolierung von mRNA

Für die Präparation von poly-A⁺-mRNA aus total-RNA wurde der Oligotex-Kit (Qiagen) verwendet. Dabei bindet der poly-A-Schwanz der messenger RNA an die mit oligo-dT gekoppelten Beads des Kits und kann somit von der übrigen RNA getrennt werden.

Die Isolierung der mRNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

3.4.4 DNase-Behandlung

RNA, die revers transkribiert werden sollte, durfte keine Spuren genomischer DNA enthalten, damit Produkte nachfolgender PCR-Reaktionen nur auf die Amplifikation eines cDNA-, nicht aber eines genomischen DNA-*templates* zurückgeführt werden konnten. 1–100µg RNA wurden in einem 100µl-Reaktionsansatz zusammen mit 1µl DNaseI (10U/µl; Roche), 10µl 10x DNase-Puffer und 10U RNasin (RNase Inhibitor von Perkin Elmer) für 30min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsenzyme wurden anschließend durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt und die RNA durch eine Ethanolfällung konzentriert. Das RNA-Pellet wurde in 20µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ gelöst, die RNA-Konzentration durch Messung der optischen Dichte bestimmt und die RNA bei -80°C gelagert.

3.4.5 cDNA-Synthese, Reverse Transkription

Das Enzym Reverse Transkriptase schreibt RNA in einzelsträngige cDNA um. Dazu wurden 0,2µg RNA, die einer DNase-Behandlung unterzogen worden war, zusammen mit 4µl 5x Reaktionspuffer, 1,6µl 250µM dNTPs, 2µl 0,1M DTT und 2µl 10µM des gewünschten *anchor*-Primers zusammengegeben, mit H_2O auf 17µl Reaktionsvolumen aufgefüllt, 10min bei 65°C zur Denaturierung von Sekundärstrukturen inkubiert und anschließend für 10min im Eisbad heruntergekühlt. Zum Schutz vor RNA-Degradation wurde dem Ansatz 1µl RNase-Inhibitor (RNasin, Perkin Elmer) beigegeben, die Reaktion durch Zugabe von 2µl Reverse Transkriptase (Expand TM, Roche) eingeleitet und der Reaktionsansatz für 1h bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde ein Denaturierungsschritt bei 95°C für 5min durchgeführt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert. Die so gewonnene einzelsträngige cDNA wurde für weitere Analysen im DD verwendet. Zur cDNA-Synthese für die semiquantitative RT-PCR wurden die Reversen-Transkriptasen von Qiagen

(Sensiscript und Omniscript) verwendet. Die Synthese erfolgte nach dem Protokoll der Hersteller mit einem oligo-dT18-23 als Primer.

3.4.6 RNA-Gelelektrophorese und RNA-Transfer (Northern Blot)

Gesamt-RNA wurde in einem Agarosegel in einer horizontalen Gelkammer unter denaturierenden Bedingungen (1% Agarose, 15% Formaldehyd in 1x MOPS-Puffer) in 1x MOPS-Puffer aufgetrennt. 1-10µg Gesamt-RNA wurden dazu mit 4µl Formaldehyd, 6µl Formamid und 2µl 10x MOPS-Puffer versetzt und mit H₂O_{DEPC} auf ein Volumen von 20µl eingestellt. Jeder Ansatz wurde für 5min auf Eis gestellt und mit je 2µl 10x RNA-Probenpuffer vermischt. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte ca. 3h bei 50 Volt.

Das Agarosegel wurde 3x10min in H₂O_{DEPC} gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen und anschließend 2x15min in 10x SSC gespült. Um die RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran zu transferieren, wurde ein Kapillarblot aufgebaut. Das Agarosegel wurde luftblasenfrei auf ein mit 10x SSC getränktes 3mm-Whatmanpapier gelegt, darauf eine in 10x SSC äquilibrierte Nylonmembran (11cm x13cm) plaziert, auf die schichtweise 8 3mm-Whatmanpapiere in 10x SSC getränkt, 8 trockene 3mm-Whatmanpapiere und abschließend ein Stapel Haushaltspapier gelegt wurden. Dieser Stapel wurde mit einem Gewicht von 500g beschwert, um den durch Kapillarkräfte vermittelten RNA-Transfer auf die Membran (ca.16h) zu verbessern. Eine kovalente Bindung der RNA an die Membran erfolgte durch UV-Quervernetzung im Stratalinker. Der Nachweis eines erfolgreichen RNA-Transfers erfolgte durch eine Methylenblaufärbung, welche die besonders stark vertretene ribosomale 18 S und 28 S RNA nachweist. Dazu wurde die Membran 2x 5min in 2x SSC gespült, danach für 3min in Methylenblaufärbelösung geschwenkt und überschüssige Farbe durch mehrmaliges Waschen mit H₂O_{DEPC} entfernt. Die gefärbte Membran wurde mit Hilfe eines Dokumentationsgerätes von Herolab unter Auflicht fotografiert und bei -20 °C gelagert.

3.4.7 Hybridisierung von Northern Blots

Für die Hybridisierung von Northern Blots wurden die Hybridisierungsreagenzien UltraHybTM-solution von Ambion und das ExpressHybTM von Clontech verwendet. Die Membran wurde in 5x SSC äquilibriert, in ein Hybridisierungsröhrchen plaziert und für 30min mit 10ml des Hybridisierungsreagenz bei 68°C prähybridisiert. Frische Hybridisierungslösung zusammen mit 1x10⁶cpm/ml einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde wurde gegen die alte Lösung ausgetauscht und die Membran für 1h bei 68°C hybridisiert. Nach Abnehmen des Hybridisierungspuffers wurde die Membran zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde für 3x15min mit Waschlösung 1 bei RT sowie 2x 20min mit Waschlösung 2 bei 65°C gewaschen. Anschließend wurde die feuchte

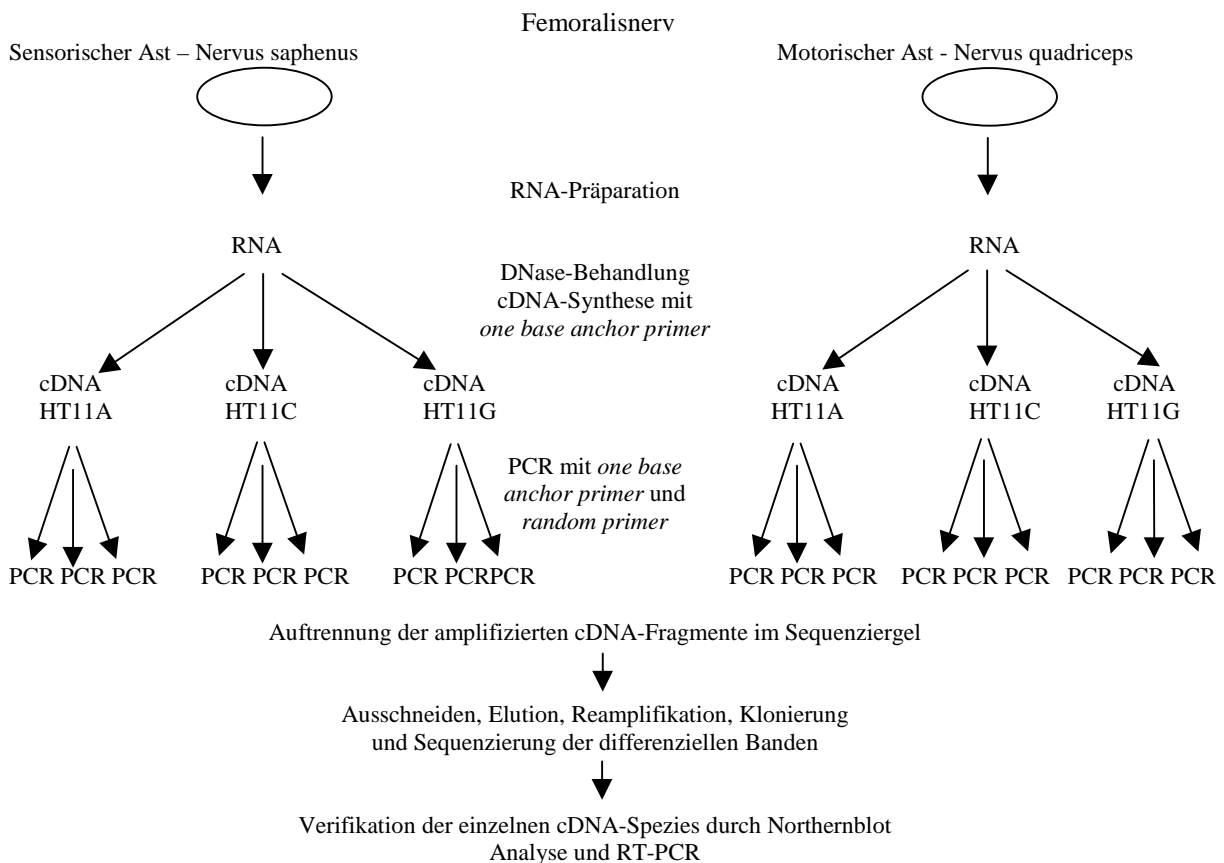
Membran in Frischhaltefolie (Saran) verpackt und ein Röntgenfilm (BiomaxMS oder X-Omat Blue XB1 von Kodak) bei -80°C exponiert.

3.4.8 *In vitro* Transkription

Um die Expression des Gens *m1* *in vivo* untersuchen zu können, wurden verschiedene Gewebeschnitte mit radioaktiv markierten RNA-Sonden hybridisiert. Für die Gewinnung dieser Riboproben wurden cDNA-Fragmente des zu untersuchenden Gens in den pCRII-Topo-Vektor (Invitrogen) kloniert und deren Orientierung im Vektor durch PCR-Analyse und anschließende DNA-Sequenzierung festgestellt. Diese Plasmide wurden durch einen Restriktionsverdau linearisiert und zur Kontrolle eines vollständigen Verdau im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die linearisierte DNA wurde aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Entfernung möglicher RNasen einer Phenol/Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung unterzogen. Die RNA-Polymerasen der E.coli Phagen T7, SP6 und T3 erkennen Promotorsequenzen auf der Plasmid-DNA direkt vor oder am Ende des cDNA-Fragments. Abhängig von der Lage der Restriktionsschnittstelle, die für die Linearisierung des Plasmids gewählt wurde, wird für die *in vitro* Transkription diejenige RNA-Polymerase verwendet, deren Promotor an der „nicht-geschnittenen“ Seite des cDNA-Fragments liegt. Dadurch kann die Polymerase beginnend von ihrem Promotor das cDNA-Fragment als *template* zur RNA-Synthese nutzen und stoppt, wenn sie am Ende des cDNA-Fragments an die offene Restriktionsschnittstelle gelangt. Abhängig von der Orientierung des cDNA-Fragments im Vektor können so *sense*- (sequenzidentisch mit der mRNA) und *antisense*- (komplementär zur mRNA) Proben generiert werden. Für die *in vitro* Transkription wurde $1\mu\text{g}$ der linearisierten Plasmid-DNA in einem $20\mu\text{l}$ Reaktionsansatz zusammen mit $1\mu\text{l}$ T7, T3 oder SP6 RNA-Polymerasen (Roche), $1\mu\text{l}$ Nukleotidmix (je $10\mu\text{M}$ CTP, GTP und ATP) und $5\mu\text{l}$ radioaktiv markiertes $\alpha^{35}\text{S}$ -UTP (NEN) gegeben und für 2h bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde über eine Gelchromatographie-Säule (ProbeQuant-G50 von Amersham Pharmacia) von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Zur Kontrolle wurde die Einbaurate durch einen Flüssigszintillationszähler bestimmt (cpm der Probe vor Säulenaufreinigung entsprachen dabei 100%).

3.5 Differential Display

Um Gene zu identifizieren, deren Expression in sensorischen und motorischen Nervenästen unterschiedlich ist, wurde die DD Technik (von der Kammer et al., 1999) angewandt.



Schema 1; Schematische Darstellung des DD-Protokolls, das zur Identifizierung unterschiedlich exprimierter Gene im sensorischen und motorischen Nervenast des N. femoralis verwendet wurde. Von den beiden Nervenästen wurde die RNA präpariert, die einem DNase-Verdau unterzogen und anschließend in Anwesenheit eines *one-base anchor primers* (HT11A, HT11G oder HT11C) in cDNA umgeschrieben wurde. Die cDNA-Moleküle dieser Subpopulationen wurden in PCR-Ansätzen (Duplikate) mit dem entsprechenden *one-base anchor primer* und einem *random primer* zusammen mit einem radioaktiv markierten Nukleotid amplifiziert, in einem Sequenziergel aufgetrennt und durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Differenzielle Banden wurden zur weiteren Analyse ausgeschnitten, eluiert, reamplifiziert, kloniert und sequenziert

3.5.1 Entnahme und Vorbereitung des zu untersuchenden Gewebes

Für unsere Experimente verwendeten wir Nerven von 3-5 Tage alten Kälbern. Der Femoralisnerv von Kälbern verzweigt sich in mehrere Äste, wobei in Zusammenarbeit mit einem Tierarzt der sensorische und der motorische Nervenast getrennt voneinander präpariert wurde. Die Entnahme erfolgte teilweise an mit Rampun betäubten Tieren und teilweise an frisch mit einem Bolzenschuß getöteten Tieren. Die Präparation wurde schnellstmöglich durchgeführt. Im Durchschnitt waren die Nerven 15-30 min nach der Anästhesie entnommen. Anschließend wurde das frische Material von umliegenden Fett-, Bindegewebe und Blut gereinigt, sodass der Nerv silbrig glänzte. Er wurde in eiskaltem

PBS gespült, in kleine Stücke geschnitten und in mehreren Aliquots sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren.

3.5.2 RNA-Präparation (siehe Abschnitt 3.4.1)

3.5.3 DNase-Verdau (siehe Abschnitt 3.4.4)

3.5.4 cDNA-Synthese

Die für die cDNA-Synthese verwendeten 3'-*anchor*-Primer weisen eine spezielle Konstruktion auf (siehe unten). Neben einer Poly-dT-Sequenz von 11 Basen enden sie am 3'-Ende entweder mit der Base A, G oder C und werden als *one-base anchor primer* bezeichnet. Darüber hinaus enthalten sie am 5'-Ende eine Erkennungssequenz des Restriktionsenzym HindIII, die in späteren Schritten eine Klonierung der cDNA-Fragmente ermöglichen soll. HindIII benötigt für einen Verdau einige Nukleotide vor der Erkennungssequenz. Aus diesem Grund befinden sich 5 weitere Nukleotide am 5'-Ende des *anchor*-Primers, die zusätzlich eine Eigenhybridisierung der *anchor*-Primer über die komplementären Sequenzen der Schnittstelle in folgenden PCR-Reaktionen verhindern. Die cDNA-Synthese wurde in Anwesenheit je eines der drei *anchor*-Primer durchgeführt, sodass drei verschiedene cDNA-Populationen entstanden.

one-base anchor primer

HT11A (5'-TGCCGAAGCTTTTTTTTTTTA-3')

HT11G (5'-TGCCGAAGCTTTTTTTTTTTG-3')

HT11C (5'-TGCCGAAGCTTTTTTTTTTTC-3')

3.5.5 Differential Display PCR

Aliquots dieser drei cDNA-Populationen wurden als *template* in PCR-Ansätzen eingesetzt zusammen mit dem jeweiligen *anchor*-Primer, der für die cDNA-Synthese verwendet wurde und einem von 64 *random*-Primern. Die im DD verwendeten *random*-Primer wurden nach einem bestimmten System konstruiert (von der Kammer et al., 1999).

HP1-Typ 5'-TGCCGAAGCTTGATTxxx-3')

HP2-Typ 5'-TGCCGAAGCTTCGACxxx-3')

HP3-Typ 5'-TGCCGAAGCTTTGGTxxx-3')

HP5-Typ 5'-TGCCGAAGCTTGGAGxxx3')

In einem 20µl Reaktionsansatz wurden je 0,2µg cDNA mit 1µM des 3'-*anchor*-Primers, der schon für die cDNA-Synthese verwendet wurde, 1µM 5'-*random* Primer, je 0,66µM dCTP, dGTP und dTTP, 0,5µM α^{35} -S-dATP (2000Ci/mmol), 1,8mM MgCl₂, 2µl 10x PCR-Puffer und 1U AmpliTaq-Polymerase (Perkin Elmer) in einem dünnwandigen PCR-Tube (Biozym) vermengt. Die Reaktionsansätze wurden in den auf 94°C vorgeheizten PCR-Cycler (PTC 200, MJ-research) gestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Position des jeweiligen Reaktionsansatzes in der PCR-Maschine späteren Bahnen im Sequenziergel zugeordnet werden konnte. Folgendes PCR-Programm wurde benutzt: 1min 94°C, 4min bei 40°C (unspezifisches *Annealing*), 1min bei 72°C gefolgt von 35 Zyklen mit

45sec bei 94°C, 2min bei 60°C, 1min bei 72°C und einem einmaligen Syntheseschritt bei 72°C für 5min. Die Reaktionsansätze wurden in einer SpeedVac eingedampft und anschließend in 10µl Formamid-Probenpuffer aufgenommen. M1 (G3-2) und SPARC (G3-1) wurden mit der Primerkombination HT11G und DD59 (TGCCGAAGCTTCGACTCG) gefunden. Das unbekannte Fragment A4-2 wurde mit den Primern HT11A und DD59, NA3-1, A3-1 und A3-2 mit HT11A und DD46 (TGCCGAAGCTTTGGTGTC), NG4-1 mit HT11G und HBS-10H (TGCCGAAGCTTACTAAGG) als differenzielle Bande identifiziert.

3.5.6 Gelelektrophoretische Auftrennung im denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgel

Die in der PCR amplifizierten cDNA-Fragmente wurden in einem 6% Polyacrylamid/7M Harnstoff-Sequenziergel (0,4mm) elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde das Gel zwischen Glasplatten gegossen, mindestens 1h auspolymerisiert, in die Sequencing-Anlage eingespannt und mit 1x TBE-Laufpuffer überschichtet. Das Gel wurde bei 2000 Volt 30min vorlaufen gelassen und durch eine Aluminiumplatte gleichmässig temperiert. Die aufzutrennenden Proben wurden 2min bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und 3µl je Probe in die gespülten Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 90min bei 2000 Volt. Nach Beendigung des Gellaufs wurde die obere Glasplatte vorsichtig gelöst, das Gel auf ein 3mm-Whatmanpapier transferiert, im Geltrockner getrocknet, Leuchtmarker aufgeklebt und die aufgetrennten cDNA-Fragmente durch Exposition eines Röntgenfilms (DuPont) ü.N. sichtbar gemacht.

3.5.7 Ausschneiden der Banden, Elution der cDNA, Reamplifikation und Klonierung

Die als differenziell identifizierten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, indem Gel und Röntgenfilm anhand der Leuchtmarker zur Deckung gebracht, die Bande mit Nadelstichen auf dem Gel markiert und anschließend vorsichtig ausgeschnitten wurde. Um die cDNA-Fragmente vom Papier zu eluieren, wurde der ausgeschnittene Papierstreifen in einem Eppendorfgefäß mit 200µl H₂O überschichtet, 10min gekocht, abzentrifugiert (2min, 14000rpm, RT), der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß transferiert, zur Entfernung weiterer Feststoffe erneut zentrifugiert (1min, 14000rpm, RT) und die cDNA durch eine Ethanol/Glycogenfällung präzipitiert. Die Pellets wurden in 25µl H₂O aufgenommen und durch eine einstündige Microdialyse (0,025µm, Millipore) gegen 10% Glycerin entsalzt. Diese cDNA wurde erneut einer PCR unterzogen (Reamplifikation), um genügend DNA-Material zur Klonierung zu erhalten. In einem 50µl Reaktionsansatz wurden 4µl des Eluats, 5µl 10x PCR-Puffer, 3,6µl 25mM MgCl₂, 2,5µl 1mM dNTPs, 5µl 10µM *anchor*-Primer, 5µl 10µM *random*-Primer und 0,2µl Taq-Polymerase (Perkin Elmer) vermengt. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet: 2min bei 94°C, 40 Zyklen mit 45sec bei 94°C, 1min bei 60°C, 1min bei 72°C und einem abschließenden einmaligen

Syntheseschritt für 5min bei 72°C. Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, ausgeschnitten und mit dem Qiaex Kit (Qiagen) aus der Agarose isoliert. Da die Primer am 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle der Restriktionsendonuklease *HindIII* enthielten, wurden die cDNA-Fragmente einem *HindIII*-Verdau unterzogen. Das Enzym wurde inaktiviert, die cDNA-Fragmente in die *HindIII*-Schnittstelle des Vektors pBlueskriptIIS+ ligiert, womit dann chemisch kompetente DH5 α -E. coli Bakterien transformiert wurden.

3.5.8 Sequenzierung und Sequenzanalyse der klonierten cDNA-Fragmente

Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit T₃- oder T₇-Sequenzierprimern versetzt und die Sequenz der klonierten cDNA-Fragmente mit Hilfe des ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) im ABI 377 DNA Sequenzer (Perkin Elmer) ermittelt. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit computergestützter Sequenzanalyse mit Hilfe des GCG-Programmpakets (Wisconsin Package, Genetic Computer Group Inc., Version 9, www.gcg.com) und des DNASTAR Programmes (Inc. Wisconsin, Version 4.05).

3.6 In-situ-Hybridisierung

3.6.1 Herstellung der Gefrierschnitte

Gefrierschnitte der verschiedenen Gewebe wurden mit Hilfe eines Kryostat-Microtoms (Leica CM 3050) hergestellt. Dazu wurde der Kryostat-Innenraum auf -20°C heruntergekühlt, die Superfrost-Objektträger (ROTH) in den Innenraum hineingestellt und das gefrorene Gewebe auf dem Objektisch mit Tissue-Tec O.C.T (Miles) festgeklebt. Gewebeschnitte von 14 μ m Dicke wurden mit Hilfe eines C-Messers (Leica) hergestellt und durch kurzes Aufwärmen des Objektträgers auf diese aufgezogen. Die Schnitte wurden bei -80°C gelagert.

3.6.2 Acetylierung

Die bei -80°C gelagerten Gewebeschnitte wurden auf Trockeneis in einen Objektträgerhalter gestellt, sofort für 5min in 4% Paraformaldehyd in 1x PBS fixiert und anschließend 2x 5min in 1x PBS gewaschen. Zur Verminderung unspezifischer Bindungen der Riboproben wurden freie Aminogruppen acetyliert, indem die Gewebeschnitte für 10min in Acetylierungspuffer inkubiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (60%, 80%, 90%, 97%) für je 3min dehydriert und die Objektträger im Abzug getrocknet.

3.6.3 Prähybridisierung

Der Hybridisierungspuffer wurde auf 55°C vorgewärmt, Lachsspermien DNA 5min bei 95°C denaturiert und zusammen mit Hefe tRNA und 10% Dextransulfat zum

Hybridisierungspuffer gegeben. Die $\alpha^{35}\text{S}$ UTP markierte Sonde wurde 5min bei 70°C zur Entfernung von Sekundärstrukturen denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Der Hybridisierungspuffer wurde mit der Sonde auf eine Aktivität von 5000cpm/ μl eingestellt. Auf jeden Objektträger wurden 100 μl dieser Hybridisierungslösung getropft, ein Deckglas aufgelegt, die Objektträger in die feuchte Kammer gelegt und für 18h bei 55°C hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläser von den Objektträgern durch Eintauchen in 4x SSC plus 20mM β -Mercaptoethanol entfernt und unspezifisch gebundene Sonde durch Waschen der Objektträger wie folgt entfernt: 2x 5min in 4x SSC (RT), 30min in RNase A-Puffer (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A, 37°C) 2x 10min in 2x SSC (55°C). Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (60%, 80%, 90%, 97%) für je 3min dehydriert und die Objektträger im Abzug getrocknet. Ein Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) wurde für 1-3 Tage exponiert.

3.6.4 Dipping

Zur genaueren Auswertung der *in-situ*-Hybridisierungssignale wurden die Schnitte nach der Filmexposition mit einer Photoemulsion (NTB-2, Kodak) beschichtet. Dazu wurde in absoluter Dunkelheit die Emulsion 1:1 mit H_2O vermischt, auf 42°C vorgewärmt und die Emulsion durch fünfsekündiges Eintauchen der Objektträger luftblasenfrei auf die Schnitte aufgetragen. Nach einem dreistündigen Trockenschritt wurden die Objektträger im Kühlschrank lichtdicht für 1-4 Wochen gelagert. Die Photoemulsion wurde nach Herstellerangaben entwickelt (Kodak Entwickler D19), fixiert (Kodak Fixierer) und mit Meyer's Hämalaun gefärbt (Hartmann et al., 1995).

3.7 Zellbiologische Methoden

Die Zellen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter 5% CO_2 bei 37°C inkubiert (Heraeus-Inkubator). Medien und Lösungen wurden vor Benutzung auf 37°C erwärmt.

Es wurden folgende Medien (GIBCO BRL) verwendet:

Für die neuronale N2A, fibroblastenähnliche CHO-K1, aus Oligodendrocyten stammende OLN und die Schwann-Zelllinie S16:

DMEM + 10% FCS + 100U/ml Penicillin + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin

GMEM + 10% FCS + 100U/ml Penicillin + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin

Glutamax + 10% FCS + 100U/ml Penicillin + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin

Für die primären Schwann-Zellen aus der Ratte:

DMEM + 10% FCS + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin

DMEM + 10% FCS + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Forskolin + 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pituitary Extrakt

3.7.1 Trypsinieren von Zellen

Der Zellrasen wurde mit PBS gespült, um inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsinaktivität zu verhindern. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen für ca. 5min mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert (mikroskopische Kontrolle). Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigen Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit der Pipette vereinzelt und in der gewünschten Dichte ausgesät.

3.7.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden trypsinisiert, in Medium aufgenommen und die Suspension in der Eppendorf Zentrifuge sedimentiert (3min, 200xg). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1ml Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierröhren überführt. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.7.3 Revitalisierung von Zellen

Nach der Entnahme aus dem Stickstofftank wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 5ml vorgewärmtes Medium überführt und in der Zentrifuge 3min bei 200xg sedimentiert. Das Medium wurde abgesaugt, das Zellpellet in Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

3.7.4 Transiente Transfektion

Eukaryontische Zellen wurden mit Hilfe von Lipofectamine (GIBCO BRL) transfiziert, hierzu wurden die cDNA-Konstrukte in die Expressionsvektoren pEGFP-C3 und pIRES2-EGFP (Invitrogen) und pcDNA3.1 myc/his +A von Clontech kloniert.

Für die Transfektion wurden parallel Mischungen aus 200µl GMEM-Medium (GIBCO BRL) mit 1µg DNA und 200µl GMEM-Medium mit 20µl Lipofectamine-Reagenz angesetzt. Die Lösungen wurden vorsichtig miteinander gemischt und 30-40min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurde eine 50-80% mit Zellen dichte 6cm Schale mit 2ml DMEM-Medium gespült und dann mit 1ml GMEM-Medium bedeckt. Die Lipofectamine-Mischung wurde hinzugegeben, die Zellen dann 3-4h unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz gegen komplettes Medium ausgetauscht, und die Zellen wurden zur maximalen Proteinexpression 1-2 Tage inkubiert.

3.8 Biochemische Methoden

3.8.1 Herstellung von Homogenaten aus Zellkulturzellen

Zellen in einer konfluent gewachsenen 6 oder 10cm Zellkulturschale wurden dreimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und sedimentiert. Das Pellet wurde in 100-500µl 1x SDS-Probenpuffer (ohne Bromphenolblau) aufgenommen, freigesetzte, hochmolekulare DNA durch Ultraschallbehandlung (Dr.Hielscher UP50H, 10x 5sec mit 30% Amplitude)

geschert. Die Proteinkonzentration des Homogenats wurde bestimmt und die Probe auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

3.8.2 Fraktionierung von Zellkulturzellen

Aus 8 konfluent gewachsenen 6-well Zellkulturschalen wurden die mit PBS gewaschenen Zellen wie oben behandelt. Das Zellpellet wurde in 1ml RIPA-Puffer ohne Detergenz (150mM NaCl, 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat, 0,1% (w/v) SDS, 50mM Tris pH8,0) aufgenommen, mechanisch homogenisiert und zur Entfernung unlöslicher Bestandteile (Kernfraktion) für 10min bei 1000xg, 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in der Ultrazentrifuge für 1h bei 100.000xg, 4°C abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand bildete die lösliche zytosolische Fraktion. Das Pellet wurde in RIPA-Puffer ohne Detergenz 3x gewaschen, d.h. jeweils durch Pipettieren resuspendiert und 1h, 100.000xg, 4°C zentrifugiert. Nach dem dritten Waschschrift wurde das Pellet in 1ml RIPA+1% (w/v) NP-40 resuspendiert und ü.N. bei 4°C solubilisiert. Es folgte eine Ultrazentrifugation (1h bei 100.000xg, 4°C), deren Überstand die Membranfraktion enthielt. Das Pellet aus diesem Zentrifugationsschritt stellte die unlösliche Zytoskelett-Fraktion dar. Alle Fraktionen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.8.3 Präparation von Hirnhomogenaten

Die Aufarbeitung erfolgte aus 10g Gewebe mit 20ml Lysispuffer-1. Das Protokoll entspricht der Fraktionierung von Zellkulturzellen, wobei hier der Lysispuffer-1 (20mM Tris/HCl pH7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, Protease-Inhibitor-Mix (Roche) und der Lysispuffer-2 (Lysispuffer-1 mit 1% (w/v) NP-40) verwendet wurde.

3.8.4 Proteinreinigung über die Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose

Bei dieser Methode wird die hohe Affinität zwischen den Nickelionen und einem 6x Histidin-Tag an einem Protein ausgenutzt. Die Ni-NTA-beads von Qiagen bestehen aus einer Sepharose CL-6B-Matrix, an die Nickel-nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) gekoppelt ist. Das Nickelkation interagiert mit dem vierzähligen Chelatbildner NTA, sodass eine recht starke Bindung zur Matrix erfolgt und zwei Bindungsstellen frei bleiben. Diese Bindungsstellen können nun mit den Imidazolringen des Histidins interagieren. Das rekombinant hergestellte m1-Protein mit dem 6xHis-Tag konnte so an die Agarose immobilisiert und aufgereinigt werden. Dazu wurde das Protokoll der Hersteller verwendet.

3.8.5 Herstellung von Peptidantikörpern

Bei der Firma Eurogentec wurden vom m1-Protein abgeleitete Peptide zur Immunisierung von Kaninchen ausgewählt, synthetisiert und injiziert. Jeweils eine Woche nach der Injektion wurde den Kaninchen Testblut abgenommen. Das Serum wurde vom Blutkuchen

abzentrifugiert und gekühlt gelagert. Die Reaktivität des Serums wurde im Westernblot und in der Immunzytochemie getestet.

3.8.6 Proteinbestimmung

Die Konzentration an Gesamtprotein einer Lösung wurde mit dem BCA Protein Assay Kit der Firma PIERCE bestimmt. Als Standard wurde eine Lösung von BSA im jeweils verwendeten Puffer eingesetzt.

3.8.7 Fällung von Proteinen

a) mit Aceton

Das siebenfache Volumen an eiskaltem Aceton wurde zu der zu präzipitierenden Probe gegeben und diese ü.N. bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (1300xg, 5min, 4°C) wurde 3x mit Aceton gewaschen und das Pellet in der SpeedVac getrocknet.

b) mit Trichloracetat

Durch Zugabe von einem Zehntel des Volumens an eiskaltem 70% Trichloracetat wurden die Proteine 2h auf Eis gefällt, anschließend wurde für 10min bei 13.500xg, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem Aceton 2x gewaschen und in der SpeedVac getrocknet.

3.8.8 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) gemäß ihrer Molmasse aufgetrennt. Hierzu wurden die Proteinproben mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5min bei 96°C aufgeköcht. Zur Molekulargewichtsbestimmung diente für Coomassie-gefärbte Gele ein nicht vorgefärbter Marker, für Westernblots ein vorgefärbter Marker (GIBCO BRL). Die Auftrennung der Proben erfolgte mit der Mini Protean II Zelle (BioRad) in Laufpuffer (25mM Tris, 190mM Glycin, 0,1% SDS). In der Regel wurden konstant 200 Volt für 45-60min angelegt.

Die Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte laut Tabelle:

1x Trenngel

	8%	10%	12%
H ₂ O (ml)	1,39	1,13	0,86
1M Tris/HCl, pH 8,8 (ml)	1,50	1,50	1,50
10% SDS (ml)	0,04	0,04	0,04
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid (ml)	1,07	1,33	1,60
TEMED (μl)	4	4	4
10% APS (μl)	10	10	10

1x Sammelgel

H ₂ O (ml)	1,05
1M Tris/HCl, pH 6,8 (ml)	0,19
10% SDS (ml)	0,02
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid (ml)	0,25
TEMED (µl)	4
10% APS (µl)	10

3.8.9 Gelfärbung mit Coomassie

Die Proteine wurden nach der SDS-PAGE im Gel für 1,5-2h mit Coomassie Blau Lösung (0,1% Coomassie Brilliant Blau, 250ml Ethanol, 50ml Eisessig, auf 500ml H₂O) gefärbt und anschließend wurde das Gel mit Entfärber (350ml Ethanol, 50ml Eisessig, auf 1l mit H₂O) für mehrere Stunden wieder entfärbt.

3.8.10 Western Blot-Analyse

Der Western Blot wurde als Tankblot mit den Trans Blot Modulen der Mini Protean II Zelle (BioRad) durchgeführt. Nach Zusammenbau des Sandwich-Blots wurde die Kammer mit Blotpuffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 10% Methanol) gefüllt, und die Proteine wurden 1,5–2h bei konstant 80 Volt, 4°C, alternativ ü.N.: bei konstant 40 Volt, 4°C, auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell) transferiert.

Nach dem Blotten wurde die Membran mit 2% MPBS (Magermilchpulver gelöst in PBS) für 1h bei RT blockiert. Anschließend wurde mit dem ersten Antikörper in austitrierter Verdünnung in 2% MPBS für 1-2h bei RT inkubiert. Es wurde 3-5x mit PBS gewaschen. Für die Detektion wurde anschließend mit dem sekundären HRP-konjugierten Antikörper (1:10000 verdünnt in 2% MPBS, 1h RT) inkubiert. Nach erneutem 3-5maligen Waschen wurde die Membran mit ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Pharmacia) überschichtet und durch Auflegen eines Biomax ML Röntgenfilmes (Kodak) wurden spezifisch gebundene Proteine detektiert.

3.9 Indirekte Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen

Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete 12mm Ø Deckgläschen ausgesät. Nach 12-48h (je nach Zelllinie) wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 15min mit 4% Paraformaldehyd in PBS bei RT fixiert und anschließend erneut 3x mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren und zur Verringerung der Hintergrundfärbung wurden sie 30min bei RT mit Blocklösung (0,1% Triton X-100, 2% BSA in PBS-Morphologie) inkubiert. Danach wurde die Inkubation mit den Primärantikörpern (verdünnt in 2% BSA in PBS) für 1-2h bei RT durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (in 2% BSA in PBS-Morphologie) für 1-2h bei RT

unter Lichtausschluss inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch erneutes Waschen (3x PBS-Morphologie) entfernt, die Präparate dann mit Aqua PolyMount (Polysciences) eingedeckelt.

Doppelmarkierungen erfolgten durch simultane indirekte Immunfluoreszenz. Da die Antikörper aus unterschiedlichen Spezies stammten, konnten durch geeignete Kombinationen und entsprechende Wahl der Sekundärantikörper diese zugleich dargestellt werden. Zur Markierung der Zellkerne wurde Hoechst-Dye (Sigma) und zur Darstellung des Aktin-Zytoskellets das Texas-Red gekoppelte Phalloidin (Molecular Probes) nach Protokoll der Hersteller verwendet.

3.10 Indirekte Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten

a) Fixierung und Schneiden des Gewebes

Teilweise wurde Gewebe von perfundierten (4% Paraformaldehyd in PBS-Morphologie) Mäusen und teilweise frisch in Tissue-Tek (MILES) eingefrorenes Gewebe verwendet. Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde das Gewebe mit Tissue Tek auf einen Schneideblock festgeklebt. Mit einem Kryostaten (Leica CM 3050) wurden 10µm dünne Schnitte angefertigt, auf Superfrost Objektträgern (ROTH) aufgezogen und ü.N. bei RT getrocknet.

b) Immunfluoreszenz

Die auf Objektträger aufgezogenen Gefrierschnitte wurden 30min bei RT mit der Blocklösung (2% BSA in PBS-Morphologie) inkubiert, dann erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in Blocklösung) für 1-2h bei RT. Die Schnitte wurden 3x mit PBS-Morphologie gewaschen, bevor für 1-2h bei RT der Sekundärantikörper (in Blocklösung) aufgetragen wurde. Danach wurde wieder 3x in PBS-Morphologie gewaschen, und die Schnitte wurden mit Aqua PolyMount (Polysciences) eingedeckelt.

Für Doppelmarkierungen wurden Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet, sodass diese durch geeignete Kombination und entsprechende Wahl der Sekundärantikörper zugleich dargestellt werden konnten.

3.11 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Beim konfokalen Mikroskop werden nur Strukturen abgebildet, die in der Ebene des Fokus liegen. Einzelne fluoreszierende Punkte eines Präparates werden in den Fokus eines Lasers gebracht und so mit einer hohen Energie angeregt. Der Laser wird auf eine Ebene (z-Ebene) im Präparat fokussiert, indem die Strahlung durch eine Lochblende (Pinhole) auf das Objektiv geführt wird. Durch die Ablenkung des Lasers in der x- und y-Ebene können schrittweise dicht nebeneinanderliegende Punkte im Präparat angeregt werden. Auf diese Weise wird eine definierte Ebene im Präparat gescannt. Das vom Präparat emittierte Licht fällt durch das Objektiv des Mikroskops und wiederum durch eine Lochblende

veränderbarer Größe, die dem Photodetektor vorgeschaltet ist. Diese Lochblende bewirkt, dass nur solche Bildpunkte auf dem Detektor abgebildet werden, die in der Fokusebene liegen. Lichtstrahlen, die von Punkten außerhalb der Fokusebene emittiert werden, werden nicht detektiert, sodass kein undeutliches Bild entstehen kann. Die Daten werden digitalisiert, von einem Computer aufgenommen und verarbeitet und auf einem hochauflösenden Bildschirm dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Geräte Leica TCS (LEICA) und das Laser Scanning Mikroskop von Zeiss benutzt.

3.12 Datenbankanalysen

Computergestützte Sequenzanalysen von DNA- und Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des GCG-Programmpakets (Wisconsin Package, Genetic Computer Group Inc., Version 9, www.gcg.com) und des DNASTAR Programmes (Inc. Wisconsin, Version 4.05) durchgeführt. Des Weiteren wurden viele Datenbankrecherchen in den NCBI-Servern (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) wie z.B. Pubmed (Medline), BLAST (*B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool), dbEST (*E*xpressed *S*equences *T*ags), dbSTS (*S*equences *T*agged *S*ites), unigene cluster, htgs (*u*nfinished *H*igh *T*hroughput *G*enomic *S*equences) genutzt. Andere wichtige www-Adressen waren:

Das BCM-Programm (*Baylor College of Medicine Search Launcher*; www.imgen.bcm.tmc.edu:9331), die GeneCards: genes, proteins, diseases (www.bioinfo.weizmann.ac.il), der Genefinder (www.clio.cshl.org), das Programm Capalignment (www.gcg.tigem.it) und für die Proteinanalyse (www.expasy.hcuge.ch).

4. Ergebnisse

Zur Analyse der PMR (präferenziellen motorischen Reinnervation) sollten der sensorische und motorische Nervenast des N. femoralis von Kälbern im Hinblick auf ihre unterschiedliche Genexpression untersucht werden. Aufgrund der häufig gleichen molekularen Mechanismen in der Entwicklung und der Regeneration wurden Nerven von 3-5 Tage alten Tieren verwendet, um einerseits ähnliche Bedingungen wie in der Regeneration und andererseits möglichst viel Gewebe zur Verfügung zu haben.

4.1 Differential Display Screening

Da die Regenerationsexperimente zur Untersuchung der PMR an Ratten- und Mäusenerven vorgenommen wurden, diese aber aufgrund ihrer Größe nicht genügend Material lieferten, wählten wir für unsere Experimente Femoralisnerven von 3-5 Tage alten Kälbern. Im Allgemeinen waren die Nerven 15-30 min nach der Anästhesie entnommen. Die anschließende Reinigung des Gewebes wurde so vorgenommen, dass einem möglichen RNase-Abbau und der Kontamination durch „Fremdgewebe“ entgegengewirkt wurde.

Nach dem Austesten verschiedener RNA-Präparationsprotokolle konnte nur mit dem Trizol-Reagenz RNA aus den peripheren Nerven in einer messbaren Menge isoliert werden. Dabei variierte die Ausbeute aus 200-300 mg Gewebe zwischen 2-18 µg Gesamt-RNA. Die Qualitätskontrolle und die Mengenbestimmung erfolgte UV/VIS-spektrometrisch, wodurch eine Kontamination durch Phenol ausgeschlossen werden konnte (Absorption bei 215nm). Auf diese Art und Weise wurde RNA aus den beiden separaten Nervenästen von mehreren Tieren isoliert.

Zur Untersuchung der differenziellen Genexpression in den sensorischen und motorischen Nervenästen im PNS wurde ein modifiziertes Differential Display-Protokoll angewandt (von der Kammer et al., 1999). Die Technik des Differential Displays musste zunächst in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden.

Das Differential Display ist eine auf PCR basierende Technik (siehe Abb.3, Abschnitt 3.5). Besonders wichtig für die Methode ist der Einsatz von RNA hoher Reinheit, die unter Verwendung von oligo-dT-*anchor*-Primern in cDNA transkribiert wird. In einer anschließenden PCR werden semiquantitativ die cDNA-Populationen aus den zu untersuchenden Geweben amplifiziert. Für diesen Schritt werden radioaktiv markierte Nukleotide und ein *random*-Primer (Primer mit Zufallssequenz) verwendet. Die Kombination aus dem jeweiligen *anchor*- und *random*-Primer für jede PCR führt zu einer bestimmten cDNA-Population, die zwischen den zu vergleichenden Geweben übereinstimmen sollte. Die erhaltenen cDNA-Fragmente werden in einem Sequenziergel aufgetrennt und durch Autoradiografie sichtbar gemacht. Falls sich die amplifizierten cDNA-Populationen in ihrer Bandenintensität voneinander unterscheiden, deutet dies auf

Unterschiede in der Genexpression hin. Diese differenziellen Banden werden zur genaueren Untersuchung aus dem Gel geschnitten und weiter analysiert.

Das modifizierte Versuchsprotokoll (von der Kammer et al., 1999) wurde erstmalig für RNA aus Gewebe angewandt. Dass die Methode gut funktionierte, konnte durch klar getrennte Banden über einen Bereich von 50-350 bp gezeigt werden (Abb.4).

Da die jeweiligen Bandenmuster der Amplifikate bestimmter Primerkombinationen in beiden Nervenästen sehr ähnlich waren und sich auch von Tier zu Tier kaum unterschieden, konnten differenzielle Banden aufgrund ihrer höheren relativen Intensität in einem der beiden Äste identifiziert werden. Diese Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die cDNA eluiert, reamplifiziert, über die *HindIII*-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pBluescriptIIKS+ kloniert und sequenziert.

Die Sequenzanalyse zeigte, dass sich die cDNA einer Bande aus einer Reihe verschiedener cDNA-Spezies zusammensetzte. Dabei variierte die Häufigkeit der einzelnen cDNA-Spezies pro Bande. Aus diesem Grund wurden pro Bande 5-15 verschiedene Klone sequenziert, um eine statistische Aussage über die Häufigkeit einzelner cDNA-Spezies zu erhalten. Während im günstigsten Fall nur eine Spezies vorhanden war, wurden im ungünstigsten Fall bis zu 5 verschiedene Genfragmente identifiziert, von denen keine im Vergleich zu den anderen stärker vertreten war. Je häufiger ein cDNA-Fragment identifiziert wurde, umso größer war die Wahrscheinlichkeit, dass diese cDNA ein differenziell exprimiertes Gen repräsentierte.

Nur solche Banden, die in der RNA aus verschiedenen Tieren als differenziell exprimiert identifiziert wurden und in denen die gleichen Klone, d.h. dieselben cDNA-Sequenzen zu finden waren, wurden für die weitere Untersuchung eingesetzt und im weiteren als „sicher“ bezeichnet. Insgesamt wurden fünf solcher „sicheren“ Banden identifiziert. Aus diesen Banden wurden acht „sichere“ cDNA-Sequenzen erhalten. Interessanterweise waren alle differenziellen cDNA-Fragmente stärker im motorischen Ast exprimiert.

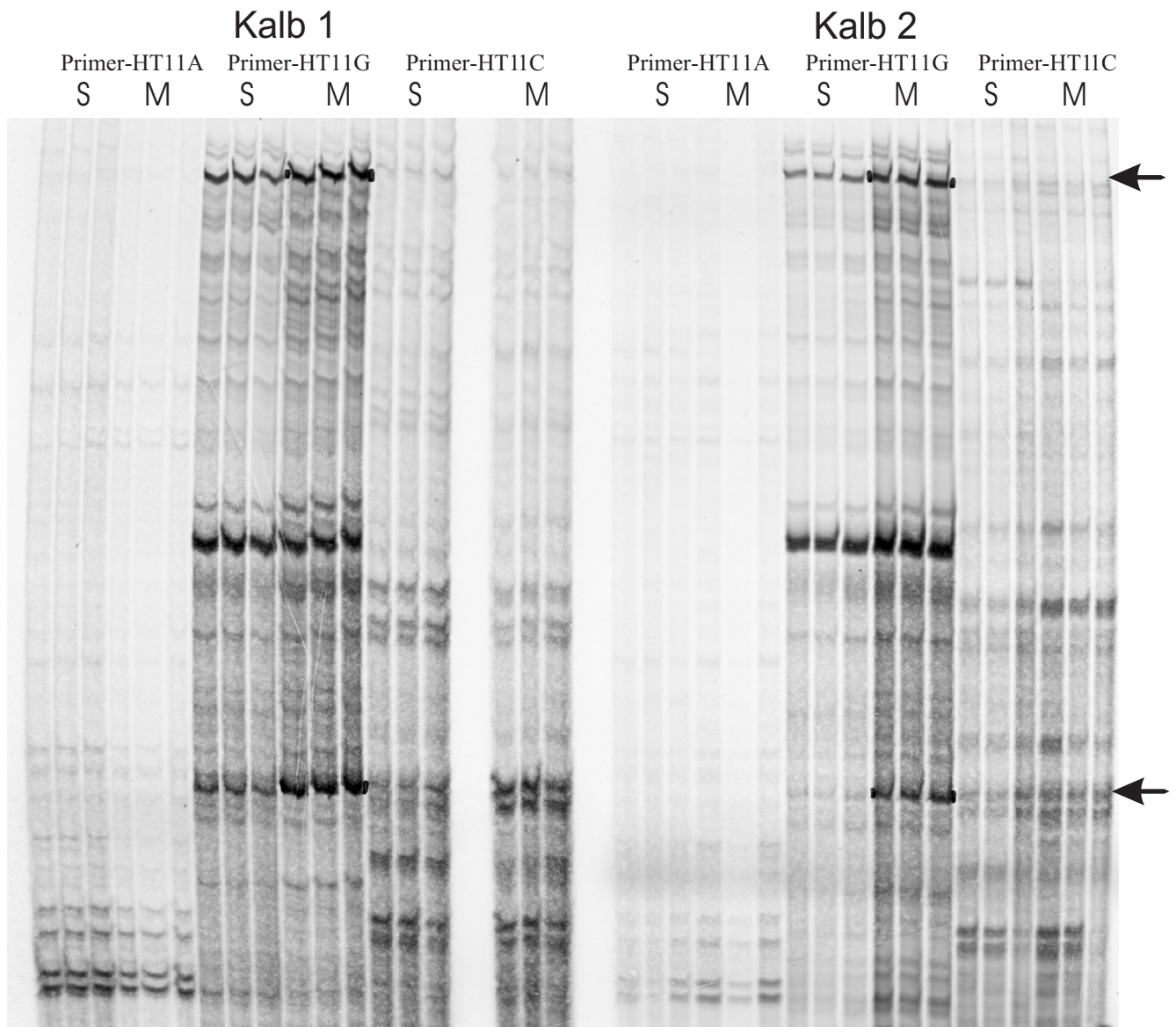


Abb. 4; Differential Display PAGE. Aus zwei Kälbern wurde die RNA aus dem N. saphenus (S) und dem motorischen N. quadriceps (M) isoliert, mit dem *one-base anchor primer* HT11G revers transkribiert und die DD-RT-PCR mit diesem und dem *random primer* DD59 durchgeführt. Es wurden aus jedem Tier jeweils 3 getrennte RT-PCR-Ansätze aufgetragen. Somit mussten immer die ersten drei Spuren aus dem sensorischen Ast mit den folgenden drei Spuren aus dem motorischen Ast verglichen werden. Nur wenn eine Bande in beiden Tieren differenziell war (siehe Pfeile), wurde diese als „sichere Bande“ weiter untersucht. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert, kloniert und sequenziert.

<i>anchor-Primer</i>	<i>random-Primer</i>	Banden-Nr.	Sequenz-bezeichnung	Banden-intensität	Länge (bp)	Sequenz homolog zu:
HT11A	DD59	1	A4-2	stark (+++)	61	unbekannt
HT11A	DD46	2	NA3-1	stark (++)	68	unbekannt
		2	A3-1	stark (++)	63	unbekannt
		3	A3-2	stark (++)	64	unbekannt
HT11G	DD59	4	G3-1	stark (++)	250	SPARC
		4	G3-2	stark (++)	273	EST (m1)
		4	G3-3	stark (++)	270	EST (ATP-binding cassette)
HT11G	HBS10H	5	NG4-1	stark(+)	163	unbekannt

Tabelle 1; Darstellung der Auswertung der im Differential Display identifizierten „sicheren“ Banden.

Die Banden wurden jeweils mit der dd-RT-PCR mit den angegebenen Primern erhalten. Dabei konnten aus der Bande 2 zwei und aus der Bande 4 drei verschiedene cDNA-Sequenzen aus der differenziellen Bande von verschiedenen Tieren identifiziert werden. Die Banden 1, 3 und 5 ergaben jeweils nur eine cDNA-Spezies. Nach der Untersuchung im Northern Blot, der RT-PCR und Immunzytochemie konnte G3-1 (SPARC) und G3-2 (m1) nicht als differenziell verifiziert werden. Die übrigen Sequenzen ergaben keine eindeutigen Ergebnisse in den Untersuchungen der RT-PCR. Die Einteilung der Bandenintensität von (+) bis (+++) erfolgte nach visueller Abschätzung.

Die Datenbankanalyse zeigte, dass die meisten Sequenz-Fragmente keinem bekannten Gen oder EST (*expressed sequence tag*) zugeordnet werden konnten. Die cDNA aus dem Klon G3-1 konnte als SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*, vgl. Abschnitt 4.3) identifiziert werden. Später wurden ESTs zu G3-2 gefunden. Aus dieser Sequenz wurde im weiteren Verlauf der Arbeit ein neues Gen mit der Bezeichnung m1 kloniert und charakterisiert (vgl. Abschnitt 4.4). Der Klon G3-3 zeigte eine Ähnlichkeit zu einem EST, der erst vor kurzem veröffentlicht wurde. Dabei handelt es sich um ein *ATP-binding Cassette*-homologen EST. Zu diesem Klon wurden keine weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

4.2 Verifizierung der differenziellen Expression

Da das Differential Display eine sehr sensitive Methode ist, mussten Verifizierungsexperimente durchgeführt werden, um falsch-positive Signale auszuschließen. Für die Untersuchungen mittels Northern Blot-Analyse stand zu diesem Zeitpunkt nicht genügend RNA, d.h. kein zusätzliches Nervenmaterial zur Verfügung. Die vorhandene RNA wurde für eine quantitative RT-PCR-Analyse verwendet.

4.2.1 Untersuchungen mittels RT-PCR

Für die Verifizierung der unterschiedlichen Genexpression der differenziellen Banden im sensorischen und motorischen Nervenast des N. femoralis sollte die quantitative RT-PCR mit einem internen cRNA-Standard als Kompetitor angewendet werden. Die Auswertung erfolgte durch densitometrische Bestimmung der Bandenintensität nach Ethidiumbromid-Färbung.

Für eine quantitative RT-PCR mussten die Reaktionsbedingungen für jedes im Differential Display erhaltene Fragment optimiert werden. Für diese Optimierungen musste RNA aus den Ischiasnerven der Kälber benutzt werden, da nicht genügend Femoralis-RNA vorhanden war.

Zunächst wurden dazu die einzelnen Parameter der Reaktion ausgetestet. Es war besonders wichtig, die Zyklenzahl so zu wählen, dass die Produkte vor Erreichen der Sättigung der Reaktion, d.h. noch während der exponentiellen Vervielfältigung, detektiert wurden. Um diese Parameter zu überprüfen, wurden Testreaktionen durchgeführt. Die sehr kurzen Fragmente (ca. 60bp Länge) konnten nicht amplifiziert und detektiert werden. Auch im hochprozentigen Agarosegel waren diese Banden nicht eindeutig zu identifizieren, weswegen sich die weiteren Experimente auf die längeren Fragmente G3-1, G3-2, G3-3 und NG4-1 konzentrierten.

4.2.2 Herstellung interner Standards für die kompetitive RT-PCR

Um die PCR als quantitative Methode einsetzen zu können, wurden interne Standards (Kompetitoren) für die Reaktionskontrolle hergestellt. Dazu wurde ausgehend von den Klonen der cDNA-Spezies mit dem Seamless-Cloning Kit von Stratagene Kompetitor-cDNA erstellt, die entweder eine Deletion von ca. 30 Nukleotiden oder eine Insertion von ca. 30 Nukleotiden hatten. Diese Kompetitor-cDNAs (oder im weiteren auch als Standards bezeichnet) wurden in vitro transkribiert und als Kontrollen in die RT-PCR zugesetzt, d.h. es wurde eine bekannte Menge des cRNA-Standards in den RT-PCR-Ansatz gegeben und nach der Amplifikation densitometrisch gemessen. Da der Standard sich nur um einen kurzen Sequenzabschnitt von dem zu untersuchenden Gen unterscheidet, sollten sich das zu analysierende Fragment und der exogen zugegebene Kompetitor in den Reaktionen weitestgehend gleich verhalten. Gleichzeitig ermöglicht der Längenunterschied der PCR-Produkte ihre Auftrennung mittels Gelelektrophorese. Die beiden zu amplifizierenden *templates* konkurrieren um die Reaktion, weil sie die gleichen Primer-Erkennungssequenzen besitzen. Somit konnte als Maß für die cDNA-Menge direkt das densitometrische Verhältnis von Standard zum untersuchten Gen genutzt werden.

4.2.3 Kompetitive RT-PCR zur Untersuchung differenzieller Expression von G3-1, G3-2, G3-3 und NG4-1

Die kompetitive RT-PCR wurde zunächst für die Fragmente G3-1, G3-2, G3-3 und NG4-1 an der Ischias-RNA durchgeführt. Dabei kam es in der RT-PCR teilweise zur Bildung von mehreren Produkten, die auch durch Variation der einzelnen PCR-Bedingungen nicht zu vermeiden waren (G3-3). Bei einem anderen Fragment konnte das Zielgen neben dem Standard nicht amplifiziert werden (G3-2). Nach einer weiteren Optimierungsphase konnte die RT-PCR mit internem cRNA-Standard für G3-1 und NG4-1 (Abb.5) an der Gesamt-RNA aus dem Ischiasnerv etabliert werden.



Abb. 5; Kompetitive RT-PCR für NG4-1 an boviner Ischias-RNA. Die Bedingungen der kompetitiven RT-PCR für das Fragment NG4-1 wurden an der Ischias-RNA ausgetestet. Die Bande bei 200 bp zeigte das endogen aus der Ischias-RNA erhaltene Produkt, die Bande bei 170 bp gab das Produkt aus der zugegebenen NG4-1 Kompetitor-cRNA, also dem Standard, wieder. Zur Kontrolle wurden die RT-PCR-Produkte in unterschiedlichen RNA-Konzentrationen der bovinen Ischias-RNA (Spur 1-3) und der NG4-1 Kompetitor-cRNA (Spur 16-18) aufgetragen. In den Spuren 4-15 wurden jeweils verschiedene Mengen der Ischias-RNA mit verschiedenen Mengen der NG4-1 Kompetitor-cRNA für die kompetitive RT-PCR eingesetzt. Dabei wurde im Reaktionsansatz für Spur 4 wenig Ischias-RNA und viel Kompetitor-cRNA für die reverse Transkription benutzt. Die Verhältnisse der RNA-Mengen wurden allmählich einander angeglichen (Spur 10+11), d.h. die Menge der Ischias-RNA wurde erhöht und die zugegebene Kompetitor-cRNA Menge wurde erniedrigt. In Spur 15 war nur noch die Bande bei 200 bp für das endogene Produkt aus der Ischias-RNA detektierbar.

Bei dem Versuch, die Expression dieser beiden Fragmente in den Femoralisästen mittels RT-PCR zu quantifizieren, zeigte sich, dass sich die für die Ischias-RNA optimierten Reaktionsbedingungen nicht auf den Femoralisnerv übertragen ließen. Die RT-PCR-Analyse erwies sich ebenfalls für die Verifizierung der differenziellen Expression der G3-1 (SPARC) mRNA als ungeeignet, da es bei Benutzung der RNA aus dem N. femoralis kein Reaktionsprodukt gab. Für eine erneute Optimierung war die Materialmenge zu gering.

Im Weiteren wurde die RT-PCR für NG4-1 an der Femoralis-RNA so optimiert, dass es zu folgendem Resultat kam: Bei Zugabe des kompetitiven Standards entstand neben den beiden erwarteten Produktbanden (siehe Abb.6; mittlere Bande-NG4-1; untere Bande-Standard) immer eine zusätzliche Heteroduplexbande (Hayward et al., 1998). Diese Bande befand sich im Agarosegel in einem höheren Bereich (220 bp), da das Produkt aufgrund der sterisch ungünstigeren Struktur langsamer im elektrischen Feld wandert. Das Heteroduplex-Produkt wurde durch Sequenzierung als solches identifiziert.

Unabhängig von der Heteroduplexbande wurde festgestellt, dass der mögliche Expressionsunterschied zwischen sensorischen und motorischen Nervenast zu gering war, um mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR detektiert zu werden.

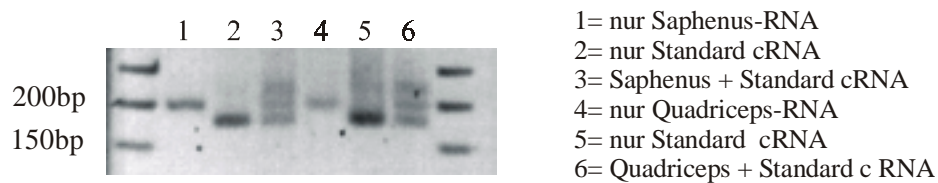


Abb. 6; RT-PCR für NG4-1 an boviner Femoralis-RNA. Die an der Ischias-RNA optimierten Reaktionsbedingungen wurden an der Femoralis-RNA angewendet. In den Spuren 1 und 4 konnte die Produktbande bei 200bp für das endogene NG4-1 detektiert werden. In den Spuren 2 und 5 wurde nur die Standard-cRNA eingesetzt, sodass hier nur die Bande bei 170bp für das Standard-Produkt sichtbar wurde. Sobald die RNA aus dem Gewebe (Spur 3 Saphenus-RNA und Spur 4 Quadriceps-RNA) mit der Standard-cRNA vermischt und eine kompetitive RT-PCR durchgeführt wurde, war immer eine zusätzliche Bande bei 220bp detektierbar. Hierbei handelte es sich um das Heteroduplex-Produkt.

4.2.4 Northern Blot-Analyse zur Untersuchung der differentiellen Expression

Die differentielle mRNA-Expression in den Ästen des N. femoralis wurde weiterhin durch Northern Blot-Analyse an Kalbsnerven untersucht. Die Versuchsbedingungen wurden durch Experimente an Ischias-RNA ausgetestet und optimiert.

Die RNA der voneinander getrennten sensorischen und motorischen Kalbsnerven wurde zunächst isoliert. Die größtmögliche Femoralis-RNA-Menge (20 µg pro Ast) wurde für diesen Northern Blot eingesetzt. Als Sonden dienten das 270 bp-lange bovine, über RT-PCR gewonnene cDNA-Fragment für G3-2 (m1) und ein 300 bp langes Fragment für G3-1 (SPARC). Diese cDNAs wurden durch Einbau von radioaktiven Nukleotiden in einer Klenow-Reaktion markiert. Die Sonden wurden zur Hybridisierung an Nylonmembranen benutzt, auf welche verschiedene RNAs (Maus- und Kalbshirn, Ischias-RNA vom Kalb und die Saphenus und Quadriceps-Kalbs-RNA) transferiert wurden. Zur Kontrolle der geblohteten RNA-Mengen wurden auch Sonden für BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) und dem *housekeeping* Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) eingesetzt.

Die Hybridisierungsbedingungen wurden zunächst an Gesamt-RNA aus wesentlich dickeren und längeren Ischiasnerven ermittelt. Dabei konnte ein Signal in Höhe von 2,4 kb für SPARC, 1,9 kb für BDNF und 1,3 kb für GAPDH detektiert werden. Eine Normalisierung der RNA-Menge auf die Gene BDNF und GAPDH in den Nervenästen des N. femoralis wurde nicht vorgenommen, da insbesondere die Expression von BDNF in diesem System nicht untersucht war. Eine zuverlässigere Bestimmung der aufgetragenen RNA-Menge war daher die fotometrische Konzentrationsbestimmung und die Kontrolle der Bandenintensität der 18 und 28 S Banden der ribosomalen RNA auf den mit Methylblau gefärbten Blotmembranen.

Wurde die entsprechende Menge (20 µg) an N. saphenus und N. quadriceps-Gesamt-RNA auf eine Membran geblottet, konnte hier kein Signal für SPARC detektiert werden (nicht abgebildet). Die beiden Kontroll-Sonden für GAPDH und BDNF zeigten auf derselben Membran ein positives Signal. Vermutlich wird SPARC weniger abundant im N. femoralis exprimiert, sodass der Nachweis mit Hilfe dieser wenig sensitiven Technik nicht erfolgen konnte. Durch die Northern Blot-Analyse konnte somit keine Aussage über die differenzielle Expression von G3-1 (SPARC) in den Nervenästen des bovinen N. femoralis getroffen werden.

Das Experiment wurde auch für die Untersuchung des Fragmentes G3-2 (m1) durchgeführt. Dabei wurde die 18 und 28 S-Bande der ribosomalen RNA zur Normalisierung verwendet. Auf der bovinen mRNA konnte ein Transkript für das neue Gen mit einer Länge von etwa 1,6 kb detektiert werden (Abb.7). Der Northern Blot zeigte ein etwas schwächeres Transkript auf der RNA des motorischen Nervenastes. Unter Berücksichtigung der tatsächlich aufgetragenen RNA-Menge (Normalisierung durch die ribosomale 28 S-Bande) unterschied sich die Expression der mRNA im sensorischen und motorischen Nervenast nicht signifikant.

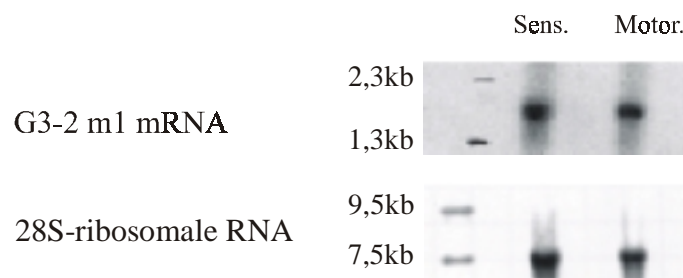


Abb. 7; Northern Blot-Analyse für G3-2 (m1) an boviner Femoralis-RNA. In diesem Blot wurde die Gesamt-RNA aus dem Kalbs N. saphenus (sens.) neben der Gesamt-RNA aus dem Kalbs N. quadriceps (motor.) aufgetragen. Nach Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten G3-2 (m1) Sonde, wurde ein Transkript mit einer Länge von ca. 1,6 kb detektiert, das etwas stärker im sensorischen Ast war. Die Kontrolle mit der ribosomalen 28 S-Bande zeigte jedoch, dass die Gesamtmenge der aufgetragenen sensorischen RNA im Vergleich zur motorischen RNA tatsächlich mehr war. Somit konnte das Ergebnis des Differential Displays, in dem die Expression von G3-2 im motorischen Ast stärker als im sensorischen Ast war, nicht verifiziert werden.

4.2.5 Semiquantitative RT-PCR an regenerierten Ratten-Femoralisnerven

Interessanterweise wurde SPARC in unserem Gemeinschaftsprojekt mit der Firma LION Bioscience AG in Heidelberg bei der Untersuchung der differentiellen Genexpression zwischen den regenerierten sensorischen und den regenerierten motorischen Maus-Femoralisnerven ebenfalls als unterschiedlich exprimiertes Gen identifiziert. Für diese Untersuchungen wurden von Dr. T. Brushart (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) adulte Mäuse operiert (Brushart, 1993). Bei dieser Operation wurde den Tieren unter Betäubung der Femoralisnerv lädiert, wobei die Läsion im oberen Bereich des Nerven durchgeführt wurde, der sowohl aus sensorischen als auch aus motorischen Fasern besteht. Nach drei Wochen wurde den Tieren der Saphenus- und der Quadricepsnerv entnommen und RNA isoliert. Die RNA aus den regenerierten Nerven wurde mit Hilfe der SSH-Methode (*suppression subtractive hybridization*) und der SAGE-Technik (*serial analysis of gene expression*) untersucht (Velculescu et al., 1995). Dabei zeigte sich für SPARC ein Verhältnis sensorisch zu motorisch von ca. 4:5 (Taganzahl 131:161). Demnach konnte auch hier eine erhöhte mRNA-Expression im N. quadriceps detektiert werden.

Häufig gibt es ähnliche Mechanismen in der Regeneration und der Entwicklung von Gewebe. Daher ist es möglich, dass die Gene, die im sich entwickelnden Kalbsnerven unterschiedlich exprimiert werden auch im regenerierten Nerven unterschiedlich exprimiert sind. Daher sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit dieser Befund auch an regenerierten Femoralisnerven von der Ratte untersucht werden. Die Rattennerven wurden genau wie die regenerierten Mausnerven behandelt und den Tieren nach dreiwöchiger Regeneration entnommen.

Als Technik wurde die semiquantitative RT-PCR mit GAPDH als *housekeeping* Gen zur Kontrolle gewählt. Dazu wurde die RNA aus Rattennerven isoliert und mit einem oligo-dT23-Primer revers transkribiert. In diesem Experiment (Abb.8) wurden sowohl für den N. saphenus als auch für den N. quadriceps drei unterschiedliche Mengen RNA für die reverse Transkription eingesetzt (fotometrische Bestimmung der RNA-Mengen; 25ng, 50ng und 100ng). An den erhaltenen cDNAs wurde mit genspezifischen Primern für G3-1 (SPARC), G3-2 (m1-cDNA) und GAPDH jeweils eine PCR durchgeführt. Das Ergebnis des Vergleichs von Saphenus- und Quadriceps-RT-PCR zeigte, dass in beiden Ästen sowohl G3-1 (SPARC) als auch G3-2 (m1-cDNA) exprimiert wurde, dass es aber keinen signifikanten Expressionsunterschied zwischen den Ästen gab. GAPDH diente zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge, der Qualität der reversen Transkription und der PCR-Güte.



Abb. 8; RT-PCR für m1, SPARC und GAPDH an Ratten Femoralis-RNA nach der Regeneration. Die Rattennerväste wurden drei Wochen nach einer Läsion aus der Ratte entnommen und zur RNA-Präparation verwendet. Die reverse Transkription wurde jeweils für die sensorische und motorische Seite mit verschiedenen RNA-Mengen (25ng, 50ng, 100ng) durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde für eine PCR eingesetzt und im Agarosegel aufgetrennt. Die Bandenintensität der RT-PCR Produkte von je drei Spuren aus der N. saphenus-RNA wurde mit den folgenden drei Spuren der RT-PCR Produkte vom N. quadriceps verglichen. GAPDH diente als Kontrolle für die eingesetzte RNA-Menge und der Güte der PCR. Die Produktbanden für m1 und SPARC waren im sensorischen und motorischen Nervenast nicht signifikant unterschiedlich.

4.3 Weitere Charakterisierungen des Fragmentes G3-1 (SPARC)

Da die Expression der mRNA oft keinen direkten Aufschluss über die Proteinexpression gibt, konnte eine differenzielle Proteinexpression im untersuchten Gewebe nicht ausgeschlossen werden. Auch eine unterschiedliche Lokalisation der Proteine in den Nervenästen des N. femoralis, ähnlich wie das HNK-1-Kohlenhydrat (siehe Abschnitt 2.3 und 2.4), das nur in den myelinisierenden Schwann-Zellen des motorischen Astes vorkommt und nicht auf den myelinisierenden Schwann-Zellen im sensorischen Ast, war denkbar und musste untersucht werden.

Für diese Analysen wurde Antikörper benötigt, die für biochemische und immunologische Untersuchungen verwendet werden konnten.

4.3.1 Identifizierung von SPARC

Die cDNA G3-1 konnte in der NCBI-Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*) als bereits eingetragene bovine Sequenz für SPARC identifiziert werden. Somit konnte das Fragment eindeutig diesem Gen zugewiesen werden, obwohl die aus dem Differential Display erhaltene Sequenz zum größten Teil aus dem untranslatierten Bereich am 3'-Ende der mRNA stammte. Die Sequenz stimmte zu 100% mit der bovinen SPARC-Sequenz überein.

SPARC steht für *secreted protein acidic and rich in cysteine*. Weitere Bezeichnungen des Proteins lauten BM-40 und Osteonectin. In Vertebraten kodiert die SPARC-cDNA ein 298-304 Aminosäuren langes, 43 kDa schweres Protein. Das Protein ist auf Aminosäureebene zwischen den Spezies hoch konserviert, die Maussequenz ist zur humanen Sequenz 93% identisch. Auf Nukleotidebene beträgt die Homologie 83% (Mason et al., 1986). Die mRNA des Maus-SPARCs hat eine Länge von 2,2 kb, die bovine SPARC mRNA ist 2,4 kb lang.

Da über die Datenbankanalyse SPARC auch in anderen Spezies als bekanntes Protein identifiziert werden konnte, war es möglich die Untersuchungen an anderen Tieren wie

Maus und Ratte (siehe Abschnitt 4.3.2) fortzuführen. Dies war insbesondere wegen des eingeschränkten Zugangs zu bovinem Gewebe von Vorteil.

4.3.2 Immunologische Untersuchung der SPARC-Expression im N. femoralis

Durch einen Antikörper, der freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. R. Timpl am MPI in Martinsried zur Verfügung gestellt wurde, konnte eine Untersuchung der Expression von SPARC auf Proteinebene erfolgen. Es handelte sich um einen polyklonalen anti-Maus Antikörper. Die Spezifität und auch die Kreuzreaktivität des Antikörpers mit dem bovinen Protein wurde zunächst in der Western Blot-Analyse getestet (Abb.9).

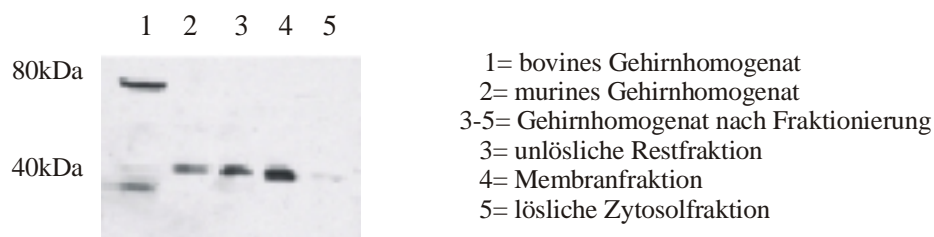


Abb. 9; Western Blot zum Test der Spezifität des polyklonalen anti-Maus-SPARC Antikörpers.

Aufgetragen wurden Gehirnhomogenate von Kalb und Maus sowie fraktionierte Gewebeproben. In den Proben der Maus war die erwartete Bande für SPARC bei 40 kDa gut zu erkennen. Im bovinen Gehirnhomogenat wurde eine schwächere Bande bei ca. 37 kDa und eine starke Bande bei 80 kDa detektiert, wobei es sich um das Homodimer handeln könnte.

Der Antikörper reagierte spezifisch mit einem ca. 40 kDa Protein im Mausgewebe. Auch im Hirnhomogenat des Kalbes konnte eine Bande detektiert werden, allerdings bei einem doppelt so hohen Molekulargewicht. Somit war zumindest die Spezifität für das Mausprotein in der Western Blot-Analyse gesichert, die Kreuzreaktivität zum bovinen Protein war dagegen fraglich.

Anschließend wurde die Tauglichkeit des Antiserums in der Immunhistochemie untersucht. Dazu wurden Gefrierschnitte von Maus Femoralisnerven mit dem anti-SPARC-Antikörper inkubiert. Es konnte eine Anfärbung spezifischer Strukturen durch die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse gezeigt werden (Abb.10). In den peripheren Nerven sind die Bindegewebshüllen SPARC-positiv. Besonders gut war die Färbung des Perineuriums zu erkennen. Von dieser Schicht ziehen Bindegewebfasern in das Innere des Nervenbündels, wodurch eine Septierung zustande kommt. Dieses Endoneurium genannte zarte Bindegewebe umhüllt die einzelnen Nervenfasern und bildet zusammen mit der Basalmembran der Schwann-Zellen die Endoneuralscheide. Der anti-SPARC-Antikörper markierte diese Basallamina und das Endoneurium der Schwann-Zellen. Diese Färbung war sowohl im N. quadriceps (Abb.10 C) als auch im N. saphenus (Abb.10 D) zu sehen. Des Weiteren waren vor allem im Saphenus stärker angefärbte Strukturen erkennbar. Bei diesen Strukturen handelte es sich um die nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen, vermutlich handelte es sich hierbei nicht nur um die Endoneuralscheide, sondern auch um

das Plasmalemma dieser Zellen. Diese Bereiche waren auch im motorischen Ast positiv, wobei die geringere Anzahl solcher Strukturen im N. quadriceps auf die weniger vorkommenden nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen im motorischen Ast zurückzuführen war. Weiterhin war eine axonale Färbung von einigen quergeschnittenen Fasern in beiden Nervenästen zu sehen. Diese war noch stärker, wenn die Inkubation des anti-SPARC-Antikörpers nicht für ca. 2h bei Raumtemperatur, sondern über Nacht bei 4°C erfolgte. Die positive Immunfärbung der nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen konnte durch eine Doppelimmunfärbung mit einem monoklonalen L1-Antikörper (555) bestätigt werden (Abb.10 B). L1 ist nur auf diesen Strukturen zu finden und somit ein geeigneter „Marker“.

Die immunologischen Untersuchungen wurden des Weiteren an regenerierten Maus-Femoralisnerven vorgenommen, wobei die Experimente eine stärkere SPARC-Expression, aber die gleiche Lokalisation wie in den nicht-beschädigten Femoralisnerven zeigten. Insgesamt war kein Unterschied der SPARC-Expression zwischen den beiden Nervenästen auszumachen.

Der SPARC-Antikörper wurde auch an Kalbsnerven getestet (Abb.10 E, F). Nachdem die positiven Strukturen im Mausnerven bekannt waren, konnte bestimmt werden, ob es sich um eine spezifische Immunreaktivität des Mausantikörpers mit dem Kalbsprotein handelte. Die Kalbsnerven zeigten ähnlich wie die Mausnerven die starke Färbung des Perineuriums, der Endoneuralscheide und zusätzlich der Blutgefäße. Eine SPARC-positive Markierung konnte in diesen größeren Nervenbündeln auch in den Axonen erkannt werden. Es gab wiederum keinen Unterschied zwischen N. saphenus und N. quadriceps.

Mit den angewendeten Methoden zur Analyse der differentiellen Genexpression konnte weder auf RNA- noch auf Proteinebene eine signifikant unterschiedliche SPARC-Expression zwischen dem sensorischen und motorischen Nervenast im N. femoralis bewiesen werden.

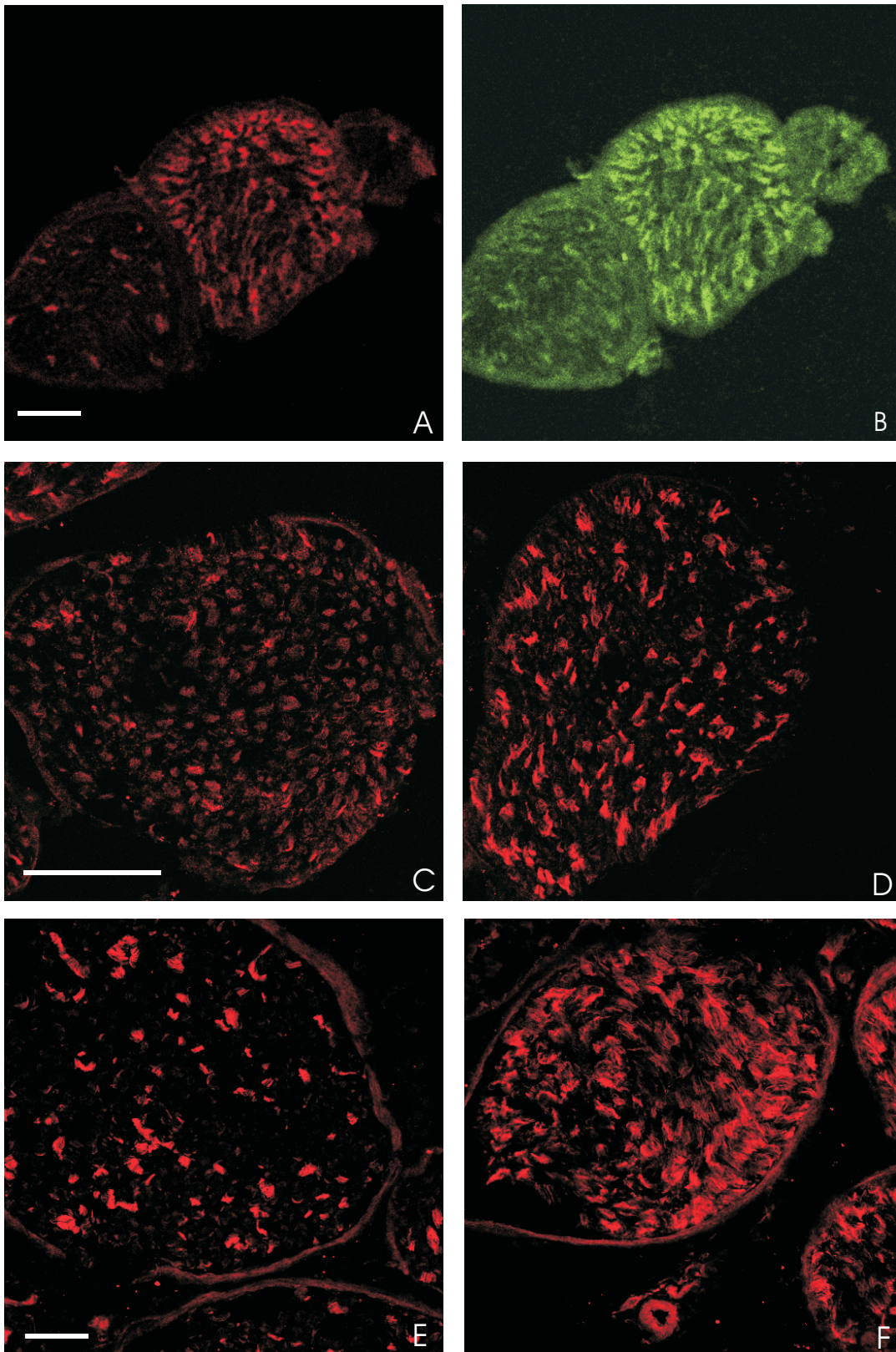


Abb. 10; Immunhistochemische Untersuchung der SPARC-Expression im N. femoralis. Bild A zeigt die anti-SPARC Immunreaktivität am murinen N. femoralis. Bild B zeigt die L1-Färbung des selben Nervs, wodurch die nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen markiert werden. Bild C zeigt eine Vergrößerung der SPARC-positiven Bereiche im murinen N. quadriceps und D im murinen N. saphenus. Auch die immunhistochemische Untersuchung am bovinen N. quadriceps (E) und am bovinen N. saphenus (F) wurde abgebildet. SPARC ist besonders stark im Endoneurium exprimiert. Die stärkere Färbung im N. saphenus kommt durch das gehäufte Vorkommen von nicht-myelinisierten Fasern in diesem Ast zustande.(Balken= 50 μ m)

4.4 Klonierung und Charakterisierung des m1-Gens

Ein weiteres cDNA-Fragment, das aus dem Differential Display erhalten wurde, war die Sequenz G3-2. Die Sequenz der bovinen cDNA zeigte eine hohe Homologie zu ESTs in den Datenbanken. Dabei stammten die homologen ESTs aus verschiedenen Spezies, vor allem aus Maus und Mensch. Da die Identität auf Nukleotidebene bei 89% lag, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um den kodierenden Bereich und um die orthologen Sequenzen zum bovinen Fragment handelte. Dieses EST wurde im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit zunächst auf die differenzielle Expression auf RNA-Ebene in den Ästen des Femoralisnervs untersucht. Eine signifikante differenzielle Expression konnte weder durch RT-PCR noch durch Northern Blot-Analyse (Abschnitt 4.2) bewiesen werden. Auch auf Proteinebene konnte keine unterschiedliche Expression festgestellt werden (Abschnitt 4.4.1). Das EST war jedoch als neues, uncharakterisiertes Genfragment in Schwann-Zellen entdeckt worden und war daher von besonderem Interesse. Die RNA-Verteilung in der Maus wurde durch Northern Blot-Analyse (Abschnitt 4.4.2) und *in-situ*-Hybridisierungen untersucht (Abschnitt 4.4.3). Das Gen mit der Bezeichnung m1 wurde in voller Länge als cDNA kloniert und seine genomische Struktur aufgeklärt (Abschnitt 4.4.12). Die chromosomale Lage konnte identifiziert werden (Abschnitt 4.4.13). Ein Peptidantikörper wurde generiert und seine Spezifität im Western Blot (Abschnitt 4.4.6) und in der Immunzytochemie untersucht (Abschnitt 4.4.9). Anschließend konnte die zelluläre Lokalisation (Abschnitt 4.4.8) und die Expression des Proteins insbesondere im Nervensystem dokumentiert werden (Abschnitt 4.4.10). Es wurden Transfektionsexperimente in Zellkulturzellen durchgeführt (Abschnitt 4.4.7), um einen möglichen Einfluss der Überexpression zu untersuchen. Aufgrund der chromosomalen Lokalisation wurde untersucht, ob das m1-Gen für eine Neuropathie (CMT4B) oder eine spinale Muskelatrophie (SMARD) verantwortlich ist (Abschnitt 4.4.14). Genomische DNA von betroffenen Patienten wurde auf mögliche Mutationen in dem neuen Gen untersucht.

4.4.1 Klonierung der vollständigen cDNA von m1 durch Datenbank- und PCR-Analysen

Die Untersuchung der sensorischen und motorischen Nervenäste des N. femoralis war auch für die Identifizierung unbekannter Gene interessant. Das im Differential Display entdeckte cDNA-Fragment G3-2 wurde als neues Gen aus peripheren Nerven amplifiziert. Im weiteren Verlauf der Arbeit war es wichtig, das Gen weiter zu analysieren, um evtl. auf eine Funktion des entsprechenden Proteins insbesondere im Nervensystem schließen zu können.

Für die bovine Sequenz des G3-2-Fragmentes konnten in den Datenbanken viele ESTs mit einer hoch homologen Sequenz identifiziert werden. Diese ESTs stammten größtenteils aus Maus und Mensch. Die weitere Analyse dieser ESTs erfolgte überwiegend mit Hilfe der Datenbanken. Am Beispiel der humanen ESTs soll die weitere Vorgehensweise

beschrieben werden, die entsprechenden Recherchen wurden auch an den murinen ESTs vollzogen.

Die erhaltenen ESTs stammten aus verschiedenen Geweben. Mit Hilfe des *Unigene*-Programms der NCBI-Datenbank wurden die EST-Sequenzen automatisch miteinander verglichen und die überlappenden Sequenzbereiche „geclustert“. Dadurch konnten weitere ESTs gefunden werden, die zusätzliche Sequenzinformationen in 5'-sowie in 3'-Richtung enthielten. Durch die Software war es nun möglich, diese neue Sequenzinformation wieder mit weiteren ESTs zu vergleichen. Sobald es ESTs gab, die mit diesem Bereich teilweise übereinstimmten, wurde genau mit diesen Sequenzen weitergesucht, bis letztendlich keine weitere homologe EST-Sequenz in der Datenbank vorhanden war. Durch eine Aneinanderreihung dieser Sequenzen konnte ein verlängertes cDNA-Fragment, der EST-Cluster, gewonnen werden. Aus diesem erhaltenen Fragment wurde ein „Contig“ erstellt. Ein „Contig“ bedeutet, dass alle überlappenden EST-Sequenzen miteinander verglichen und zu einer Sequenz zusammengeführt werden. Als „Contig-Sequenz“ resultiert die Nukleotidabfolge, wie sie in den meisten EST-Sequenzen vorkommt. Somit können mit hoher Wahrscheinlichkeit Fehler der einzelnen EST-Sequenzierungen ausgeschlossen werden. Durch diese Analyse konnte für die humane Sequenz ein Unigene-Cluster mit der Nummer Hs42743 und einer Länge von 702 bp und für die Maus-Sequenz der Unigene-Cluster Mm43017 mit einer Länge von 1052 bp erstellt werden.

Für den humanen Cluster konnte ein offener Leserahmen mit Hilfe des BCM-Programms (*Baylor College of Medicine Search Launcher*) identifiziert werden, der am 3'-Ende ein Stopkodon aufwies. Im 5'-Bereich konnte allerdings kein Start-Methionin identifiziert werden. Dagegen ließ sich aus dem Maus-Cluster nach Translation im Leserahmen +1 ein vollständiges Protein ableiten. Ein Stopkodon 6 Aminosäuren vor dem Start-Methionin erhöhte die Wahrscheinlichkeit, dass dieses ATG tatsächlich das Startkodon war (Kozak, 1996). Das Protein hatte eine Länge von 229 Aminosäuren und endete mit der gleichen Sequenz wie der translatierte humane Cluster. Der hohe Grad der Übereinstimmung zwischen dem humanen und dem murinen Sequenzcluster legte den Schluss nahe, dass es sich hierbei um kodierende Teile zweier orthologer cDNAs handelte.

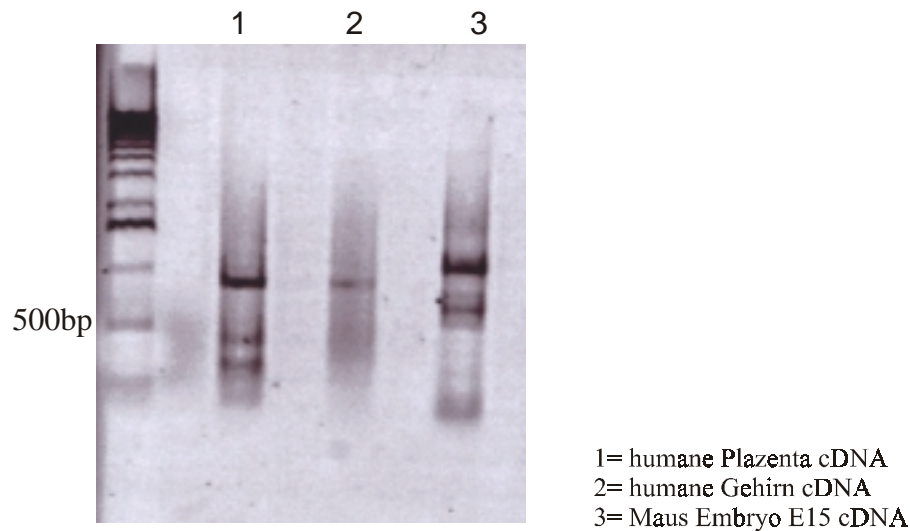


Abb. 11; 5'RACE PCR für m1 aus humaner und muriner Marathon cDNA-Bank. Die Produkte der *nested*-PCR mit den Primern AP2 des Marathon-Kits und einem genspezifischen Primer wurden im Agarosegel aufgetrennt. In den Produkten aus der humanen Plazenta-cDNA war ein hervorragendes Transkript mit einer Länge von etwa 850 bp auffällig, welche der erwarteten mRNA-Länge von m1 entsprach. Aus der murinen Embryo- cDNA konnte eine stärkere Bande bei 1050 bp detektiert werden. Alle Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und sequenziert. Die humane Produktbande konnte als m1 identifiziert werden.

Diese Resultate der Datenbankrecherche mussten durch eine Sequenzanalyse der cDNA verifiziert werden. Dazu wurde zunächst eine RACE-PCR durchgeführt. Durch Nutzung des „Marathon“-Kits von Clontech konnte mit Adaptorprimern und einem genspezifischen Primer eine Amplifikation der gesuchten Fragmente erfolgen. Anschließend wurde eine spezifischere PCR mit *nested*-Primern (weiter innenliegenden Primern) durchgeführt (Abb.11). Aus der humanen Plazenta-cDNA konnte ein Produkt von ca. 850 bp erhalten werden. Aus der Mausembryo-cDNA wurden im 5'-RACE-Ansatz 2 Banden erhalten. Alle Banden wurden analysiert. Dabei konnte die Sequenz des humanen PCR-Produktes bestimmt werden. Diese Sequenz stimmte fast vollständig mit der Sequenz des humanen *Unigene*-Clusters überein, wies aber darüber hinaus noch 100 zusätzliche Basenpaare des 5'-Endes auf. Auch diese Sequenz wurde in alle sechs Leserahmen translatiert. Dieses Mal konnte ein offener Leserahmen gefunden werden, der wie bereits im Mauscluster mit einem Start-Methionin am 5'-Ende begann. Auch in dieser Sequenz konnte man davon ausgehen, dass es sich um das Startkodon handelte, denn nur zwei Aminosäuren vorher konnte ein Stopkodon identifiziert werden. Das Protein hatte eine Länge von 229 Aminosäuren.

Die Analyse der RACE-PCR-Produkte aus Maus cDNA ergab keine Sequenzinformation. Damit die Datenbankanalyse aber bestätigt werden konnte, wurden Primer aus der Sequenz des murinen *Unigene*-Clusters entworfen. Die Primer wurden möglichst weit ans 5'- und 3'-Ende des Clusters gelegt. Unter Verwendung dieser Primer wurde eine PCR mit Maus cDNA als *template* durchgeführt. Das Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen. Eine starke Bande bei der erwarteten Größe von 1050 bp konnte detektiert werden. Die

Sequenzanalyse des aufgereinigten PCR-Produktes ergab eine vollständige Übereinstimmung mit der Maus-Clustersequenz.

Die erhaltenen Nukleotidsequenzen aus Maus und Mensch sowie die Aminosäuresequenzen der neuen Proteine wurden analysiert. Die Sequenzen zeigten auf Nukleotidebene eine Identität von 89 %, auf Aminosäureebene von 98 %. Homologe Proteine konnten durch weitere Datenbankrecherchen auch in anderen Spezies (*Drosophila* und *C.elegans*) identifiziert werden, dabei war das Protein zwischen den Spezies hoch konserviert (Abb.12).

Besonders auffällig in der Aminosäuresequenz war das gehäufte Vorhandensein von geladenen Aminosäuren. Das gesamte Protein war zu 20 % aus den positiv geladenen (basischen) Aminosäuren Lysin und Arginin und zu 22 % aus den negativ geladenen (sauren) Aminosäuren Glutamin- und Asparaginsäure aufgebaut. Es gab kein bekanntes Protein, das eine Sequenzähnlichkeit zu diesem neuen Protein zeigte. Das neuronale Protein GAP-43 (auch Neuromodulin genannt) wies eine Aminosäureidentität von 24 % mit m1 auf. Diese identischen Aminosäuren waren allerdings auf das gesamte Protein verteilt und nicht in bestimmten funktionellen Domänen konzentriert.

Des Weiteren konnte durch die Proteindatenbank-Analyse (ExPASy-Datenbanken) eine Strukturvorhersage vorgenommen werden. Danach hat das gesamte Protein vermutlich eine coiled-coil Struktur. Außerdem enthält das Protein ein NLS-Signal (*nuclear localisation signal*). Dieses Signal beginnt an der Aminosäure 60 und hat die Sequenz RRELEERERAAAREKNRD. Die zelluläre Lokalisation des Proteins sollte demnach im Zellkern sein. Durch diese Analyse konnten auch mögliche Proteinkinase C- und Caseinkinase II-Phosphorylierungsstellen und auch N-Glycosylierungsstellen identifiziert werden. In diesen möglichen Modifikationsbereichen wurden jedoch keine identischen Sequenzen bekannter Proteine, die phosphoryliert oder glycosyliert werden, gefunden. Die Wahrscheinlichkeit, dass m1 an diesen Stellen tatsächlich modifiziert wird, ist also eher gering.

```

mouse      1  MTTAARPTFEPARGGRGKGGEDLSQLSKQYSSRDLPSTHKIKYRQTTQDAPEEVRNRDFR
human      1  MTTAARPTFEPARGGRGKGGVLSQLSKQYSSRDLPSTHKIKYRQTTQDAPEEVRNRDFR
C.elegans  1  MTTAHRPTFEPARGGTARGEGDLSKLSNQYSSKDMPSHTKMKYRQTGQETEADLRKKDLR
Drosphila  1  MTTAARPTFDPARGGSGRGEKDLSELSKQYSSRDLPCHTKLKYRETGQGTSDENRRNDFR

mouse      61  RELEERERAAAARDKNRDRP-----TREHTTSSSVSCKPRL
human      61  RELEERERAAAREKNRDRP-----TREHTTSSSVSCKPRL
C.elegans  61  RELEDKERNATREKRARDS-----ASSSSSHSKRQRMDQI
Drosphila  61  KELEEREREARSMTGATSSSSGKALPSIVRKAIEANNAGGGSSAAKRSKPDAGQQQAQQA

mouse      96  DQIPAAANLDADDPLTDEEDEDDEEESDDDDTAALLAELEKIKKERAEEQARKEQEQAEE
human      96  DQIPAAANLDADDPLTDEEDEDDEEESDDDDTAALLAELEKIKKERAEEQARKEQEQAEE
C.Elegans  96  AAESAASVDADEFAVDELNSSDDDD-SDEDDTAALMAELEKIKKERAEEKAAARDEEIKEKE
Drosphila121 AQQQAAANMDADEPLDNDSSDSDS--SDDDAALLAELOKIKQERLQETARRESEKKQED

mouse      156  ERIRMENILSGNPLLNLT-----GPSQPQANFKVKRRWDDDDVVFKNCAKGIDDQKK
human      156  ERIRMENILSGNPLLNLT-----GPSQPQANFKVKRRWDDDDVVFKNCAKGVDDQKK
C.elegans155 EKQORMENILAGNPLLNDTP-----AGSSTSGGDFTVKRRWDDDDVVFKNCAKGVEEKK
Drosphila179 ERIRMENILSGNPLMNYEPGTAASAAGRASGLGGDLKIKRRWDDDDVVFKNCARSA PDKK-

mouse      207  DKRFVNDTLRSEFHKKFMEKYIK
human      207  DKRFVNDTLRSEFHKKFMEKYIK
C.elegans208 EVTFINDALRSEFHKKFMDKYIK
Drosphila238 -TFVNDALRSDFHKKFMDKYIK

```

Abb.12; Proteinfamilie m1. Durch Datenbankrecherche konnte aus verschiedenen Spezies das m1-Protein teilweise als *Unigene*-Cluster und teilweise als vollständige cDNA-Sequenzen gefunden und in die Aminosäuresequenz translatiert werden. Das hoch konservierte Protein ist in Mensch, Maus, Drosophila und C. elegans zu finden. Identische Aminosäuren sind schwarz, isofunktionelle Austausche von Aminosäuren sind grau unterlegt.

4.4.2 Untersuchung der m1 mRNA-Expression;

Charakterisierung der mRNA-Expression im Multiple Tissue Northern Blot (MTN^R) und Multiple Tissue Array (MTETM)

Für eine weitere Charakterisierung des m1-Gens war es zunächst wichtig, einen guten Überblick über die m1-RNA-Expression zu erhalten. Dazu wurden kommerziell erhältliche Northern Blots und Dot Blots eingesetzt (Clontech). Die Detektion erfolgte mit einer aus humaner m1-cDNA hergestellten ³²P-markierten Sonde von 800 bp Länge. In der Northern Blot-Analyse (Abb.13) konnte ein deutliches Signal in einer Höhe von ca. 900 bp für die vollständige humane m1-mRNA detektiert werden. Das Signal war besonders stark in der mRNA aus dem Skelettmuskel zu erkennen. Auch im Herzen, der Niere, der Leber und in der Lunge war eine stärkere Bande zu sehen. Im Gehirn war nur ein schwaches Signal zu identifizieren.

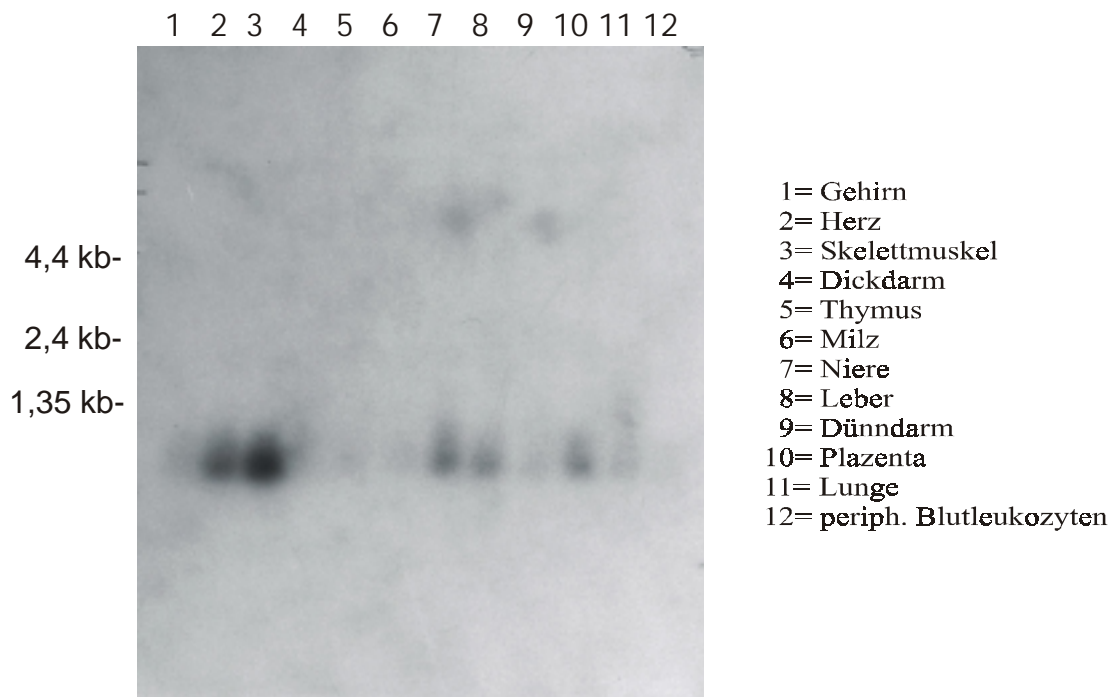
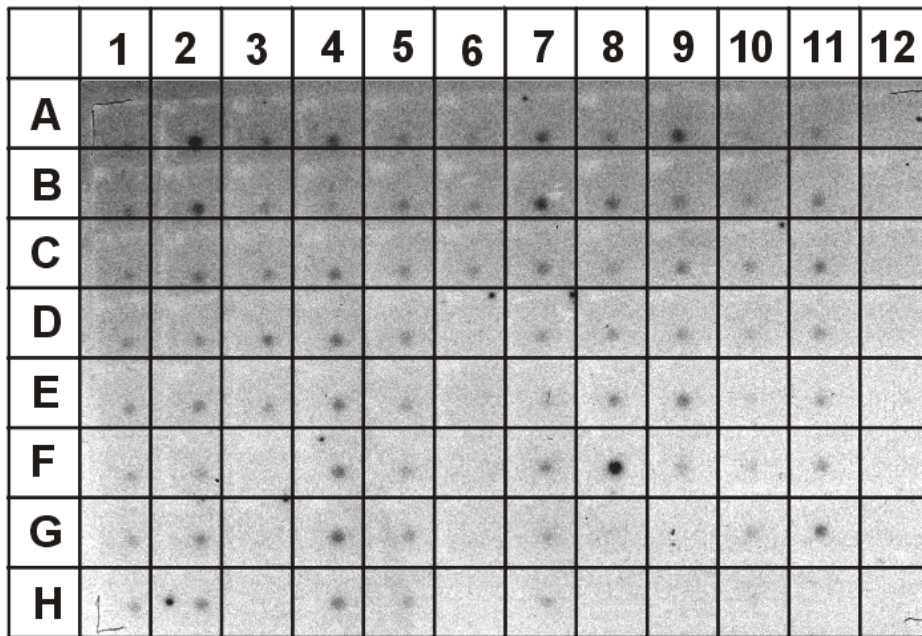


Abb. 13; Der *Multiple Tissue Northern Blot* von Clontech wurde mit einer radioaktiv gelabelten m1-Sonde hybridisiert. Es wurde eine Bande in Höhe von 900 bp detektiert, die der mRNA Länge von m1 entspricht. Eine besonders starke Expression war im Skelettmuskel sichtbar. Auch im Herzen, der Niere, Leber und in der Lunge war die Bande gut zu erkennen. Das Signal im Gehirn war schwach.

Dieses Expressionsmuster stimmte auch mit den Ergebnissen des Multiple Tissue Arrays (Abb.14) (kommerziell erhältlicher Dot Blot, Clontech) überein, d.h. die etwas stärkeren Dots waren im Skelettmuskel, im Herzen, in der Niere, in der Leber und im Testis zu erkennen. Unter den Gehirnregionen wies das Kleinhirn die höchste Signalintensität auf. Im Übrigen konnte in diesem Experiment eine ubiquitäre Expression der m1-mRNA erkannt werden.



A1 brain, whole	B1 cerebral cortex	C1 frontal lobe	D1 parietal lobe
A2 cerebellum, left	B2 cerebellum, right	C2 corpus callosum	D2 amygdala
A3 substantia nigra	B3 accumbens nucleus	C3 thalamus	D3 pituitary gland
A4 heart	B4 aorta	C4 atrium, left	D4 atrium, right
A5 esophagus	B5 stomach	C5 duodenum	D5 jejunum
A6 colon, transverse	B6 colon, descending	C6 rectum	D6 empty
A7 kidney	B7 skeletal muscle	C7 spleen	D7 thymus
A8 lung	B8 placenta	C8 bladder	D8 uterus
A9 liver	B9 pancreas	C9 adrenal gland	D9 thyroid gland
A10 leukemia, HL-60	B10 HELA S3	C10 leukemia, K-562	D10 leukemia, MOLT-4
A11 brain, fetal	B11 heart, fetal	C11 kidney, fetal	D11 liver, fetal
A12 yeast total RNA	B12 yeast tRNA	C12 E.coli rRNA	D12 E. coli DNA
E1 occipital lobe	F1 temporal lobe	G1 p.g. of cerebral cortex*	H1 pons
E2 caudate nucleus	F2 hippocampus	G2 medulla oblongata	H2 putamen
E3 spinal cord	F3 empty	G3 empty	H3 empty
E4 ventricle, left	F4 ventricle, right	G4 interventricular space	H4 apex of the heart
E5 ileum	F5 ilocecum	G5 appendix	H5 colon, ascending
E6 empty	F6 empty	G6 empty	H6 empty
E7 periph. blood leuk.**	F7 lymph node	G7 bone marrow	H7 trachea
E8 prostate	F8 testis	G8 ovary	H8 empty
E9 salivary gland	F9 mammary gland	G9 empty	H9 empty
E10 Burkitt's ***	F10 Burkitt's ****	G10 SW480 *****	H10 lung carcinoma, A549
E11 spleen, fetal	F11 thymus, fetal	G11 lung, fetal	H11 empty
E12 Poly r(A)	F12 human C α -1 DNA	G12 human DNA, 100 ng	H12 human DNA, 500 ng

Abb. 14; Multiple Tissue Array von Clontech. Der mRNA-Dot Blot wurde mit einer radioaktiven m1-Sonde hybridisiert. Die Signale in den Feldern A2 und B2 (Cerebellum links und rechts), A4 (Herz), A7 (Niere), A9 (Leber), B7 (Skelettmuskel) und F8 (Testis) waren etwas deutlicher. Bis auf die Gewebe zur Negativkontrolle in Spur 12 zeigten alle Gewebedots ein positives Signal.

4.4.3 Untersuchungen der m1-mRNA-Expression durch *in-situ*-Hybridisierungen an Embryonen und am adulten Gehirn

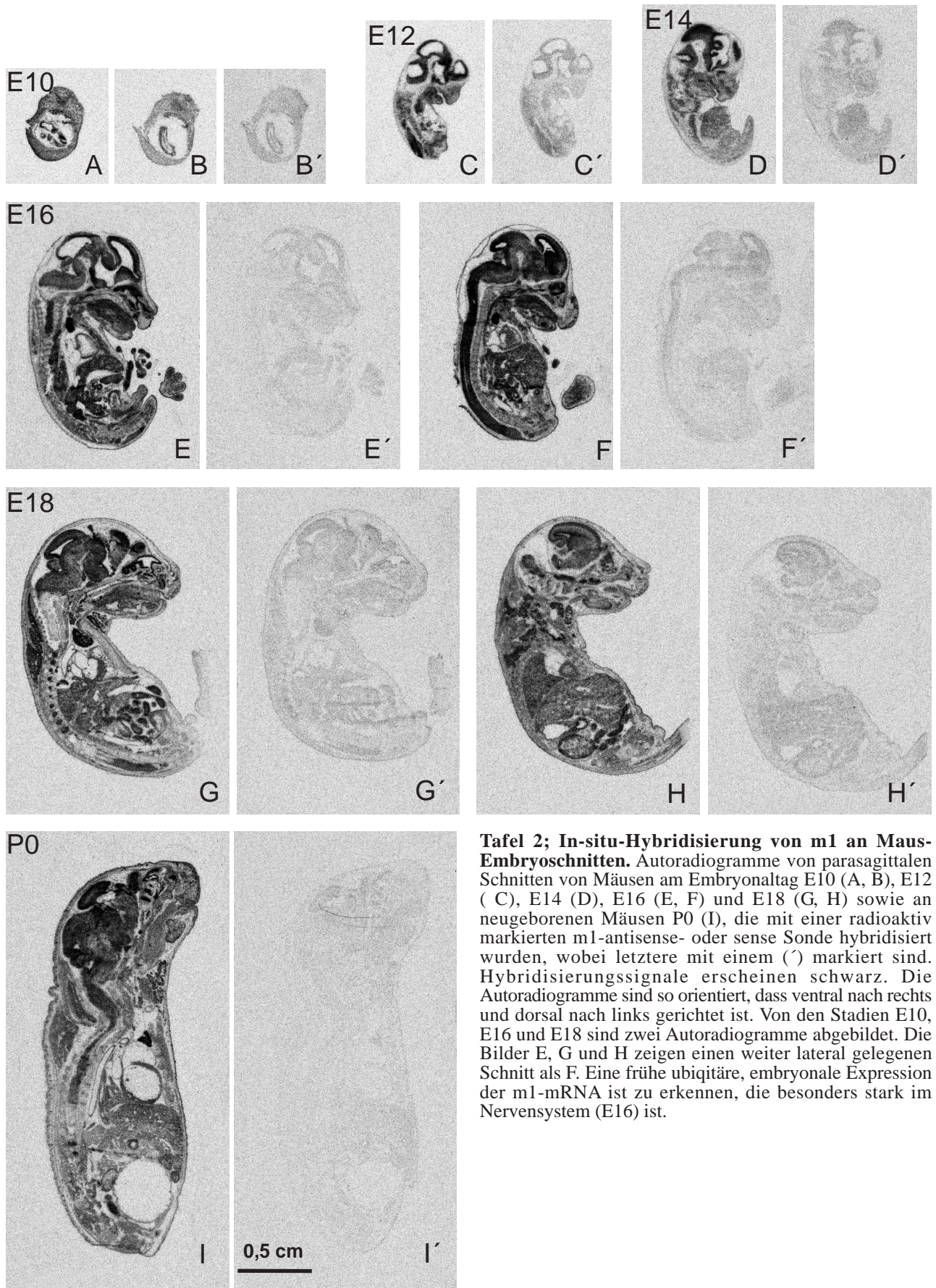
Für die *in-situ*-Hybridisierungen wurden verschiedene Sonden aus der murinen m1-cDNA hergestellt. Dabei wurde eine Sonde über die gesamte cDNA-Länge (ca. 1000 bp) konstruiert. Eine weitere Sonde stammte vom 5'-Ende der cDNA und hatte eine Länge von ca. 350 bp. Die dritte Sonde erstreckte sich über den 3'-Bereich der murinen m1-cDNA. Sie hatte eine Länge von ca. 750 bp. Auch die entsprechenden sense-Sonden wurden hergestellt. Diese dienten als Negativkontrollen.

Die ³⁵S-markierten Sonden wurden an Gewebeschnitten hybridisiert. Es wurde eine Reihe von Längsschnitten von Mäusen im Alter von Embryonaltag 10, 12, 14, 16 und 18 vorbereitet (Abb.15). Auch von neugeborenen Mäusen wurden Längsschnitte angefertigt. Diese Präparate wurden von Dr. S. Fehr in der Serviceeinrichtung des ZMNH hergestellt.

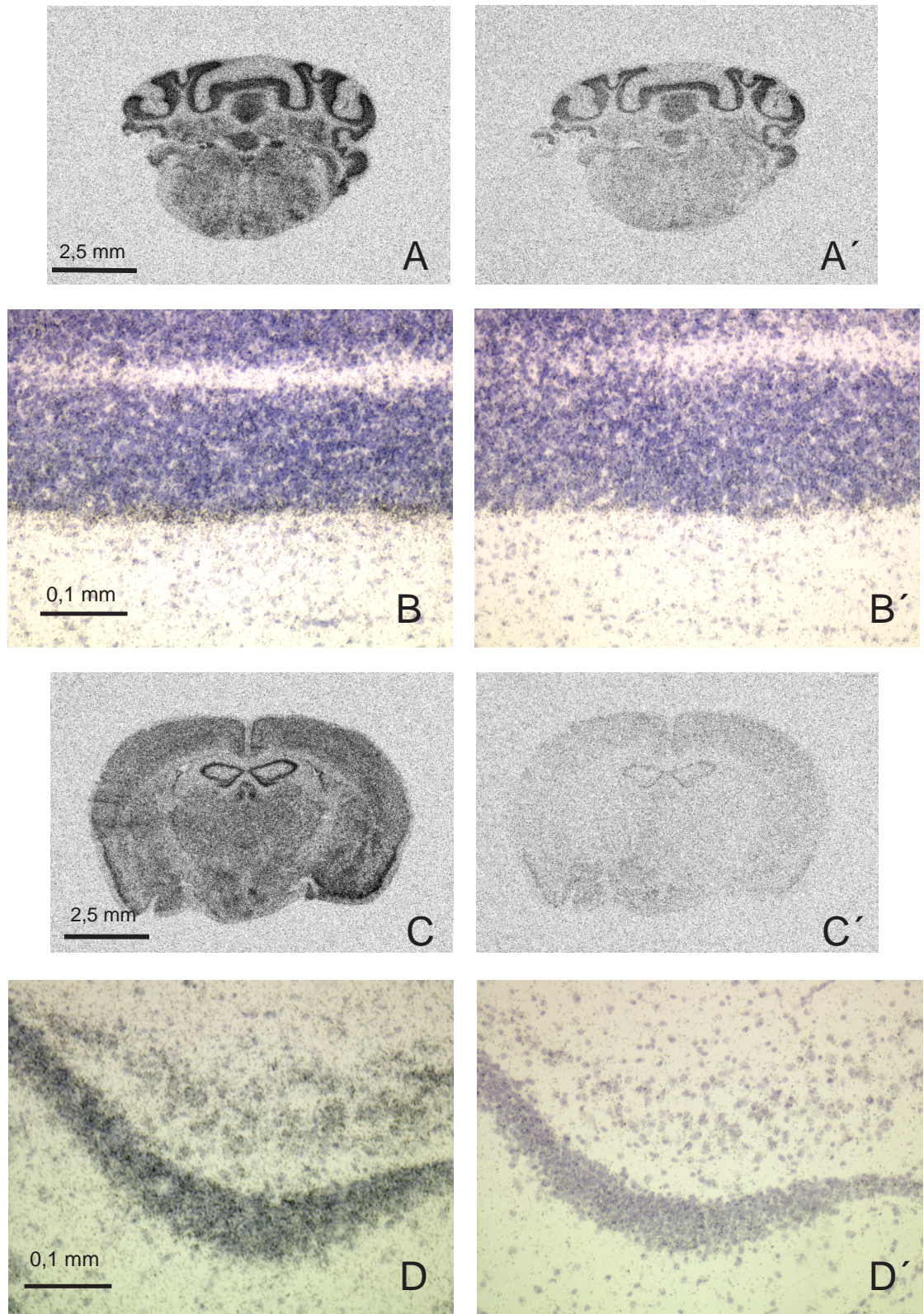
Die Embryonen zeigten bereits am Tag 10 eine starke m1-mRNA-Expression (Abb.15 A, B). Dabei waren insbesondere das Neuralrohr und die Somiten positiv. Diese Konzentrierung auf das Nervensystem war auch in der weiteren Entwicklung deutlich. Die Embryonen am Tag 12 und 14 waren alle einheitlich markiert (Abb.15 C, D), wobei das gesamte Nervensystem immer hervortrat. Am Embryonaltag 16 war die m1-Expression besonders stark (Abb.15 E, F). Der gesamte Embryo war m1-positiv, allerdings war eine besonders intensive Markierung im Rückenmark, im gesamten Gehirn, Ganglien, Thymus, Nackenmuskulatur, Herzen und Niere zu erkennen. In einer anderen Schnittebene konnte auch eine starke m1-mRNA-Expression des Diaphragmas verdeutlicht werden (Abb.25, Abschnitt 4.4.14). Das Expressionsmuster blieb erhalten im Embryonaltag 18 (Abb.15 G, H), wobei die Markierung im Nervensystem zwar stark aber nicht ganz so kräftig war wie am Tag 16. Auch die neugeborenen Mäuse (Abb.15 I) zeigten eine eher ubiquitäre Expression der m1-mRNA mit besonderer Konzentrierung auf das Nervensystem.

Die adulten Gehirnschnitte waren ebenfalls ubiquitär m1-positiv (Abb.16). Hier konnten einzelne Areale als stärker m1-exprimierende Regionen erkannt werden. Dabei handelte es sich um den Hippocampus, das Cerebellum und den pyriformen Cortex. Diese Bereiche sind insbesondere durch eine hohe Zelldichte gekennzeichnet.

Durch die *in-situ*-Hybridisierungen wurde deutlich, dass die m1-mRNA bereits in der frühen embryonalen Entwicklung exprimiert wurde. Dabei war die Expression ubiquitär und insbesondere auf das Nervensystem konzentriert. In der Embryonalentwicklung konnten auch weitere Gewebe als starke m1-exprimierende Bereiche erkannt werden, wie die Ganglien, Thymus, Herz, Niere und Nackenmuskulatur. Die starke m1-Expression konnte auch im adulten Stadium im Gehirn detektiert werden.



Tafel 2; In-situ-Hybridisierung von m1 an Maus-Embryoschnitten. Autoradiogramme von parasagittalen Schnitten von Mäusen am Embryonaltag E10 (A, B), E12 (C), E14 (D), E16 (E, F) und E18 (G, H) sowie an neugeborenen Mäusen P0 (I), die mit einer radioaktiv markierten m1-antisense- oder sense Sonde hybridisiert wurden, wobei letztere mit einem (') markiert sind. Hybridisierungssignale erscheinen schwarz. Die Autoradiogramme sind so orientiert, dass ventral nach rechts und dorsal nach links gerichtet ist. Von den Stadien E10, E16 und E18 sind zwei Autoradiogramme abgebildet. Die Bilder E, G und H zeigen einen weiter lateral gelegenen Schnitt als F. Eine frühe ubiquitäre, embryonale Expression der m1-mRNA ist zu erkennen, die besonders stark im Nervensystem (E16) ist.



Tafel 3; In-situ-Hybridisierung von m1 an adulten Maus-Gehirnschnitten. Murine Gehirne wurden coronal geschnitten und mit einer radioaktiv markierten antisense-Sonde oder eine sense-Sonde hybridisiert, letztere Negativkontrollen sind mit einem (') markiert. Schnitte in der cerebellaren (A, A') und einer frontalen (C, C') Ebene sind als Autoradiogramme gezeigt. Hybridisierungssignale erscheinen schwarz. Man erkennt eine besonders starke m1-mRNA-Expression im Cerebellum, Hippocampus und pyriformen Cortex. Vergrößerte Aufnahmen stellen das Cerebellums (B, B') und den Hippocampus (D, D') dar. Diese Schnitte wurden mit einer Photoemulsion behandelt und sind als Hellfeld-Aufnahme gezeigt. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt, so dass die Zellkerne blau erscheinen. Die Hybridisierungssignale erscheinen als schwarze Punkte. Das Signal im Cerebellum ist nicht abhängig von der Zelldichte, wie es im Hippocampus der Fall ist.

4.4.4 Untersuchung der Protein-Expression;

Herstellung und Charakterisierung eines Peptid-Antikörpers

Die Analyse von physiologischen Proteinfunktionen erfordert in der Regel eine Lokalisation des untersuchten Proteins in nativem Gewebe. Um das m1-Protein lokalisieren zu können und damit Hinweise auf seine Funktion zu erhalten, wurde ein spezifischer Antikörper gegen das Protein hergestellt. Dazu wurde ein 16-mer Peptid zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Peptidsequenz (MTTAARPTFEPARGGR) wurde vom N-Terminus des Maus-Proteins abgeleitet.

4.4.5 Überprüfung der Antiseren durch Western Blot-Analyse

Zur ersten Kontrolle der Immunreaktivität der erhaltenen Seren wurden nach jeder Immunisierungsinjektion Western Blot-Analysen mit Gesamt-Gehirnhomogenaten durchgeführt. Erst als die Reaktivität des Antiserums ein deutliches Signal bei 32 kDa zeigte, wurde das Serum für weitere Untersuchungen verwendet (nicht abgebildet).

4.4.6 Spezifität des anti-m1-Antikörpers

Da das Molekulargewicht der vom Antiserum erkannten Bande nicht spezifisch sein musste, sondern auch durch ein gleichgroßes kreuzreaktives Protein zustande kommen konnte, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Dazu wurde das Antiserum mit dem Peptid, das zur Immunisierung der Kaninchen verwendet wurde, präinkubiert. In dieser Inkubationszeit sollte der im Serum erzeugte Antikörper an das m1-Peptid binden und abgesättigt werden. Ein so blockierter Antikörper sollte im anschließenden Western Blot-Experiment keine Immunreaktivität mehr zeigen. Zur Negativ-Kontrolle für diese Untersuchung wurde ein gleiches Aliquot des Antikörpers mit einem unspezifischen Peptid präinkubiert.

In Abb.14 ist erkennbar, dass das mit dem spezifischen Peptid vorbehandelte Antiserum kein Protein mehr auf dem Blot detektierte (Abb.17, linke Seite), wohingegen das unspezifische Peptid keinen Einfluss auf die Reaktivität des Antikörpers hatte (Abb.17, rechte Seite). Die Spezifität des hergestellten Antikörpers für das neue Protein m1 war somit sichergestellt. Der Antikörper erkannte in diesem Experiment eine klare Proteinbande in Höhe von ca. 32 kDa. Die berechnete Molekülmasse des Proteins lag bei 27 kDa. Zusätzlich wurde im Gesamtlisat der transfizierten CHO-Zellen (siehe Abschnitt 4.4.7) eine zweite etwas höher liegende Bande detektiert. Diese zweite Proteinbande deutete darauf hin, dass es sich um das exogene Proteinprodukt handelte, das einen 6x Histidin- und einen c-myc-Tag trägt. Durch diese anhängenden Tag-Sequenzen konnte das langsamere Laufverhalten im SDS-Gel erklärt werden (vgl. Abb.20).

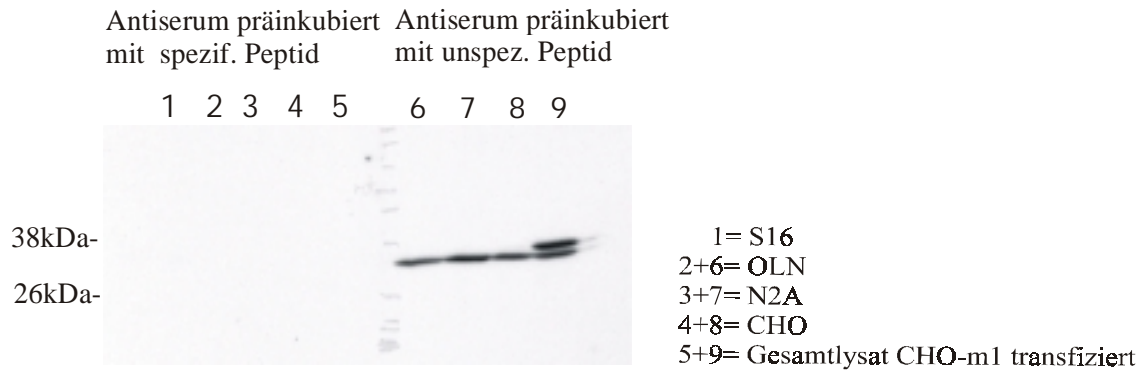


Abb. 17; Blockierungstest zur Spezifität des anti-m1 Antikörpers. Zur Kontrolle der Spezifität des hergestellten Antikörpers wurde das Serum mit dem Peptid, das zur Immunisierung der Kaninchen diente, präinkubiert. Dieser vorbehandelte Antikörper erkannte kein Protein im Western Blot. Die reaktiven Bindungsstellen wurden durch das Peptid spezifisch blockiert. Als Negativkontrolle wurde das Serum mit einem nicht spezifischen Peptid entsprechend vorinkubiert. Hier blieb die Reaktivität des Antikörpers voll erhalten, er erkannte die Proteinbande bei 32 kDa für m1 und die zusätzliche Bande des exogenen m1-Fusionsproteins mit 6xHistidin- und c-myc-Tag aus den transfizierten CHO-Zellen.

4.4.7 Transiente Transfektion

Für funktionelle Untersuchungen des Proteins wurden Transfektionsexperimente durchgeführt (Abb.18). Dazu wurde die Maus-m1-cDNA in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert. Der pcDNA3.1-Vektor (Invitrogen) wurde dazu verwendet, um ein Fusionsprotein mit einem C-terminalen 6xHistidin- und einem c-myc-Tag zu erzeugen. Die Transfektion wurde an CHO (Chinese Hamster Ovarien) Zellen, einer Oligodendrocyten Zelllinie (OLN) und einer neuronalen Zelllinie (N2A) vorgenommen. Zur Transfektion wurde das Lipofectamin-Reagenz (Qiagen) verwendet. Da alle Zellen das m1-Protein endogen exprimierten (vgl. Abb.17), wurden Kotransfektionen mit dem pEGFP-Vektor (Invitrogen) durchgeführt, der die cDNA des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) enthielt. Dadurch konnten transfizierte, überexprimierende Zellen durch ihre grüne Fluoreszenz von den übrigen Zellen im Mikroskop unterschieden werden. Auch mögliche Wechselwirkungen des m1-Proteins mit Zytoskelettproteinen wurden in diesem Experiment untersucht. Dazu wurden die Zytoskelettbestandteile Aktin (mit Phalloidin), Tubulin und Tau (jeweils über spezifische Antikörper) angefärbt, um mögliche Veränderungen beobachten zu können. Das Muster und die Anordnung der jeweiligen Zytoskelettproteine wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in den m1-überexprimierenden und den „Kontrollzellen“ verglichen.

Untersucht wurde auch die Vitalität der transfizierten Zellen. Dazu wurde in gewissen Zeitabständen die Zellform und Zelldichte mikroskopisch bestimmt. Die Experimente zeigten keinen sichtbaren Unterschied zwischen den m1-überexprimierenden Zellen (Abb.18 A) und den mit dem leeren pcDNA3.1- und pEGFP-Vektor transfizierten Zellen (Abb.18 B). Die Zellform sowie die Vitalität der m1-transfizierten Zellen waren im Vergleich zu den „Kontrollzellen“ unverändert, d.h. beide behandelten Zellen hatten die gleiche Erscheinungsform und eine ähnliche Zelldichte an verschiedenen Zeitpunkten.

Auch die strukturelle Anordnung der untersuchten Zytoskelettproteine war in den m1-überexprimierenden und den „Kontrollzellen“ gleich. Es konnte daraus gefolgert werden, dass m1 weder einen Einfluss auf die untersuchten Zytoskelettproteine noch einen toxischen Effekt auf die Zellen hatte.

4.4.8 Subzelluläre Lokalisation des m1-Proteins;

Zellfraktionierung von CHO-Zellen

Zur biochemischen Bestimmung der zellulären Lokalisation des m1-Proteins wurden transient transfizierte CHO-Zellen (siehe Abschnitt 4.4.7) in die Zellkompartimente fraktioniert. Gesammelt wurden vier Fraktionen: Zellkernfraktion, zytosolische Fraktion, Membranfraktion und die Fraktion mit den unlöslichen Bestandteilen (Zytoskelett). Diese Fraktionen wurden zur Herstellung eines Western Blots benutzt (Abb.20). Die Nylonmembran wurde mit dem spezifischen Antikörper inkubiert. Dabei wurden in den fraktionierten, transfizierten CHO-Zellen zwei besonders starke Banden in der Höhe von 32 kDa in der Zellkernfraktion detektiert. In allen anderen Fraktionen war keine eindeutige Bande zu erkennen. Das Protein m1 scheint daher zum größten Teil im Zellkern exprimiert zu werden.

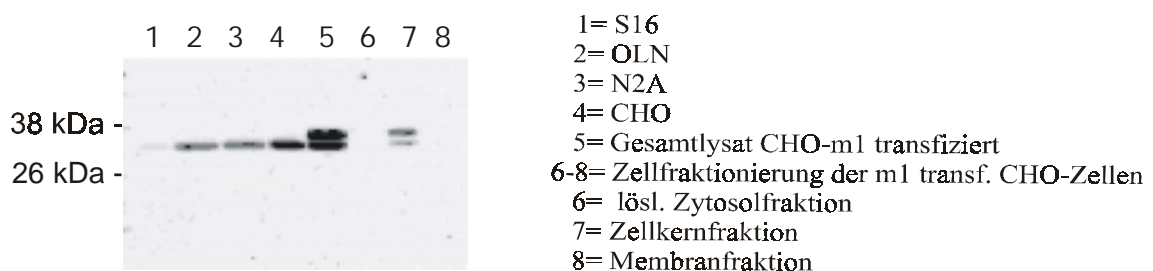


Abb. 20; Westernblot zum Test des hergestellten Peptid-Antikörpers gegen m1. Gesamtzelllysate einer Schwann (S16), Oligodendrocyten (OLN), neuronalen (N2A) und der chinesischen Hamster Ovarien Zelllinie (CHO) wurden neben dem Gesamtzelllysat von mit pcDNA3-1-m1 transfizierten CHO-Zellen aufgetragen. Des Weiteren wurden die transfizierten CHO-Zellen fraktioniert und ebenfalls aufgetragen. Der Antikörper erkannte nur ein Protein in Höhe von 32 kDa in allen Zelllinien. Nur die Bande in den S16-Zellen war wesentlich schwächer. In den transfizierten Zellen wurde eine zusätzliche Bande detektiert, die vom exogenen m1-Fusionsprotein mit dem 6xHistidin- und c-myc-Tag stammte. Diese Bande wurde auch in der Zellkern-Fraktion detektiert.

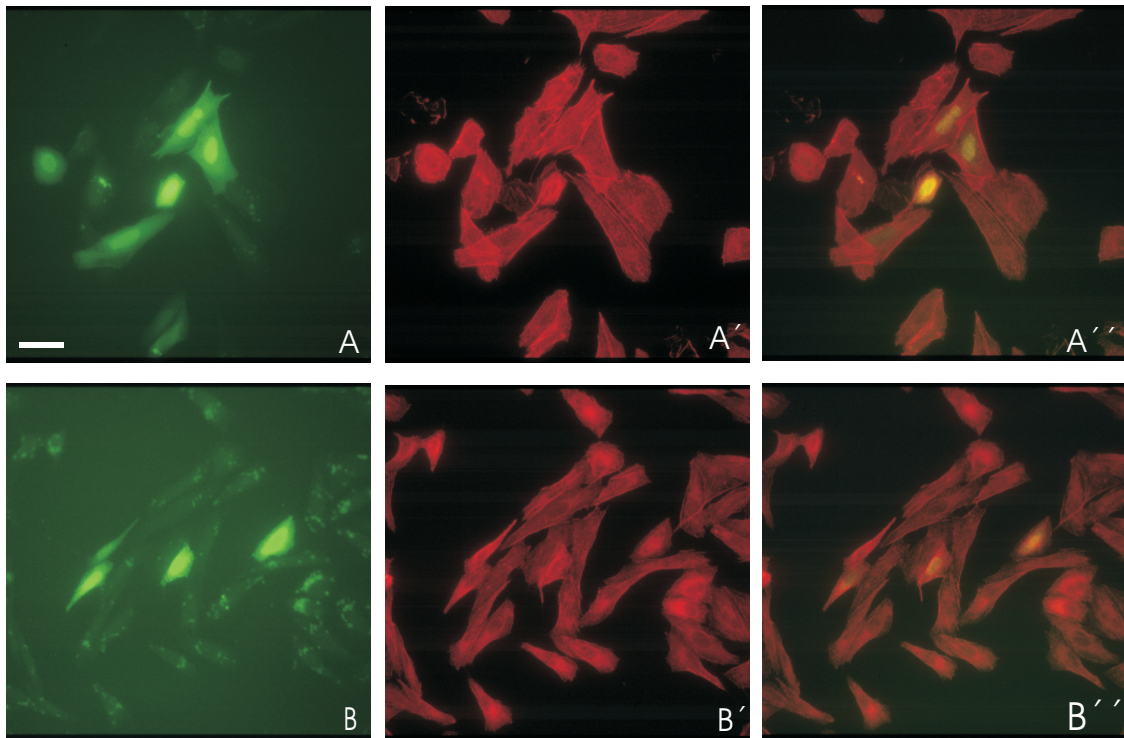


Abb. 18; Transfizierte CHO-Zellen. CHO-Zellen wurden mit einem pcDNA3.1-m1-Plasmid und pEGFP-Plasmid (A, A', A'') und zur Kontrolle mit den leeren Vektoren kotransfiziert (B, B', B''). Bilder A und B zeigen die grün-fluoreszierenden transfizierten Zellen. Das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin (rot) verdeutlicht (A', B'). Die überlagerten Darstellungen sind in A'' und B'' dargestellt. Die m1-überexprimierenden Zellen unterscheiden sich weder in ihrer Zellform und Vitalität noch in ihrem Zytoskelett von den Kontrollzellen. (Balken=10µm)

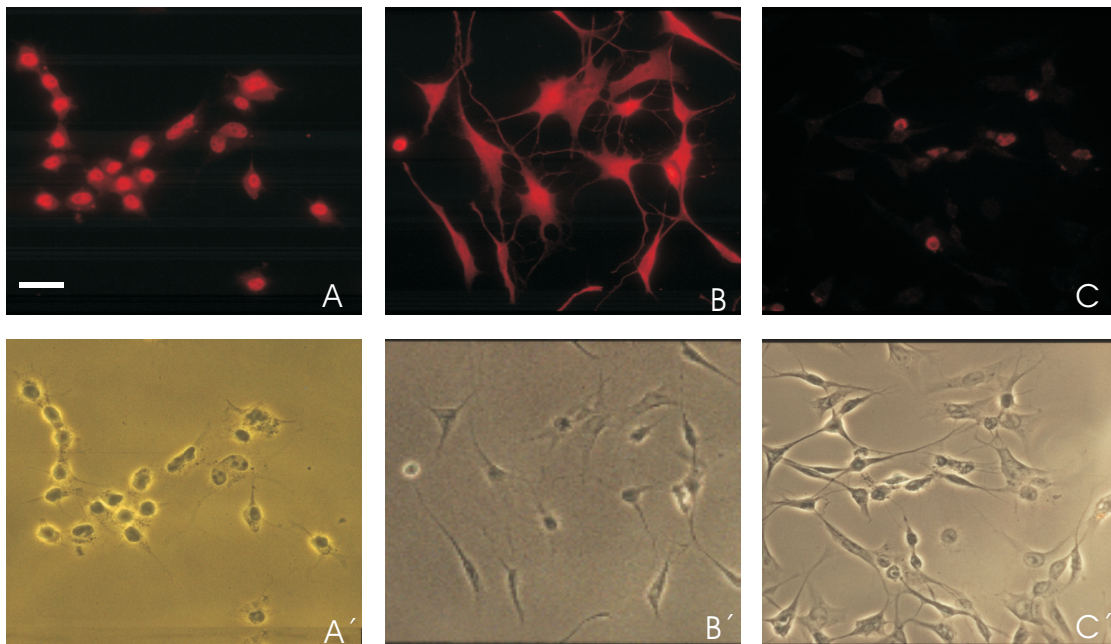


Abb. 19; Immunzytochemische Untersuchung zur zellulären Lokalisation von m1. Die nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation in der neuronalen Zelllinie N2A (A, A') und der Oligodendrocyten-Zelllinie OLN (B, B') ist zu erkennen. Die Bilder C und C' zeigen die Negativkontrolle mit dem sekundären Antikörper. Phasenkontrastaufnahmen sind mit (') markiert. (Balken=10µm)

4.4.9 Immunzytochemische Untersuchungen zur m1-Protein Expression

Nachdem durch Western Blot-Analysen die Spezifität des Antikörpers untersucht wurde und die subzelluläre Lokalisation des Proteins bekannt war, konnte der Antikörper auch in immunzytochemischen Experimenten eingesetzt werden (Abb.19). Dazu wurden zunächst die oben verwendeten Zelllinien und primäre Schwann-Zellen aus der Ratte benutzt. Mit diesem Experiment sollte das Ergebnis der subzellulären Lokalisation durch die Zellfraktionierung bestätigt werden.

Tatsächlich konnte mit dem Antikörper ein starkes Signal in den Zellkernen detektiert werden. In den Zellen wurde auch ein zytoplasmatisches Signal neben der Kernfärbung erkannt (Abb.19).

4.4.10 Untersuchung der Gewebeverteilung des m1-Protein im PNS und ZNS

Durch indirekte Immunhistochemie wurde die Verteilung des Proteins im Gewebe untersucht. In diesen Experimenten sollte auch eine Verifizierung der bisherigen Ergebnisse erfolgen. Die Untersuchung der differentiellen Expression, die bisher auf der RNA-Ebene stattgefunden hatte (siehe Abschnitt 4.2), wurde nun auf Proteinebene an Gefrierschnitten von Maus-Femoralnerven (Abb.21 A, B, C), regenerierten Maus Femoralnerven und Kalbsnerven (Abb.21 D, E) durchgeführt. Da die Expression der mRNA oft keinen direkten Aufschluss über die Proteinexpression gibt, wäre es möglich, dass in den beiden Ästen des N. femoralis unterschiedliche Mengen von m1-Protein synthetisiert werden oder unterschiedliche Lokalisationen des m1-Proteins vorkommen. Auch die zelluläre Lokalisation wurde in diesen Experimenten untersucht. Die immunologischen Untersuchungen wurden weiterhin an Längsschnitten von Maus-Ischiasnerven (Abb.22 A), am Rückenmark (Abb.22 D) und am Gehirn (Abb.22 B, C) durchgeführt.

In den peripheren Nerven (Abb.21) waren das Perineurium und alle Schwann-Zellkerne stark m1-positiv. Die Schwann-Zellen im N. femoralis zeigten sowohl im N. saphenus (Abb.21 B) als auch im N. quadriceps (Abb.21 C) eine Immunreaktivität mit dem anti-m1-Antikörper. Auch im Zytoplasma dieser Zellen scheint das Protein exprimiert zu sein. Es konnte eine vermutlich zytoplasmatische Markierung in den Axonen erkannt werden. Teilweise konnten auch Nervenfasern detektiert werden, die keine Färbung des Axons hatten. Solche Bereiche waren im sensorischen als auch im motorischen Nervenast vorhanden. Diese axonale m1-Expression war nicht durch sensorische und motorische und auch nicht durch myelinisierte und nicht-myelinisierte Axone zu unterteilen. Nicht-myelinisierte Fasern wurden durch eine Doppelfärbung mit einem anti-L1-Antikörper markiert (Abb.22 A).

Die bovinen Femoralisäste (Abb.21 D, E) zeigten ebenfalls ein starkes Signal im Perineurium und in den Schwann-Zellkernen. Hier konnten auch die Blutgefäße als m1-

positiv detektiert werden. Weiterhin wurde in den bovinen Nerven jede Nervenfasern durch Anfärbung des Endoneuriums deutlich. Diese Markierung konnte ebenfalls im sensorischen und motorischen Nervenast beobachtet werden. Außerdem konnte eine klare axonale Färbung erkannt werden.

Die regenerierten Maus-Femoralisnerven zeigten insgesamt eine ähnliche m1-Expression wie die unbehandelten Femoralisnerven. Das regenerierte Gewebe unterscheidet sich aufgrund der Verletzung etwas vom „Normalzustand“, wodurch auch eine stärkere Färbung des Bindegewebes zustande kam. Es wurden auch sich entwickelnde Mausnerven (P0, P5, P7, P14, P21 und adult) untersucht. Dabei konnte ebenfalls kein Unterschied in der Expression des m1-Proteins in sensorischen und motorischen Nervenästen festgestellt werden (nicht abgebildet).

In den weiteren Untersuchungen konnte das m1-Protein in allen neuronalen und glialen Zellen identifiziert werden. Im Rückenmark (Abb.22 D) waren die großen Motoneurone positiv. Auch die Interneurone wurden angefärbt. Auffällig war, dass ausschließlich das Zytoplasma der Zellen gefärbt wurde. Die Zellkerne reagierten nicht mit dem anti-m1-Antikörper. Dabei gab es keinen Unterschied, ob die Immunfärbung an Gefrierschnitten von frischem Rückenmark oder an in Paraformaldehyd fixierten Rückenmark durchgeführt wurde. Auch in den Gehirnschnitten (Abb.22 B, C) wurde jede Zelle in der weißen wie auch in der grauen Substanz vom m1-Antikörper detektiert. In diesem Gewebe war in Gefrierschnitten und im perfundierten Gewebe die Zellkernfärbung eindeutig zu erkennen. Es wurde auch untersucht, ob es Unterschiede in der m1-Expression im Gehirn während der Entwicklung gibt. Dazu wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse an mit Paraformaldehyd fixierten 7 Tage alten Mäusen und adulten Mäusen durchgeführt. Die m1-Expression war zu diesen Zeitpunkten nicht unterschiedlich. Es wurden alle neuronalen wie auch glialen Zellkerne markiert (Abb.22 B, C entsprechend).

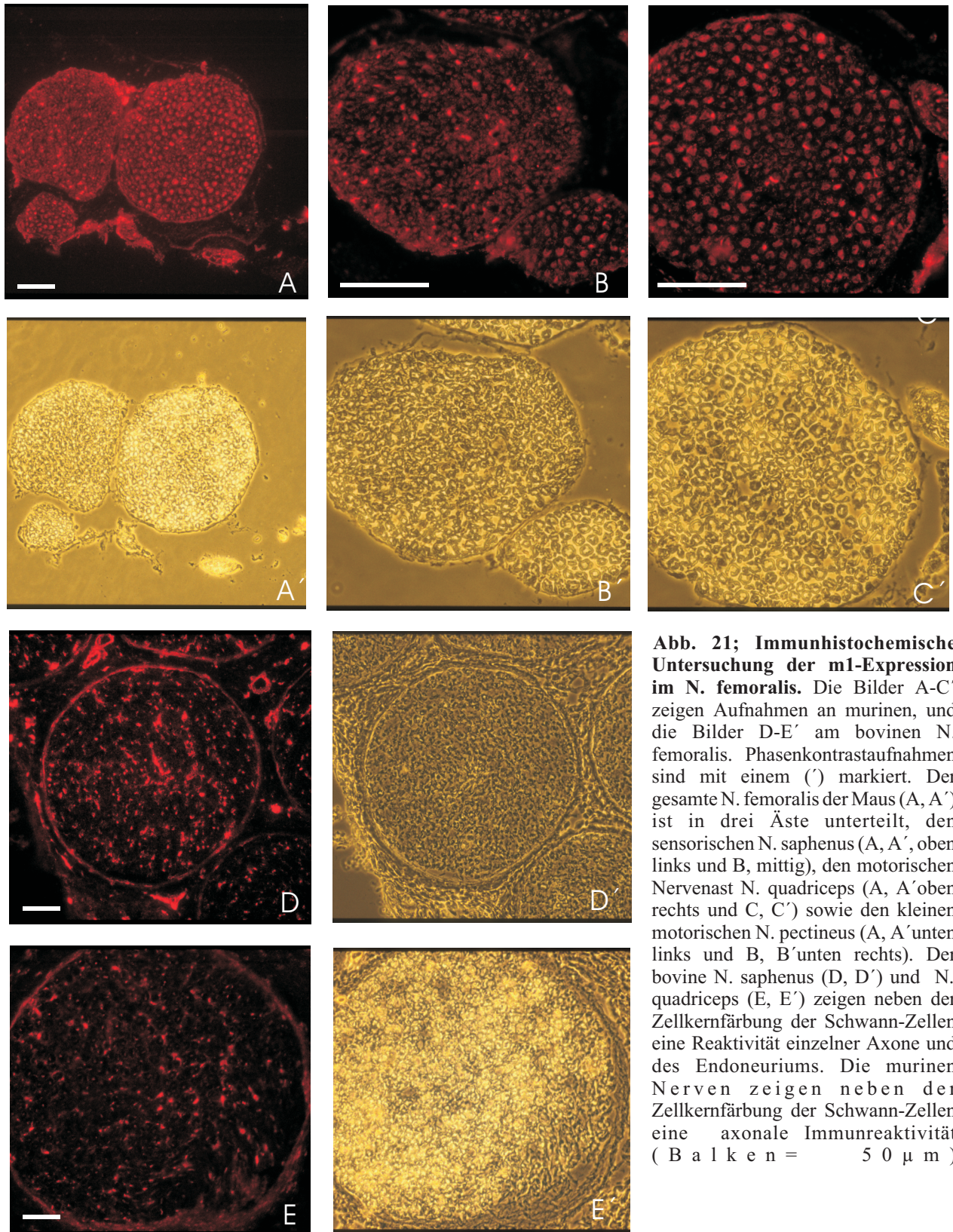


Abb. 21; Immunhistochemische Untersuchung der m1-Expression im N. femoralis. Die Bilder A-C' zeigen Aufnahmen an murinen, und die Bilder D-E' am bovinen N. femoralis. Phasenkontrastaufnahmen sind mit einem (') markiert. Der gesamte N. femoralis der Maus (A, A') ist in drei Äste unterteilt, den sensorischen N. saphenus (A, A', oben links und B, mittig), den motorischen Nervenast N. quadriceps (A, A' oben rechts und C, C') sowie den kleinen motorischen N. pectineus (A, A' unten links und B, B' unten rechts). Der bovine N. saphenus (D, D') und N. quadriceps (E, E') zeigen neben der Zellkernfärbung der Schwann-Zellen eine Reaktivität einzelner Axone und des Endoneuriums. Die murinen Nerven zeigen neben der Zellkernfärbung der Schwann-Zellen eine axonale Immunreaktivität (B a l k e n = 5 0 μ m)

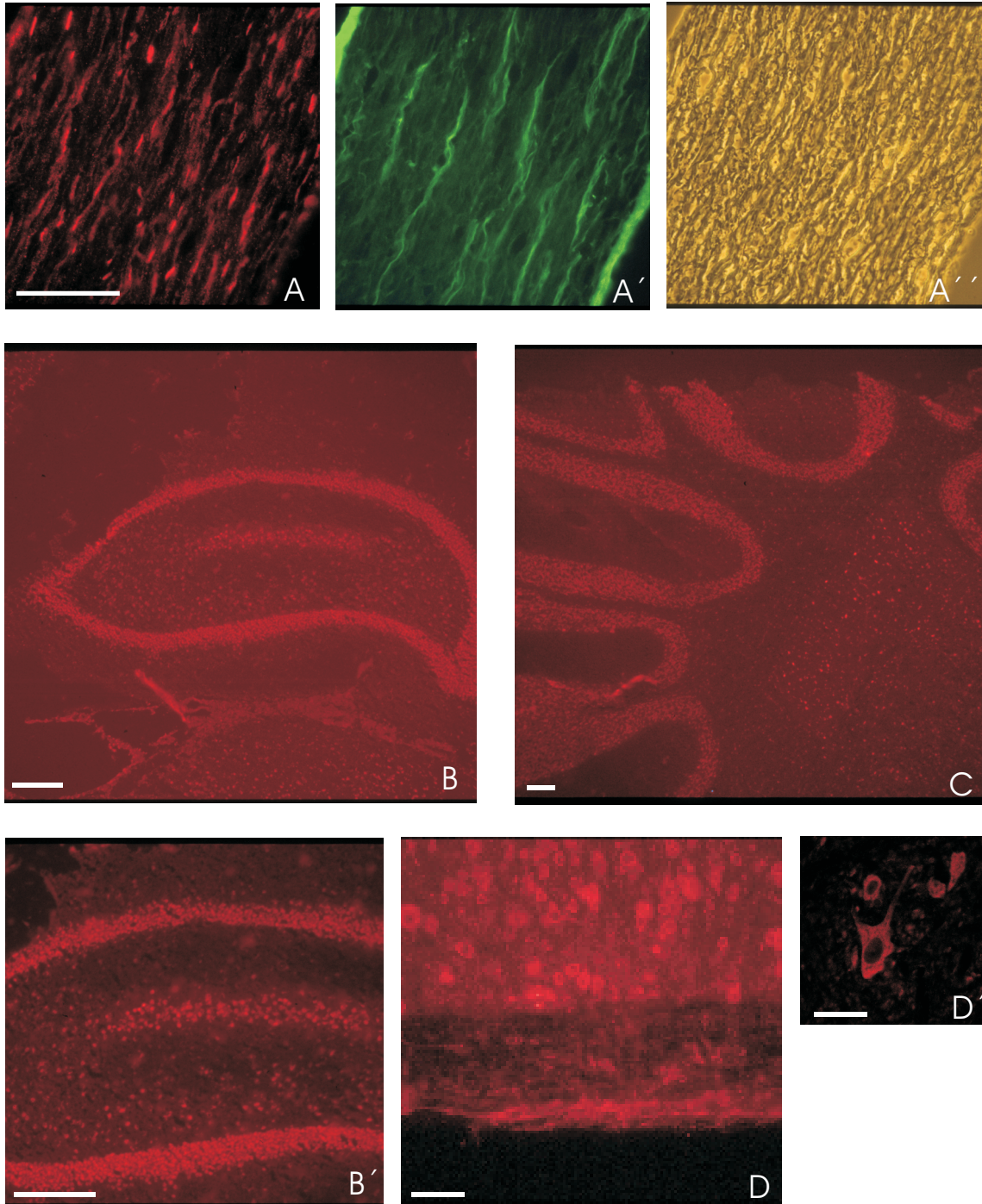


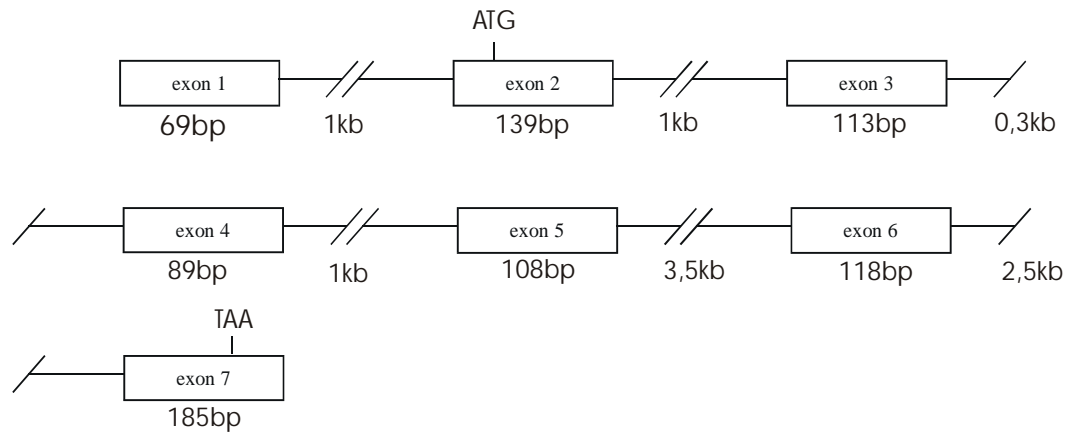
Abb. 22; Untersuchung der m1-Expression im murinen Nervensystem. Bilder A-A'' stellen einen Längsschnitt eines Ischiasschmerv dar. Die anti-m1-Immunreaktivität zeigt deutlich die linsenförmige Schwann-Zellkernfärbung. Zusätzlich sind die Nervenfasern m1-positiv, wobei es sich nicht nur um nicht-myelinisierte Fasern handelt. Letztere wurden durch die L1-Doppelfärbung markiert (A'). A'' zeigt die Phasenkontrastaufnahme. Bilder B-C zeigen die immunhistochemischen Aufnahmen adulter Gehirnschnitte. Der Hippocampus (B, B') sowie das Cerebellum (C) zeigen die starke m1-Expression. Auch das Rückenmark (D, D') ist anti-m1-immunreaktiv. Die abgebildeten Gehirnregionen zeigen eine starke m1-Immunreaktivität, die besonders deutlich in den Zellkernen ist. Die Neurone im Rückenmark (Motoneuron D') sind nur im Zytoplasma m1-positiv. (Balken D'=10 µm; Balken A, D=50µm; Balken B, B', C=100µm)

4.4.11 Gibt es eine menschliche Erkrankung, für die das m1-Gen verantwortlich ist?

Genetische Analysen können oft Hinweise auf die Funktion eines bisher unbekanntes Proteins geben. Dazu werden die chromosomale Lokalisation und die genomische Struktur des neuen Gens benötigt. Über Datenbankrecherchen ist es möglich, Krankheiten zu identifizieren, die ebenfalls in die entsprechende chromosomale Region kartiert wurden, denen aber bisher kein Gen zugeordnet werden konnte. Sobald es eine Überschneidung von Genlokus und Krankheitslokus gab, und diese Krankheit zu den bisher bekannten Daten des m1-Gens in Übereinstimmung gebracht werden konnte, wurde durch Untersuchung der entsprechenden Patienten-DNA das m1-Gen als Kandidatengen getestet. Ein positives Ergebnis ließe, aufgrund der bekannten Erscheinungsform der Krankheit, Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins zu. Es könnten weiter gehende Experimente zu diesem Protein im Hinblick auf die Krankheit durchgeführt werden, z.B. wenn bereits andere Gene im Zusammenhang mit der Erkrankung bekannt sind, die vielleicht ähnliche Funktionen haben oder möglicherweise mit dem bisher unbekanntes Protein interagieren.

4.4.12 Aufklärung der genomischen Struktur des m1-Gens

Durch den Vergleich der cDNA-Sequenz mit bereits in der htgs-Datenbank (*unfinished high throughput genomic sequences*) enthaltenen genomischen Sequenzen konnten teilweise Übergänge von der cDNA zu nichttranslatierter genomischer DNA vorausgesagt werden. Damit konnten bereits mögliche Intron-Exon-Grenzen ausgemacht werden. Mit Hilfe von Primern, die in der cDNA-Sequenz lagen, konnte die Struktur des gesamten Gens aufgeklärt werden. Mit Hilfe der PCR wurden die entsprechenden Genabschnitte amplifiziert, ansequenziert und somit die Intron-Exon-Übergänge aufgeklärt (Abb.23). Das gesamte humane m1-Gen hat eine Größe von ca. 10,5 kb. Es besteht aus 7 Exons, von denen 6 im translatierten Bereich liegen. Das erste Exon liegt im 5'-untranslatierten Bereich vor dem Startkodon.



Exon	Intron	Exon
1	CGGACCTCGGCCAGTgtgagcggcaagagg.....tatttttcttcaaag	2
2	AAAGATAAAATACAGgtagtaagactttct.....ttgtttctactttag	3
3	ATCGTCCAACCCGAGgtaccaacactatcc.....ttgtttccccccag	4
4	GACCTCTAACAGATgtatgttttgtttcc.....tcaactgttcttttag	5
5	GAGCAGGCCAGGAAGgtaaaaccaaagtat.....ctttatcattgacag	6
6	TCAAAGTTAAAAGAAgtactatacagtaac.....cttttttttctcag	7

Abb. 23; Die genomische Struktur. Das m1-Gen hat eine Länge von ca. 10,5 kb. Es kodiert 7 Exone. Das Startcodon mit dem offenen Leserahmen befindet sich im Exon 2. Die Sequenzen der Exon/Intron Übergänge wurden dargestellt, wobei die Exonsequenzen in Großbuchstaben und die Intronsequenzen in Kleinbuchstaben geschrieben wurden. Die Donorsplice- und Akzeptorsplice-Sites wurden unterstrichen.

4.4.13 Chromosomale Lokalisation des m1-Gens

Da bereits genomische Sequenzinformationen des m1-Gens in der Datenbank zu finden waren, wurde in der STS-Datenbank (*sequence tagged sites*) nach genomischen Sequenzen gesucht. Insgesamt drei solcher genomischen Sequenzen konnten identifiziert werden: WI-11443, WI-18020 und D11S1757 (Abb.24). Sie liegen alle auf dem Chromosom 11. Die identifizierte Sequenz D11S1757 enthält einen *CA-repeat*, d.h. hier wiederholen sich die Nukleotide Cytosin und Adenin über einen längeren Sequenzabschnitt, solche *repeats* können als Marker benutzt werden. Die relative physikalische Lage eines solchen Markers ist im Vergleich zur Lage anderer Marker bekannt, wodurch auf die genaue chromosomale Lokalisation des m1-Gens geschlossen werden kann. Das m1-Gen liegt auf Chromosom 11q23.1.

4.4.14 Untersuchungen des m1-Gens als Kandidatengen für Krankheiten auf dem Chromosom 11q

Da die chromosomale Lage des Gens nun bekannt war, wurden Erkrankungen gesucht, die in die entsprechende Region des Chromosoms 11 kartiert wurden. Besonders vorteilhaft war die erst kürzlich veröffentlichte physikalische Genkarte von STSs, genetischen Markern und ESTs für einen Bereich dieser Region (Abb.24) (Bolino et al., 2000). Die verwendeten Marker für die jeweilige Krankheit mussten zunächst mit den Markern des Gens (WI-11443, WI-18020 und D11S1757) verglichen und in Verbindung bezüglich der relativen Lage auf dem Chromosom gebracht werden. Sobald diese Faktoren übereinstimmten, konnte die Untersuchung fortgeführt werden.

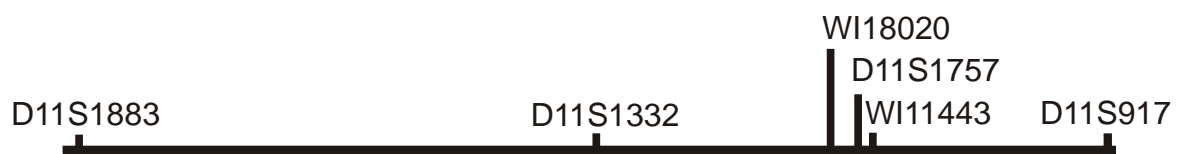


Abb. 24; Physikalische Karte eines etwa 10 cM großen Bereichs auf Chromosom 11q. Die Orientierung ist von 11q centromerisch (links) nach 11q telomerisch (rechts). Angegeben wurden STS und genetische Marker für CMT4B, m1-Gen und SMARD (modifiziert aus (Bolino et al., 2000)).

Eine Kandidatenerkrankung, die in die Region 11q23 gemappt wurde, war eine spezielle Form der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit, die CMT4B-Erkrankung. Hierbei handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbliche motorische und sensorische Neuropathie, die durch Veränderung der Myelinstrukturen im PNS gekennzeichnet ist, wobei in dieser speziellen Form fokale gefaltete Myelinschichten zu beobachten sind. Durch diese Verformungen des Myelins ist die Reizweiterleitung im Nerv nicht optimal möglich. Charcot-Marie-Tooth-Patienten leiden unter Muskelschwäche, Muskeldegeneration und Sensibilitätsstörungen. In der CMT4B-Form sind insbesondere schon sehr junge Patienten betroffen. Durch die Technik des *homozygosity mappings* wurde mit Hilfe einer genomweiten Suche der Locus für CMT4B auf Chromosom 11 in einen 4 cM Intervall in der Region q23.1 gemappt. Dieser Locus wurde durch die Marker D11S1332 und D11S917 begrenzt (Abb.24) (Bolino et al., 1996).

Der Marker D11S1757 für das m1-Gen befindet sich in der CMT4B-Region, sodass das m1-Gen ein gutes positionelles Kandidatengen für die CMT4B-Erkrankung darstellte. Des Weiteren ist das m1-Protein stark im PNS exprimiert, und eine Funktion bezüglich der Myelinisierung und des Erhalts der Myelinschichten wäre auch aufgrund der axonalen Lokalisation gut denkbar. Um diese These zu überprüfen, wurde genomische DNA von CMT4B-Patienten von Dr. A. Gabreels-Festen (Institute of Neurology, University Hospital Nijmegen, Niederlande) im Mutationsscreening untersucht. Durch das Amplifizieren und Sequenzieren der Exons und der Splice-Sites mit intronischen Primern konnten keine Mutationen entdeckt werden. Dadurch war es zumindest für diese Patienten

unwahrscheinlich, dass das m1-Protein für die Erkrankung verantwortlich war. Zeitgleich hatte Dr. A. Bolino in der Gruppe von Dr. A. Monaco (Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Oxford, UK) das Gen für die CMT4B-Erkrankung identifizieren können. Es handelte sich um die Phosphatase Myotubularin-related Protein-2 (Bolino et al., 2000).

Eine weitere Erkrankung, die auf Chromosom 11q23 lokalisiert wurde, ist eine Form der Spinalen Muskelatrophie (SMA). Diese spezielle SMA, in der die oberen Gliedmaßen und die distale Muskulatur besonders stark betroffen sind, wird als SMARD (*spinal muscular atrophy with respiratory distress*) bezeichnet. Ein Symptom der SMARD-Erkrankung ist das schwere respiratorische Leiden durch die Paralyse des Zwerchfells, wodurch die Krankheit ihren Namen erhalten hat. Der Locus für SMARD wurde mit den Markern D11S1883 und D11S917 begrenzt (Abb.24) (Grohmann et al., 1999). Der Marker D11S1757 des m1-Gens befindet sich ebenfalls in dieser Region, allerdings liegt er relativ nahe zum distalen Rekombinationsmarker (Abb.24). Mögliche pathophysiologische Erklärungen für die SMARD-Erkrankung sind a) die Degeneration der Vorderhorn-Zellen im Rückenmark, die eine neurogene Muskelatrophie verursacht oder b) dass durch prä- und postsynaptische Signale, die von den motorischen Endplatten stammen, die Degeneration vom Muskel zur Nervenzelle weitergeleitet wird. Diese Erklärungen konnten sehr gut in Einklang mit den Ergebnissen aus der m1-Untersuchung gebracht werden, da bereits in den *in situ* Experimenten eine m1-Expression im Embryonaltag 16 in den Vorderhorn-Zellen und im Zwerchfell deutlich wurde (Abb.25).

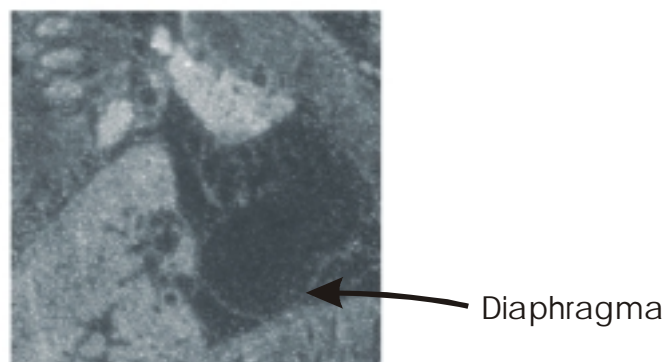


Abb. 25; *In-situ*-Hybridisierung der m1-Sonde am murinen Embryo. Es wurde eine radioaktiv markierte m1-Sonde an Embryonen (E16) hybridisiert. Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt eines mit Photoemulsion behandelten parasagittalen Schnittes (dorsal ist links, ventral ist recht gerichtet). Es ist die Dunkelfeld-Aufnahme dargestellt, wobei Hybridisierungssignale als weiße Punkte erscheinen. Man erkennt die stark positiven Signale im Thymus und den Ganglien. Das Diaphragma kann als zarte C-förmige Linie erkannt werden.

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. C. Hübner (Klinik für Neuropädiatrie, Berlin) und Dr. K. Zerres (Institut für Humangenetik, TU, Aachen) wurde die genomische DNA der SMARD-Patienten in einem Mutationscreening für das m1-Gen untersucht. Die Exons und die Splice-Sites wurden amplifiziert und sequenziert. Zur Kontrolle wurde eine Wildtyp-Probe und eine Leerkontrolle getestet. In den Exons konnte kein Nucleotidaustausch mit Auswirkung auf die Translation gefunden werden. Nur in einer konsanguinen Familie aus dem Libanon wurde ein Polymorphismus im ersten Intron entdeckt. Hierbei wurde eine homozygote gleichzeitige Deletion von 4 Nucleotiden und eine Insertion von 7 Nucleotiden direkt vor dem Startkodon identifiziert. Durch Untersuchung der DNA der Eltern konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser Austausch keinen Einfluss auf SMARD hat, da auch ein gesundes Elternteil homozygot für diesen Polymorphismus war. Die Ergebnisse dieses Experimentes machten es unwahrscheinlich, dass das m1-Gen für SMARD verantwortlich ist. Bisher zeigte der genetische Ansatz keinen Zusammenhang des m1-Gen zu einer humanen Erkrankung. Weitere Krankheiten wurden noch nicht in die Region gemappt, die auf Mutationen des m1-Gens getestet werden könnten.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sensorische und motorische Nervenäste des Femoralisnervs im Hinblick auf eine differenzielle Expression untersucht, um weitere Gene zur Aufklärung der Mechanismen der PMR (*preferential motor reinnervation*) zu entdecken. Dazu wurden Kalbsnerven mit Hilfe des DD gescreent. Es wurden fünf differenzielle Banden erhalten, denen acht unterschiedliche Genfragmente zugrundelagen. Ein cDNA-Fragment ist Teil eines bereits bekannten Gens, welches für das extrazelluläre Matrixprotein SPARC kodiert. Ein weiteres cDNA-Fragment ist Teil eines neuen Gens, welches aufgrund humaner und muriner ESTs vollständig kloniert werden konnte (m1). Von den übrigen Sequenzen zeigte eine cDNA eine Ähnlichkeit zu einem *ATP-binding Cassette*-homologen EST, alle weiteren Genfragmente sind unbekannt. Die Expression von SPARC und m1 wurde durch RT-PCR, Northern Blot-Analysen und immunhistochemischen Analysen untersucht. Mit diesen Methoden konnte eine signifikant differenzielle Expression nicht bestätigt werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das m1-Gen als bisher nicht beschriebenes neural exprimiertes Gen vollständig kloniert und charakterisiert. Eine ubiquitäre Expression der m1-mRNA konnte gezeigt werden, dabei war die Expression im Nervensystem besonders stark. Das Gen konnte auch in weiteren Spezies (*Drosophila*, *C. elegans*) identifiziert werden. Das m1-Protein ist hoch konserviert und zeigt keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Proteinen. Es besitzt ein NLS-Signal (*nuclear localisation signal*) und besteht zu über 40% aus geladenen Aminosäuren. Mit Hilfe eines, gegen das m1-Protein generierten Antikörpers, wurde die Expression / Lokalisation des Proteins untersucht. Das m1-Protein ist stark im Zellkern exprimiert, kann aber auch im Zytoplasma detektiert werden. Es zeigte sich, dass m1-Protein nicht nur in den Schwann-Zellen des PNS, sondern auch stark in neuronalen Zellen des ZNS, wie z.B. den Motoneuronen des Rückenmarks, vorkommt. Wegen seiner hohen Konservierung in der Evolution und seiner frühen embryonalen Expression, muss dem Protein eine grundlegende Funktion zukommen.

5.1 Methoden zum Screenen differenzieller Expression

Das menschliche Genom besteht aus ca. 40.000 verschiedenen Genen, von denen nur etwa 15-30 % zellspezifisch exprimiert werden. Davon sind ca. 80 % der Gene mit weniger als fünf Kopien pro Zelle präsent (Zhang et al., 1997). Es wurden in der Vergangenheit verschiedene Techniken entwickelt, um differenziell exprimierte Gene zu identifizieren (Carulli et al., 1998; Wan et al., 1996). Dazu gehören neben der differenziellen Analyse von cDNA-Banken oder subtraktiven cDNA-Bibliotheken auch das Differential Display (DD), das seit seiner Entwicklung durch Liang und Pardee 1992 (Liang and Pardee, 1992) zu einer der am häufigsten angewendeten Methoden zählt (Livesey and Hunt, 1996). Eine weitere, wenig aufwendige und daher oft benutzte Methode ist die SSH-Technik (*suppression subtractive hybridization*) (Tedder et al., 1988). In Zusammenarbeit mit der

Firma LION Bioscience AG wurden die SSH-Technik und das SAGE-Protokoll eingesetzt, um die differenzielle Genexpression in regenerierten Maus-Femoralisnerven zu untersuchen. Zum Screening der sich entwickelnden Femoralisnerven des Kalbes wurde das DD verwendet. Im Folgenden sollen die verwendeten Methoden kurz beschrieben und in ihren Vor- und Nachteilen diskutiert werden.

1. Bei der SSH (oder allgemein den subtraktiven Klonierungstechniken) werden cDNA-Populationen, die aus RNA der zu vergleichenden Gewebe gewonnen werden, miteinander hybridisiert. Die cDNA-Population des Kontrollgewebes wird als *driver* und die des Gewebes zur Analyse differenzieller Genexpression als *tester* bezeichnet. Durch die Hybridisierung von *driver* und *tester* werden diejenigen cDNA-Moleküle selektiert, die im *tester* als Überschuss vorhanden sind. Diese Moleküle werden in einer PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Ein Vorteil des SSH ist, dass größere cDNA-Fragmente des kodierenden Bereiches verwendet werden, wodurch z.B. eine Analyse der Genfragmente in den Datenbanken erleichtert wird. Auch unbekannte Gene können besser analysiert werden. Ein Nachteil der SSH-Technik ist, dass hoch- oder auch herunterregulierte Gene nur durch Umkehrung von *tester* und *driver* identifiziert werden können. Die Untersuchung sollte demnach immer zweimal durchgeführt werden.

2. In der SAGE-Methode (*serial analysis of gene expression*) (Velculescu et al., 1995) werden die durch reverse Transkription hergestellten cDNA-Produkte durch Verwendung von verschiedenen Enzymen in kleine Sequenzbereiche geschnitten. Die Genfragmente werden mit Hilfe ihres poly-A-Schwanzes immobilisiert. Dadurch ist es möglich, 3'-Genfragmente zu selektieren, die jeweils die erste Restriktionsschnittstelle für das spezielle Enzym und die Nukleotide vor dieser Erkennungsschnittstelle beinhalten und damit spezifisch ein Gen repräsentieren. In anschließenden Reaktionsschritten werden die Nukleotide vor dieser ersten Erkennungssequenz selektiv „gefiltert“ und als spezifische *Tagsequenzen* miteinander verbunden. Eine Analyse der *Tagsequenzen* erfolgt durch Sequenzierung. Die differenzielle Expression wird durch Vergleich der absoluten *Taganzahl* (für jedes Gen) zwischen den Geweben festgestellt.

Ein Vorteil der SAGE-Technik ist, dass genau diese kurzen spezifischen Sequenzinformationen (*Tagsequenzen*) jeder cDNA genügen, um ein Gen zu identifizieren. Laut Velculescu et al. (1995) sind nur neun Nukleotide für die Identifizierung eines Gens nötig. Eine weitere Stärke dieser Technik ist, dass die erhaltenen Klone die Sequenzinformation von mindestens 30 Genen enthalten (Velculescu et al., 1995).

Ein Nachteil der SAGE-Technik ist, dass nur wenige Nukleotide Sequenzinformation der Gene erhalten werden, wodurch die Identifizierung von unbekanntem Genen schwer möglich ist. Außerdem ist es wichtig, dass die Auswertung der SAGE-Daten mit einer Sequenzierung höchster Qualität erfolgt, da ein Sequenzierfehler von nur einer Base zu

einem falschen *Tag* und somit zu einem falschen Gen führen würde. Weiterhin sollten die Sequenzdaten durch eine gute Software ausgewertet und mit den aktuellsten Datenbanken verglichen werden. Differenziell exprimierte Gene werden entdeckt, indem die Untersuchung mit den zu vergleichenden Geweben durchgeführt, analysiert wird und die resultierten *Tags* aus beiden Ansätzen miteinander in ihrer Häufigkeit verglichen werden. Für eine gute Aussagekraft der Ergebnisse muss eine hohe Anzahl von *Tag*-Sequenzierungen erfolgen. In unserem Gemeinschaftsprojekt mit der Firma LION Bioscience AG wurden zur Untersuchung der differenziell exprimierten Gene des sensorischen und motorischen Astes des regenerierten Maus-Femoralisnervs 18.000 *Tags* pro Gewebe sequenziert. Solch ein Ansatz ist daher besonders kostenintensiv. Ein weiterer Nachteil des SAGE ist, dass 5 µg poly A+ - mRNA als Ausgangsmaterial benötigt werden. Eine Verbesserung stellt die kürzlich veröffentlichte SAGE-Lite Technik dar (Peters et al., 1999), die auf dem „traditionellen“ SAGE-Protokoll basiert. In der SAGE-Lite Technik wird ein PCR-Schritt mit möglichst wenigen Amplifikationsschritten (18 Zyklen) nach der reversen Transkription durchgeführt, sodass mit nur 100 ng Gesamt-RNA gearbeitet werden kann.

3. Das verwendete DD-Protokoll basiert auf der vergleichenden Analyse von cDNA-Molekülen, die in PCR-Ansätzen durch Kombination verschiedener *anchor*- und *random*-Primer semiquantitativ amplifiziert werden (von der Kammer et al., 1999). Aufgrund der Vervielfältigung der cDNA ist die Methode sehr sensitiv, und es kann mit geringen Mengen an Ausgangsmaterial gearbeitet werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, verschiedene Proben gleichzeitig zu analysieren und sowohl hoch- als auch herunterregulierte Gene zu identifizieren. Außerdem müssen nur wenige Primerkombinationen zur Entdeckung von differenziellen Banden eingesetzt werden, d.h. es muss keine vollständige Analyse aller exprimierter Gene durchgeführt werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen (Wan et al., 1996).

Das DD wurde seit seiner Entwicklung kontinuierlich modifiziert, da die Methode sehr komplex und empfindlich ist. Jeder einzelne Schritt, angefangen von Wahl und Präparation des Ausgangsmaterials über die cDNA-Synthese bis hin zur PCR, beeinflusst die Spezifität der Methode. Durch Unterschiede im eingesetzten Ausgangsmaterial oder Unregelmäßigkeiten in der PCR können Fragmente bzw. Banden entstehen, die sich in nachfolgenden Analysen als falsch-positiv herausstellen. Darüber hinaus müssen PCR-Bedingungen geschaffen werden, die sensitiv genug sind, um alle verschiedenen cDNA-Moleküle im System mit entsprechenden Primerkombinationen zu amplifizieren, sodass ein homogenes Bandenmuster generiert und eine statistisch möglichst komplette Analyse gewährleistet werden kann.

Ein Nachteil des DD ist, dass Banden häufig aus mehreren unterschiedlichen cDNA-Fragmenten gleicher Länge bestehen. Es kommt somit zur Schwierigkeit, das tatsächlich

differenziell exprimierte Gen zu erkennen und dieses zu analysieren. Um Fehler auszuschließen, müssten alle erhaltenen Sequenzen in einer weiteren Analyse auf eine differenzielle Expression hin untersucht werden.

Das hier verwendete DD-Protokoll zeigt in der Literatur eine falsch-positiv Rate von 10 % (von der Kammer et al., 1999). Es weist durch die Redundanz der angesetzten Reaktionen und durch den direkten Vergleich zweier Experimente eine gute interne Kontrolle auf. Allerdings werden in der PCR zur Amplifikation der spezifischen Produkte 35 Zyklen durchgeführt, wodurch die Spezifität bzw. die Quantität der Methode leidet. Dies wird auch im Vergleich zum SAGE-Lite Protokoll deutlich, in dem die Zyklenzahl zur Amplifikation aller cDNA-Moleküle bei 18 liegt (siehe oben Punkt 2).

Bei allen Methoden zur Untersuchung differenzieller Genexpression wird immer weniger Ausgangsmaterial für das Screenen eingesetzt. Da die Ergebnisse aber durch Verifizierungsexperimente wie z.B. durch Northern Blot-Analysen bestätigt werden müssen, sind immer noch die entsprechenden RNA-Mengen erforderlich.

5.2 Bewertung des Differential Display Screens

Im durchgeführten DD-Screening wurden unterschiedlich exprimierte Gene zwischen sensorischen und motorischen Nervenästen des N. femoralis von 3-5 Tage alten Kälbern gesucht. Für Kalbsnerven hatten wir uns entschieden, um von jungen Tieren in der Entwicklung besonders viel Ausgangsmaterial für die Experimente zur Verfügung zu haben. Die Entnahme der Nerven wurde schnellstmöglich durchgeführt, um den RNA-Abbau zu verhindern. Die Nerventnahme wurde von einem Tierarzt in Gegenwart eines Neuroanatoms durchgeführt. Anschließend musste das Gewebe von umliegendem Fett- und Bindegewebe sowie von Blut gereinigt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass Gewebekontaminationen vorgekommen sind. Dies ist ein entscheidender Unterschied zur Erstbeschreibung des verwendeten DD-Protokolls, bei dem die Experimente an einer Zelllinie durchgeführt wurden und eine falsch-positiv Rate von nur 10% beobachtet wurde (von der Kammer et al., 1999).

Weiterhin ist die RNA-Präparation aus peripheren Nerven ein wichtiger Aspekt für die Güte des DD. Das Gewebe besitzt eine sehr zähe Konsistenz, die die Ausbeute der RNA-Isolierung negativ beeinflusst. Es wurde darauf geachtet, dass das Gewebe vor der Präparation gut unter flüssigem Stickstoff zermörsert wurde. Auch das Auflösen im Lysispuffer wurde besonders ausgiebig unter Einsatz des Homogenisators durchgeführt. Durch Verwendung des Trizol-Reagenzes wurde die beste Ausbeute erzielt. Vermutlich kann das phenolhaltige Reagenz durch das fetthaltige PNS-Gewebe die Zellen aufschließen und so die RNA zugänglich machen. Aus den Nervenästen ist nur die RNA der Schwann-Zellen und anderer nicht neuronaler Zellen isolierbar, da die Zellkörper der Nerven als Spinalwurzelganglien im Rückenmark liegen. Insbesondere die geringe Anzahl von Schwann-Zellkernen in einem Nervstück ist der Grund für geringe RNA-Ausbeuten.

Das Phenol im Trizol-Reagenz wurde durch häufiges Ausschütteln mit Chloroform aus den RNA-Proben entfernt. Durch spektrometrische Messung konnte eine Kontamination mit Phenol (Absorption bei 215 nm) weitestgehend ausgeschlossen werden. Allerdings konnte auch eine Chloroform- oder Ethanolkontamination vorkommen, die ebenfalls alle weiteren Analyseschritte behindern würde. Zur Generierung qualitativ hochwertiger cDNA wurde die präparierte Gesamt-RNA einem DNase-Verdau unterzogen, um Reste genomischer DNA zu entfernen. Problematisch für die Qualitätskontrolle der eingesetzten RNA war, dass aufgrund der geringen Ausbeuten kein Kontrollgel gemacht werden konnte. Hier wäre ein möglicher Abbau durch RNase sichtbar geworden, und die RNA-Qualität hätte besser beurteilt werden können.

Ein Schritt innerhalb des DD-Protokolls, der aktualisiert werden sollte, ist die Klonierung der cDNA-Fragmente. Vermutlich führten intern vorhandene *HindIII*-Schnittstellen zur Verkürzung der erhaltenen Sequenzinformation der Genfragmente. In einigen Klonen konnte nur auf einer Seite die *anchor*- bzw. *random*-Primersequenz identifiziert werden. Dies deutete auf eine zusätzliche *HindIII*-Schnittstelle innerhalb des Gens hin. Eine Alternative wäre, die Klonierung über den TOPO-Vektor durchzuführen. Dadurch können die PCR-Produkte direkt in den Vektor kloniert werden.

Im DD-Screening wurden acht Sequenzen aus fünf „sicheren“ Banden erhalten. „Sicher“ bedeutet, dass nur die Banden als differenziell galten, die in Kalbsnerven aus zwei Tieren jeweils als differenzielle Bande detektiert wurden. Im weiteren Verlauf wurden nur die Sequenzen analysiert, die in diesen unabhängigen aber parallel angesetzten Experimenten aus der entsprechenden Bande erhalten wurden.

Wie oben bereits erwähnt bestehen Banden im DD häufig aus mehreren cDNA-Fragmenten mit der gleichen Länge, was es schwer macht das tatsächlich differenzielle Gen als solches zu erkennen. Durch das Klonieren und das anschließende Sequenzieren der erhaltenen Proben sollte eine statistische Aussage über die Anzahl der cDNA-Fragmente in der Bande erfolgen. Denn es wurde davon ausgegangen, dass unterschiedlich starke Bandenintensitäten durch ein häufig vorhandenes cDNA-Fragment zustande kommen müssten. Um jedoch auszuschließen, dass ein Klon, der nur einmal identifiziert wurde, das differenzielle Gen darstellt, müssten alle erhaltenen Sequenzen in einer weiteren Analyse auf ihre differenzielle Expression hin untersucht werden. Häufig ist es allerdings problematisch, dass nicht genügend Ausgangsmaterial für diese Experimente zur Verfügung steht.

Die Datenanalyse gestaltete sich schwierig, da die Datenbanken wenig bovine Sequenzen enthalten und es größtenteils nicht möglich war, die Sequenzen bekannten Genen zuzuordnen. Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass der 3'-untranslatierte Bereich zwischen den Spezies keine signifikante Homologie zeigt und somit die Genidentifizierung nicht möglich war.

5.3 Verifizierungsexperimente zur Überprüfung der differentiellen Expression

Die im DD-Screening erhaltenen acht Genfragmente konnten zum größten Teil keinem bekannten Gen zugeordnet werden. Ein cDNA-Fragment zeigte eine Ähnlichkeit zu einem neuen EST-Datenbankeintrag mit Homologie zur ATP-bindenden Kasette. Durch Datenbankanalyse konnte ein Fragment (G3-1) als SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) (Abschnitt 5.4 und 5.5) identifiziert werden, und ein weiteres Fragment (G3-2) wurde als neues Gen (m1) vollständig kloniert (Abschnitt 5.6).

5.3.1 RT-PCR Analysen

Die im DD erhaltenen Fragmente mussten mit Hilfe unabhängiger Techniken als tatsächlich unterschiedlich exprimierte Gene verifiziert werden. Dazu wurde zunächst die RT-PCR durchgeführt. Die RT-PCR ist eine Methode, für die nur wenig Ausgangsmaterial notwendig ist und die eine semiquantitative Aussage ermöglicht. Die kurzen (etwa 60 bp-langen) Fragmente (siehe Tabelle 1, Abschnitt 4.1) eigneten sich wegen ihrer Größe nicht für eine Analyse mittels RT-PCR, da die erhaltenen Produktbanden auch im Polyacrylamidgel ungefähr die gleiche Höhe wie Primerdimere hatten. Zudem gab es aufgrund der Fragmentlänge kaum Variationsmöglichkeiten hinsichtlich des Primerdesigns. Insgesamt gilt für die RT-PCR, dass die Technik so vielfältig und sensibel ist, dass es schwierig war, sie für die Analyse mehrerer Gene zu benutzen und zu etablieren (Siebert and Larrick, 1992; Zimmermann and Mannhalter, 1996).

Es wurden kompetitive Standards erstellt, die eine Deletion oder eine Insertion von ca. 30 Nukleotiden hatten, sich sonst aber nicht von den zu untersuchenden Sequenzen unterschieden. Die cRNA dieser Standards wurden zur internen Kontrolle der Reaktionen benutzt und dienten als Maß für die RNA-Menge, da sie in bekannten Konzentrationen zum Reaktionsansatz gegeben wurde. Die Reaktionsbedingungen für eine gute Amplifikation von kompetitiven Standard und endogener Sequenz wurden aufgrund von Materialmangel an RNA von Ischiasnerven der Kälber optimiert. Die an der Ischias-RNA optimierten Reaktionsbedingungen der kompetitiven RT-PCR konnten allerdings wegen der folgenden Gründe nicht ohne weiteres an der Femoralis-RNA angewendet werden. Die gemeinsame Amplifikation von Kompetitor und endogenem Produkt aus der Femoralis-RNA führte bei einem Fragment (NG4-1) zur Bildung von Heteroduplices (Hayward et al., 1998). Durch Verringerung der PCR-Zyklen und eine Erniedrigung der Ausgangskonzentrationen sollte der Bildung von Heteroduplices entgegengewirkt werden (Chen et al., 1999). Für das Fragment NG4-1 wurden verschiedene Ausgangs- und Reaktionsbedingungen ausgetestet, allerdings war die Detektion der endogenen Produktbande immer erst möglich, wenn sich bereits Heteroduplices gebildet hatten. Es konnte keine Aussage über eine mögliche differentielle Expression erfolgen.

Ein anderes Fragment (G3-1, SPARC) konnte endogen auf Femoralis-RNA nicht mehr amplifiziert werden, sobald die Kompetitor-RNA dazugegeben wurde. Dieses Problem

kann durch eine zu geringe RNA-Menge des Transkripts in den Femoralisästen begründet sein (Chen et al., 1999), oder die Qualität der Femoralis-RNA war schlechter als die Ischias-RNA (so könnte z.B. eine Kontamination mit Chloroform oder Ethanol inhibierend auf die enzymatischen Schritte der PCR wirken).

Wichtig für alle PCR-Analysen ist, dass die Sensitivität der densitometrisch ausgewerteten RT-PCR nicht so hoch ist wie die Sensitivität im DD, da im letzteren Fall die cDNA-Fragmente radioaktiv markiert wurden. Für eine empfindlichere Detektion müsste auch bei der quantitativen RT-PCR-Analyse eine radioaktive Markierung erfolgen, oder eine Realtime-PCR zur genauen Quantifizierung müsste durchgeführt werden. Auch bei der durchgeführten semiquantitativen RT-PCR mit GAPDH als Kontrollgen konnte nicht die Sensitivität des DD erzielt werden. Diese Sensitivitätsschwäche der RT-PCR wurde durch das Ergebnis unseres Kooperationspartners LION Bioscience AG bestätigt. Durch Anwendung des SAGE-Lite Protokolls im Screening der regenerierten sensorischen und motorischen Femoralisäste der Maus konnte SPARC ebenfalls als höher exprimiertes Gen im motorischen Ast identifiziert werden. Es handelte sich dabei aber nur um einen Unterschied von ca. 4:5 für das Verhältnis des sensorischen gegenüber des motorischen Nervenastes. Eine differenzielle Expression in dieser Größenordnung ist sicherlich kaum mittels der semiquantitativen RT-PCR aufzulösen.

Zusammenfassend resultierte die semiquantitative RT-PCR-Untersuchung für die zu analysierenden Gene G3-2 (m1) und G3-1 (SPARC) in einer klaren PCR-Produktbande (Abb.8), die gleichmäßig mit zunehmendem RNA-Konzentrationsgradienten sowohl im motorischen als auch im sensorischen Nervenast für jedes Gen anstieg, aber nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Nervenästen war. Auch die Bande des Kontrollgens GAPDH zeigte dieses Ergebnis.

5.3.2 Northern Blot-Analyse

Mit Hilfe der Northern Blot-Analyse als nicht PCR-basierende Methode sollten die Ergebnisse des DD kontrolliert werden. Da für diese Technik besonders große Mengen RNA benötigt werden, erfolgte die Optimierung der Reaktionsbedingungen auf Ischias-RNA. Die Northern Blot-Technik kann maximal als semiquantitative Methode verwendet werden.

Für das Fragment G3-2 (m1) konnte eine Analyse auf RNA des N. femoralis erfolgreich durchgeführt werden. Es wurde in beiden Nervenästen ein Transkript detektiert, wobei das auf der motorischen Seite etwas schwächer war. Im Vergleich zur 28 S-Bande der ribosomalen RNA wurde jedoch deutlich, dass auch hier eine schwächere Bande im motorischen Ast zu sehen war, d.h. in Relation zur tatsächlich aufgetragenen RNA-Menge unterschied sich die Expression der mRNA im sensorischen und motorischen Nervenast

für G3-2 (m1) nicht (Abb.7). Hinzu kommt, dass aus den Ergebnissen des DD eine stärkere Expression im motorischen Ast zu erwarten gewesen wäre.

Die gute Qualität der RNA konnte im Northern Blot-Experiment durch Anfärben der Membran mit Methylenblau kontrolliert werden. Die hergestellten Membranen wurden zur Positivkontrolle mit GAPDH und BDNF hybridisiert. Diese Experimente zeigten, dass sowohl die Ischias- als auch die Femoralis-RNA erfolgreich transferiert wurde, und dass sie qualitativ gut war. Umso auffälliger war es, dass die Hybridisierung mit der SPARC-Sonde auf der Ischias-RNA ein Signal zeigte, allerdings weder auf der sensorischen noch auf der motorischen RNA der Femoralisäste des Kalbes eine mRNA-Bande detektieren konnte. Eine Erklärung dafür wäre, dass das SPARC-Transkript im N. femoralis weniger abundant als im Ischiasnerv ist. Auch das Ergebnis der quantitativen RT-PCR, die nur im bovinen Ischiasnerv und nicht in der bovinen Femoralis-RNA eine eindeutige Produkt-Bande zeigte, würde diese Aussage unterstützen.

5.4 Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz mit dem anti-m1-Antikörper und dem anti-SPARC-Antikörper am N. femoralis

Die differenzielle Expression von SPARC und G3-2 (m1) wurde auch durch indirekte Immunfluoreszenz an Kalbs- und Maus-Femoralisnerven auf Proteinebene untersucht. Dazu mussten die verwendeten polyklonalen Antikörper zunächst in der Western Blot-Analyse bezüglich ihrer Spezifität getestet werden.

Der generierte anti-m1 Antikörper zeigte eine spezifische Reaktivität, die durch Western Blot-Analysen und durch Blockierung des Antiserums mit dem zur Immunisierung der Kaninchen eingesetzten Peptids getestet wurde (Abb.17, Abschnitt 4.4.6 und 5.6.2).

Das Fragment G3-2 (m1) konnte besonders stark in den perineuralen Bindegeweben der Nervenbündel detektiert werden (Abb.21). Zudem wurde eine eindeutige Kernfärbung der Schwann-Zellen deutlich. In den Maus-Femoralisnerven wurde zusätzlich eine Färbung des des Axons identifiziert. Wahrscheinlich handelte es sich nicht um rein axonale Färbung, da die positiven Strukturen relativ groß waren. Diese Bereiche konnten im sensorischen und im motorischen Nervenast detektiert werden. Es gab aber kein einheitliches Muster, teilweise konnten Nervenfasern identifiziert werden, die diese Färbung nicht zeigten. Durch welche Faktoren diese m1-Expression im Axon zustande kam, konnte nicht festgestellt werden. In den bovinen Femoralisästen (Abb.21 D, E) konnte zusätzlich eine Färbung des Endoneuriums festgestellt werden, auch die Axone waren m1-positiv. Da es sich in beiden untersuchten Spezies um eine erstmalige Untersuchung des Proteins handelte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Antikörper (im Gegensatz zur Anwendung im Western Blot) in der indirekten Immunfluoreszenz unspezifisch gebunden hat. Eine Unspezifität durch den sekundären Antikörper wurde durch Verwendung unterschiedlicher sekundärer Antikörper getestet. Die Kontrollen waren negativ.

Zusammenfassend gilt, dass der Antikörper in diesem Experiment in Maus und Kalb Strukturen erkannte, die gleichermaßen im sensorischen als auch im motorischen Nervenast detektiert wurden.

Die Spezifität des anti-SPARC-Antikörpers wurde ebenfalls im Western Blot untersucht (Abb.9). Er erkannte im Maus-Gewebe eine deutliche Bande bei ca. 40 kDa. Das entspricht etwa dem Molekulargewicht von SPARC, das in der Literatur mit 43 kDa angegeben ist. Bei der Untersuchung der Kreuzreaktivität des Antikörpers mit dem bovinen Protein konnte allerdings kein überzeugendes Resultat erzielt werden. Der Antikörper erkannte eine dominante Proteinbande bei ca. 80 kDa und detektierte somit ein Protein mit ungefähr dem doppelten erwarteten Molekulargewicht. Vermutlich handelt es sich hier um ein Proteindimer (Zhou et al., 1998). SPARC hat 14 hoch konservierte Cysteine (Schwarzbauer and Spencer, 1993), die auch für eine intermolekulare Bindung verantwortlich sein könnten. Es wäre möglich, dass unter den reduzierenden Bedingungen des SDS-Gels vorhandene Disulfidbrücken nicht vollständig reduziert wurden. Der Antikörper konnte dadurch erst für immunologische Untersuchungen an bovinem Gewebe verwendet werden, nachdem die Lokalisation im Mausgewebe bekannt, und somit ein direkter Vergleich des Expressionsmusters möglich war.

In der Literatur wurde bereits eine immunhistochemische Expressionsanalyse von SPARC im ZNS beschrieben, wobei das Protein sowohl neuronal als auch glial vorkommt (Yan et al., 1998). In neuronalem Gewebe wurde SPARC im adulten Maushirn im Cerebellum, Mittelhirn und Stammhirn detektiert, wobei in den frontalen Bereichen eine niedrigere Expression zu finden ist (Mendis and Brown, 1994). SPARC ist außerdem besonders stark im Soma und auch in den Axonen von adulten bovinen retinalen Ganglionzellen exprimiert. Das gleiche, allerdings schwächere Expressionsmuster konnte in neugeborenen Kälbern immunhistochemisch dokumentiert werden (Yan et al., 1998). Über die Lokalisation in Schwann-Zellen wurden kaum Untersuchungen vorgenommen. SPARC wurde allerdings als sezerniertes Basalmembran-Protein im Medium von kultivierten Schwann-Zellen (Dziadek et al., 1986) und in einem weiteren differenziellen Screening als hochregulierte mRNA in regenerierten gegenüber den unbehandelten Ischiasnerven (also in Schwann-Zellen) entdeckt (Gillen et al., 1995).

In unseren Experimenten detektierte der anti-SPARC-Antikörper im Maus-Femoralisnerv (Abb.10) insbesondere das Endoneurium und die Basallamina der Schwann-Zellen, auch das Zytoplasma der nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen war positiv. Die zytoplasmatische Lokalisation von SPARC wurde auch in der Literatur beschrieben, wobei es im Zytoplasma von großen Ganglion-Zellen und Astrocyten in der Retina exprimiert wird (Yan et al., 1998). In den immunologischen Untersuchungen im N. femoralis zeigten auch einige Axone ein Signal auf den anti-SPARC-Antikörper. Eine axonale SPARC-Färbung wurde in der Literatur schon in der Retina von Kälbern beschrieben, wobei insbesondere die großen Ganglion-Axone SPARC-positiv sind (Yan et al., 1998).

Zusammenfassend kann zur differentiellen Expressionsuntersuchung gesagt werden, dass die angewendeten Methoden nur sehr eingeschränkt quantitative Aussagen zulassen. Insbesondere nur geringe Expressionsunterschiede zwischen dem sensorischen und motorischen Nervenast können nicht erkannt werden. Für die untersuchten Proteine m1 und SPARC konnte mit den verwendeten Techniken kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Ein weiterer Aspekt ist, dass beide Sequenzen aus einer Bande des DD-Screenings stammten und noch eine dritte Sequenz in dieser Bande entdeckt wurde. Möglicherweise ist dieses nicht weiter untersuchte Fragment bzw. Gen differentiell zwischen den Nervenästen exprimiert. Diese dritte Sequenz ist das Fragment G3-3, das eine Ähnlichkeit zu einem erst kürzlich veröffentlichten EST mit Homologie zur ATP-bindenden Kasette zeigte.

5.5 Identifizierung von SPARC, einem entwicklungs- und regenerationsassoziiertem Protein im Nervensystem

SPARC ist ein extrazelluläres matrixassoziiertes Glycoprotein, das in vielen Geweben insbesondere während der Embryo- und Morphogenese sowie der Regeneration exprimiert wird (Motamed, 1999). SPARC kann zelluläre Kontakte selektiv unterbrechen, wodurch es Einfluss auf die Zellform nehmen kann. Das Protein wird auch als antiadhäsiv bezeichnet (Floege et al., 1992). Durch eine große Anzahl der extrazellulären Interaktionen und Modifikationen hat SPARC abhängig von der spezifischen Umgebung eine Reihe von Möglichkeiten, sich in verschiedene Wege der Regulation der zellulären Adhäsion zu integrieren (Sage and Bornstein, 1991).

SPARC scheint auch für die Regeneration im PNS wichtig zu sein. Dafür spricht die Hochregulation des Proteins in lädierten Ischiasnerven (Gillen et al., 1995) und unser Befund, dass SPARC im DD der Kalbsnerven und im SAGE-Screening (Firma LION) in regenerierten Mausexemplaren gefunden werden konnte. Wahrscheinlich beeinflusst SPARC auch durch seine Interaktion mit den Cytokinen PDGF und TGF-beta die Regeneration im Nervensystem. Die spezifische Affinität des SPARC zur B-Form des PDGF reguliert die biologische Aktivität dieses Cytokins. Denn durch das Binden der B-Form enthaltenen PDGF-Dimere an SPARC (also PDGF AB und BB) kann die Bindung des Wachstumsfaktors an den PDGF-beta Oberflächenrezeptor inhibiert werden (Bonner, 1994). Der PDGF-beta Rezeptor ist besonders hoch exprimiert in neonatalen Ratten-Ischiasnerven (Eccleston et al., 1993) und etwas schwächer in den adulten Nerven (Hardy et al., 1992), wobei nur die myelinisierten Fasern den PDGF-beta Rezeptor tragen (Eccleston et al., 1993). Auch Schwannsche Vorläuferzellen exprimieren den PDGF-beta-Rezeptor (Lobsiger et al., 2000). PDGF kann einerseits von Neuronen, d.h. deren Axone (Weinmaster and Lemke, 1990), oder auch von Makrophagen exprimiert werden (Bonner, 1994). Es ist somit ein wichtiger Faktor bei der Wallerschen Degeneration und der

Regeneration von Neuriten und könnte auch ein Kandidat für die spezifische Regeneration sein.

Das Cytokin TGF-beta ist vermutlich ebenfalls ein Interaktionspartner des SPARCs. TGF-beta ist besonders wichtig bei der schnellen Remodellierung von Gewebe, insbesondere durch seine regulierende Wirkung auf die Expression der ECM-Proteine (Kingsley, 1994; Reed et al., 1994). Es wurde beschrieben, dass TGF-beta auch den SPARC mRNA-Level erhöhen kann (Wrana et al., 1991). Weiterhin scheint SPARC aber auch die Expression von TGF-beta erhöhen zu können, dies wurde auf mRNA- und Proteinebene in kultivierten mesangialen Zellen gezeigt (Francki et al., 1999). Allerdings wurde die spezifische Interaktion von TGF-beta mit SPARC noch nicht bewiesen (Yan and Sage, 1999).

In welchen molekularen Mechanismen SPARC auf die neuronale Regeneration tatsächlich einwirkt, ist nicht bekannt. Unsere Ergebnisse im differenziellen Screening zeigen sowohl in den Kalbsnerven (DD) als auch in den regenerierten Mausnerven (SAGE), dass SPARC ein wichtiges Protein bei der Remodellierung des PNS ist. Da die quantitative Aussagekraft der eingesetzten Methoden zur Verifizierung dieser Ergebnisse nicht ausreicht, kann ein Einfluss auf die spezifische Regeneration nicht ausgeschlossen werden.

5.6 Ergebnisse der Klonierung und Charakterisierung des m1-Gens

Die Klonierung des neuen Gens erfolgte durch Datenbank-, PCR- und Sequenzanalyse. Ursprünglich wurde die m1-cDNA in peripheren Nerven entdeckt. In welchen weiteren Geweben die mRNA exprimiert wird, war die erste zu untersuchende Fragestellung. Da in der Datenbankanalyse humane und murine ESTs aus verschiedenen Geweben erhalten wurden, handelte es sich wahrscheinlich um eine sehr stark verbreitete mRNA. Diese Vermutung konnte durch die Untersuchungen mittels Northern und Dot Blot-Techniken und *in-situ*-Hybridisierungen bestätigt werden. Auch auf Proteinebene konnte das m1-Protein in allen untersuchten Geweben identifiziert werden.

Interessanterweise wurde die m1-cDNA in vielen weiteren Spezies entdeckt. Vergleicht man die einzelnen Proteine wird die starke evolutionäre Konservierung deutlich. Das Protein ist aufgrund dieses Befundes vermutlich für viele Organismen von grundlegender, funktioneller Bedeutung.

5.6.1 m1-mRNA-Expressionsmuster durch Northern und Dot Blot-Analyse sowie *in-situ*-Hybridisierung

Das m1-mRNA-Expressionsmuster zeigte im multiplen Gewebe-Dot-Blot (Abb.14) ein ubiquitäres Vorkommen, wobei ein stärkeres Signal im Skelettmuskel, der Niere, Herz, Leber, Lunge und Cerebellum zu finden war. Die Negativkontrollen in diesem Experiment zeigten kein Signal. Die besonders stark m1-mRNA exprimierenden Gewebe konnten auch in der Northern Blot-Analyse detektiert werden (Abb.13). Außerdem konnte das Ergebnis durch radioaktive *in-situ*-Hybridisierungen bestätigt werden (Abb.15 und 3). In den Gewebeschnitten von Embryonen vom Tag 10-18, von neugeborenen Mäusen und auch von adulten Gehirnschnitten ist beinahe überall ein Signal zu sehen. Die sense-Sonde wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Sie zeigte auf den entsprechenden Gewebeschnitten ein wesentlich schwächeres Signal. In den Gehirnschnitten erzielte die sense-Sonde ein verhältnismäßig starkes Signal. Dieses Signal war allerdings nicht in allen Regionen gleich stark (siehe Abb. 2 B', C' und D'). Dass es sich um ein spezifisches Signal der antisense-Sonden handelte, wurde durch den Einsatz von verschiedenen antisense-Sonden getestet. Es wurde eine Sonde hergestellt, die vom 5'-Ende der m1-cDNA stammte, eine Sonde entsprach dem 3'-Ende der cDNA und eine wurde vom gesamten cDNA-Bereich konstruiert. Alle Sonden zeigten das gleiche mRNA-Expressionsmuster in den *in-situ*-Hybridisierungen. So wurde die Richtigkeit der Ergebnisse in unabhängigen Experimenten untersucht und konnte bestätigt werden.

Die *in situ*-Hybridisierungen an Embryonen wiesen insbesondere ein starkes Signal im ZNS auf, vor allem im Rückenmark (Abb.15). Wenn man das Signal mit dem adulten Gehirnschnitt (Abb.16) vergleicht, scheint es einen Expressionspeak im embryonalen Stadium zu geben. Dabei kann von einer sehr starken Expression im Nervensystem gesprochen werden, auch wenn es sich um eine ubiquitäre Verteilung handelt. Die

Experimente an den Gehirnschnitten zeigten ebenfalls überall ein Signal, wobei diese unterschiedlich stark waren. Besonders kräftig war das Signal im Cerebellum, Hippocampus und im pyriformen Cortex. In diesen Regionen kam die stärkere Intensität durch eine erhöhte Zelldichte zustande (I. Hermanns-Borgmeyer, persönliche Mitteilung). Auffällig war eine besonders deutliche Markierung im Kleinhirn oberhalb der Körnerschicht. Ob es sich dabei um die Purkinje- oder die Bergmann-Glia-Zellen handelte, konnte mit der Auflösung der radioaktiven *in-situ*-Hybridisierungen nicht erkannt werden (U. Bartsch, persönliche Mitteilung). Es wäre auch möglich, dass die Korbzellen für das stark positive Signal verantwortlich waren (S. Fehr, persönliche Mitteilung).

Zusammenfassend zeigten die mRNA-Expressionsuntersuchungen ein m1-Expressionspeak im embryonalen Stadium. Vergleicht man die *in-situ*-Hybridisierungen am adulten Mausgehirn (Abb.16) mit dem humanen *multiple tissue* Dot Blot (Abb.14), ist zu erkennen, dass beide Techniken eine zwar schwächere aber ubiquitäre m1-mRNA-Expression zeigen, die verhältnismäßig intensiv im Cerebellum ist. Daher ist auch eine schwache Bande im humanen *multiple-tissue* Northern Blot zu erwarten, in dem eine Mischung des gesamten adulten Gehirns aufgetragen wurde (Abb.13).

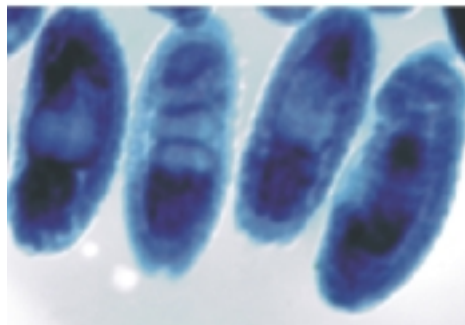


Abb. 26; *In-situ*-Hybridisierung an Drosophila-Larven. Die CK-Datenbank beinhaltet ESTs aus Drosophila, die in einem großangelegten Screen Digoxigenin-markierte Sonden auf Drosophila-Embryonen hybridisieren. Dargestellt sind ganze Embryonen, die mit einer CK01793-Sonde hybridisiert wurden. Hybridisierungssignale erscheinen blau. CK01793 ist die orthologe Sequenz zur m1-cDNA. Eine stark positive Färbung ist im embryonalen Gehirn, im ventralen Nervenband und im visceralem Mesoderm lokalisiert (entnommen aus; Clone Report for CK01793 <http://openfly.bdgp.berkeley.edu>).

Die besonders starke Expression der m1-mRNA im Nervensystem konnte auch in einer anderen Spezies gezeigt werden. Denn interessanterweise konnte durch Recherchen in der Drosophila-Datenbank eine *in-situ*-Hybridisierung der orthologen Sequenz an den Larven der Fruchtfliege gefunden werden (<http://openfly.bdgp.berkeley.edu> Clone Report for CK01793) (Abb.26). Auch hier wurde eine stark positive Reaktion im ZNS, im embryonalen Gehirn, im ventralen Nervenband und im visceralem Mesoderm (Mesoderm der Eingeweide) gezeigt. Damit scheint die m1-mRNA eine sehr ähnliche Verteilung zwischen den Spezies zu haben und hat vermutlich dementsprechend eine wichtige Funktion in diesen Geweben.

5.6.2 m1-Proteinexpression

Damit die m1-Proteinexpression überhaupt untersucht werden konnte, musste ein Antikörper generiert werden. Dieser Antikörper wurde zunächst in Western Blot-Analysen auf seine Spezifität hin getestet (Abb.17). Da die Antiserum aus zwei immunisierten Kaninchen im Vergleich zu den Seren der selben Kaninchen vor der Immunisierung eine einzige Proteinbande bei ca. 32 kDa erkannten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um das m1-Protein handelte. Das berechnete Molekulargewicht des m1-Proteins liegt bei 27 kDa. Bei diesem berechneten Wert kann die Struktur und Größe, die die elektrophoretische Beweglichkeit des Proteins im SDS-Polyacrylamidgel beeinflussen, nicht miteinbezogen werden.

Die Spezifität des anti-m1-Antikörper wurde durch zwei weitere Experimente abgesichert: Zum einen konnte die Spezifität des Serums durch Blockierungsexperimente mit dem Peptid, das zur Immunisierung der Kaninchen benutzt wurde, verdeutlicht werden. Dabei konnte der Antikörper nach Inkubation mit dem spezifischen Peptid keine Bande mehr detektieren, sowohl die Bande des endogenen Proteins als auch die des Fusionsproteins war nicht mehr vorhanden. Dagegen beeinflusste ein unspezifisches Peptid die Immunreaktivität des Antikörpers nicht (Abb.17). Zum anderen erkannte der anti-m1-Antikörper eine zweite Bande im Western Blot, sobald das Gesamtzell-Lysat von transfizierten Zellen aufgetragen wurde. Bei der Transfektion wurde ein Expressionsvektor mit der m1-cDNA, einem c-myc-Tag und einem 6x Histidin-Tag in die Zelle transfiziert. Das exogen produzierte Protein stellte somit ein Fusionsprotein mit den entsprechenden Epitopen dar. Dadurch dass sich dieses Fusionsprotein langsamer im SDS-Gel bewegt, konnte es als zweite, etwas höher liegende Bande identifiziert werden.

Das m1-Protein zeigte eine schwache Ähnlichkeit zum neuronalen Protein GAP-43. Dieses Protein kann in nicht-neuronalen Zellen durch Überexpression neuritenartiges Wachstum hervorrufen (Zuber et al., 1989). Aus diesem Grund wurde mit Hilfe von Transfektionsexperimenten (Abb.18) an verschiedenen Zelllinien in vivo ein Einfluss der Überexpression von m1 auf die Struktur, Form und den allgemeinen Zustand der Zellen untersucht. Wenn m1 im Überfluss toxisch auf die Zellen wirkt, wäre ein vermehrter Zelltod zu beobachten. Da die m1-überexprimierenden Zellen sich in ihrem Zellwachstum und ihrer Zellform zu verschiedenen Zeitpunkten nicht von den Kontrollzellen unterschieden, hat eine m1-Überexpression wahrscheinlich keinen toxischen Effekt auf die untersuchten Zellen. Ein Einfluss auf die Zytoskelettproteine Aktin, Tubulin und Tau wurde ebenfalls untersucht. Wenn m1 ähnlich dem GAP-43 ein neuritenartiges Wachstum bewirken könnte, müsste sich die Anordnung des Zytoskeletts ändern. Die Anfärbungen der oben aufgeführten Zytoskelettproteine zeigten jedoch keine sichtbaren Unterschiede des Musters und der Struktur der Zytoskelettfilamente zwischen den m1-

überexprimierenden Zellen und den Kontrollzellen. Eine m1-Überexpression hat demnach keinen sichtbaren Einfluss auf die untersuchten Faktoren.

Die Zellkulturexperimente dienten auch zur Identifizierung der subzellulären Lokalisation des m1-Proteins. Dazu konnten einerseits transfizierte CHO-Zellen fraktioniert werden, und das m1-Protein konnte in einer Western Blot-Analyse in der Zellkernfraktion identifiziert werden (Abb.20). Andererseits konnte durch indirekte Immunfluoreszenz-Untersuchungen an kultivierten Zellen die nukleäre Lokalisation gezeigt werden (Abb.19). In diesen Experimenten wurde in CHO-, S16-, OLN- und N2A-Zellen zusätzlich eine zytoplasmatische Färbung deutlich.

Auch im Gewebe konnte durch indirekte Immunfluoreszenz die zelluläre Lokalisation bestimmt werden. Dabei konnte in Schwann-Zellen eine intensive nukleäre Färbung beobachtet werden, allerdings gab es in diesen Zellen ebenfalls eine wahrscheinlich zytoplasmatische m1-Expression. In den Rückenmarksneuronen war diese zytoplasmatische Markierung besonders stark zu erkennen (Abb.22 D). Um eine Aussage treffen zu können, ob es sich bei dieser Färbung um eine ungenügende Durchlässigkeit des Gewebes oder ein Umverteilungsproblem des Antikörpers handelte, wurde das Experiment sowohl an frisch-eingefrorenen Rückenmarkschnitten als auch an perfundiertem Gewebe durchgeführt. Unabhängig von der Behandlung der Gewebeschnitte wurde die Markierung des Zytoplasmas erhalten, d.h. auch das für den Antikörper gut durchlässige, fixierte Gewebe zeigte nur eine Markierung des Zytoplasmas. Gewebeschnitte des Gehirns zeigten dagegen eine eindeutige Zellkernfärbung. Die nukleäre zelluläre Lokalisation des m1-Proteins ist aufgrund des NLS-Signals (*nuclear localisation signal*) sehr wahrscheinlich. Von welchen Faktoren der Transport in den Zellkern abhängig ist, ist jedoch nicht bekannt. Bekannte Proteine mit einem NLS-Signal sind zum Beispiel die NAPs (*nucleosome assembly protein*). NAPs sind wie das Nucleoplasmin bei der Bildung der Nucleosomen beteiligt. Sie können sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorkommen. Das NAP-2 ist wahrscheinlich ein Histon-Chaperon (Rodriguez et al., 1997). Vermutlich spielt der Phosphorylierungsstatus dieser NAPs eine wichtige Rolle bei der zellulären Lokalisation. Für NAP-2 konnte gezeigt werden, dass die durch die Caseinkinase II phosphorylierte Form sich im Zytoplasma befindet, und dass das dephosphorylierte Protein verstärkt in den Nucleus transportiert wird (Rodriguez et al., 2000).

Eine ähnliche Abhängigkeit von einer Phosphorylierung und eine eventuell ähnliche Funktion wäre auch für das m1-Protein vorstellbar. Das m1-Protein hat wie das Nucleoplasmin und die NAPs einen sauren Bereich, es besitzt neben dem NLS-Signal auch mögliche CaseinkinaseII-Phosphorylierungsstellen, und es konnte in den bisherigen Untersuchungen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert werden.

Durch die indirekte Immunfluoreszenz wurde weiter gehend kontrolliert, ob es eine Abhängigkeit der m1-Expression vom Entwicklungsstadium der Tiere gibt. Dazu wurden Gehirnschnitte vom postnatalen Tag 7 und adulte Mäuse auf ihre m1-Expression hin untersucht. Es konnte kein deutlicher Unterschied der Intensität und kein Unterschied des Expressionsmusters erkannt werden. Das m1-Protein wurde in den untersuchten Geweben in jeder Zelle detektiert.

Ein Einfluss der m1-Expression auf die Entwicklung des PNS wurde durch die indirekte Immunzytochemie an peripheren Nerven von Neugeborenen, juvenilen und adulten Mäusen untersucht. Dabei würde ein Expressionspeak am postnatalen Tag 5 z.B. auf einen Einfluss auf die Bildung der Ranvier'schen Schnürringe und am Tag 7 auf die Myelinisierung der Schwann-Zellen hinweisen. Da es keinen Unterschied zwischen den Geweben von jungen und adulten Mäusen gab, kann gefolgert werden, dass das m1-Protein an allen untersuchten Zeitpunkten eine entwicklungsunabhängige, wichtige Funktion hat.

5.6.3 Untersuchung des m1-Gens als Kandidatengen für Krankheiten auf Chromosom 11q23

Eine Möglichkeit die physiologische Funktion des m1-Gens näher zu charakterisieren, wäre über die chromosomale Lokalisation denkbar. Denn immer häufiger werden Krankheiten durch genetische Kopplungsanalysen in chromosomale Regionen zugeordnet, wobei die krankheitsverursachenden Gene unbekannt sind. Über die chromosomale Lokalisation konnte nach entsprechenden Erkrankungen in der chromosomalen Region gesucht werden. Anschließend musste die DNA dieser Patienten im Hinblick auf eine Mutation im m1-Gen weiteranalysiert werden.

Durch Datenbankrecherche haben wir eine spezielle Form der Neuropathie, die CMT4B-Erkrankung, entdeckt, die auf Chromosom 11q23 kartiert wurde (Bolino et al., 1996). Durch Analyse der genetischen Marker konnte gezeigt werden, dass sich das m1-Gen in der CMT4B-Region befindet (Abb.24). Da das m1-Gen aus peripheren Nerven kloniert wurde und zudem die chromosomale Lokalisation in Übereinstimmung zur CMT4B-Kartierung war, war das m1-Gen ein geeignetes Kandidatengen. Allerdings hatte eine andere Arbeitsgruppe fast zeitgleich das CMT4B-verantwortliche Gen identifiziert. Dabei handelte es sich um die Phosphatase MTMR2 (*myotubularin-related protein 2*) (Bolino et al., 2000).

Bei einer weiteren interessanten Erkrankung, die ebenfalls in die entsprechende Region des Chromosoms 11q kartiert wurde, handelte es sich um eine spezielle Form der Spinalen Muskelatrophie SMARD (*spinal muscular atrophy with respiratory distress*). SMARD führt durch Paralyse des Diaphragmas zum respiratorischen Leiden. Eine pathophysiologische Überlegung, wie es zu SMARD kommen könnte, wäre zum einen eine Degeneration der Vorderhorn-Zellen im Rückenmark oder eine *dying-back* Atrophie, also eine Degeneration beginnend von der motorischen Endplatte zum neuronalen

Zellkörper hin (Grohmann et al., 1999). Das m1-Gen war somit aufgrund der chromosomalen Lokalisation und aufgrund der mRNA- und Proteinexpression ein geeignetes Kandidatengen. Das m1-Protein ist stark im Rückenmark (den Motoneuronen) und auch im Muskel (Nackemuskel und Diaphragma) exprimiert, und es wäre möglich, dass ein Defekt des m1-Gens zur Degeneration sowohl der Motoneurone als auch der peripheren Nerven und der Muskulatur führen könnte. Des Weiteren zeigten die bisher bekannten SMA-verantwortlichen Gene Ähnlichkeiten zum m1-Protein. Zum Beispiel hat das SMN-Protein (*survival motor neuron*) ein berechnetes Molekulargewicht von 32 kDa, und es befindet sich in der Zelle sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Im Zellkern nimmt das Protein bestimmte Strukturen an, die als „gems“ (*gemini of the coiled bodies*) bezeichnet werden (Liu and Dreyfuss, 1996). SMN interagiert mit SIP1 (*SMN interacting protein*). Sie formen einen Komplex, der für die Biosynthese von Ribonukleotiden, den snRNP (*small nuclear ribonuclearproteins*), wichtig ist (Liu et al., 1997). Diese snRNP sind Bestandteile der Spleißosomen. Auch für das m1-Protein wäre aufgrund der bisherigen Untersuchungen eine ähnliche Funktion denkbar. Ein Mutationsscreening der SMARD-Patienten-DNA wurde für das m1-Gen durchgeführt. In dieser Untersuchung konnten alle Exons der Patienten amplifiziert werden, damit war eine große Deletion des Gens ausgeschlossen. Auch die Sequenzierungen erfolgten problemlos, die erhaltenen Sequenzinformationen zeigten weder Auffälligkeiten in den Splice-Sites noch in den Exons. Mit dieser PCR-basierenden Untersuchung wurde die Wahrscheinlichkeit, dass das m1-Gen für SMARD verantwortlich sein könnte, sehr gering. Auch die Besonderheit im ersten Intron der DNA des libanesischen Patienten ist nicht ursächlich für die Krankheit, da die Deletion von 4 Nukleotiden und die gleichzeitige Insertion von 7 Nukleotiden vor dem Startkodon auch in einem gesunden Elternteil des Patienten als homozygoter Polymorphismus entdeckt werden konnte.

Da z.B. keine Untersuchungen der intronischen Bereiche und der regulatorischen Regionen durchgeführt wurden, kann das m1-Gen nicht vollständig als Ursache für SMARD ausgeschlossen werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass das m1-Gen für SMARD verantwortlich ist, ist aufgrund des durchgeführten Mutationsscreenings jedoch sehr gering.

6. Ausblick

Die aus dem DD erhaltenen Genfragmente sollten mit den Datenbanken verglichen werden, da laufend neue ESTs veröffentlicht werden. Die bovinen Genfragmente müssten analog dem bisherigen Ansatz des m1-Gens weiteranalysiert werden. Dazu sollte die Verlängerung der Sequenzinformation der Fragmente im Vordergrund stehen. Für diesen Ansatz müssten die Gene aus einer bovinen cDNA-Bank (z.B. mit einem 5'-RACE-Ansatz) isoliert werden. Dabei sollte das Ziel sein, die Genfragmente so weit zu verlängern, dass man einen Teil des kodierenden Bereiches erhält. Mit dieser Information wäre eine Analyse durch Datenbanken möglich, wodurch entweder orthologe Sequenzen entdeckt werden können oder Homologien zu anderen bereits bekannten Genen zu finden wären. Mit solchen homologen Sequenzen könnte auch auf eine Funktion des neuen Gens geschlossen werden.

In der weiteren Analyse muss die differenzielle Expression in den sensorischen und motorischen Nervenästen untersucht werden. Für diesen Ansatz sollten die Untersuchungen möglichst mit den murinen Genen durchgeführt werden, da die Datenbankanalysen optimal durchgeführt werden können und das Material in kleinen Mengen am besten zugänglich ist.

Das in Maus und Mensch vollständig klonierte, bisher unbekannte m1-Gen konnte durch Northern Blot, *in-situ*-Hybridisierungen und immunhistochemische Untersuchungen weitestgehend charakterisiert werden. Mit Hilfe der chromosomalen Lokalisation und der Untersuchung interessanter Erkrankungen in dieser chromosomalen Region wurde nach einer möglichen Funktion des Gens bzw. Proteins gesucht. Dieser Ansatz sollte auch in Zukunft weiter verfolgt werden, da menschliche Erkrankungen die einfachsten und am schnellsten zugänglichen Beispiele für Funktionsdefekte von Genen darstellen.

Weiterhin könnten verschiedene funktionelle Untersuchungen des m1-Gens stattfinden. Es sollte analysiert werden, ob sich die zelluläre Expression des m1-Proteins in Abhängigkeit des Zellzyklus verändert, wie es z.B. für NAP-2 gezeigt wurde (Rodriguez et al., 2000). Dabei ist es auch wichtig eine mögliche Phosphorylierung des Proteins zu beachten und zu untersuchen, ob das m1-Protein anhand seiner geladenen Aminosäuren evtl. an Chromatine bindet. Ein biochemischer Ansatz wäre mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid Systems möglich, wodurch direkte Interaktionspartner des m1-Proteins identifiziert werden können. Weiterhin könnte der Einfluss des NLS-Signals untersucht werden. Dazu sollte das Signal deletiert werden und durch Transfektionen dieses modifizierten Expressionsvektors in eukaryontischen Zellen untersucht werden, ob und wie sich die Lokalisation des Proteins ändert. Ein weiter gehender Ansatz wäre das Herstellen von transgenen bzw. knock-out Tieren. Für diese Mutations-Untersuchungen könnte als relativ einfaches Modell die Fruchtfliege dienen. Das m1-Gen hat wahrscheinlich eine wichtige Funktion bereits im frühen Embryonalstadium, sodass Mutationen zu einem auffälligen Phänotyp führen könnten, wodurch auf die Funktion des m1-Gens geschlossen werden könnte.

- Abo, T., and Balch, C. M. (1981). A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J Immunol* *127*, 1024-9.
- Albelda, S. M., and Buck, C. A. (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J* *4*, 2868-80.
- Anton, E. S., Weskamp, G., Reichardt, L. F., and Matthew, W. D. (1994). Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 2795-9.
- Baichwal, R. R., and DeVries, G. H. (1989). A mitogen for Schwann cells is derived from myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun* *164*, 883-8.
- Bixby, J. L., Lilien, J., and Reichardt, L. F. (1988). Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. *J Cell Biol* *107*, 353-61.
- Bolino, A., Brancolini, V., Bono, F., Bruni, A., Gambardella, A., Romeo, G., Quattrone, A., and Devoto, M. (1996). Localization of a gene responsible for autosomal recessive demyelinating neuropathy with focally folded myelin sheaths to chromosome 11q23 by homozygosity mapping and haplotype sharing. *Hum Mol Genet* *5*, 1051-4.
- Bolino, A., Levy, E. R., Muglia, M., Conforti, F. L., LeGuern, E., Salih, M. A., Georgiou, D. M., Christodoulou, R. K., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Mandich, P., Gambardella, A., Quattrone, A., Devoto, M., and Monaco, A. P. (2000). Genetic refinement and physical mapping of the CMT4B gene on chromosome 11q22. *Genomics* *63*, 271-8.
- Bolino, A., Muglia, M., Conforti, F. L., LeGuern, E., Salih, M. A., Georgiou, D. M., Christodoulou, K., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Mandich, P., Schenone, A., Gambardella, A., Bono, F., Quattrone, A., Devoto, M., and Monaco, A. P. (2000). Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat Genet* *25*, 17-9.
- Bollensen, E., and Schachner, M. (1987). The peripheral myelin glycoprotein P0 expresses the L2/HNK-1 and L3 carbohydrate structures shared by neural adhesion molecules. *Neurosci Lett* *82*, 77-82.
- Bonner, J. C. (1994). Regulation of platelet-derived growth factor (PDGF) and alveolar macrophage-derived PDGF by alpha 2-macroglobulin. *Ann N Y Acad Sci* *737*, 324-38.
- Brown, M. C., Lunn, E. R., and Perry, V. H. (1991). Poor growth of mammalian motor and sensory axons into peripheral nerve stumps. *Eur.J.Neurosci.* *3*, 1366-1369.
- Brushart, T. M. (1993). Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *J Neurosci* *13*, 2730-8.
- Brushart, T. M. (1998). *Nerve Repair and Grafting*, D. Green, R. Hotchkiss and W. Peterson, eds. (New York: Churchill Livingstone).
- Brushart, T. M. (1988). Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. *J Neurosci* *8*, 1026-31.
- Bunge, R. P., Bunge, M. B., and Eldridge, C. F. (1986). Linkage between axonal ensheathment and basal lamina production by Schwann cells. *Annu Rev Neurosci* *9*, 305-28.
- Bunge, R. P., and Hopkins, J. M. (1990). The role of peripheral and central neuroglia in neural regeneration in vertebrates. *Seminars in the Neuroscience* *2*, 509-518.
- Cajal, S. R. y. (1928). *Degeneration and Regeneration of the Nervous System* (London: Oxford Univ. Press).
- Carenini, S., and Martini, R. (2000). Myelin-defiziente Mutanten des peripheren Nervensystems: Chancen für Behandlungsstrategien erblicher Neuropathien? *Neuroforum* *3*, 216-228.
- Carratu, M. R., Steardo, L., and Cuomo, V. (1996). Role of polysialic acid in peripheral myelinated axons. *Microsc Res Tech* *34*, 489-91.

- Carulli, J. P., Artinger, M., Swain, P. M., Root, C. D., Chee, L., Tulig, C., Guerin, J., Osborne, M., Stein, G., Lian, J., and Lomedico, P. T. (1998). High throughput analysis of differential gene expression. *J Cell Biochem Suppl* 31, 286-96.
- Chen, Z., Smithberger, J., Sun, B., and Eggerman, T. L. (1999). Prevention of heteroduplex formation in mRNA quantitation by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 266, 230-2.
- Cohen, J. A., Yachnis, A. T., Arai, M., Davis, J. G., and Scherer, S. S. (1992). Expression of the neu proto-oncogene by Schwann cells during peripheral nerve development and Wallerian degeneration. *J Neurosci Res* 31, 622-34.
- Cole, G. J., and Schachner, M. (1987). Localization of the L2 monoclonal antibody binding site on chicken neural cell adhesion molecule (NCAM) and evidence for its role in NCAM-mediated cell adhesion. *Neurosci Lett* 78, 227-32.
- Czeizel, A., and Hamula, J. (1989). A hungarian study on Werdnig-Hoffmann disease. *J Med Genet* 26, 761-3.
- Dubois, C., Figarella-Branger, D., Pastoret, C., Rampini, C., Karpatis, G., and Rougon, G. (1994). Expression of NCAM and its polysialylated isoforms during mdx mouse muscle regeneration and in vitro myogenesis. *Neuromuscul Disord* 4, 171-82.
- Dyson, M. (1995). Regeneration of axons in the peripheral nervous system. In Gray's Anatomy, W. P.L, ed. (New York, Edingborough, London, Tokyo, Madrid and Melbourne: Churchill Livingstone), pp. 956ff.
- Dziadek, M., Edgar, D., Paulsson, M., Timpl, R., and Fleischmajer, R. (1986). Basement membrane proteins produced by Schwann cells and in neurofibromatosis. *Ann N Y Acad Sci* 486, 248-59.
- Ebadi, M., Bashir, R. M., Heidrick, M. L., Hamada, F. M., Refaey, H. E., Hamed, A., Helal, G., Baxi, M. D., Cerutis, D. R., and Lassi, N. K. (1997). Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem Int* 30, 347-74.
- Eccleston, P. A., Funa, K., and Heldin, C. H. (1993). Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF alpha- and beta-receptors in the peripheral nervous system: an analysis of sciatic nerve and dorsal root ganglia. *Dev Biol* 155, 459-70.
- Edelman, G. M. (1987). CAMs and Igs: cell adhesion and the evolutionary origins of immunity. *Immunol Rev* 100, 11-45.
- Faissner, A. (1987). Monoclonal antibody detects carbohydrate microheterogeneity on the murine cell adhesion molecule L1. *Neurosci Lett* 83, 327-32.
- Finne, J. (1982). Occurrence of a unique polysialosyl carbohydrate unit in glycoproteins of developing brain. *J. Biol. Chem.* 257, 11966-70.
- Finne, J., and Mäkelä, H. (1985). Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidas. *J. Biol. Chem.* 260, 1265-70.
- Floege, J., Alpers, C. E., Sage, E. H., Pritzl, P., Gordon, K., Johnson, R. J., and Couser, W. G. (1992). Markers of complement-dependent and complement-independent glomerular visceral epithelial cell injury in vivo. Expression of antiadhesive proteins and cytoskeletal changes. *Lab Invest* 67, 486-97.
- Francki, A., Bradshaw, A. D., Bassuk, J. A., Howe, C. C., Couser, W. G., and Sage, E. H. (1999). SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells. *J Biol Chem* 274, 32145-52.
- Friedlander, D. R., Grumet, M., and Edelman, G. M. (1986). Nerve growth factor enhances expression of neuron-glia cell adhesion molecule in PC12 cells. *J Cell Biol* 102, 413-9.
- Frostick, S. P., Yin, Q., and Kemp, G. J. (1998). Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 18, 397-405.

- Fu, S. Y., and Gordon, T. (1997). The Cellular and Molecular Basis of Peripheral Nerve Regeneration. *Molecular Neurobiology* 14, 67-116.
- Funakoshi, H., Frisen, J., Barbany, G., Timmusk, T., Zachrisson, O., Verge, V. M., and Persson, H. (1993). Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol* 123, 455-65.
- Gennarini, G., Rougon, G., and Goridis, C. (1990). F3: a new developmentally regulated member of the HNK-1 family. *Acta Histochem Suppl* 38, 65-9.
- Gillen, C., Gleichmann, M., Spreyer, P., and Muller, H. W. (1995). Differentially expressed genes after peripheral nerve injury. *J Neurosci Res* 42, 159-71.
- Gowda, D. C., Margolis, R. U., and Margolis, R. K. (1989). Presence of the HNK-1 epitope on poly(N-acetyllactosaminyl) oligosaccharides and identification of multiple core proteins in the chondroitin sulfate proteoglycans of brain. *Biochemistry* 28, 4468-74.
- Griffith, L. S., Schmitz, B., and Schachner, M. (1992). L2/HNK-1 carbohydrate and protein-protein interactions mediate the homophilic binding of the neural adhesion molecule P0. *J Neurosci Res* 33, 639-48.
- Grohmann, K., Wienker, T. F., Saar, K., Rudnik-Schoneborn, S., Stoltenburg-Didinger, G., Rossi, R., Novelli, G., Nurnberg, G., Pfeufer, A., Wirth, B., Reis, A., Zerres, K., and Hubner, C. (1999). Diaphragmatic spinal muscular atrophy with respiratory distress is heterogeneous, and one form is linked to chromosome 11q13-q21. *Am J Hum Genet* 65, 1459-62.
- Hall, H., Liu, L., Schachner, M., and Schmitz, B. (1993). The L2/HNK-1 carbohydrate mediates adhesion of neural cells to laminin. *Eur J Neurosci* 5, 34-42.
- Hall, H., Vorherr, T., and Schachner, M. (1995). Characterization of a 21 amino acid peptide sequence of the laminin G2 domain that is involved in HNK-1 carbohydrate binding and cell adhesion. *Glycobiology* 5, 435-41.
- Hardy, M., Reddy, U. R., and Pleasure, D. (1992). Platelet-derived growth factor and regulation of Schwann cell proliferation in vivo. *J Neurosci Res* 31, 254-62.
- Hartmann, D., Fehr, S., Meyerhoff, W., and Richter, D. (1995). Distribution of somatostatin receptor subtype 1 mRNA in the developing cerebral hemispheres of the rat. *Dev. Neurosci.* 17, 246-255.
- Hayward, A. L., Oefner, P. J., Sabatini, S., Kainer, D. B., Hinojos, C. A., and Doris, P. A. (1998). Modeling and analysis of competitive RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 26, 2511-8.
- Jessen, R., and Jessen, K. R. (1990). Schwann cell development and the regulation of myelination. *Seminars in the Neurosciences* 2, 423-435.
- Kauppila, T., Jyvasjarvi, E., Huopaniemi, T., Hujanen, E., and Liesi, P. (1993). A laminin graft replaces neurotrophic support in the restorative surgery of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 123, 181-91.
- Kemler, R. (1992). Classical cadherins. *Semin Cell Biol* 3, 149-55.
- Kingsley, D. M. (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8, 133-46.
- Kleitman, N., Simon, D. K., Schachner, M., and Bunge, R. P. (1988). Growth of embryonic retinal neurites elicited by contact with Schwann cell surfaces is blocked by antibodies to L1. *Exp Neurol* 102, 298-306.
- Korsching, S. (1993). The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 13, 2739-48.
- Kozak, M. (1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mammalian Genome* 7, 563-574.
- Kreiger, N., Kelsey, J., Harris, C., and Pastides, H. (1981). Injuries to the upper extremity: patterns of occurrence. *Clin. Plas. Surg.* 8, 13-19.

- Kruse, J., Keilhauer, G., Faissner, A., Timpl, R., and Schachner, M. (1985). The J1 glycoprotein--a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature* *316*, 146-8.
- Kruse, J., Mailhammer, R., Wernecke, H., Faissner, A., Sommer, I., Goridis, C., and Schachner, M. (1984). Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature* *311*, 153-5.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Science* *227*, 680-685.
- Lallier, T., and Bronner-Fraser, M. (1991). Avian neural crest cell attachment to laminin: involvement of divalent cation dependent and independent integrins. *Development* *113*, 1069-84.
- Langley, J. N., and Anderson, a. H. K. (1904). The union of different types of nerve fibres. *J.Physiol.* *31*, 365-391.
- Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Buret, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., and et al. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy- determining gene. *Cell* *80*, 155-65.
- Liang, P., and Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* *257*, 967-71.
- Lindsay, R. M., Wiegand, S. J., Altar, C. A., and DiStefano, P. S. (1994). Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci* *17*, 182-90.
- Liu, Q., and Dreyfuss, G. (1996). A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J* *15*, 3555-65.
- Liu, Q., Fischer, U., Wang, F., and Dreyfuss, G. (1997). The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* *90*, 1013-21.
- Livesey, F. J., and Hunt, S. P. (1996). Identifying changes in gene expression in the nervous system: mRNA differential display. *Trends Neurosci* *19*, 84-8.
- Livingston, B. D., Jacobs, J. L., Glick, M. C., and Troy, F. A. (1988). Extended polysialic acid chains (n>55) in glycoproteins from human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* *263*, 9443-48.
- Lobsiger, C. S., Schweitzer, B., Taylor, V., and Suter, U. (2000). Platelet-derived growth factor-BB supports the survival of cultured rat Schwann cell precursors in synergy with neurotrophin-3. *Glia* *30*, 290-300.
- Low, K., Orberger, G., Schmitz, B., Martini, R., and Schachner, M. (1994). The L2/HNK-1 carbohydrate is carried by the myelin associated glycoprotein and sulphated glucuronyl glycolipids in muscle but not cutaneous nerves of adult mice. *Eur J Neurosci* *6*, 1773-81.
- Martini, R. (1994). Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* *23*, 1-28.
- Martini, R., Bollensen, E., and Schachner, M. (1988). Immunocytological localization of the major peripheral nervous system glycoprotein P0 and the L2/HNK-1 and L3 carbohydrate structures in developing and adult mouse sciatic nerve. *Dev Biol* *129*, 330-8.
- Martini, R., and Schachner, M. (1988). Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* *106*, 1735-46.
- Martini, R., Schachner, M., and Brushart, T. M. (1994). The L2/HNK-1 carbohydrate is preferentially expressed by previously motor axon-associated Schwann cells in reinnervated peripheral nerves. *J Neurosci* *14*, 7180-91.

- Martini, R., Schachner, M., and Faissner, A. (1990). Enhanced expression of the extracellular matrix molecule J1/tenascin in the regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Neurocytol* *19*, 601-16.
- Mason, I. J., Taylor, A., Williams, J. G., Sage, H., and Hogan, B. L. (1986). Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell 'culture shock' glycoprotein of Mr 43,000. *Embo J* *5*, 1465-72.
- McGarry, R. C., Helfand, S. L., Quarles, R. H., and Roder, J. C. (1983). Recognition of myelin-associated glycoprotein by the monoclonal antibody HNK-1. *Nature* *306*, 376-8.
- Mendis, D. B., and Brown, I. R. (1994). Expression of the gene encoding the extracellular matrix glycoprotein SPARC in the developing and adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* *24*, 11-9.
- Miragall, F., Kadmon, G., and Schachner, M. (1989). Expression of L1 and N-CAM cell adhesion molecules during development of the mouse olfactory system. *Dev Biol* *135*, 272-86.
- Mohan, P. S., Chou, D. K., and Jungalwala, F. B. (1990). Sulfoglucuronyl glycolipids bind laminin. *J Neurochem* *54*, 2024-31.
- Monani, U. R., McPherson, J. D., and Burghes, A. H. (1999). Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim Biophys Acta* *1445*, 330-6.
- Motamed, K. (1999). SPARC (osteonectin/BM-40). *Int J Biochem Cell Biol* *31*, 1363-6.
- Nelis, E., Haites, N., and Van Broeckhoven, C. (1999). Mutations in the peripheral myelin genes and associated genes in inherited peripheral neuropathies. *Hum Mutat* *13*, 11-28.
- Neugebauer, K. M., Tomaselli, K. J., Lilien, J., and Reichardt, L. F. (1988). N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. *J Cell Biol* *107*, 1177-87.
- Paul, J. A., and Gregson, N. A. (1992). An immunohistochemical study of phospholipase A2 in peripheral nerve during Wallerian degeneration. *J Neuroimmunol* *39*, 31-47.
- Pesheva, P., Horwitz, A. F., and Schachner, M. (1987). Integrin, the cell surface receptor for fibronectin and laminin, expresses the L2/HNK-1 and L3 carbohydrate structures shared by adhesion molecules. *Neurosci Lett* *83*, 303-6.
- Peters, D. G., Kassam, A. B., Yonas, H., O'Hare, E. H., Ferrell, R. E., and Brufsky, A. M. (1999). Comprehensive transcript analysis in small quantities of mRNA by SAGE- lite. *Nucleic Acids Res* *27*, e39.
- Reed, M. J., Vernon, R. B., Abrass, I. B., and Sage, E. H. (1994). TGF-beta 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *J Cell Physiol* *158*, 169-79.
- Ridley, A. J., Davis, J. B., Stroobant, P., and Land, H. (1989). Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol* *109*, 3419-24.
- Rodriguez, P., Munroe, D., Prawitt, D., Chu, L. L., Bric, E., Kim, J., Reid, L. H., Davies, C., Nakagama, H., Loebbert, R., Winterpacht, A., Petrucci, M. J., Higgins, M. J., Nowak, N., Evans, G., Shows, T., Weissman, B. E., Zabel, B., Housman, D. E., and Pelletier, J. (1997). Functional characterization of human nucleosome assembly protein-2 (NAP1L4) suggests a role as a histone chaperone. *Genomics* *44*, 253-65.
- Rodriguez, P., Pelletier, J., Price, G. B., and Zannis-Hadjopoulos, M. (2000). NAP-2: histone chaperone function and phosphorylation state through the cell cycle. *J Mol Biol* *298*, 225-38.
- Sage, E. H., and Bornstein, P. (1991). Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem* *266*, 14831-4.
- Santos, P. M., Winterowd, J. G., Allen, G. G., Bothwell, M. A., and Rubel, E. W. (1991). Nerve growth factor: increased angiogenesis without improved nerve regeneration. *Otolaryngol Head Neck Surg* *105*, 12-25.

- Schachner, M., and Martini, R. (1995). Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci* 18, 183-91.
- Schachner, M., Martini, R., Hall, H., and Orberger, G. (1995). Functions of the L2/HNK-1 carbohydrate in the nervous system. *Prog Brain Res* 105, 183-8.
- Schafer, M., Fruttiger, M., Montag, D., Schachner, M., and Martini, R. (1996). Disruption of the gene for the myelin-associated glycoprotein improves axonal regrowth along myelin in C57BL/Wlds mice. *Neuron* 16, 1107-13.
- Schlaepfer, W. W. (1974). Calcium-induced degeneration of axoplasm in isolated segments of rat peripheral nerve. *Brain Res* 69, 203-15.
- Schrank, B., Götz, R., Gunnensen, J. M., Ure, J. M., Toyka, K. V., Smith, A. G., and Sendtner, M. (1997). Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9920-9925.
- Schwarzbauer, J. E., and Spencer, C. S. (1993). The *Caenorhabditis elegans* homologue of the extracellular calcium binding protein SPARC/osteonectin affects nematode body morphology and mobility. *Mol Biol Cell* 4, 941-52.
- Seilheimer, B., and Schachner, M. (1987). Regulation of neural cell adhesion molecule expression on cultured mouse Schwann cells by nerve growth factor. *Embo J* 6, 1611-6.
- Seilheimer, B., and Schachner, M. (1988). Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 in mediating sensory neuron growth on Schwann cells in culture. *J Cell Biol* 107, 341-51.
- Shibuya, Y., Mizoguchi, A., Takeichi, M., Shimada, K., and Ide, C. (1995). Localization of N-cadherin in the normal and regenerating nerve fibers of the chicken peripheral nervous system. *Neuroscience* 67, 253-61.
- Siebert, P. D., and Larrick, J. W. (1992). Competitive PCR. *Nature* 359, 557-8.
- Snipes, G. J., and Suter, U. (1995). Molecular anatomy and genetics of myelin proteins in the peripheral nervous system. *J Anat* 186, 483-94.
- Spector, J. G., Lee, P., Derby, A., Friedrich, G. E., Neises, G., and Roufa, D. G. (1993). Rabbit facial nerve regeneration in NGF-containing silastic tubes. *Laryngoscope* 103, 548-58.
- Stoll, G., and Muller, H. W. (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 9, 313-25.
- Stoll, L., Fleckenstein, P., Riemann, D., and Muller, W. E. (1989). A simple but highly sensitive radioreceptor assay for the determination of scopolamine and biperiden in human plasma. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 64, 59-68.
- Suter, U., and Snipes, G. J. (1995). Biology and genetics of hereditary motor and sensory neuropathies. *Annu Rev Neurosci* 18, 45-75.
- Taniuchi, M., Clark, H. B., Schweitzer, J. B., and Johnson, E. M., Jr. (1988). Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *J Neurosci* 8, 664-81.
- Tedder, T. F., Streuli, M., Schlossman, S. F., and Saito, H. (1988). Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 208-12.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484-7.

- von der Kammer, H., Albrecht, C., Mayhaus, M., Hoffmann, B., Stanke, G., and Nitsch, R. M. (1999). Identification of genes regulated by muscarinic acetylcholine receptors: application of an improved and statistically comprehensive mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res* 27, 2211-8.
- Voshol, H., van Zuylen, C. W., Orberger, G., Vliegthart, J. F., and Schachner, M. (1996). Structure of the HNK-1 carbohydrate epitope on bovine peripheral myelin glycoprotein P0. *J Biol Chem* 271, 22957-60.
- Wan, J. S., Sharp, S. J., Poirier, G. M., Wagaman, P. C., Chambers, J., Pyati, J., Hom, Y. L., Galindo, J. E., Huvar, A., Peterson, P. A., Jackson, M. R., and Erlander, M. G. (1996). Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat Biotechnol* 14, 1685-91.
- Weinmaster, G., and Lemke, G. (1990). Cell-specific cyclic AMP-mediated induction of the PDGF receptor. *Embo J* 9, 915-20.
- Wrana, J. L., Overall, C. M., and Sodek, J. (1991). Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor beta. Comparison of transcriptional and post-transcriptional control with fibronectin and type I collagen. *Eur J Biochem* 197, 519-28.
- Yan, Q., and Sage, E. H. (1999). SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 47, 1495-506.
- Yan, Q., Sage, E. H., and Hendrickson, A. E. (1998). SPARC is expressed by ganglion cells and astrocytes in bovine retina. *J Histochem Cytochem* 46, 3-10.
- Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276, 1268-72.
- Zhang, Y., Campbell, G., Anderson, P. N., Martini, R., Schachner, M., and Lieberman, A. R. (1995). Molecular basis of interactions between regenerating adult rat thalamic axons and Schwann cells in peripheral nerve grafts I. Neural cell adhesion molecules. *J Comp Neurol* 361, 193-209.
- Zhou, H. Y., Salih, E., and Glimcher, M. J. (1998). Isolation of a novel bone glycosylated phosphoprotein with disulphide cross-links to osteonectin. *Biochem J* 330, 1423-31.
- Zimmermann, K., and Mannhalter, J. W. (1996). Technical aspects of quantitative competitive PCR. *Biotechniques* 21, 268-72, 274-9.
- Zuber, M. X., Goodman, D. W., Karns, L. R., and Fishman, M. C. (1989). The neuronal growth-associated protein GAP-43 induces filopodia in non-neuronal cells. *Science* 224, 1193-1195.

Abkürzungen

aa	Aminosäuren
APS	Ammoniumpersulfatlösung (10% w/v, H ₂ O)
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
cM	centi Morgan
CMT	Charcot-Marie-Tooth (Neuropathie)
DD	Differential Display
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
GAP-43	<i>growth associated protein 43</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HNK-1	Kohlenhydratepitop (3'-sulfatierte Glucuronsäure an einem Lactosaminylrest) (<i>human natural killer cell</i>)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich -Peroxidase)
kb	Kilobasen
MAG	<i>myelin associated glycoprotein</i>
MPBS	Magermilchpulver in Phosphatpuffer
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMR	<i>preferential motor reinnervation</i>
PNS	peripheres Nervensystem
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RT	reverse Transkription
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SMA	Spinale Muskel Atrophie
SMARD	<i>spinal muscular atrophy with respiratory distress</i>
SPARC	<i>secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
SSH	<i>suppression subtractive hybridization</i>
STS	<i>sequenced tagged sites</i>
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Sequenzen der bovinen cDNA-Fragmente (DD):

>A4-2

CACTTAGCTTGACTTTGAGAAGACTCTATTATTTTCTTTCCTCTACCTA
TGGGGCCAGTCG

>NA3-1

CTTTTCAGTTGCCCTTTTCACAAGGGAAGTGGTTTATTAAAGGTGGAGGA
TGCTGGAGATAGTGTTAGG

>A3-1

GAACTAAATTTTTCACAAAATTGCTGCTGCTGCTAAGTTACTTCAATCGT
GTCCGACTCTGTGT

>A3-2

AACAGGTGAGCTACCTGCAGGAGAGTGTATAGTGTTTTGTAAATAAATGG
GTGATACCGATATGT

>G3-1

CTAAATCAGTACTTTTTATTTTGAAGATTTGTCAAACCTTTCACACCG
TGGCAAGAGTTTGCATGATTAATAAGATGCAGCTTTTTCATGAAATGCT
TGGAGGTGAACGAGTTCTCAGCCTGTGAGATCCGACCATCCCATTGATT
TTGAAATTTCTTTTGATTAATAGAAAAGAAAAGTGGGGAGGGGAGAAGA
GGAGGAACATGCTAGCGACTGAAAGATCTCTGGTGACAGCCATCCAGAT
GTGGA

>G3-2

ACCAGATTCCTGCTGCCAACCTTGATGCAGATGATCCACTAACAGATGA
GGAAGATGAAGATGAAGATTTTGAAGAGGAGAGTGTATGATGACGATACT
GCAGCTCTTCTTGCCGAGCTGGAAAAAATTAAGAAAGAAAGAGCTGAA
GAGCAGGCCAGGAAGGAACAAGAACAAGAGGCTGAAGAAGAAAGGATGC
CCCTGAAGAGGTTTCGAAACCGTGACTTCAGGAGAGAGTTGGAGGAGAGA
GAGAGAGCTGCTGCAAGAGAAAAA

>G3-3

TAAGTAAATAACAGAAGGAGGTGATAAGGAAACAATACAACAATTGCTG
TTACCAGAGGGTGGGGTACTTGCCTTGGGTTAGCTCTAAGATTCTATGG
CTTATTATAGATATTGACCTCTGAACCTCGTGAACCTCTGATCACGAGTT
GATTATCTGATCGTCCAGGAAATTTCCACCAGAGGGCAGTGTGTTAGATT
TGAGCTAAAAGGAAGCTCAAAAAGGAGGGATGCAGGCGGGATAGAAGGG
AAAAACAGAAATGGAAAAA

>NG4-1

ATGTCATAGGGTCACAAGATTAGCTTCAAACCTTGTGAATAACATAAA
ACTTGTGCTTATGGCATTAGTACCTTTGAATATTGGCTTTGAAAATCT
CAGATACCCCATTTCTGACAATCTCAAATTTTTTCTCTTTCAGTCACTA
TCCCGGAAAAA

Sequenz der m1-cDNA (human):

```
>m1
CGGCACGAGGTGGTAATGGCGTCTGTATGATCTTCGGAGCCTGCTGCATC
GGACCTCGGCCAGTCATAAAAGATGACAACAGCAGCCAGGCCAACCTTTG
AACCTGCCAGAGGTGGAAGGGGAAAAGGAGAAGGTGATTTGAGCCAACTT
TCAAAGCAGTATTCAAGCAGAGACCTACCCCTCATACAAAGATAAAAATA
CAGACAGACTACTCAGGATGCCCTGAAGAGGTTTCGTAACCGTGACTTCA
GGAGAGAGTTGGAAGAAAGAGAGAGAGCTGCTGCAAGAGAGAAAAATAGG
GATCGTCCAACCCGAGAACATACAACCTCCTCTTCAGTGTCAAAAAAGCC
ACGTTAGACCAGATTCCCTGCCGCAACCTTGATGCAGATGACCCTCTAA
CAGATGAGGAAGATGAAGATTTTGAAGAAGAAAGTGATGATGATGATACT
GCAGCTCTTCTTGCAAGACTGGAAAAAATTAAAAAAGAAAGAGCTGAAGA
GCAGGCCAGGAAGGAACAAGAACAAGCTGAAGAAGAGAGGATTCGTA
TGAAAAACATTTCTGAGCGGAAACCCCTCCTTAATCTCACTGGCCCATCC
CAGCCTCAGGCCAACTTCAAAGTTAAAAGAAGGTGGGATGATGACGTTGT
CTTCAAGAACTGTGCAAAAAGGTGTAGATGACCAGAAGAAAGACAAAAGAT
TTGTAATGACACACTGCGATCTGAATTTACAAAAAGTTCATGGAGAAA
TATATTAATAGTACAGTTTTATGTGCTTAATTAAGACTGTAAAACGTA
AAGGATCAAAAAAAAA
```

Sequenz des m1-Proteins (human):

```
>m1
MTTAARPTFEPARGGRGKGEGLSQLSKQYSSRDLPSTKIKYRQTTQDA
PEEVRNRDFRRELEERERAAAREKNRDRPTREHTTSSSVSKKPRLDQIPA
ANLDADDPLTDEEDEDFFEEESDDDDTAALLAELEKIKKERAEEQARKEQE
QKAEERIRMENILSGNPLLNLTGPSQPQANFKVRRRWDDDVVFNCAKG
VDDQKKDKRFVNDTLRSEFHKKFMEKYIK
```

Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. M. Schachner am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg und Herrn Prof. Dr. T. H. Scheper am Institut für Technische Chemie an der Universität Hannover für die Begutachtung meiner Dissertation.

Frau Prof. Dr. M. Schachner danke ich für die Überlassung des Themas und die hervorragenden Bedingungen, die ich in Ihren Laboren zur Verfügung hatte. Ich bedanke mich für die vielfältigen Möglichkeiten zur Weiterbildung in Ihrem Institut und für die nationalen sowie internationalen Kooperationen mit Wissenschaftlern. Vielen Dank für Ihre stete Diskussionsbereitschaft und wertvollen Anregungen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Martini (Universität Würzburg) und Herrn Dr. Z. Xiao (University Singapore) für die stete Hilfsbereitschaft danken. Herrn Dr. Tom Brushart (Johns Hopkins University, Baltimore) danke ich für Operationen der Tiere. Meinen besonderen Dank möchte ich Dr. Christian Kubisch (Universität Bonn) aussprechen, der mir so oft mit seinen Tipps und Ideen bei Problemen mit der PCR, bei Datenbankrecherchen und den genetischen Fragestellungen zur Seite gestanden und geholfen hat und immer ein ermunterndes Wort übrig hatte. Herrn Prof. Dr. C. Hübner (Universität Berlin), Herrn Prof. Dr. K. Zerres (Technische Universität Aachen) und Frau Dr. A. Gabreels-Festen (University Nijmegen) danke ich für die Patienten-DNA. Den Mitarbeitern der Firma LION Bioscience AG Dr. Ralf Löbber, Patrick Jelitto und Dr. Ute Wirkner (EMBL) danke ich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit. Weiterhin bedanke ich mich für die Hilfe bei den *in-situ*-Hybridisierungen bei Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Dr. Susanne Fehr. Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. R. Nitsch danke ich für die Hilfe beim Differential Display. Dr. Thomas Tilling, Dr. Frank Plöger, Dr. Astrid Rollenhagen, Dr. Udo Bartsch und Dr. Michael Kutsche möchte ich für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft danken. Dr. Catherina und Dr. Thomas Becker danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch meinen Laborkollegen Matthias Evers und Dimitri Gimnopoulos und –kolleginnen Maren von der Ohe, Annette Rünker und Claudia Senn durch deren freundschaftliche Zusammenarbeit mir die vergangenen Jahre viel Freude bereitet haben. Ebenso bedanke ich mich bei Achim Dahlmann, Peggy Putthoff und Birte Rossoll und allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schachner.

Ich danke herzlich all meinen Freundinnen und Freunden die mich privat immer unterstützt haben.

Mein größter Dank geht an meine Eltern und Geschwister, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.

Teşekkür ederim!

Lebenslauf

Meliha Karsak geboren am 19.04.1971 in Neustadt a. Rbge

<i>Schulausbildung</i>	1977 - 1981	Stadtschule in Wunstorf
	1981 - 1983	Orientierungsstufe-Nord in Wunstorf
	1983 - 1987	Scharnhorst-Realschule in Wunstorf
	1987 - 1990	Hölty-Gymnasium in Wunstorf
<i>Studium</i>	1990 - 1996	Grund-und Hauptstudium Chemie-Dipl. Universität Hannover
	06.1996	Diplomprüfungen
	06.1996 - 01.1997	Diplomarbeit am Institut für Toxikologie Medizinische Hochschule Hannover bei Herrn Prof. Dr. H.H. Wellhöner <i>Thema:</i> Aktivierung des ACE-Hemmers Captopril mit SMCC für die Herstellung von Peptid- und Proteinkonjugaten
<i>Dissertation</i>	05.1997 - 2000	Doktorarbeit im Institut für Biosynthese neuraler Strukturen Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg bei Frau Prof. Dr. Melitta Schachner <i>Thema:</i> Untersuchung der differentiellen Genexpression in motorischen und sensorischen Nervenästen des peripheren Nervensystems
<i>Aufbaustudium</i>	10.1997 – 11.2000	Aufbaustudiengang Molekularbiologie Universität Hamburg