

Aus dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. R. Meyermann

Differentielle Expression des
Early Growth Response Gene Egr1 und
frühe Aktivierung der Mikroglia nach ionisierender Bestrahlung
im Zentralen Nervensystem der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Henning Vollmann
aus
Schwäbisch Hall

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Meyermann

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Wick

für Aglaia

Inhaltsverzeichnis

1. Vorwort	6
2. Einleitung	7
2.1 Bestrahlung	7
2.1.1 Vorkommen und Bedeutung	7
2.1.2 Pathomechanismus	7
2.1.3 Strahlenschäden	8
2.2 Immediate Early Genes	10
2.2.1 Vorkommen und Bedeutung	10
2.2.2 Die EGR- Familie	11
2.3 Egr1 - ein Transkriptionsfaktor	12
2.3.1 Vorkommen und Bedeutung	12
2.3.2 Das Egr1 - Gen	13
2.3.3 Egr1 - mRNA Varianten	13
2.3.4 Egr1 - Protein	14
2.3.5 Funktionen von Egr1	15
2.3.6 Posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen	16
2.3.7 Basale Expression von Egr1 im ZNS der Ratte	18
2.3.8 Egr1 und Pathways nach Bestrahlung	19
2.3.9 Therapeutische Optionen von Egr1	22
2.4 Mikroglia	23
2.4.1 Vorkommen und Bedeutung	23
2.4.2 Funktionen der Mikroglia	23
2.4.3 Phenotypische Veränderungen der Mikroglia	25
2.4.4 Mikroglia und Bestrahlung	26
2.5 Zielsetzungen	27
3. Material und Methodik	30
3.1 Versuchsaufbau	30
3.1.1 Studiendesign	30
3.1.2 Versuchstiere und Haltung	31
3.1.3 Anästhesie	32
3.1.4 Bestrahlung	32
3.1.5 Dekapitation und Präparation	33
3.2 Immunhistochemie	35
3.2.1 Fixierung und Vorbehandlung	35
3.2.2 Antikörper	36
3.2.3 ABC - Färbeprotokoll	38
3.2.4 Doppelfärbeprotokoll mit Daco EnVision Doublestaining Kit	39
3.2.5 Stammlösungen	40
3.3 Mikroskopie	40
3.3.1 Regionen	41
3.3.2 Zählmethode	42
3.3.3 Kategorien und Entitätenbildung	43
3.4 Statistische Verfahren	44

3.5	Western blot Analysen	46
3.5.1	Proteinisolierung	46
3.5.2	Gelherstellung	47
3.5.3	Probenaufbereitung	48
3.5.4	Zellfraktionierung	48
3.5.5	Photometrische Proteinbestimmung	50
3.5.6	SDS-Gelelektrophorese	51
3.5.7	Immunoblotting	51
3.5.8	Puffer und Arbeitslösungen	53
4.	Ergebnisse	55
4.1	Immunhistochemie	55
4.1.1	Auswahl der Primärantikörper	55
4.1.2	Expression von Egr1 im Normalhirn der Ratte	57
4.1.3	Expression von CD68 im Normalhirn der Ratte	58
4.1.4	Allgemeine Effekte der Anästhesie und Bestrahlung auf die Expression von Egr1 und die Aktivierung von Mikroglia / Makrophagen im ZNS ...	59
4.1.5	Spezielle Effekte der Bestrahlung auf die Expression von Egr1 in glialen Zellen und die Aktivierung von Mikroglia in verschiedenen Hirnregionen	61
4.1.6	Doppelfärbungen	68
4.2	Western blot Analysen	69
5.	Diskussion	71
5.1	Egr1 und seine Verteilung im Normalhirn	72
5.1.1	Subzelluläre Lokalisation von Egr1	72
5.1.2	Egr1 als Aktivitätsmarker	73
5.2	Egr1 und Veränderungen durch Bestrahlung	75
5.2.1	Gliale Zellen reagieren auf Bestrahlung	75
5.2.2	Zeitlicher Verlauf der subzellulären Lokalisation von Egr1 in glialen Zellen	76
5.2.3	Die beiden subzellulären Lokalisationen von Egr1 in glialen Zellen entsprechen einer negative Korrelation	76
5.2.4	Egr1 im Zusammenhang mit Proliferation und Apoptose	77
5.2.5	Hinweise auf eine differentielle Expression von Egr1 im Hippokampus nach Bestrahlung	79
5.3	Frühe Aktivierung von Mikroglia / Makrophagen im bestrahlten ZNS	80
5.4	Sequenz der frühen Reaktionen nach Bestrahlung	82
5.5	Liegt Egr1 als Dimer vor ?	83
5.6	Schlussfolgerungen	85
6.	Zusammenfassung	87
7.	Abbildungen	89
8.	Tabellen	105
9.	Abkürzungen	107
10.	Literaturverzeichnis	109
11.	Danksagung	114
12.	Lebenslauf	115

1. Vorwort

Die vorliegende Dissertation ist Teil einer Gemeinschaftsarbeit, welche die Untersuchung bestrahlungsinduzierter Veränderungen im ZNS von Ratten zum Ziel hatte. Hierfür wurden frühe Veränderungen der Expression des *Immediate Early Genes* und Transkriptionsfaktors *Egr1 (Early Growth Response Gene 1)* und eine mögliche Mitbeteiligung der Mikroglia / Makrophagen als Antwort auf Bestrahlung näher betrachtet.

Die unterschiedlichen Arbeitsansätze, die für diese Studie verwendet wurden, waren einerseits molekularbiologische Untersuchungen von Transkriptionsprodukten, also von mRNA, die in Zusammenhang mit *Egr1* und Markern für Mikroglia standen. Dafür wurde die Methode der quantitativen real-time RT-PCR verwendet. Dieser Teil der Arbeit wurde von Frau Sarah Wölfel durchgeführt und in ihrer Dissertation „*Frühe transkriptionelle Veränderungen der mRNA-Varianten des Early Growth Response Genes egr1 sowie des endothelialen Monozytenaktivierungspeptids emap II nach ionisierender Bestrahlung im Zentralen Nervensystem der Ratte*“ präsentiert.

Der hier vorgestellte Anteil der Gemeinschaftsarbeit stellt die Untersuchung der Translationsprodukte dar, und ist also auf die Proteinebene beschränkt. Dieses beinhaltete die Anwendung von Immunhistochemie und Western blot Analysen von unterschiedlichen Regionen, bzw. Geweben aus den Gehirnen von Ratten. Dieser gesonderte Teil wurde von mir selbständig durchgeführt.

Der gemeinschaftliche Anteil der Arbeit enthält vor allen Dingen die Behandlung der Tiere im Tierversuch und die Entnahme der Organe. Die Aufarbeitung und Isolierung der Gewebeproben verliefen anschließend wieder auf getrennten Wegen. Außerdem profitierte diese Gemeinschaftsarbeit von dem Konzept, ein möglichst umfassendes Bild der zu untersuchenden Vorgänge zu liefern. Es wurden somit auf allen relevanten Ebenen Informationen gesammelt, die zu einem späteren Zeitpunkt ausgetauscht und in einem gemeinschaftlichen Kontext zusammengefasst werden konnten. Aus diesem Grund enthält der Diskussionsteil der vorliegenden Dissertation auch Aspekte aus dem molekularbiologischen Teil der Gemeinschaftsarbeit.

2. Einleitung

2.1 Bestrahlung

2.1.1 Vorkommen und Bedeutung

Bestrahlung von Tumoren ist eine seit langem etablierte Therapieoption, die gerade bei Hirntumoren sehr häufig eingesetzt wird. Ungefähr 40% aller Tumorpatienten erhalten in ihrem Krankheitsverlauf eine Form der Bestrahlung (Mackillop et al 1997). Die Behandlung kann sich dabei auf ein Zielgebiet beschränken, bzw. stereotaktisch durchgeführt werden, oder den gesamten Kopf einschließen. Vor allem bei Gliomen stellt die Bestrahlung eine sinnvolle Zusatzbehandlung dar, die das Überleben der Patienten signifikant steigert. Beispielsweise kann bei Oligodendrogliomen eine zusätzliche Radiotherapie nach durchgeführter Operation die Prognose deutlich bessern bzw. eine Heilung herbeiführen.

2.1.2 Pathomechanismus

Zell- und Gewebsschädigungen bei Bestrahlung resultieren aus einem Energietransfer beim Durchtritt der Strahlung. Ionisierende Strahlung führt dabei zu einer Störung der Teilungsfähigkeit und damit zu einer Hemmung der Zellproliferation – ein Effekt der bei der Behandlung von Tumoren angestrebt wird. Gewebe mit einem hohen Zellumsatz sind gegenüber Strahlenbehandlung besonders empfindlich, während Gewebe mit geringeren Proliferationsraten entsprechend weniger davon betroffen sind. Direkter Angriffspunkt der Strahlentherapie ist das Genom, wobei es vor allem zu Einzelstrangbrüchen der DNA, zu Veränderungen der Basenpaare (z.B. zur Bildung von Thyminindimeren) und ebenso zu Querverbindungen innerhalb und zwischen DNA-Strängen kommt. Seltener ist dabei eine komplette Durchtrennung beider Stränge zu erwarten.

Obwohl Zellen imstande sind, die meisten Schädigungen der DNA mit Hilfe des komplementären Strangs zu korrigieren, kann es doch zu irreparablen chromosomalen Schädigungen führen, die das Überleben von Zellen verhindern. Weitere Faktoren, die

dabei eine wichtige Rolle spielen, sind das Sauerstoffangebot an die betroffenen Zellen und Veränderungen des Gefäßsystems (van der Kogel 1986).

Neben den bereits beschriebenen direkten Veränderungen am Erbgut durch Strahlenenergie treten auch indirekte Schädigungen auf, die vor allem durch die Entstehung von reaktionsfähigen Sauerstoffradikalen (*Reactive Oxygen Intermediates, ROI*) vermittelt werden (Valko et al 2004). Die wichtigste Quelle von reaktionsfähigen Sauerstoffspezies ist elementarer Sauerstoff, der durch Reduktion in ein Superoxidradikal umgewandelt wird. Diese Umwandlung kann durch physikalische Energie (UV-, Röntgen oder ionisierende Strahlung), chemische Noxen und in einem weit geringeren Ausmaß auch durch physiologische Stoffwechselprozesse innerhalb der Zelle zustande kommen. Diese durch die Strahlung entstandenen freien Radikale führen im Sinne oxidativen Stresses unter anderem zu einer Inaktivierung von Enzymen, Veränderungen der Basenpaare und des Zuckergrundgerüsts der DNA und einer Labilisierung von Lipidmembranen.

Ist die Strahlenschädigung größer als die zellulären Reparaturmechanismen bewältigen können, gehen Zellen unter normalen Verhältnissen in den Vorgang der Apoptose, bzw. den „programmierten Zelltod“ über (Li et al 1996). Dies beinhaltet den Eintritt in eine festgelegte Kaskade der Zellauflösung, die ATP-abhängig ist. Zu den morphologischen Veränderungen gehören die Schrumpfung des Zellkerns, Zerfall der Plasmamembranen in Vesikel und letztlich die Auflösung, bzw. Phagozytose der Zelle. Abhängig vom Ausmaß des Schadens können Zellen auch mit Nekrose oder aber Mutation und Entartung reagieren.

2.1.3 Strahlenschäden

Reaktionen des ZNS auf Bestrahlung lassen sich nach ihrer zeitlichen Abfolge in drei Phasen einteilen: In der akuten Phase entwickeln sich klinisch innerhalb von Tagen bis Wochen Kopfschmerzen, Übelkeit / Erbrechen und neurologische Symptome im Sinne einer Hirndrucksteigerung durch ein reversibles Hirnödem. Histologisch lassen sich meist unspezifische gliale Zellveränderungen und diskrete entzündliche Infiltrate um Gefäße feststellen. In der frühen Spätphase (Wochen bis Monate nach Bestrahlung) kann es zu meist reversiblen Enzephalo- und Myelopathien kommen, die sich in Form einer

multifokalen Demyelinierung darstellen. Klinisch können vermehrte Somnolenz, Schwindel, Übelkeit und Abgeschlagenheit beobachtet werden.

Spätfolgen, die sich nach mehreren Monaten bis Jahren manifestieren, können abhängig von der erhaltenen Dosis und deren Fraktionierung zu ausgedehnten Strahlennekrosen, irreversibler Leukenzephalopathie und einer relevanten Gehirnatrophie führen. Dieser Prozess ist klinisch in vielen Fällen von einem irreparablen kognitiven Verfall gezeichnet (Surma-aho et al 2001), wobei die morphologischen Veränderungen dabei auch weitaus geringer ausgeprägt sein können. Gerade die kraniale Bestrahlung von Kindern mit Hirntumoren oder Leukämien zeigt im zeitlichen Verlauf diese Tendenz besonders deutlich (Roman & Sperduto 1995). Die wichtigsten Defizite werden durch Funktionen repräsentiert, die mit Lernen, Gedächtnis und der Verarbeitung von räumlichen Inhalten verbunden sind. Sicherlich spielen in diesem Zusammenhang eine Beeinträchtigung von adulten neuronalen Stammzellen, wie sie im Hippokampus zu finden sind, eine wesentliche Rolle. In Antwort auf Bestrahlung sind vor kurzem durch Monje et al. die Aktivierung von Mikroglia und Veränderungen in der Mikroumgebung von Gefäßen beschrieben worden, die für die korrekte Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen im Hippokampus eine Schlüsselrolle spielen (Monje et al 2002).

Aus Untersuchungen aus dem Jahr 1995 ist bekannt, dass mit Schädigungen der Blut-Hirnschranke nach ionisierender Bestrahlung durch Beeinträchtigung der *Tight Junctions* mit einem zeitlichen Verzug von ungefähr drei Monaten nach einmaliger Bestrahlung im Rückenmark von Ratten zu rechnen ist (Stewart et al 1995).

Ein verstärkter Zelluntergang in bestimmten Neuronen, Oligodendrozyten und ependymalen Zellen (Chow et al 2000, Shinohara et al 1997) sowie die Aktivierung von Astrozyten (Hwang et al 2005) in Antwort auf ionisierende Strahlung wurden bisher schon mehrfach beschrieben. Als besonders strahlensensibel gelten in diesem Zusammenhang Oligodendrozyten, die wenige Stunden nach Exposition mit einer erhöhten Apoptoserate reagieren (Kurita et al 2001, Li et al 1996).

Während viele von diesen Ereignissen höchstwahrscheinlich direkt an zytotoxische Effekte gekoppelt sind, die eine kritische quantitative Schwelle überschreiten müssen, ist relativ wenig über die molekularen *Pathways* bekannt, die zu langfristigen Veränderungen im ZNS von Patienten mit therapeutischen Bestrahlungen führen. Weiterhin ist bisher offen, ob es einen molekularen *Pathway* gibt, der direkt durch die

Bestrahlung verursacht wird und der möglicherweise verantwortlich für die Einleitung von länger andauernden entzündungsähnlichen Reaktionen ist. Ob wiederum diese durch Aktivierung von Mikroglia oder andere zelluläre Antworten im ZNS stattfinden und dabei unabhängig von direkten zytotoxischen Effekten der Bestrahlung sind, stellt sicherlich eine interessante Fragestellung dar.

2.2 Immediate Early Genes

2.2.1 Vorkommen und Bedeutung

Signaltransduktionen innerhalb oder zwischen Zellen werden durch Kaskaden von Regulatorproteinen gewährleistet, die beispielweise die Funktion von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Kinasen oder Transkriptionsfaktoren innehaben. Die meisten dieser Proteine sind genetisch eng miteinander verwandt. *Immediate Early Genes* (auch *Early Response Genes* genannt) stellen eine große Familie von Faktoren dar, die innerhalb von kürzester Zeit nach einem meist extrazellulären Stimulus exprimiert werden. Diese Stimuli können durch die Bindung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Serumbestandteilen zustande kommen, aber auch intrazelluläre Faktoren, Strahleneinwirkung, osmotischer Druck, Ischämie, Membrandepolarisation, Zelladhäsion oder allgemeiner Stress, der auf die Zelle einwirkt, können zur Aktivierung von Mitgliedern dieser Genfamilie führen. *Immediate Early Genes* repräsentieren somit die initiale Antwort einer Zelle und leitet durch die Expression von *Downstream Genen* längerfristige Veränderungen ein, die beispielsweise in Zusammenhang stehen können mit Wachstum, Differenzierung, Aktivierungsvorgängen oder Apoptose.

Die Transkriptionsfaktoren aus der Subfamilie der EGR Gene (*Early Growth Response Genes*) stellen wichtige Vertreter innerhalb der *Immediate Early Genes* dar.

2.2.2 Die EGR-Familie

Innerhalb der *Immediate Early Genes* werden Familien von Transkriptionsfaktoren üblicherweise nach folgenden Kriterien gebildet: die zu erkennende DNA-Sequenz, die Aminosäuresequenz des Transkriptionsfaktors, die die Bindungsstelle erkennt und gleiche Proteinmotive für Wechselwirkungen mit der DNA oder mit anderen Proteinen.

Die EGR-Familie ist durch zwei Kriterien gekennzeichnet. Sie besitzen einerseits homologe Zinkfinger motive der Cys₂His₂-Klasse und erkennen andererseits eine GC-reiche DNA-Konsensussequenz (5'- GCGGGGGCG -3'). Bis heute sind fünf Vertreter bekannt: Egr1, Egr2, Egr3, Egr4 und WT1, das Wilmstumoren. Die Zinkfingerregionen stellen evolutionär hoch konservierte Strukturen dar und haben beispielsweise eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz unter den Mitgliedern zwischen 61% für WT1 und 94% für Egr2 verglichen mit Egr1. Das WT1-Suppressorgen unterscheidet sich am deutlichsten von den restlichen Vertretern der EGR-Familie. WT1 verfügt über vier Zinkfinger gegenüber den anderen, die stattdessen lediglich drei aufweisen. (Madden & Rauscher, III 1993).

2.3 *Egr1 – ein Transkriptionsfaktor*

2.3.1 *Vorkommen und Bedeutung*

Egr1 (*Early Growth Response Gene 1*, Synonyme: NGFI-A, TIS8, Krox-24, zif268) ist ein Transkriptionsfaktor, der zuerst Ende der 1980er Jahre in PC12-Zellen (Phaeochromozytomlinie) entdeckt wurde (Milbrandt 1987). Seit dieser Zeit haben sich viele unabhängige Arbeitsgruppen mit diesem Faktor beschäftigt. In Abhängigkeit von der Zellspezies und der Form der Induktion führte dies zu einer umfangreichen unterschiedlichen Nomenklatur, wie die vielen Synonyme bezeugen. Milbrandt entdeckte die hohe transiente Genexpression dieses Faktors durch die Behandlung der PC12-Zellen von Ratten mit *NGF* (*Nerve Growth Factor*). Eine folgende Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit der Induktion durch *TPA* (*Tetradecanoyl Phorbol Acetat*) ebenfalls in Zellkulturen (3T3 Maus-Zelllinie), was sich im Namen *TIS8* niederschlug (Varnum et al 1989). *Krox-24* ist eine Abkürzung für *Krüppel Box*, bzw. eine Bezeichnung für den Faktor durch die Stimulation dergleichen 3T3-Zellen mit Serumbestandteilen (Lemaire et al 1988). Der Begriff EGR wurde durch eine Arbeitsgruppe eingeführt, die sich mit der Stimulation von humanen und Mausfibroblasten in Kultur durch *NGF* beschäftigte (Sukhatme et al 1988). *Zif-268* steht für *Zinkfinger* und wurde von einer Gruppe so benannt, die sich gleichfalls mit der Induktion dieses Genes in Mauszellen (BALB/c3T3) durch Serumbestandteile auseinandersetzte (Christy et al 1988).

Egr1 ist der bekannteste und am gründlichsten untersuchte Transkriptionsfaktor aus der Familie der EGR. Zahlreiche Studien beleuchteten seine Eigenschaften in Bereichen der Struktur, Verteilung und funktioneller Aspekte wie beispielsweise Teilungs- und Differenzierungsfähigkeit, bzw. die Einleitung von längerfristigen Veränderungen innerhalb der Zelle.

Protein und mRNA von *Egr1* sind stark exprimiert im ZNS, in der Lunge, im Myokard und in lymphatischem Gewebe wie der Milz (Sukhatme et al 1988). Auf zellulärer Ebene sind zahlreiche Spezies bekannt, die *Egr1* konstitutiv oder transient exprimieren.

2.3.2 Das *Egr1*-Gen

Das *Egr1*-Gen (*egr1*) ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 5 lokalisiert (5q31.1). Das gesamte Gen ist aufgeteilt in einen Promotorbereich, zwei kodierende Exons, ein dazwischen liegendes Intron und die 3'-UTR-Region (*Untranslated Region*). Die 5'-Region des *Egr1*-Gens enthält innerhalb der Promotorregion, die ungefähr 700 Basenpaare aufweist, unter anderem fünf Areale, die durch die Induktion von *Serumbestandteilen* die Transkription des Gens einleiten können. Diese Regionen werden *Serum Response Elements (SRE)* genannt und enthalten die hochkonservierte Sequenz CC (A/T)₆ GG, auch „*CArG Box*“ genannt, die nicht nur die Endstrecke für die Transkription des *Egr1*-Gens nach der Stimulation durch *Serumbestandteile* darstellt, sondern auf diese Weise auch die Induktion von *Egr1* durch Phorbolester oder *ROIs*, bzw. durch Bestrahlung einleiten (Datta et al 1993). Daneben bietet diese Regionen zusätzlich noch ein ähnliches Element, das in Zusammenhang mit einer Kaskade steht, die durch cAMP eingeleitet wird. Dieses Element wird *cAMP-like Response Element (CRE)* genannt. Ebenfalls in diesem Promotor sind Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren *AP-1*, *NFκB* und *SP-1* beschrieben. Interessanterweise bietet die Promotorregion von *Egr1* neben all diesen Bindungsstellen noch zwei als *EBS (Egr1 Binding Site)* bekannte Sequenzen (5'- CGCCCGCGC -3'), die die Bindung von *Egr1*-Protein selbst zulassen.

Allgemein ist für die Transkription der mRNA die komplette Bindung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich notwendig. Dieses als *Initiationskomplex* bezeichnete Konglomerat ist dafür verantwortlich, dass die eigentlichen Enzyme, die die Transkription ausführen (u.a. die RNA-Polymerase II), die korrekte Position für den Start einnehmen und die Ablesung der DNA beginnen kann.

2.3.3 *Egr1*-mRNA Varianten

Kürzlich wurden zwei verschiedene Varianten der *Egr1*-mRNA beschrieben: *egr1* long variant (GenBank entry AK040925, *egr1-lv*) und short variant (GenBank entry NM_007913, *egr1-sv*), die sich nur durch ihre unterschiedliche Länge in ihrer 3'UTR (*Untranslated Region*) unterscheiden und deshalb das identische Protein transkribieren.

Während *egr1-sv* die dominierende Variante darstellt, die auf einem höheren Niveau exprimiert wird, werden hohe Level an polyadenylierter Egr1-mRNA der langen Variante *egr1-lv* nach neuronaler Aktivierung gefunden (Simon et al 2004). Dieser Vorgang ist abhängig von der Aktivität des NMDA-Rezeptors.

2.3.4 *Egr1-Protein*

Das Egr1-Protein müsste der *Coding Sequence* des Gens bzw. der cDNA folgend ein Molekulargewicht von umgerechnet 54 kDa aufweisen. In der Literatur sind allerdings mehrere Varianten beschrieben, die ein abweichendes Gewicht aufweisen (Day et al 1990).

Die Aminosäuresequenz von Egr1 besteht beim Menschen aus 543 Bausteinen und weist in der ersten der drei N-terminalen Domänen (1-331) in seiner Zusammensetzung häufig Prolin (14,2%) und Serin (16%), mit je 7,9% weniger Alanin und Threonin auf. Die C-terminale Region (417-543) hat ebenfalls häufig Prolin und Serin (15,4 und 26,5%) und 10,3% Alanin und 11,1% Threonin. Der hohe Prolinanteil könnte auf eine geringere Ausbildung von α -helikalen Strukturen hinweisen, der hohe Anteil von Serin und Threonin könnte vielfältigen Phosphorylierungen dienen. Die Egr1-mRNA enthält im übrigen auch viele potentielle Signale für Polyadenylierung (AATAAA oder AATTAA, Sukhatme et al 1988).

Das Protein besitzt drei homologe Zinkfinger bestehend aus einer Sequenz von jeweils 22 - 24 AS. Diese Zinkfinger sind in folgenden Positionen der AS-Sequenz zu finden: AS 338 – 362, AS 368 – 390 und AS 396 – 418. Diese Strukturen sind so angeordnet, dass je zwei Cystein- und Histidinreste im funktionellen Zentrum dieser Fingermotive eine nichtkovalente Bindung mit einem Zink (II)- Ions eingehen. Daher erklärt sich der Name dieser Zinkfingersubgruppe, die man Cys₂His₂ (C₂H₂) nennt. Der räumlichen Vorstellung folgend geht man davon aus, dass die Zinkfinger in die große Furche der DNA ragend nach einem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ eine spezifische DNA-Domäne erkennen und durch ihre Bindung zur Transkription der entsprechenden Gene führen. Diese Regionen der DNA sind GC-reiche Zielsequenzen in Bereichen von Promotoren, die die Basenabfolge von 5' - GCGGGGCG -3' enthalten. Diese Abfolge wird *EGR Consensus Box* genannt. Vielfache *Downstream Gene*, die an der Regulation von Wachstum und

Zelldifferenzierung beteiligt sind, werden von Egr1 durch diese Box erkannt und in ihrer Transkription reguliert. Der zentrale Teil des Egr1-Proteins besitzt interessanterweise häufige Tandemrepeats beginnend mit der AS 332, die DNA-Bindungsdomänen gleichen, die von den Zinkfingern der C₂H₂-Klasse erkannt werden.

Verantwortlich für den Transport des Egr1-Proteins vom Zytoplasma in den Nukleus ist diejenige Sequenz, die man gemeinhin das *Nuclear Localization Signal (NLS)* nennt. Das *NLS* von Egr1 wurde als ein relativ kurzer Abschnitt identifiziert, der kurz vor der ersten Zinkfinger-Struktur (AS 315 – 330) lokalisiert ist (Gashler et al 1993).

2.3.5 Funktionen von Egr1

Wie wir bereits festgestellt haben, spielt Egr1 in einer Vielzahl von Prozessen eine wichtige Rolle. Zu diesen gehört beispielsweise die Teilungsfähigkeit und Differenzierung von eukaryoten Zellen (Sukhatme et al 1988). Allgemein werden durch Egr1 längerfristige Veränderungen auf molekularer Ebene eingeleitet, die durch einen meist extrazellulären Stimulus ausgelöst wurden. So ist Egr1 einer Reihe von Faktoren direkt vorgeschaltet und reguliert diese in ihrer Expression. Zu diesen durch Egr1 regulierten *downstream* Genen gehören unter anderem das Tumorsuppressorgen *p53*, *TNF- α* (Tumor Nekrose Faktor α), *TGF- β* (Transforming Growth Factor β), *EGF* (Epidermal Growth Factor), *PDGF-A* (Platelet Derived Growth Factor A), *IGF* (Insuline-like Growth Factor), die β -Untereinheit des luteinisierenden Hormons *LH* (Knight et al 2000, Dorn et al 1999) und Egr1 selbst (Meyer et al 2002, Pines et al 2003, Cao et al 1993).

Mittlerweile ist eine große Zahl von Prozesse bekannt, in denen Egr1 maßgeblich involviert ist. Beispiele dafür sind die Ausbildung von Immuntoleranz (Seyfert et al 1990), Ischämie (Yan et al 2000), Fortpflanzung (Lee et al 1996, Tourtellotte et al 2000), Kurzsichtigkeit (Fischer et al 1999, Simon et al 2004), Schmerzverarbeitung im Hippokampus (Wei et al 2000) und die Ausbildung sowohl von Langzeitgedächtnis (Jones et al 2001) als auch von Angst (Malkani & Rosen 2001). Die Proliferation von Schwanzzellen und die Ausbildung der Myelinscheiden ist ebenfalls abhängig von Egr1 (Mercier et al 2001).

Sowohl förderliche (Sells et al 1995) als auch hemmende (Virolle et al 2001) Wirkung von Egr1 auf das Wachstum maligner Tumorzellen wurden beschrieben. Egr1 ist dem Tumorsuppressors *PTEN* unmittelbar vorgeschaltet und leitet darüber die Apoptose in maligne entarteten Zellen ein. Bis heute gibt es unterschiedliche Auffassungen darüber, ob Egr1 vor allem proapoptotisch oder andererseits als wichtiger fördernder Bestandteil in der Tumorgenese agiert.

Weiterhin ist Egr1 als äußerst wichtiger Faktor im Zusammenhang von Schmerz- und Langzeitgedächtnis und synaptischer Plastizität beschrieben worden. Im Jahr 2000 konnte demonstriert werden, dass eine tetanische Stimulation von hippokampalen Neuronen in Ratten, denen vorher Schmerzreize appliziert wurde, eine 2 - 4 Stunden andauernde höhere Expression von Egr1 im Sinne der späten Phase der *LTP* (*Long Term Potentiation*) aufwies. Die Expression von Egr1 ist dabei abhängig von einer NMDA-Rezeptor-vermittelten glutamatergen synaptischen Aktivität (Cole et al 1989). Egr1-defiziente Tiere (*Egr1^{-/-}*) zeigen zwar scheinbar weniger Einschränkungen der Verarbeitung von Kurzzeithalten – die Überführung von schmerzabhängigen Lernprozessen in eine Form des Langzeitgedächtnisses war in einem ähnlichen Experiment an den defizienten Mäusen aber nicht möglich (Jones et al 2001).

Im Jahr 2004 beschrieben Simon und Kollegen erstmals zwei unterschiedliche mRNA-Varianten des Egr1 Gens, die abhängig von der neuronalen Aktivität in der Netzhaut exprimiert werden (Simon et al 2004).

2.3.6 Posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen

Wie bereits erläutert, kann die Egr1-mRNA eine posttranskriptionale Modifikation durch Polyadenylierung im Bereich der *UTR* (*Untranslated Region*) an ihrem 3'-Ende erfahren. Dies erklärt die beiden unterschiedlich langen Varianten *egr1-lv* und *egr1-sv*. Die kurze Variante entbehrt diesen Poly-A-Schwanz, während die lange Version über 293 zusätzliche Adenosin-Basenpaare aufweist. Reguliert wird diese Polyadenylierung durch zwei potentielle zytoplasmatische Polyadenylierungs-Elemente (*CPE*): *CPE1* mit der Sequenz: UUUUUGU und *CPE2* mit der Sequenz: UUUUUACUUU. Diese werden gefolgt von dem zytoplasmatischen Polyadenylierungssignal AATAAA. Diese Abfolge wird auch als Tandem-Poly-A-Arrangement bezeichnet, die je nach

Vorhandensein für eine differentielle Regulierung unterschiedlicher mRNA-Varianten verantwortlich ist. Ihr werden wichtige regulatorische Eigenschaften hinsichtlich der Dauer und Stabilität der Transkription zugeschrieben (Levy et al 1995).

Simon und Kollegen konnten zeigen, dass die basale Expression der kurzen Variante *egr1-sv* im ZNS generell höher liegt, wohingegen *egr1-lv* u.a. auf exzitatorische Reize wie Lichtexposition oder Glutamat-Freisetzung rasch höher exprimiert wird (Simon et al 2004).

Um ein Protein vermehrt zu translatieren, gibt es unterschiedliche Regulationsmechanismen: einerseits kann die *de novo* Syntheserate der mRNA erhöht werden und weiterhin besteht die Möglichkeit, bereits bei Bedarf präexistierende mRNA aus einem Pool und dadurch sehr rasch zu translatieren (Wells et al 2000, Aakalu et al 2001). Für weitere Proteine, die vor allem synaptisch lokalisiert sind wie zum Beispiel α -CaMK II (*Calcium-Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II*) wurde eine NMDA-abhängige Aktivierung eines mRNA-Pools durch Polyadenylierung nachgewiesen. Essentielle Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein von *CPEs* (Wu et al 1998, Wells et al 2001).

In einer Arbeit aus dem Jahre 2004 konnte auf anschauliche Weise geschildert werden, wie die höhere Expression von Egr1-Protein in pulmonalen Epithelzellen durch die chemischen Noxen *TCDD* (*2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin*) und *PAHs* (*Polyzyklische Aromatische Hydrocarbone*) zustande kommt (Martinez et al 2004). Bemerkenswert war die Tatsache, dass die entsprechende mRNA in ihrer Stabilität scheinbar erhöht wurde und zur gleichen Zeit die Transkription des Egr1-Gens nicht signifikant gesteigert war, wie ein Reporter gen innerhalb des Promotors als Marker (*Luciferase*) anzeigte. Dennoch führte dieser Vorgang zu einer höheren Proteinexpression über eine Verlängerung der Halbwertszeit der mRNA.

Auf der Seite des Proteins kommt als posttranslationale Modifikation vor allen Dingen die Phosphorylierung in Frage. Wie bereits berichtet, besitzt das Egr1-Protein durch seinen hohen Anteil an Serin und Threonin zahlreiche Stellen für eine potentielle Phosphorylierung (Day et al 1990, Sukhatme et al 1988). Day et al. konnten an einer nukleären Variante des Egr1-Proteins ebenfalls zeigen, dass eine im Western blot erkennbare Doppelbande durch die Behandlung mit *Alkalischer Phosphatase* auf eine einzelne Bande reduziert werden konnte. Glykosylierung als posttranslationale Modifikation schloss diese Arbeitsgruppe weitgehend aus. Bereits Day vertrat die

Auffassung, dass Transkriptionsfaktoren wie Egr1 nicht nur *de novo* synthetisiert werden, sondern dass diese möglicherweise in präexistenter Form bereits in der Zelle vorhanden sein und durch mehrere Stimuli aktiviert werden könnten. Neuere Daten, die eine Aktivierung von bereits translatierten Transkriptionsfaktoren beschrieben, fehlen allerdings immer noch.

2.3.7 Basale Expression von Egr1 im ZNS der Ratte

Eine Arbeit aus dem Jahre 1991 untersuchte die Egr1-mRNA durch *in situ* Hybridisierung (Schlingensiepen et al 1991). Danach wurde eine starke basale Expression von Egr1-mRNA in neokortikalen Bereichen vor allem in den Laminae IV und VI der Rindenstruktur, insbesondere in visuellen und somatosensiblen Anteilen gefunden. Im Hippokampus war die Expression am stärksten in CA 1 und sehr gering dagegen im Gyrus dentatus. Eine starke Expression war außerdem zu sehen im primären olfaktorischen Kortex, Striatum, in den Amygdalae, im Nucleus accumbens und im zerebellären Kortex.

Auf Proteinebene hat Waters et al. Egr1 auf die Nuklei von Neuronen beschränkt (Waters et al 1990). Day et al. beschrieben im selben Jahr zwei verschiedene Egr1-Protein-Varianten, die sie in eine zytoplasmatische 54 kDa schwere Version und in ein 84 kDa Protein einteilten, das sich auf den Zellkern beschränkte (Day et al 1990). Mack und Kollegen widmenten sich im Jahr 1990 der Verteilung von Egr1 im ZNS der Ratte und konnten dabei feststellen, dass das Protein in Gehirngewebe sehr häufig exprimiert und dass die Anfärbung ebenfalls auf die Neuronenkerne beschränkt war. Die basale Expression war dabei besonders hoch in zerebralem Kortex, Hippokampus, Thalamus und im Striatum (Mack et al 1990). In einer etwas ausführlicheren Arbeit aus dem Jahre 1995 wird eine hohe Expression im motorischen und sensiblen Kortex von Ratten berichtet. Darin zeigte sich eine hohe Immunoreaktivität vor allem in den kortikalen Laminae II, IV und VI, wohingegen die Anfärbungen in den Laminae III und V gering ausgeprägt waren (Herdegen et al 1990). Hughes et al. konnte eine hohe Egr1-Protein-Expression nachweisen in den hippokampalen Regionen CA 1, 3 und Subiculum, eine geringere dagegen im Gyrus dentatus (Hughes et al 1992).

2.3.8 *Egr1* und Pathways nach Bestrahlung

Angesichts der Komplexität der Signalkaskaden und der Fülle der bereits veröffentlichten Arbeiten, die sich mit diesem Thema beschäftigen, erscheint es sinnvoll zuerst einen Überblick über die gemeinsame Endstrecke der verschiedenen *Pathways* aufzuzeigen. Diese Endstrecke ist im Promotorbereich des *Egr1*-Gens zu finden – die verschiedenen Bindungselemente für Transkriptionsfaktoren (*SREs*, *CREs*, *EBS*, etc.) sind bereits vorgestellt worden. Der erste Abschnitt dieses Kapitels wird sich also vorerst damit beschäftigen, bevor in einem zweiten Abschnitt die Kaskaden beschrieben werden, die sich weiter „*upstream*“ darstellen.

Es besteht heute Übereinstimmung darin, dass die Expression von *Egr1* nach Bestrahlung vor allem durch die Bindung von bestimmten Faktoren an die *SREs* im Promotor zustande kommen. Diese *Serum Response Elements* oder auch „*CaRG-Box*“ genannten Strukturen dienen nicht nur bei Aktivierung durch *Serumbestandteile* als Endstrecke in der *Egr1*-Expression. Diese Bindungsstellen werden ebenfalls bei der Induktion durch Phorbolster, *ROIs*, *EGF* und *PDGF* benutzt.

Der klassische Weg der Induktion über die *SREs* lässt sich folgendermaßen beschreiben (siehe Abb. 1 a). Zwei verschiedene Faktoren werden für die Transkription benötigt: 1. der *SRF* (*Serum Response Factor*, auch als *p68* bezeichnet) und 2. ein Konglomerat, das aus drei verschiedenen Transkriptionsfaktoren besteht und das man *TCF* (*Ternary Complex Factor*) nennt. Dieser unter 2. aufgeführte Komplex enthält die Proteine *Elk1*, *Sap1* und *Sap2*. Diese Proteine müssen eine Bindung zur DNA und zum *SRF* eingehen, anderenfalls wird keine Transkription eingeleitet. *Elk1* wird einerseits durch den Kaskadenweg von *ERK 1/2* (*Extracellular Signal-regulated Protein Kinase 1/2*) und durch *JNK/SAPK* (*c-Jun N-terminal Protein Kinase / Stress-Activated Protein Kinase*) phosphoryliert. Durch diese Phosphorylierung kommt es zu einer erhöhten DNA-Bindung, zur räumlichen Ausbildung des *TCFs* und damit letztlich zur *SRE*-vermittelten Einleitung der Transkription des *Egr1*-Gens (Whitmarsh et al 1995).

Durch eine Studie aus dem Jahr 2002, die unterschiedliche Deletionsmutanten der *Egr1*-Promotorregion verwendete, konnte die herausragende Rolle der *SREs* nach ionisierender Bestrahlung nachgewiesen werden (Meyer et al 2002). Dabei wurde eine

Beteiligung des *p38MAPK/SAPK2 Pathways* nach Bestrahlung weitestgehend ausgeschlossen. Wie bereits vorgestellt, konnte die Bedeutung des *ERK 1/2* und des *JNK/SAPK Pathways* unterstrichen werden. Außerdem wurde durch diese Arbeit die Beteiligung von *EGF* und seines Rezeptors an der Egr1-Induktion gleichfalls bestätigt, wie dies in späteren Arbeiten weiter untermauert wurde (Jones & Agani 2003). Durch die zuletzt genannte Arbeit wurde die Egr1-Induktion nach Hyperoxie in kultivierten Alveolarzellen durch die Bildung von *ROIs* geschildert. Auch hier wurde der *p38MAPK/SAPK2 Pathway* ausgeschlossen und dagegen der *ERK 1/2* Signalweg für die Transkription von Egr1 aufgezeigt. Eine Verminderung der *ROIs* durch Antioxidantien wie *NAC (N-Acetyl-Cystein)* als Vorstufe des Glutathion konnte in diesem Experiment wie in vorherigen Studien die Induktion von Egr1 nahezu komplett unterbinden (Datta et al 1993).

An dieser Stelle kann noch angeführt werden, dass die ebenfalls im Promotor von Egr1 zu findenden *CREs (cAMP-like Response Element)* vermutlich abhängig von ihrer Lage einerseits unterstützende Wirkung auf die Genexpression haben können (Meyer et al 2002) und andererseits die Transkription zu hemmen scheinen (Jungling et al 1994). Durch die Arbeit von Dziema et al. wird die Egr1-Induktion nach Lichtexposition durch eine Kaskade eingeleitet, die über den *MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) Pathway* eine *CRE*-abhängige Transkription als Endstellen aufweist (Dziema et al 2003).

Auch die eigene Bindungsstelle von Egr1 an seinem Promotor (bekannt als *EBS*) hat vermutlich einen inhibitorischen Effekt und könnte über einen *negativen Feedback* die Überexpression von Egr1 regulieren (Cao et al 1993).

Die Einleitung der Transkription von Egr1 über die *SREs* geschieht nach Bestrahlung voraussichtlich in einem überwiegenden Teil über die Aktivierung von *ERK 1/2* (siehe oben). Der wichtigste Kaskadenweg, der zur Aktivierung von *ERK 1/2* führt, ist der *MAPK*-Pathway (siehe Abb. 1 a). In den meisten Fällen wird dieser Signalweg durch die Bindung eines Liganden an einen Membranrezeptor für Wachstumsfaktoren eingeleitet. Beispiele dafür sind die Aktivierung von Egr1 durch *NGF*, *EGF* und *PDGF*. Diese Rezeptoren sind in den meisten Fällen Rezeptortyrosinkinasen, durch die Bindung des Liganden eine Transformation mit Hilfe einer Autophosphorylierung und Dimerisierung erfahren. Rezeptoren ohne eigene intrinsische Tyrosinkinaseaktivität

bedienen sich dabei sogenannter „assoziierter Kinasen“, die diese Funktion stellvertretend übernehmen. Nach dieser Aktivierung wird eine Kaskade eingeleitet, die mit der Phosphorylierung von Effektorproteinen beginnt. Zu diesen Proteinen gehören *Grb2* und *SOS* (siehe Abb. 1a). *SOS* aktiviert nun das G-Protein *Ras*, das in eine aktive GTP-bindende Form überführt wird. *Ras* aktiviert im folgenden *Raf-1* und dieses wiederum *MEK*, eine *MAP-Kinase-Kinase*. Der Weg führt dann weiter über die eigentliche *MAP-Kinase (MAPK)*, welche letztlich *ERK 1/2* aktiviert.

Ein weiterer oft im Zusammenhang mit *Egr1* und UV-Bestrahlung genannter Signalweg geschieht über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors *c-Jun* durch *JNK / SAPK (c-Jun N-terminal Kinase)*. Dieser Signalweg wird durch mehrere stressinduzierte Stimuli ausgelöst wie beispielsweise Hitzeschock, oxidativer und osmotischer Stress oder mechanische Reize (Hebert et al 2005). Die Expression von *Egr1* soll durch Aktivierung von *JNK* ebenfalls über den Weg der *SREs* zustande kommen (Hallahan et al 1995).

Ein anderer molekularer *Pathway* endet in einer *Protein Kinase C* - vermittelten *Egr1*-Expression (Pines et al 2003). Diese Kaskade beginnt ebenfalls an einem Tyrosinkinaserzeptor, der allerdings über eine gebundene *Phosphatidylinositol- 3-Kinase* wirkt. Dieses Enzym wandelt *Phosphatidylinositol- 4,5- bisphosphat (PIP₂)* in *Phosphatidylinositol- 3,4,5- triphosphat (PIP₃)* um. Über die Freisetzung von *IP₃ (Inositol- 3,4,5- triphosphat)* kommt es zur intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung und über *DAG (Diacylglycerol)* zur Aktivierung der *PKC (Proteinkinase C)*. *PKC* soll laut dieser Arbeit indirekt über *ERK 1/2* und direkt über den *TCF* auf die Expression von *Egr1* durch ein *SRE* einwirken.

Ein in diesem Jahr vorgestellter Signalweg der *Egr1*-Expression zeigt die Rolle der nicht-rezeptorgebundenen Tyrosinkinase *c-Abl* auf (Stuart et al 2005). In Antwort auf Bestrahlung und oxidativen Stress wird diese Tyrosinkinase direkt über *ATM (Ataxia teleangiectasia-mutated Protein)* phosphoryliert (Baskaran et al 1997) und leitet über einen *Egr1*- und dadurch *p53*- abhängigen Mechanismus Apoptose und Zellzyklusarrest ein. Auch hier wird das *SRE* im Promotorbereich von *Egr1* für die Expression genutzt.

Komplizierend zu der Komplexität der molekularen *Pathways* kommt noch hinzu, dass bereits spezifische Inhibitoren des *Egr1*-Proteins und der *Egr1*-Promotorregion beschrieben sind, die physiologischerweise die Aktivität bzw. Funktionalität des *Egr1*-Proteins selbst und die dadurch vermittelte Transkription direkt hemmen (Russo

et al 1995). Diese als *NAB1* und *2* (*NGFI-A Binding Protein 1/2*) bezeichneten Proteine vermögen durch Protein – Proteinwechselwirkung die Transkription zu hemmen wie auch durch Protein – DNA – Wechselwirkung einen Suppressoreffekt im Promotorbereich auszuüben.

2.3.9 Therapeutische Optionen von Egr1

Bisher wurden mehrere Ansätze erwogen, wie man mit Hilfe der Gentherapie Tumorzellen für die Wirkung der Chemotherapie empfänglicher und dadurch ihr Wachstum von außen steuern könnte. In vielen Studie wurde bereits geprüft, ob eine Gentherapie mit dem radiosensitiven Promotor von *Egr1* durch adenovirale Vektoren möglich ist, um beispielsweise im Bestrahlungsgebiet von Hirntumoren eine selektive und strahleninduzierte Genexpression in transfizierten Zellen zu gewährleisten (Manome et al 1998). Die Verwendung von *Egr1*-Promotoren für die Genexpression bietet die Möglichkeit, diese Gene spezifisch im Bestrahlungsgebiet zu aktivieren scheinbar ohne andere Areale zu schädigen. Die Schwierigkeiten bestehen aber sicherlich darin, eine Transfektion spezifisch nur in Tumorzellen zu erreichen. Weiterhin kann nicht vorhergesagt werden, welche Auswirkungen eine unkontrollierte Verbreitung von Genabschnitten, die in Zusammenhang mit Proliferation und Differenzierung stehen, auf die Interaktion und das Überleben auch nicht beteiligter Zellen haben.

2.4 Mikroglia

2.4.1 Vorkommen und Bedeutung

1932 erkannte del Rio-Hortega als Erster die Rolle der Mikroglia in pathologischen Prozessen im ZNS (Del-Rio Hortega 1932). Heutzutage ist ihre Herkunft von der Mononukleär – Phagozytären Zellreihe unter Fachkreisen weitgehend anerkannt.

Was ihre Bedeutung angeht, ist nach Kreutzberg kaum eine Pathologie im ZNS ohne Beteiligung der Mikroglia denkbar (Kreutzberg 1996). Sie sind vielfach die ersten Zellen, die mit einer Aktivierung auf eine große Anzahl von Läsionen und Veränderungen in der Mikroumgebung im Gehirn reagieren.

Eine der charakteristischen Eigenschaften der Mikroglia ist die Aktivierung zu einem sehr frühen Zeitpunkt. Sie reagieren auf Änderung des physiologischen Milieus mit der Expressierung von Oberflächenmolekülen und gleichzeitig mit morphologischen Veränderungen.

2.4.2 Funktionen der Mikroglia

Die Mikroglia spielt eine wichtige Rolle bei der Infektabwehr, sie kann Mikroorganismen ebenso wie Zelltrümmer phagozytieren, reguliert die Geweberegeneration und unterstützt die Wundheilung durch Sekretion von bestimmten Faktoren. Sie kann andererseits aber ebenso zytotoxisch auf eine Reihe von Läsionen reagieren. Mikroglia exprimiert Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche unter anderem für den F_c-Anteil von Antikörpern und für Bestandteile des Komplementsystems. Während antikörpervermittelter Demyelinisierung lysiert die Mikroglia antikörpermarkierte Zielzellen durch Interaktion mit diesen F_c- und Komplementrezeptoren. Wie in *in vitro* Experimenten beobachtet, kann die Mikroglia zytotoxische Substanzen sezernieren, wie z.B. freie Stickstoffradikale (NO), Proteasen, Arachidonsäurederivate, Zytokine oder exzitatorische Aminosäuren. Da sich die meisten dieser Informationen über solcherlei Vorgänge auf *in vitro* Beobachtungen beziehen, müssten diese durch *in vivo* Untersuchungen bestätigt werden. Mikroglia produziert sowohl einen Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp als auch

Plasminogen selbst. Sie spielt weiterhin sicherlich eine wichtige Rolle in Geweberegeneration und im *Tissue Remodelling*.

Die experimentelle Durchtrennung des peripheren N. facialis liefert ein gutes Verständnis für Aktivierungsvorgänge nach einer zentralen Läsion ohne dass die Blut-Hirnschranke beeinflusst wird. Ablaufende Reparaturvorgänge im ZNS können mit diesem Modell untersucht werden. Im Gegensatz zu Astrozyten proliferiert und hypertrophiert die Mikroglia dabei und präsentiert eine Reihe von Oberflächenmolekülen wie *CR3bi* (Ratte), *αMβ2* (Maus), *MHC - 1 und 2*, *B7-1*, *APP*, *L-APP*, *TNF-α* und Thrombospondin. Was man bei dieser Durchtrennung des N. facialis (Axotomie) außerdem beobachten kann, wird als *Synaptic Stripping* bezeichnet. Darunter versteht man das Lösen der afferenten synaptischen Verbindungen eines Neurons durch proliferierende Mikroglia. Nach 2-3 Wochen wird diese Reaktion durch eine Proliferation von Astrozyten abgelöst, die feine Lamellen zwischen die synaptische Verbindung einfügen, wenn der Prozess länger andauert. So betroffene Neurone haben nach *Synaptic Stripping* prinzipiell das Potential zu regenerieren. In manchen Fällen wird dies aber den Untergang des Neurons nicht verhindern können.

Zusammenfassend kann die Aktivierung der Mikroglia nach Läsionen sowohl in Richtung Phagozytose, Abräumung und letztlich Zelltod ablaufen als auch einen Weg von Protektion und Überleben einschlagen.

Mikroglia im entzündungsfreien und nicht geschädigten Gehirn hingegen gehört nicht zu den *APCs (Antigen Präsentierenden Zellen)*. Sie stellt sich vielmehr als ruhende Zellspezies dar, die eine Sensorfunktion ausübt und erst durch pathologische Vorgänge aktiviert wird.

Die Feststellung, dass das ZNS über kein Lymphsystem verfügt, dass die Expression von MHC-1 auf die Region der Blutgefäße beschränkt ist und die der MHC-2-Klasse fast völlig fehlt, hat früh zu der Annahme verleitet, das ZNS besitze kein eigenes Immunsystem, solange die Blut-Hirnschranke intakt bleibe. Patrollierende T-Lymphozyten in gesunden Gehirnen und die Induzierbarkeit der MHC-2-Expression auf Mikroglia zeigen, dass dieses vereinfachende Bild vom Immunstatus des ZNS revidiert werden musste.

Als wichtige Mitogene für die Mikroglia haben sich *CSFs (Colony Stimulating Factors)*, *GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-CSF)*, *M-CSF (Makrophagen-CSF)* und *IL-3*

(multi-CSF) herausgestellt, wobei *GM-CSF* und *M-CSF* die Proliferation von Mikroglia auch *in vivo* verstärken.

Unter künstlich erzeugter Entzündung *EAE (Experimental Allergic Encephalitis)* konnte unter anderem der Transkriptionsfaktor *NFκB* als wichtiger Aktivierungsfaktor identifiziert werden. *CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein)* ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der als frühe Folge von peripherer Nervenschädigung in Mikroglia induziert wird.

Allgemein lässt sich aussagen, dass die Mikroglia auf verschiedene Läsionen und Noxen, die auf das ZNS einwirken, mehr oder weniger stereotyp reagiert. Sie proliferiert, wandert zum Ort des Geschehens und unterläuft charakteristische Veränderungen in ihrer Morphologie und Funktion.

2.4.3 Phenotypische Veränderungen der Mikroglia

Abhängig von ihrem Aktivierungsniveau stellt sich die Mikroglia morphologisch sehr unterschiedlich dar (siehe Abb. 1 b). Im nicht-aktivierten Zustand ist sie mit den üblichen Methoden kaum anfärbbar, da sie nur sehr wenige Oberflächenmarker exprimiert und andererseits zu einer der fragilsten Zellspezies überhaupt gehört. Dieser „ruhende“ Phenotyp stellt sich als längliche Ausrichtung der Zelle mit elliptischem Kern und sehr filigranen, dendritischen Ausläufern dar.

Nach Aktivierung erscheint die Zelle hypertrophiert und die baumartigen Verzweigungen der Fortsätze stellen sich nun kräftiger und plumper dar, was morphologisch als „ramifiziert“ beschrieben werden kann. Der Zellkern ist immer noch elliptisch („Zigarren - ähnlich“) geformt.

In weiteren Aktivierungsschritten rundet sich die Zelle ab und nimmt immer mehr die Gestalt einer makrophagozytischen Zelle an. Der Zellkern ist mittlerweile rund und prominent, im Zytoplasma können sich granulaartige Kompartimente darstellen. Dieser Phenotyp wird allgemein als „amöboid“ bezeichnet.

2.4.4 Mikroglia und Bestrahlung

Monje et al. zeigten im Jahr 2002 einen signifikanten Anstieg der Mikroglia im Bereich des Hippokampus von Ratten mehrere Wochen nach Bestrahlung (Monje et al 2002). Gleichzeitig war die Anzahl der neuronalen Vorläuferzellen in den bestrahlten Gehirnen stark reduziert und die räumliche Beziehung dieser *Precursor cells* zu den kleinen Blutgefäßen (Mikrovaskulatur) gestört. Dabei zeigte sich, dass diese in ihrer Funktion beeinträchtigte Beziehung zwischen *NLS* und Mikrovaskulatur für die Proliferation und Ausreifung der Vorläuferzellen essentiell ist.

Es ist anzunehmen, dass mikrogliale Zellen in Antwort auf Bestrahlung eine wichtige Rolle spielen, ähnlich wie bei vergleichbaren Läsionen des ZNS. Die bisher dafür durchgeführten Studien beschäftigten sich jedoch fast ausschließlich mit späten Veränderungen Wochen bis Monate nach einer Bestrahlung (Nakagawa et al 1996, Deininger et al 2001, Reinacher et al 1999).

Durch eine Arbeit aus dem Jahr 2005 wissen wir, dass die Aktivierung von Astrozyten nach ionisierender Bestrahlung höchstwahrscheinlich auf initiale Vorgänge, die durch Mikroglia eingeleitet werden, zurückzuführen ist. Diese Annahme wurde aus *in vitro* Untersuchungen abgeleitet (Hwang et al 2005).

2.5 Zielsetzungen

Obwohl Bestrahlung einerseits im therapeutischen Bereich durch die Behandlung von Hirntumoren wie auch in experimentellen Forschungsansätzen ein vielfach untersuchter Vorgang ist, beschränken sich die meisten Studien auf die Beschreibung von Vorgängen, die nach einer mehr oder weniger langen Latenz zu beobachten sind. Veränderungen unmittelbar nach erfolgter Bestrahlung sind dagegen weit weniger dokumentiert und stützen sich meist auf *in vitro* Experimente. Die verschiedenen Reaktionen und Kaskaden, die zellulär nach ionisierender Bestrahlung eingeleitet werden, lassen sich wie bereits beschrieben in verschiedene zeitliche Abschnitte gliedern. Es sind dies in ihrer Abfolge Sofortreaktionen, überleitende Reaktionen und Spätreaktionen. Essentiell für das Verständnis von anhaltenden Veränderungen sind mit großer Sicherheit die auslösenden Sofortreaktionen.

Mit Egr1 wird in der vorliegenden Arbeit ein Faktor untersucht, der auf molekularer Ebene als *Immediate Early Gene* bei der Initiation von intrazellulären Kaskaden eine sehr wichtige Rolle spielt. Die vielfachen Stimuli, auf die Egr1 mit der Einleitung der Transkription einer Reihe wichtiger *Downstream Gene* reagiert, sind in der Einleitung dargelegt. Egr1 ist u.a. durch Bestrahlung induzierbar und stellt mit Sicherheit wichtige „Weichen“ für Prozesse, die länger andauern und beispielsweise das Fortbestehen einer Zelle nach strahlenbedingter Läsion beeinflussen. Die genaue Dokumentation des chronologischen Ablaufes in frühen Stadien erschien uns dabei ausschlaggebend. Aus diesen Gründen wurde der Faktor *Zeit* als „abhängige Variable“ gewählt gegenüber einem festen unabhängigen Faktor *Bestrahlung* bzw. Kontrollen ohne eine Bestrahlung. Von besonderem Interesse im Fall von Egr1 als „*molekularem Marker*“ waren für unsere Arbeitsgruppe Fragen, wie die in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen von diesem Transkriptionsfaktor erklärt werden könnten. Weiterhin ist durch bisherige Arbeiten nicht zufriedenstellend geklärt worden, welche Zellspezies Egr1 im ZNS überhaupt exprimiert und in welchem quantitativen Verhältnis.

Der zweite wichtige Eckpfeiler dieser Gemeinschaftsarbeit war die Untersuchung der Mikroglia als „*zellulärem Faktor*“ innerhalb kurzer Intervalle. Von besonderem

Interesse war die Vermutung, dass auch nach Bestrahlung mikrogliale Zellen in einem initialen Stadium an der Einleitung früher Reaktion beteiligt sein müssten.

Um diese Zielsetzungen im Sinne einer Untersuchung des zeitlichen Ablaufs einer frühen Aktivierungsreaktion in einem sinnvollen Gesamtzusammenhang beantworten zu können, legte unsere Arbeitsgruppe den Schwerpunkt auf die Beobachtung früher Zeitpunkte nach Bestrahlung. Dies beinhaltete Zeiträume, die initial im Minuten- und Stundenbereich lagen und die eine weitere Beobachtung bis 3 Tage nach Bestrahlung erlaubten.

Des Weiteren war die Auswahl der Methoden und der zu untersuchenden Gewebe festzulegen. So sollte für Egr1 wie für Marker der Mikroglia ein Gesamtbild entstehen mit der Untersuchung einerseits der Transkription, also auf mRNA-Ebene, wie andererseits der Translation und Expression auf Proteinebene. Für ersteres wurde die Methode der *quantitativen real-time RT-PCR* gewählt, um unterschiedliche mRNA-Varianten gegeneinander abzugrenzen. Dieser Teil der Arbeit wurde von Frau Wölfel durchgeführt.

Auf der anderen Seite sollte die Expression des Proteins in einem histologischen Zusammenhang durch die Methode der *Immunhistochemie* ausgewertet werden. Zusätzlich sollte eine Untersuchung unterschiedlich schwerer Egr1-Proteine durch *Western blot Analysen* durchgeführt werden. Dieser zweite Teil der Proteinuntersuchung wurde von mir geleistet.

Die Auswahl der verschiedenen histologischen Areale und Gewebe innerhalb des ZNS sollte auf der einen Seite eine ausgewogene und repräsentative Darstellung der Vorgänge im Gehirn erlauben. Andererseits sollte für das Verständnis der Vorgänge besonders wichtigen Regionen das notwendige Gewicht beigemessen werden. So wurden funktionell wichtige Areale wie Frontaler und Parietaler Kortex, Weiße Substanz, Kleinhirn und vor allem die Hippokampusregionen im Vergleich zueinander untersucht.

Die Auswahl des Tiermodells für diese Studie war geprägt von einer guten Datenlage sowohl über Egr1 als auch über Mikroglia innerhalb des ZNS der Ratte. Ebenfalls aus praktischen und organisatorischen Gründen schien das Versuchstier Ratte für diese Art von Untersuchungen sehr gut geeignet.

Aus diesen genannten Erwägungen wurde ein Studiendesign erarbeitet, das im ersten Kapitel von *Materialien und Methodik* erläutert wird. In Abhängigkeit von der Zeit sollten in fünf verschiedenen Stadien Veränderungen der Egr1-Expression und der Mikroglia beobachtet werden nach einer ausreichend hohen, für das Verhalten der Tiere innerhalb unseres Untersuchungszeitraums aber nicht weiter beeinflussenden Einzelbestrahlung. Damit sollte eine „*Sequenz der frühen Aktivierung*“ nach ionisierender Bestrahlung skizziert werden, die ein weitergehendes Verständnis für die Forschung und möglicherweise für eine spätere klinische Anwendung erlaubt.

3. Material und Methodik

3.1 Versuchsaufbau

3.1.1 Studiendesign

Der Versuchsaufbau ist in Abb. 2 schematisch verdeutlicht. In diesem Tiermodell wurden 21 Ratten unter Narkose einer Behandlung zugeführt.

Für 15 dieser Tiere beinhaltete dies eine Bestrahlung, die für alle Tiere gleich und standardisiert durchgeführt wurde. Um einen zeitlichen Ablauf der Vorgänge nach Bestrahlung beschreiben zu können, wurden Untergruppen von je 3 Tieren gebildet, die nach unterschiedlich langen Zeiträumen nach Bestrahlung getötet wurden. Diese Zeiträume beinhalteten 20 Minuten, 2 und 6 Stunden, 1 Tag und 3 Tage nach Bestrahlung. Die Betäubung erfolgte ebenfalls standardisiert und für alle Tiere gleich. Lediglich für die Tiere, die nach 20 min getötet wurden, erfolgte keine zweite Narkose, da die Anästhesie nach dieser kurzen Zeit in ihrer Wirkung noch anhielt und man eine schädliche Dosis mit einem nicht kalkulierbaren Risiko für die Tiere selbst und den Versuch vermeiden wollte.

Als Kontrollen auf der anderen Seite dienten 6 Tiere, die einer Scheinbestrahlung zugeführt wurden. Grundsätzlich wurden diese Tiere im Vergleich zu den bestrahlten völlig identisch behandelt, bis auf den Verzicht der Bestrahlung. Auch hier wurden Untergruppen von je 3 Tieren gebildet mit den Überlebenszeiten von 20 Minuten und 2 Stunden nach Bestrahlung. Eine zweite Anästhesie für die 20 min-Gruppe erfolgte auch hier nicht. Dem Einfluss der zweizeitigen Narkose sollte mit Hilfe dieser beiden Kontrollgruppen Rechnung getragen werden. Im Falle der bestrahlten 20 min-Gruppe erwachten die Tiere nicht aus der Narkose und sollten demnach einer direkten Kontrollgruppe mit ebenfalls 20 min Überleben gegenübergestellt werden. Allen anderen Tieren diente die Kontrollgruppe mit einer Überlebenszeit von 2 Stunden als direkter Vergleich.

Eine Perfusionsfixierung durch den großen Kreislauf mit einer Formaldehydlösung (peraortal vor dem Töten der Tiere) schied aus praktischen Gründen aus, da der früheste Zeitraum von 20 min eine solche sicherlich sinnvolle aber aufwendige Behandlung nicht zuließ.

Nach erfolgter Behandlung und ggf. zweiter Narkose wurden die Tiere sofort dekapitiert und umgehend zur Gewebegewinnung präpariert. Anschließend wurden die Gewebeproben mit den unterschiedlichen Methoden wie Immunhistochemie, Western blot Analysen und real-time RT-PCR aufbereitet.

Alle Tiere wurden vor der Durchführung der unterschiedlichen Behandlung nach einer nicht-chronologischen Reihenfolge nummeriert und diese Einteilung in einem Protokoll festgehalten. Aus der Nummer selbst konnte in späteren Verarbeitungsschritten nicht direkt auf die Gruppe geschlossen werden, welcher das Tier angehörte. Diese Zuordnung sollte gewährleisten, dass beispielsweise beim quantitativen Auswerten der unterschiedlichen Gruppen in der Immunhistochemie alle Tiere grundsätzlich gleich behandelt werden sollten und nicht etwa das Ergebnis durch eine subjektive Erwartung verfälscht werden konnte. Eine randomisierte und kontrollierte Form der Studie nach dem Schema „blind“ war aus praktischen Gründen nicht möglich, weil die Durchführung der Behandlung, bzw. die Tierversuche und die spätere Auswertung nicht von getrennten Personengruppen durchgeführt werden konnte.

3.1.2 Versuchstiere und Haltung

21 *Sprague-Dawley* Ratten wurden nach strikter Auswahl von gleichem Alter, Geschlecht und Gewicht (7 Wochen alt, männlich, durchschnittlich 200 g) bei der Firma Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland bestellt und im Tierlabor des Verfügungsgebäudes der Universität Tübingen in Gruppen à 3 Tieren gehalten. Nach Eintreffen der Tiere wurden diese über eine Woche in ihrer neuen Umgebung belassen, um eine mögliche Beeinflussung der Experimente durch den Transport zu verhindern. Die Haltung der Tiere sowie die Tierexperimente selbst erfolgten nach den Vorgaben des Regierungspräsidiums Tübingen. Dies beinhaltete eine standardisierte Umgebung mit einem Tageszyklus von jeweils 12 Stunden Licht bzw. Dunkelheit. Die Tierversuchsnummer lautete N3/03.

3.1.3 Anästhesie

Alle Versuchstiere wurden 5 – 10 min vor der Bestrahlung bzw. Scheinbestrahlung mit einem Gemisch aus 0,7 ml Ketamin (Ketanest® 50 mg/ml) und 0,4 ml Xylazin (Rompun® 0,2 mg/ml) anästhetisiert. Der durch Ketamin (Esketamin) bewirkte Bewusstseinszustand wird als "dissoziative Anästhesie" bezeichnet, d.h. gewisse Systeme des ZNS werden gehemmt, andere erregt. Einerseits werden Schmerzempfindung und Bewusstsein aufgehoben, andererseits führen die erregenden Eigenschaften von Ketamin zu motorischer Starre (Katalepsie). Xylazin ist ein α -2-Rezeptoragonist, der einen sedativ-hypnotischen Zustand, verbunden mit einer allgemeinen Muskelrelaxation und Analgesie, bzw. Anästhesie erzeugt. Da aus vorherigen Studien (Wei et al 2000) bekannt ist, dass Egr1 in der Verarbeitung von Schmerz und Stress, bzw. Angst eine wichtige Rolle spielt und dieser Einfluss möglichst klein gehalten werden sollte, schien diese etablierte Betäubungsmethode als sinnvoll und passend für diese Art von Untersuchungen.

Die Anästhesie wurde mit einer feinen Kanüle durch eine Hautfalte im unteren Abdomen der Tiere intraperitoneal injiziert. Die Ratten wurden dabei mit Hilfe eines Tuches vorsichtig umhüllt und gehalten. Die Narkose hielt für den Zeitraum von ungefähr 45 - 60 min an und die Tiere zeigten danach keine sichtbaren Beeinträchtigungen oder Verhaltensauffälligkeiten.

3.1.4 Bestrahlung

In der Bestrahlungseinheit wurden 15 Tiere in fünf Gruppen (je n = 3) einer einzeitigen γ -Ganzkörperbestrahlung von 10 Gy ausgesetzt. Die Bestrahlung wurde unter gleichen und standardisierten Bedingungen (Bestrahlungszeit: 1 min, 18 sec) mit einer γ -Zelle (Cs137, Gammacell 1000, Nordion, Kanata, Canada) durchgeführt. Die Lage der Tiere im Bestrahlungsgerät war dabei ohne Belang, da sich die Metallhülse, in die die Tiere zum Bestrahlungsvorgang gelegt wurden, gleichmäßig um die Bestrahlungsquelle im Gerät bewegte und deswegen eine einheitliche Verteilung der effektiven Strahlendosis

gewährleistet war. Zwei Kontrollgruppen mit je 3 Tieren wurden identisch zu den bestrahlten Tieren anästhetisiert, für die gleiche Zeit in die Bestrahlungshülse für eine Scheinbestrahlung überführt und nach 20 min und 2 Stunden dekapitiert. Durch ein genaues Protokoll und ein zeitlich versetztes Arbeiten war gewährleistet, dass die Tiere innerhalb einer Gruppe auch exakt den gleichen Behandlungszeiträumen unterworfen waren und sich keine Ungleichheiten einstellten. Abgesehen von den Gruppen, die nach 20 min getötet wurden, erwachten die übrigen Tiere nach etwa 45 min und erhielten abhängig von der festgelegten Überlebenszeit eine zweite Anästhesie vor der Dekapitation. Dies sollte gewährleisten, dass potentielle äußere und innere Störeinflüsse so gering wie möglich gehalten wurden. Alle Tiere, die länger als 20 min überlebten, erwachten ungefähr nach gleichen Zeiträumen und verweigerten nachfolgend weder Fressen noch Trinken.

3.1.5 Dekapitation und Präparation

Die Ratten wurden in Gruppen von je 3 Tieren nach 20 min, 2 und 6 Stunden, einem und drei Tagen nach der Bestrahlung mit Hilfe eines Fallbeils/Guillotine für Nagetiere enthauptet. Anschließend wurden Haut und Weichteile des Kopfes vom Schädel gelöst und die Kalotte durch den Porus acusticus externus beidseits mit einer spitzen Schere eröffnet und möglichst weiträumig entfernt. Das Gehirn wurde stumpf angehoben und durch Abtrennung der Hirnnerven und des oberen Halsmarks komplett entnommen und schnellstmöglich auf eine mit Eis gekühlte Petrischale überführt. Für die exakte Präparation wurden koronare Gehirnscheiben von 3 - 5 mm Dicke nach einer Beschreibung zur schnellen regionenbezogenen Gewebeentnahme hergestellt (Heffner et al 1980). Als Orientierung dienten makroskopische Landmarken auf der Unterseite des Rattenhirns. Die Schnittebenen sind in Abb. 3 a,b mit den Nummern 1-4 gekennzeichnet. Nach dieser Methode erhielt man für die Immunhistochemie koronare ZNS-Regionen vom Frontalen (Schnittebene 1, siehe Abb. 3 c) und Parietalen Kortex (Schnittebene 3, siehe Abb. 3 d) mit angrenzender Hippokampusformation, Gyrus dentatus und Marklager wie ebenfalls einen repräsentativen Schnitt durch das Kleinhirn (Schnittebene 4).

Bei der Auftrennung des Materials für molekularbiologische Untersuchungen mit Western blot, bzw. PCR-Analysen wurden Gewebefraktionen gebildet von Frontalem

und Parietalem Kortex ohne Balken und Marklager, isolierten hippocampalen Regionen und ebenfalls vom Kleinhirn. Dafür wurde die zusätzliche Schnittebene 2 benötigt. Das hippocampale Gewebe ließ sich dabei makroskopisch gut von Kortex und Marklager unterscheiden und mit stumpfen Instrumenten voneinander trennen. Zusätzlich wurden als Positivkontrollen Gewebe aus Lunge und Milz der Tiere entnommen und ebenfalls asserviert.

Alle Proben für die Western blot, bzw. PCR Analysen wurden sofort in Kryoröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff fixiert und bei -70°C bis zur Isolierung eingefroren. Die Schnitte für die Immunhistochemie wurden in entsprechenden Einbettkörbchen asserviert und in Formalin aufbewahrt.

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 Fixierung und Vorbehandlung

Die koronaren Gewebeschnitte und die Gewebe aus Lunge und Milz wurden über Nacht in 4,5% Formalin (Roti-Histofix, Roth, Karlsruhe, Germany) fixiert, nach Standardprozeduren alle entnommenen Organe/Proben eines Tieres in einen Paraffinblock eingebettet, mit Hilfe eines Mikrotoms in 3 µm dicke Sektionen geschnitten und auf beschichteten Objektträgern bei 55°C getrocknet. Für die folgende Entparaffinierung wurden die Schnitte 2 x 15 min in Chloroform und danach je 2 min in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100%, 96%, 70%, 5 min A.d.) behandelt. Die Antigendemaskierung wurde mit Mikrowellenbehandlung durchgeführt (15 min bei 600W in 0,01M Tris-HCl pH8) mit 30 min Abkühlung. Anschließend wurde die Aktivität der endogenen Peroxidase durch 15-minütige Inkubation in 1,5% H₂O₂ in Methanol blockiert und 15 min mit Leitungswasser gespült. Unmittelbar vor dem Primärantikörper wurden unspezifische Ladungsunterschiede im Gewebeschnitt durch Inkubation mit 10% Schweineserum (Biochrom, Berlin, Germany) in TBS für 15 min ausgeglichen.

3.2.2 Antikörper

Als Primärantikörper wurden verwendet:

- rabbit polyclonal anti-Egr1 gegen das carboxyterminale Ende des Egr1-Proteins (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA, C-19 / sc-189, 200 µg/ml, Verdünnung 1:200);
- rabbit polyclonal anti-Egr1 gegen das carboxyterminale Ende des Egr1-Proteins (Santa Cruz, sc-110, 200 µg/ml, Verdünnung 1:200);
- rabbit polyclonal anti-Egr1 gegen das aminoternale Ende des Egr1-Proteins (AS 24 – 37, Active Motif, Rixensart, Belgium, 100 µg/ml, Verdünnung 1:200);
- mouse monoclonal anti-rat-CD68 (Marker für Monozyten / Makrophagen, Serotec, Düsseldorf, Germany, ED-1; 0,5 mg/ml, Verdünnung 1:100);
- mouse monoclonal anti-human-EMAP II (Marker für aktivierte Mikroglia, BMA, Augst, Switzerland, 1 mg/ml, Verdünnung 1:100);
- mouse monoclonal anti-rat-GFAP (Marker für Astrozyten, Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany, 1 mg/ml, Verdünnung 1:500) und
- mouse monoclonal anti-CNPase (Marker für Oligodendrozyten, Chemicon Intern., Temecula, USA, 1 mg/ml, Verdünnung 1:100).

Als Sekundärantikörper wurden verwendet: swine/rabbit biotinylated anti-rabbit/mouse Ig/Biotin (Dako Cytomation, Hamburg, Germany, Verdünnung 1:400). Die Gewebeschnitte wurden mit den Primärantikörpern in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert, während die Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 1 Stunde einwirkten. Nach jeder Inkubation wurden Waschschrirte von 10 min mit TBS zwischengeschaltet. Die Antikörperkomplexe wurden mit je 30 min mit der Avidin-Biotin-Methode (Avidin-biotinylated Complex, StreptABComplex/HRP, Dako) verstärkt und mit DAB (Diaminobenzidin) als Chromogen entwickelt und sichtbar gemacht. Danach folgte eine kurze HE-Gegenfärbung (Mayer's Hämalaun & 0,1% Eosin) mit anschließender aufsteigender Alkoholreihe und 2 x 15 min Einwirken in Xylol vor dem Einbetten in alkohollöslichem Eindeckmittel.

Negativkontrollen für das Egr1-Antiserum wurden einerseits mit der IgG-Fraktion vom Kaninchen (Dako, 15,5 g/l) in derselben Stoffkonzentration wie der Primärantikörper und

unter den gleichen Bedingungen ausgeführt. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle eine Immunopräzipitation mit dem korrespondierenden Blockingpeptid C-19 (Santa Cruz, 100 µg / 0,5 ml) in zehnfachem Überschuss (w/v) mit dem Primärantikörper in einer Verdünnung 1:500 durchgeführt. Das Gemisch aus Antikörper und Blockingpeptid wurde für 4 Stunden bei 4 °C bei permanenter Durchmischung auf einem Schwenktisch mit halbstündlichem Vortexen inkubiert. Um die Funktionalität des Antikörpers unter diesen Bedingungen zu verifizieren, wurde unter denselben Behandlungsbedingungen Primärantikörper in gleicher Verdünnung simultan inkubiert und als interne Positivkontrolle verwendet.

Als Negativkontrolle für die monoklonalen Antikörper (CD68, GFAP und CNPase) diente irrelevantes Isotypen-IgG gegen *Fumigatus niger* von der Maus (IgG_{1/2} Dako negativ control, 100 mg/l) in derselben Konzentration und unter denselben Bedingungen wie bei den Primärantikörpern. Die nachfolgenden Protokollschritte wurden identisch zu den oben beschriebenen Färbungen durchgeführt.

Als Positivkontrollen dienten die im Paraffinblock, bzw. in den Gewebeschnitten enthaltenen Proben des Lungen- und Milzgewebes, die somit jeweils vom gleichen Tier auf dem entsprechenden Objektträger mitbehandelt wurden. Aus vorherigen Untersuchungen war eine kräftige Anfärbung von sowohl Lungen- wie auch Milzgewebe durch die Antikörper gegen Egr1 und Makrophagen bekannt. Die Antikörper gegen CD68 und EMAP II sind gegen Epitope gerichtet, die nicht spezifisch für Mikroglia sind, sondern die alle Zellen der monozytären bzw. der Makrophagenreihe in einem Aktivierungsstadium aufweisen.

Doppelfärbungen (Egr1/CD68, Egr1/GFAP und Egr1/CNPase) wurden mit Daco EnVision Doublestaining Kit ausgeführt. Dabei wurde den Instruktionen und Empfehlungen des Herstellers gefolgt und die Chromogene *DAB* und *Fast Red* verwendet. Die Egr1-Färbung mit *Fast Red* wurde vorangestellt und unter demselben Protokoll ausgeführt bis einschließlich die Inkubation des Sekundärantikörpers. Anschließend wurde 30 min ein Alkalische Phosphatase-Polymergemisch (AP) inkubiert und direkt folgend mit *Fast Red* entwickelt. Nach einem Blockierungsschritt und unter Aussparung einer erneuten Antigendemaskierung erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Entsprechend

schloss sich eine 10-minütige Inkubation mit HRP-Polymer (Meerrettichperoxidase) und die Entwicklung mit DAB als Chromogen an. Es wurde direkt ohne HE-Gegenfärbung mit einem wasserlöslichen Eindeckmittel abgeschlossen. Als Negativ- und Positivkontrollen dienten dieselben Seren und Gewebe wie bei den singulären Färbungen.

3.2.3 ABC-Färbeprotokoll

1. Entparaffinierung:

- 2 x 15 min in Chloroform
- 2 x 2 min in 100% Ethanol
- 1 x 2 min in 96% Ethanol
- 1 x 2 min in 70% Ethanol
- 1 x 5 min in Aqua dest.

2. Antigendemaskierung mit Mikrowellenbehandlung bei 600 W über 15 min in 0,01 M TBS mit 30 min Abkühlung, 5 min in A.d.

3. Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit 1,5% H₂O₂ in Methanol für 15 min, anschließend spülen mit fließendem Wasser für 5 min, 5 min in A.d. wässern.

4. Ladungsausgleich mit 100 µl pro Schnitt 10% Schweineserum in TBS für 15 min, anschließend nicht spülen, Überschuss nur abklopfen.

5. Primärantikörperinkubation bei 4°C über Nacht für polyklonale Antikörper, bei Raumtemperatur für 1 Stunde für alle monoklonalen Antikörper, anschließend 10 min wässern in TBS.

6. Sekundärantikörperinkubation bei RT über 30 min, anschließend 10 min wässern in TBS.

7. Avidin-Biotin-Komplex: für 1 ml Ansatz je 5 µl Avidin und Biotin in 990µl TBS lösen und bei RT über 30 min inkubieren, anschließend 10 min wässern in TBS.

8. DAB-Entwicklung: 70 mg DAB in 180 ml A.d. mit 20 ml Substratpuffer und 200µl 30% H₂O₂, filtrieren, nach mikroskopischer Kontrolle ca. 1-2 min entwickeln, 5 min spülen mit fließendem Wasser, 5 min in A.d. wässern.

9. HE-Gegenfärbung: 5-10 sec in Hämalaun, anschließend 10 min spülen mit Leitungswasser, 5-10 sec in 1% Eosin in 70% Ethanol, anschließend 10 min spülen mit Leitungswasser, kurz in A.d.

10. Entwässerung:

- 1 x 2 min in 70% Ethanol
- 1 x 2 min in 96% Ethanol
- 2 x 2 min in 100% Ethanol
- 2 x 15 min in Xylol

11. Eindecken in alkohollöslichem Medium.

3.2.4 Doppelfärbeprotokoll mit Daco EnVision Doublestaining Kit

1.- 6. wie in ABC-Färbeprotokoll mit polyklonalem anti-Egr1-Erstantikörper C-19.

7. Markiertes AP-Polymer: Inkubation für 30 min mit anschließend 5 min wässern in TBS.

8. Entwicklung mit Fast Red als Chromogen unter mikroskopischer Kontrolle für 20 min, 5 min spülen in TBS.

9. Blockieren des ersten Färbeschrittes mit dem Doppelfarbblock für 5 min, anschließend 5 min spülen in TBS.

10. Ladungsausgleich wie unter Punkt 4 des ABC-Färbeprotokolls.

11. Zweitantikörperinkubation mit monoklonalen anti-GFAP/CD68/CNPase-Antikörper bei RT über 30 min, anschließend 5 min wässern in TBS.

12. Markiertes HRP-Polymer: Inkubation für 30 min mit anschließend 5 min wässern in TBS.

13. Entwicklung mit DAB als Chromogen für 4-6 min unter mikroskopischer Kontrolle, 5 min spülen in TBS.

14. Eindecken in wasserlöslichem Medium.

3.2.5 Stammlösungen

TBS-Waschpuffer 10x (Tris base buffered saline) :

60,6 g Tris Base + 163,6 g NaCl auf 2 l mit A.d. auffüllen, pH 7,5

0,01 M TBS-Mikrowellenpuffer 10 x :

15,8 g Tris Base auf 1 l A.d. auffüllen, pH 8

Substratpuffer für DAB-Ansatz 10 x :

21 g Zitronensäure-Monohydrat + 34 g Imidazol + 29,2 g NaCl

auf 500 ml mit A.d. auffüllen, pH 7.0

3.3 Mikroskopie

3.3.1 Regionen

Durch Untersuchungen im Vorfeld konnte kein signifikanter Unterschied in der Immunoreaktivität sowohl von Egr1 als auch von CD68 zwischen den beiden Hemisphären gefunden werden. Die Zuordnung, an welcher Hirnhälfte die Auswertung durchgeführt wurde, erfolgte zufällig. Die folgenden histologischen Regionen der koronaren Hirnschnitte wurden für die Immunhistochemie untersucht (siehe Abb. 3 c,d und 4 a, histologische Übersichts- und Detailaufnahmen sind auch in Abb. 5 dargestellt): Frontaler und Parietaler Kortex (FK, PK); Hippokampales *Cornu ammonis* (CA 1,2,3); Hippokampaler Gyrus dentatus (GD); weiße Substanz im Corpus callosum (CC), Hilus des Hippocampus (HH), um den Seitenventrikel (SV, periventrikulär); die verschiedenen Schichten des Kleinhirns.

Nach Erhebung der Rohdaten in den jeweils einzelnen Arealen wurden die Absolutwerte in größere zusammenhängende Regionen subsummiert (siehe Abb. 4 a). Beispielsweise wurden Frontaler und Parietaler Kortex als eine Entität untersucht (Kortex zusammen), desgleichen die hippokampale Region CA 1,2 und 3 gemeinsam, CA 1,2,3 und Gyrus dentatus, die gesamte weiße Substanz im Großhirn (Corpus callosum, periventrikulär und im hippokampalen Hilus) und letztlich die Entität „Gesamtgewebe“, die sich aus allen kortikalen, hippokampalen und den Bereichen aus der weißen Substanz inklusive des zerebellären Stratum moleculare et medullare zusammensetzte. Diese Zusammenfassung erfolgte durch Summation der absoluten Rohdaten und Relation zu der gemeinsamen Fläche.

3.3.2 Zählmethode

Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland). Unter 400-facher Vergrößerung wurde mit Hilfe eines Zähllokulars (Vanox AHB3, Olympus, Hamburg, Deutschland) Zellen pro Fläche ausgezählt. Das Okular besaß ein zentrales Zählfeld (siehe auch Abb. 3e) bestehend aus 100 Quadraten mit einer Kantenlänge von je $0,03 \text{ mm} = 30 \text{ }\mu\text{m}$, die Länge des Zählfeldes betrug also $0,3 \text{ mm} = 300 \text{ }\mu\text{m}$ und eine Fläche von $0,3^2 \text{ mm}^2 = 0,09 \text{ mm}^2$. Nur in Regionen geringer Zelldichte wurde ein Zählfeld komplett ausgezählt. In allen anderen Regionen wurden repräsentativ lediglich die beiden äußeren Streifen von je 10 Quadraten (siehe Abb. 3 e, entspricht 20 % eines kompletten Zählfeldes) ausgezählt und die Ausrichtung so gewählt, dass sie möglichst der histologischen Orientierung folgten. In kortikalen Bereichen fing die Zählung in einem Zählfeld unmittelbar unterhalb der Rindenoberfläche an mit Ausrichtung der beiden repräsentativen Streifen auf das Marklager. Mehrere Zählfelder wurden entlang dem axonalen Verlauf daran angeschlossen bis zum Erreichen der weißen Substanz des Corpus callosum. Es wurden auf diese Weise 3 - 6 kortikale Areale innerhalb des Koronarschnitts von der Mantelkante bis in den Bereich über dem Seitenventrikel ausgewählt und diese entlang der Rindenarchitektur ausgezählt (s. Abb. 3 c,d: FK 1 – 3, PK 1 - 6).

Die Regionen Hippocampus, Gyrus dentatus und Corpus callosum wurden in ihrer gesamten Länge durchgemessen und die repräsentativen Streifen innerhalb des Zählfeldes senkrecht zum Verlauf der Zellorientierung, bzw. zum Faserverlauf gewählt, um Unterschiede in der Zelldichte möglichst klein zu halten. Außerdem wurden dabei die repräsentativen Streifen außen und in der Mitte des Zählfeldes gewählt, damit beim Weiterrücken des Feldes jeweils gleiche Abstände in der Abfolge eingehalten und nicht zwei direkt benachbarte Streifen charakterisiert wurden. Die hippokampalen Regionen CA 1 und CA 2 wurden zusammengefasst und bis kurz vor den Scheitelpunkt ausgedehnt, um eine klare Abgrenzung zu CA 3 zu erreichen und die gewonnenen Daten möglichst vergleichbar zu machen (siehe Abb. 3 d und 5 c). Die Regionen im Hilus des Hippokampus und um den Seitenventrikel wurden aufgrund der geringen Zelldichte in kompletten Zählfeldern ausgewertet. Dies geschah auch in den Zellschichten des

Kleinhirns Stratum moleculare, granulosum et medullare. Angesichts der großen Zelldichte im Stratum granulosum wurden nur die positiv gefärbten Zellen berücksichtigt und die Gesamtzellzahl pro Fläche gemittelt und festgelegt. In der Purkinjellschicht wurde die Zählung nach Fläche aufgegeben zugunsten der Beschreibung von 100 benachbarten Purkinjellen.

3.3.3 Kategorien und Entitätenbildung

Bei der Charakterisierung der Egr1-Färbungen (siehe Abb. 4 b) wurde vorerst zwischen Neuronen und Glia differenziert und in einem zweiten Schritt zwischen keiner Anfärbung (negativ) und einer zytoplasmatischen, einer nukleären oder einer kombinierten Lokalisation der Immunoreaktivität. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass man nicht nur Aussagen über die absolute Verteilung der positiv gefärbten Zellen pro Flächeninhalt machen konnte, sondern auch unter Einbeziehen der nicht gefärbten Zellen Informationen über die relative Verteilung und die Gesamtzellzahl erhalten konnte. Zusätzlich wurden alle Egr1⁺ gefärbten Zellen auch in eine gemeinsame Entität zusammengefasst – unabhängig von der subzellulären Lokalisation der Immunoreaktivität (z.B. Glia positiv Egr1 gefärbt). So erfolgte eine Einteilung einerseits in Abhängigkeit von der Fläche und andererseits von der Gesamtzellzahl. Als zusätzliche Information wurden Verhältnisse ermittelt, die die beiden subzellulären Lokalisationen zueinander in Relation setzten (Glia zytoplasmatisch / nukleär) oder Neurone und Glia miteinander korrelierten (Neurone gesamt / Glia gesamt). Alle unterschiedliche Kategorien der Egr1-Lokalisation inklusive der Verhältnisse sind in Abb. 4 b dargestellt.

Mit Hilfe der Doppelfärbungen (Egr1/GFAP, Egr1/CNPase und Egr1/CD68) sollten die glialen Egr1⁺ Zellen weiter in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia/Makrophagen charakterisiert werden.

Anhand der CD68-Färbung (siehe Abb. 4 c) wurden die positiv gefärbten Zellen einmal räumlich unterschieden als *um die Gefäße liegend* (perivaskulär) oder *ohne Gefäßanbindung* (parenchymal). Zusätzlich wurde morphologisch differenziert zwischen einerseits rundlichen, bzw. „amöboiden“ und andererseits mehr länglichen, bzw. „ramifizierten“ Zellen mit kräftigen Verzweigungen (siehe Abb. 1 b). Auch hier

wurden zusammengefasste Entitäten gebildet wie z.B. alle CD68⁺ Zellen unabhängig von ihrer Lokalisation oder Morphologie (CD68 positiv gesamt). Ebenfalls wurden Verhältnisse analysiert zwischen den unterschiedlichen Lokalisationen (perivaskulär / parenchymal) und den morphologischen Phänotypen (amöboid / ramifiziert). Auch alle Kategorien der CD68-Lokalisation sind in Abb. 4 c dargestellt. Aus Vereinfachungsgründen wurde auf die quantitative Auswertung des frontalen Kortex verzichtet.

3.4 *Statistische Verfahren*

Die Rohdaten aus den immunhistochemischen Zählungen beinhalteten einerseits absolute Werte in Relation zur zugrundeliegenden Fläche (z.B. gliale Zellen zytoplasmatisch positiv für Egr1 pro mm²) und andererseits relative Werte, die in Zusammenhang mit der Gesamtzellzahl innerhalb einer ausgezählten Fläche standen (z.B. Glia zytoplasmatisch positiv für Egr1 in % aller glialen Zellen). Die Rohdatensätze wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk-W-Testes im Statistikprogramm *JMP IN*, Version 5.1 (SAS Institute Inc., NC, USA) auf ihre Normalverteilung überprüft. Um beide Datensätze sekundär einer Normalverteilung möglichst anzunähern, wurden die absoluten Werte logarithmiert und alle anschließenden statistischen Tests danach durchgeführt. Die Gleichung für die Transformierung der absoluten Rohdatenwerte lautete (mit „Entität pro mm²“ als Beispiel):

$$(\text{Entität} / \text{mm}^2)_{\text{transformiert}} = \ln ((\text{Entität} / \text{mm}^2) + 1)$$

Dabei handelte es sich bei dem Logarithmus \ln um den „natürlichen“ Logarithmus, definiert als Umkehrfunktion von e^x . Da im Falle keiner gezählten Immunoreaktivität der Absolutwert gleich 0 wäre und der Wert 0 nicht logarithmiert werden kann, wurde zum absoluten Rohdatenwert die Zahl 1 addiert.

Im Falle der relativen Rohdatenwerte wurde der Datensatz bestehend aus Werten zwischen 0 und 1 durch eine Arcus-Sinus-Wurzeltransformation der Normalverteilung angenähert. Die Gleichung dafür lautete (mit „Entität in %“ als Beispiel):

$$(\text{Entität in \%})_{\text{transformiert}} = \arcsin \left(\sqrt{\text{Entität in \%}} \right)$$

Box-Cox-Transformation bestätigte, dass durch die jeweilige Transformation der Rohdaten eine Normalverteilung erreicht wurde.

Die so gewonnenen sekundären Datensätze wurden mit Hilfe des Statistikprogramms in unterschiedlichen Subgruppen untersucht. Beispielsweise wurde zu Beginn der Einfluss der zweizeitigen Anästhesie auf die immunhistochemischen Ergebnisse geprüft. Dafür wurden zwei Gruppen gebildet: alle Tiere, die nur eine Anästhesie erhielten und nicht wieder erwachten, also die Tiere, die 20 min überlebten (unabhängig von der Bestrahlung, n = 6) und dem gegenüber alle restlichen Tiere, die zweimal Anästhesie verabreicht bekamen (n = 15). In einer anschließenden Untersuchung wurde zwei Gruppen miteinander verglichen: alle bestrahlten Tiere (unabhängig von der Überlebenszeit, n = 15) gegen alle Kontrolltiere (n = 6). Erst nach Auswertung dieser Daten mit den entsprechenden signifikanten Ergebnissen wurden die 7 unterschiedlichen Versuchsgruppen miteinander verglichen, also jeweils alle bestrahlten Gruppen (je n = 3) gegen die beiden Kontrollgruppen (ebenfalls je n = 3).

Innerhalb der verschiedenen Gruppen (unabhängig von ihrer Einteilung) wurden die Mittelwerte in Form des geometrischen Mittels aus den einzelnen Werten mit Hilfe einer *One-way ANOVA* gebildet. Das Signifikanzniveau (Prob < F, p-value, ANOVA) für einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen musste dabei kleiner gleich 0,05 sein (dieser p-value wurde in Text und Tabellen angegeben). In einem zweiten Schritt wurde mit einem *Post-Hoc-Test (all pairs Tukey-Kramer)* dieser Unterschied aus der ANOVA für die jeweiligen Gruppenvergleiche untersucht und die gegen Mehrfachvergleiche adjustierten p-values ermittelt. Wenn *beide* statistischen Tests übereinstimmend einen Unterschied feststellten, fand dieser Unterschied als *signifikant* Eingang in den Ergebnisteil und wurde in Text und Abbildungen verwendet.

Die so gewonnenen Ergebnisse wurden nach Feststellung des Mittelwertes und des zugehörigen oberen bzw. unteren 95%- Konfidenzintervalles innerhalb einer Gruppe wieder rücktransformiert. Wenn nach erfolgter Rücktransformation Werte für das untere 95%-Konfidenzintervall kleiner Null entstanden, so wurde dieses Intervall gleich Null gesetzt.

3.5 *Western blot Analysen*

3.5.1 *Proteinisolierung*

Die bei -70°C gelagerten Gehirnproben wurden einerseits mit Isolierungsreagenz Trizol bearbeitet, um dabei in einem Ansatz für molekularbiologische und Western blot Verfahren DNA, mRNA und die Proteinfraction zu erhalten. Hierfür wurden jeweils 50 mg Gewebe in einem Dounce-Homogenisator mit Trizol Reagenz vorsichtig lysiert. Da die Isolierung mit Trizol unter anderem Chloroform-Derivate beinhaltet, kommt diese Art der Proteinaufreinigung einer starken Denaturierung gleich. Vor allem Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine werden dadurch und durch die Resuspension des Proteinpellets möglicherweise grundlegend verändert. Deshalb schien es ratsam, eine zusätzliche, möglichst milde Form der Proteinisolierung im Western blot zu verwenden. Außerdem war die Isolierung von Protein in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraction nach dem Trizol-Protokoll nicht möglich. Also wurde eine etablierte Methode der Zellfraktionierung verwendet, die ohne Verwendung von reduzierenden Agenzien arbeitete.

Der Homogenisator wurde nach jedem Isolierungsschritt 2 x mit 70% Ethanol und 2 x mit A.d. gespült, mit Anti-RNase behandelt und nochmals mit A.d. gespült, um mögliche Verunreinigungen minimal zu halten.

3.5.2 Gelherstellung

Sammelgel 4% (2 ml pro Gel)		Trenngel 10% (5 ml pro Gel)	
Aqua dest.	1,15 ml	Aqua dest.	2 ml
30% Acrylamid/ Bisacrylamidmischung	0,33 ml	30% Acrylamid/ Bisacrylamidmischung	1,7 ml
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	0,5 ml	1,5M Tris-HCl, pH 8,8	1,3 ml
10% SDS (w/v)	20 µl	10% SDS (w/v)	50 µl
10% APS (Ammoniumpersulfat, w/v)	20 µl	10% APS (Ammoniumpersulfat, w/v)	50 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	2 µl	TEMED	2 µl

Einen Tag vor der Elektrophorese musste das Auftrenngel gegossen werden. Das Trenngel wurde vor der Auspolymerisierung für 20 min mit einer Wasserstrahlpumpe vakuumisiert und nach Zugabe von APS und TEMED in die 8 x 8 cm großen Minigelvorrichtungen gegossen. Das Trenngel wurde mit 100 µl wassergesättigtem Butanol überschichtet um eine möglichst scharfe Trennlinie zu erhalten. Nach 45 min Auspolymerisierung wurde das Butanol entfernt, gespült und das Sammelgel daraufgegossen. Der obere Rand des Trenngels und der untere Rand der Probenkämme ließen eine etwa 1 cm große Laufstrecke im Sammelgel frei, die die Proteinproben während der Elektrophorese vor Eintreffen ins Trenngel durchmessen mussten. Die Auspolymerisierung erfolgte ebenfalls über 45 min und das fertige Gel wurde im Kühlschrank (in feuchter, luftangeschlossener Umgebung) bis zum Gebrauch konserviert.

3.5.3 Probenaufbereitung

Nach der Trizol-Isolierung wurden die Proteinpellets für ein Gesamtvolumen von 150 µl in 135 µl 1 M Tris-HCl, pH 6,8 und 15 µl 10% SDS (entspricht zusammen 1% SDS) mechanisch zerkleinert und bei 50°C für 15 min in Lösung gebracht. Zwischendurch wurden die Proben immer wieder mechanisch suspendiert. Der grobe Zelldetritus und unlysierte Zellen wurden 3 min bei 5000 U/min abzentrifugiert. Der daraus entnommene Überstand wurde mit einer entsprechenden Menge an 6 x Lämmli-Probenpuffer versetzt und bei 90°C für 2 min (mit Unterbrechungen nach jeweils 30 sec) gekocht. Die Proben wurden nach Abkühlung in gleicher Menge und Volumen zusammen mit Hela TPA-behandeltem Nukleärem Extrakt (Active Motif, 4.7 µg/µl) als Positivkontrolle und einem Marker (Biotinylated protein ladder, Cell Signaling, Beverly, USA, 5 µg/Bahn) in die Taschen des Sammelgels eingeführt.

3.5.4 Zellfraktionierung

Stammlösungen	Konzentration	Puffer A	Puffer B
1 M HEPES, pH 7,9	23,83 g/dl	100 µl	200µl
2,5 M KCl	18,64 g/dl	40 µl	1,6 ml
0,5 M EDTA	18,61 g/dl	2 µl	20 µl
0,1 M EGTA	3,8 g/dl	10 µl	100 µl
Glycerin	-	-	1,0 ml
Aqua dest.		10 ml	10 ml
1 M DTT	15,43 g/dl	10 µl	10 µl
Proteaseinhibitor Complete Mini (Roche, Penzberg, Germany)	-	1 Tablette	1 Tablette

Für je eine Auftrennung in die zytoplasmatische und nukleäre Fraktion nach einer etablierten Methode (Merseburger et al 2005) wurden ungefähr 100 mg Gewebeprobe durch ein Zellsieb (Porengröße 40 μm) mit reichlich gekühltem PBS (Phosphate buffered saline) in ein steriles 50 ml Röhrchen gerieben. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1500 U/min und 4°C wurde das überständige PBS vorsichtig abgezogen und verworfen. Die abzentrifugierte Einzelzellsuspension wurde in 500 μl PBS erneut gelöst und in ein Eppendorfcup überführt. Nun wurde die tatsächliche Masse anhand eines gleichen Cups mit gleichem Volumen gemessen und in den folgenden Schritten mit 100 μl Puffer A und 10 μl Puffer B pro 20 mg Gewebemasse versetzt. Dafür wurde erneut für 5 min bei 1500 U/min und 4°C zentrifugiert und der PBS-Überstand abgesaugt. Das Pellet in einem entsprechenden Volumen von Puffer A resuspendiert, gevortext und für 30 - 40 min bei 4°C in einer Eisbox auf einem Schwenktisch inkubiert. Anschließend wurde 25 μl 10% NP40 zugegeben, 10 sec gevortext und sofort für 1 min bei 14.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand enthielt die zytoplasmatische Proteinfraction, die photometrisch auf ihre Konzentration bestimmt und aliquotiert wurde. Das Pellet enthielt die Kernfraction, die mit 500 μl Puffer A gewaschen und erneut für 1 min bei 14.000 U/min und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgesogen und das Pellet in 50 μl Puffer C resuspendiert, gevortext und für 1 Stunde bei 4°C in der Eisbox auf dem Schwenktisch inkubiert (dabei alle 15 min für ca. 10 sec gevortext). Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 14.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Fraktion der Kernproteine, die ebenfalls photometrisch bestimmt und aliquotiert wurde.

3.5.5 *Photometrische Proteinbestimmung*

Der Proteingehalt von vergleichbaren Proben ähnlicher Ionenkonzentration im Medium konnte relativ einfach und schnell anhand zweier Extinktionen bei unterschiedlichen Wellenlängen photometrisch vermessen werden, um die unterschiedlichen Proben zum Auftragen auf das Elektrophoresegel auf dieselbe Proteinkonzentration anzugleichen. Dabei handelte es sich um die Wellenlängen E_1 ($\lambda_1 = 235 \text{ nm}$) und E_2 ($\lambda_2 = 280 \text{ nm}$). Hierbei wurde folgende Formel verwendet :

$$C [g/l] = \frac{E_1 [235 \text{ nm}] - E_2 [280 \text{ nm}]}{2,51} \times 100 \quad \begin{array}{l} C = \text{Konzentration} \\ E = \text{Extinktion} \end{array}$$

3.5.6 SDS-Gelelektrophorese

Die vorbereiteten Gele wurden in die Elektrophoresevorrichtungen gespannt und die Elektrodentanks mit Laufpuffer befüllt. Als Vorbereitung auf die Beladung wurden die Taschen im Sammelgel mehrmals vorsichtig ausgespült und am Unterrand der Gele mögliche Luftblasen, die ein einheitliches Vorrücken der Lauffront behindern könnten, verdrängt.

Die Beladung der Gele erfolgte mit je 20 µg Protein in 15 µl Volumen für alle Proben. Die Elektrophorese wurde mit 15 mA gestartet und nach Eintritt der Proteinfrent ins Trenngel mit 45 mA (entspricht < 200 V) fortgesetzt. Nach Austritt der Bromphenolblaufront wurde für weitere 30 min bei 35 mA fortgeführt, um im Bereich zwischen 50 und 150 kDa eine größere Auftrennung zu erreichen. Kleine Proteine von weniger als 20 kDa gingen dabei verloren.

3.5.7 Immunoblotting

Blotting: Die aufgetrennten Proteine wurden jetzt in einer Semidry-Anlage vom Gel auf eine 0,45 µm dicke PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde dafür in Methanol und Transferpuffer präinkubiert und mit dem Gel bei 20 V über 2 Stunden elektrogeblottet.

Anschließend wurde das Gel mit *Comassie Blue* und die Membran reversibel mit *Ponceau S* gefärbt, um das Ergebnis des Blottingverfahrens zu überprüfen und um eventuell die Bahnen der erfolgreich geblotteten Membran anschließend getrennt bearbeiten zu können.

Blockierung: Unspezifische Ladungen auf den Membranen wurden durch 2 Stunden Inkubation in 5% Magermilchlösung in TBS-T neutralisiert. Anschließend wurden die Blots 1 x 15 und 2 x 5 min in TBS-T gewaschen.

Als Primärantikörper wurden verwendet:

- rabbit polyclonal anti-Egr1 gegen das carboxyterminale Ende des Egr1-Proteins (Santa Cruz, C-19 / sc-189, 200 µg/ml, Verdünnung 1:1000);
- rabbit polyclonal anti-Egr1 gegen das carboxyterminale Ende des Egr1-Proteins (Santa Cruz, sc-110, 200 µg/ml, Verdünnung 1:1000);
- rabbit polyclonal anti-Egr1 gegen das aminoternale Ende des Egr1-Proteins (AS 24 – 37, Active Motif, 100 µg/ml, Verdünnung 1:1000).

In einem Volumen von je 5000 ml Antikörperlösung in TBS-T wurden die Blots über Nacht bei 4 °C in einer versiegelten Kammer und bei langsamer Durchmischung auf einem Schwenktisch inkubiert. Anschließend wurden die Blots 1 x 15 und 2 x 5 min in TBS-T gewaschen.

Sekundärantikörper: Inkubation von HRP-konjugiertem Antikörper goat anti-rabbit IgG (Sigma; St.Louis, USA; 0,8 mg/ml, 1:1000) in einem Volumen von 5000 ml in TBS-T für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch. Anschließend wurden die Blots 1 x 15 und 4 x 5 min in TBS-T gewaschen.

Entwicklung: Die Blots wurden mit *ECLTM Western Blotting Analysis System* (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) mit Reagentien der Chemiluminiszenz für 1 min inkubiert, in eine Kamerabox übertragen und auf Polaroid mit unterschiedlichen Zeiten entwickelt (bei starker Anfärbung im Minutenbereich, sonst im Stundenbereich). Das positive Färbeergebnis, das ebenfalls einer Verstoffwechselung von Substraten durch die an die Antikörperkomplexe gebundene Meerrettichperoxidase gleichkam, erschien auf Polaroidphotopapier weiß auf schwarzem Hintergrund.

3.5.8 Puffer und Arbeitslösungen

Probenpuffer / Gelpuffer	
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	7,8 g/dl
1,0 M Tris-HCl, pH 6,8	15,6 g/dl
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	23,4 g/dl
30% Acrylamid / Bisacrylamid	
Acrylamid	29,2 g
Bisacrylamid	0,8 g
Aqua dest.	100 ml
6 x Probenpuffer (Lämmli)	
10 mM Tris-HCl, pH 6,8	375 µl
12% SDS	1,2 g
0,6% Bromphenolblau	60 mg
β-Mercaptoethanol	1,5 ml
Glycerin	6 ml
Aqua dest.	auf 10 ml auffüllen
5 x Laufpuffer, pH 8,3	
25 mM Tris Base	9 g
193 mM Glycin	43,2 g
0,5% SDS	3 g
Aqua dest.	auf 600 ml auffüllen
10 x Transferpuffer	
25 mM Tris-HCl	30,3 g
192 mM Glycin	144 g
Aqua dest.	auf 1 l auffüllen

für 250 ml 1 x Transferpuffer: 25 ml 10 x Puffer + 50 ml Methanol mit A.d. auf 250 ml auffüllen

TBS-T-Waschpuffer: 100 ml 10 x TBS-Stammlösung (s.o.) mit A.d. auf 1 l auffüllen und mit 1 ml Tween 20 versetzen (entspricht 0,1%).

4. Ergebnisse

4.1 Immunhistochemie

4.1.1 Auswahl der Primärantikörper

Durch zahlreiche Voruntersuchungen und die Etablierung der unterschiedlichen Primärantikörper mit Festlegung der optimalen Bedingungen wie Antigendemaskierung, Pufferauswahl, Inkubations- und Entwicklungszeiten zeigten sich qualitativ wie quantitativ unterschiedliche Resultate in der Anfärbbarkeit der Antigene.

Bei den polyklonalen Antikörpern gegen Egr1 zeigte der Antikörper von *Santa Cruz* sc-110 eine kräftige aber auch diffuse Immunoreaktivität mit deutlicher Anfärbung des Hintergrundes. Histomorphologisch stellten sich am ehesten Astrozyten als immunoreaktiv auf sc-110 dar (siehe Abb. 6 a). Es konnten auch vereinzelt Interaktionen zwischen glialen Zellen und Neuronen mit diesem Antikörper beobachtet werden (siehe Abb. 6 b). Der später entwickelte polyklonale Antikörper C-19 (ebenfalls von *Santa Cruz*) lieferte im Vergleich ein wesentlich verlässlicheres Verhältnis von kräftiger zellulärer Anfärbung und weniger unspezifischem Hintergrund. In der Literatur wurde dieser Antikörper auch bereits als spezifischer charakterisiert (Knight et al 2000). Er erwies sich zudem bei unterschiedlichen Aufbereitungsbedingungen als wesentlich stabiler.

Alle Zellspezies stellten sich mit C-19 als potentiell immunoreaktiv gegen Egr1 dar. Beide Antikörper von *Santa Cruz* zeigten in Probefärbungen beispielsweise eine reiche Immunoreaktivität von humanen neoplastischen glialen Tumorzellen (siehe Abb. 6 c,d). Sowohl durch die IgG-Fraktion aus Kaninchenserum wie durch Immunoprecipitation mit dem Zielepitop durch das *Blocking Peptide* konnte in den Negativkontrollen alle Immunoreaktivität von C-19 unterdrückt werden (siehe Abb. 6 e,f).

Die gleichzeitig zu den Negativkontrollen identisch behandelten Ansätze mit Antikörper (C-19) ohne *Blocking Peptide* zeigten auch nach dieser langen Behandlung ein qualitativ

gleiches Färbeergebnis wie der Antikörper dies unter den üblichen Bedingungen aufwies. Damit konnte gezeigt werden, dass der Antikörper C-19 von *Santa Cruz* spezifisch gegen das Epitop von Egr1 gerichtet ist und die Negativkontrolle nicht aufgrund von einer Inaktivierung des Antikörpers in seiner Funktion durch zu lange Behandlung erfolgte.

Der polyklonale Antikörper gegen Egr1 von *Active motif* lieferte zwar ein gutes Verhältnis von zellulärer Anfärbbarkeit und geringem Hintergrund, es konnten damit aber nicht alle Zelltypen gleichermaßen angefärbt werden. Als augenscheinlicher Effekt waren zahlreiche gliale Zellen vor allem in der weißen Substanz mit diesem gegen ein aminoterminal gelegenes Epitop von Egr1 gerichteten Antikörper positiv (siehe Abb. 7 a,b). Auch in kortikalen Arealen und im Kleinhirn konnten nur gliale Zellen angefärbt werden (siehe Abb. 7 c,d). Die Lokalisation der Anfärbungen war ausschließlich zytoplasmatisch – eine nukleäre Immunreaktivität war nicht festzustellen. Die angefärbten Zellen entsprachen weiterhin morphologisch und der räumlichen Anordnung nach vor allem Oligodendrozyten.

Aus diesen Gründen, die auch mit den Ergebnissen der Western blot Analysen korrelierten, wurden die quantitativen Bestimmungen der Egr1-Verteilung mit dem Antikörper C-19 von *Santa Cruz* durchgeführt, der den Vorzug besaß, sowohl nukleäres, als auch zytoplasmatisches Epitop mit relativ geringem Hintergrund zu färben. Dies ermöglichte eine quantifizierbare Aussage über die subzellulären Lokalisationen von Egr1.

Bei der Auswahl der monoklonalen Antikörper zur Darstellung der Mikroglia/Makrophagen wurden die Antikörper gegen *Endothelial-Monocyte-Activating-Polypeptide II (EMAP II, BMA)* und gegen das Oberflächenantigen CD68 auf monozytären Zellen (ED1, Serotec) in Betracht gezogen. Durch *EMAP II* konnte lediglich eine Immunreaktivität gegen Mikroglia / Makrophagen beobachtet werden, die sich um Gefäße darstellten und morphologisch überwiegend als amöboid charakterisiert werden konnten (siehe Abb. 7 e,f). Eine Veränderung durch die Bestrahlung konnte innerhalb unseres Zeitrahmens von drei Tagen nicht festgestellt werden. Eine vermehrte parenchymale Expression von *EMAP II* nach Entzündung und Läsion ließ sich ohnehin voraussichtlich erst nach zwei Wochen erwarten (Schluesener et al 1997). Das Färbemuster des Antikörpers gegen CD68 lieferte im Normalhirn und in den meisten

Bestrahlungsgruppen nur eine perivaskuläre Anfärbung. Hingegen konnten Veränderungen in der Anzahl wie auch der Morphologie der CD68⁺ Zellen in einzelnen Bestrahlungsgruppen innerhalb der allermeisten untersuchten Arealen beobachtet werden (siehe Abb. 8 a-f und allgemeiner bzw. spezieller Teil). Aus diesen Gründen wurde die quantitative Auswertung der mikroglialen / makrophagozytären Veränderungen lediglich mit dem Antikörper gegen CD68 vorgenommen.

4.1.2 Expression von Egr1 im Normalhirn der Ratte

Überblick- und Detailaufnahmen der immunhistochemischen Egr1-Färbungen sind in Abb. 5 dargestellt. In kortikalen, hippocampalen sowie in zerebellären Geweben zeigte sich eine sehr regelmäßige Verteilung von Egr1 sowohl in Neuronen wie in glialen Zellen. Das vorherrschende Muster von Egr1 war in Neuronen nukleär, wobei auch zytoplasmatische und eine kombinierte Lokalisation von nukleär und zytoplasmatisch gefunden wurde (Abb. 9 a). Egr1 ist, wie es seine Funktion als Transkriptionsfaktor vermuten lässt, in Neuronen stark exprimiert. Nukleäre Egr1⁺ Neurone in Relation zu allen Neuronen (definiert durch eine HE-Gegenfärbung) waren in den unbestrahlten Tieren (n = 6) in den folgenden Hirnarealen wie folgt verteilt (siehe Abb. 10 a): hohe Expression im Parietalen Kortex (Mittelwert, mw = 50% aller neuronalen Zellen), CA 1&2 (37%), Frontalem Kortex (35%) und geringere in CA 3 (13%) und GD (11%). Zytoplasmatische Egr1⁺ Neurone waren vor allem zu finden in: CA 3 (11%), CA 1&2 (7%), Frontalem Kortex (6%) und sehr gering ausgeprägt im Parietalen Kortex (4%) und GD (2%). Die kombinierte Lokalisation war dagegen relativ gering ausgeprägt: am höchsten im Frontalen und Parietalen Kortex (4-5%), CA 1&2 (4%) und sehr niedrig in GD (0,5 - 1,5%).

Egr1 in glialen Zellen war dagegen vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert und verglichen zur gesamten Glia (definiert durch HE-Gegenfärbung) in den unbestrahlten Tieren (n = 6) am deutlichsten exprimiert (siehe Abb. 10 b) im Corpus Callosum (24%), Frontalem Kortex (20%), GD (18%), in der zerebellären Medulla, im Hilus des

Hippocampus (17%), im Parietalen Kortex (17%), CA 3 (15%), um die Seitenventrikel (13%), CA 1&2 (13%) und im zerebellären Stratum moleculare (5%). Die nukleäre Egr1-Expression in Glia war sehr gering in Parietalem Kortex, Corpus Callosum, um die Seitenventrikel und CA 1&2 (< 1%). Egr1 in kombinierter Lokalisation war vernachlässigbar gering (< 0,3%).

Wir konnten relativ hohe basale Egr1-Expressionsraten im Kleinhirn beobachten, vermittelt auch durch die hohe Zelldichte, vor allem im Stratum granulosum (siehe spezieller Teil und Abb. 5 e,f).

4.1.3 Expression von CD68 im Normalhirn der Ratte

CD68⁺ Zellen wurden folgendermaßen charakterisiert: mit Gefäßanbindung (perivaskulär) gegenüber ohne Gefäßanbindung (parenchymal) und eine ramifizierte gegenüber einer amöboiden Zellmorphologie. Die perivaskuläre CD68 Immunoreaktivität war in den unbestrahlten Tieren (n = 6) häufiger (siehe Abb. 9 b) und in den folgenden Regionen am stärksten ausgeprägt: Hilus des Hippocampus (Mittelwert, mw = 13 CD68⁺ Zellen pro mm²), periventriculär (10/mm²), Parietaler Kortex (8/mm²), Corpus callosum (7/mm²), CA 1&2 (6/mm²), Zerebelläre Medulla (5/mm²), GD (4/mm²) und CA 3 (3/mm²). Parenchymale CD68⁺ Zellen wie folgt (siehe auch Abb. 11 a): periventriculär (5/mm²), Corpus callosum und zerebelläre Medulla (2/mm²), Parietaler Kortex, Hilus des Hippocampus und GD (je 1/mm²) und CA 1-3 (0,5/mm²). Ramifizierte CD68⁺ Zellen wie folgt (siehe auch Abb. 11 b): periventriculär (12/mm²), Hilus des Hippocampus (10/mm²), Corpus callosum und Parietaler Kortex (je 6/mm²), Zerebelläre Medulla (5/mm²), CA 1&2 und GD (je 4/mm²) und CA 3 (3/mm²). Amöboide CD68⁺ Zellen wie folgt: Hilus des Hippocampus (4/mm²), Corpus callosum, periventriculär und Parietaler Kortex (je 3/mm²), Zerebelläre Medulla und CA 1&2 (je 2/mm²) und CA 3 und GD (je 1/mm²). CD68⁺ Zellen, unabhängig von Lokalisation und Morphologie (CD68 positive Zellen) wie folgt: periventriculär (16/mm²), Hilus des Hippocampus (15/mm²),

Corpus callosum (10/mm²), Parietaler Kortex (9/mm²), Zerebelläre Medulla (8/mm²), CA 1&2 (6/mm²), GD (5/mm²) und CA 3 (4/mm²).

4.1.4 Allgemeine Effekte der Anästhesie und Bestrahlung auf die Expression von Egr1 und die Aktivierung von Mikroglia / Makrophagen im ZNS

Zuerst untersuchten wir getrennt den Einfluss der Anästhesie und der Bestrahlung auf die Expression von Egr1 und CD68 in der Summe der einzelnen Hirnareale (Gesamtgewebe). Abgesehen von den Tieren, die nach 20 min getötet wurden, erwachten alle Gruppen nach Bestrahlung oder Scheinbestrahlung von der Narkose und erhielten eine erneute Betäubung direkt vor der Dekapitation. Wir bildeten also Gruppen einerseits mit allen Tieren, die nur eine Narkose erhielten, nicht wieder erwachten und nur 20 min überlebten (1xN, n = 6) und andererseits mit all jenen Tieren, die nach Bestrahlung/Scheinbestrahlung wieder erwachten und vor der Tötung ein zweites Mal anästhetisiert wurden (2xN, n = 15). In dieser binären Einteilung ergab sich eine Korrelation zwischen der Gruppe 2xN und einer signifikant höheren Expression von Egr1 in Kernen von Neuronen im Gesamtgewebe ($p = 0,0092$; ANOVA). Sonst ergab sich keinerlei Effekt auf die Expression von Egr1 allein durch die Narkose und das erneute Aufwachen.

Auch bei der Untersuchung des Einflusses der Bestrahlung auf die Egr1-Expression wurde zuerst wie im letzten Abschnitt eine binäre Unterscheidung in zwei Gruppen vorgenommen (bestrahlte Tiere, n = 15 gegen nicht bestrahlte, n = 6). Der Effekt der Bestrahlung auf die Expression von Egr1 spielte sich dem folgend nur in den glialen Zellen ab, in Neuronen waren keine signifikanten Veränderungen feststellbar. Die Mittelwerte der nukleären Expression von Egr1 in unbestrahlten Neuronen (Abb. 10 a) waren auch nicht etwa höher im Vergleich zu den Kontrollen, sondern das Expressionsniveau war in nahezu allen untersuchten Arealen geringer als die basale Expression in den Kontrollgruppen. Abb. 9 c illustriert die unterschiedlichen Egr1-mRNA-Expressionsniveaus in bestrahlten und unbestrahlten Tieren (mit freundlicher Genehmigung von Frau Wölfel). Hier zeigte sich lediglich ein signifikanter

Abfall der langen Variante *egr1-lv* gegenüber den Kontrollen. In dieser binären Unterscheidung (bestrahlt gegen Kontrollen) ließ sich weiterhin in den meisten Hirnarealen eine ausgeprägte, signifikant höhere zytoplasmatische Anfärbbarkeit ($p = 0,0027$; ANOVA) und ein weniger ausgeprägtes, aber dennoch signifikant höheres Niveau von nukleärem Egr1 in glialen Zellen bestrahlter Tiere gegenüber den Kontrollen feststellen ($p = 0,0467$; ANOVA). Egr1⁺ Glia (unabhängig von der subzellulären Lokalisation, Glia positiv gefärbt) war ebenfalls signifikant höher in den bestrahlten Tieren gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0005$; ANOVA). Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch festzuhalten, dass die Anzahl der Egr1⁻ glialen Zellen in den bestrahlten Tieren signifikant geringer war gegenüber den Kontrolle ($p = 0,0005$; ANOVA), während sich die Gesamtzellendichte (Egr1⁺ plus Egr1⁻ Glia, Glia gesamt) in keinem anatomischen Areal durch Bestrahlung signifikant unterschied. Das Verhältnis und die absolute Verteilung von Egr1⁺ glialen Zellen war aber in den meisten Regionen nach Bestrahlung signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen. Diese globalen Effekte durch die binäre Unterscheidung (bestrahlt versus Kontrollen) konnten regelmäßig bestimmten Gruppen innerhalb der Überlebenszeiten von 20 min bis drei Tage nach Bestrahlung zugeordnet werden (siehe spezieller Abschnitt Gesamtgewebe und Tabelle 1).

Den Effekt der Anästhesie auf die Immunoreaktivität von CD68 konnte man in derselben Auswahl der Gruppen (siehe oben, 2xN und 1xN) in einer signifikant höheren perivaskulären Anfärbbarkeit in 2xN gegenüber 1xN darstellen ($p = 0,036$; ANOVA). Ebenfalls signifikant höher war in der Gruppe 2xN die Entität „*ramifiziert um Gefäße*“ ($p = 0,0465$; ANOVA).

Veränderungen durch die Bestrahlung im Gesamtgewebe konnten in einem signifikant niedrigerem Verhältnis von perivaskulärer zu parenchymaler CD68-Anfärbung in bestrahlten Tieren gegenüber den Kontrollen beobachtet werden ($mW_{\text{bestrahlt}} = 2,4 : 1$; $mW_{\text{Kontrollen}} = 5,7 : 1$; $n_{\text{bestrahlt}} = 15$; $n_{\text{Kontrollen}} = 6$; $p = 0,0016$; ANOVA). Die absolute Dichte aller CD68⁺ Zellen unabhängig von Lokalisation und Morphologie (CD68 gesamt positiv) war signifikant höher in den bestrahlten Tieren gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0266$; ANOVA). Auch in nahezu allen anderen Kategorien konnten signifikant höhere Werte gefunden werden in behandelten gegenüber unbehandelten Tieren (die Kategorie entsprach jeweils positive Zellen pro mm²): CD68-Anfärbung

parenchymal ($p = 0,0113$; ANOVA), perivaskulär ($p = 0,044$), ramifiziert ($p = 0,0006$), ramifiziert im Parenchym ($p = 0,0142$). Erwähnenswert ist auch, dass sich das Verhältnis von $CD68^+$ Zellen im Parenchym zu allen $CD68^+$ Zellen nach Bestrahlung von 15,2 auf 31,7% mehr als verdoppelte ($p = 0,0068$; ANOVA), während das Verhältnis von perivaskulären $CD68^+$ Zellen sich entsprechend verringerte. Weiterhin war die relative Häufigkeit von amöboiden $CD68^+$ Zellen um die Gefäße in den bestrahlten Tieren signifikant geringer ($p = 0,0002$; ANOVA). Diese globalen Effekte konnten ebenfalls wie im Falle von *Egr1* regelmäßig bestimmten Gruppen nach Bestrahlung zugeordnet werden (siehe spezieller Teil und Tabelle 2).

4.1.5 Spezielle Effekte der Bestrahlung auf die Expression von Egr1 in glialen Zellen und die Aktivierung von Mikroglia in verschiedenen Hirnregionen

In Übereinstimmung zu dem allgemeinen Teil, der sich mit den Effekten der Bestrahlung auf das Gesamtgewebe beschäftigte, wurde auch hier im speziellen Teil im ersten Schritt eine binäre Unterscheidung (bestrahlte Tiere, $n = 15$ gegenüber den Kontrollen, $n = 6$) in den einzelnen Hirnregionen vorgenommen. Die an dieser Stelle angeführten signifikanten Ergebnisse wurden in einem zweiten Schritt in den sieben unterschiedlichen Versuchsgruppen (abhängig vom Überleben, jeweils $n = 3$) untersucht. Zeigte sich eine Übereinstimmung, also eine Zuordnung eines Effektes auf eine bestimmte zeitliche Gruppe, so wurde dies im Text angeführt. Gleichzeitig sind diese Effekte der einzelnen Versuchsgruppen unter Angabe der Konfidenzintervalle und des entsprechenden p -values in den Tabellen 1 und 2 dargestellt. Im Text wird jeweils darauf verwiesen.

Kortikale Areale: Im Frontalen Kortex war der Anteil von zytoplasmatisch $Egr1^+$ glialen Zellen in den bestrahlten Tieren signifikant höher als in den Kontrollen ($p = 0,0423$; ANOVA). Auch der Anteil aller $Egr1^+$ glialen Zellen (unabhängig von der subzellulären Lokalisation) war in den bestrahlten Gruppen signifikant höher ($p = 0,0091$; ANOVA). In Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Bestrahlung war das Verhältnis der zytoplasmatischen gegenüber der nukleären *Egr1*-Anfärbung in glialen Zellen in den

Gruppen 2 und 6 Stunden signifikant niedriger gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1).

Im Parietalen Kortex war der Anteil von zytoplasmatisch Egr1⁺ glialen Zellen in den bestrahlten Tieren signifikant höher als in den Kontrollen ($p = 0,0126$; ANOVA). Ebenfalls war der Anteil aller Egr1⁺ glialen Zellen in den bestrahlten Gruppen signifikant höher ($p = 0,0026$; ANOVA). Abhängig von der Überlebenszeit war der absolute und relative Anteil an zytoplasmatisch Egr1⁺ glialen Zellen in den Gruppen 6 h und 1 Tag nach Bestrahlung signifikant höher gegenüber den Kontrollen und der 2 h Gruppe (siehe Tabelle 1). Auch der Anteil aller Egr1⁺ glialen Zellen war in den Gruppen 6 h, 1 Tag und 3 Tage signifikant höher gegenüber den Kontrollen und der 2 h Gruppe (siehe Tabelle 1). Der Anteil der ungefärbten glialen Zellen war dagegen in den Gruppe 6 h, 1 und 3 Tage nach Bestrahlung signifikant niedriger gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1). Im Parietalen Kortex war außerdem die Dichte an ramifizierten CD68⁺ Zellen in den bestrahlten gegenüber den Kontrollgruppen signifikant höher ($p = 0,0087$; ANOVA) und außerdem der Anteil an parenchymalen CD68⁺ Zellen 2 h nach Bestrahlung signifikant höher gegenüber den Kontrollen und den Gruppen 20 min. und 6 h nach Bestrahlung (siehe Tabelle 2).

Im Frontalen und Parietalen Kortex zusammen stellten wir ein signifikant höheres Niveau von zytoplasmatisch Egr1⁺ glialen Zellen in bestrahlten Gruppen gegenüber den Kontrollen fest ($p = 0,0091$; ANOVA). Der Anteil aller Egr1⁺ gefärbten glialen Zellen war ebenfalls in den bestrahlten Gruppen höher als in den Kontrollen ($p = 0,0011$; ANOVA). Der Anteil der ungefärbten glialen Zellen war dagegen in den bestrahlten Gruppen niedriger gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0011$; ANOVA). Im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung war das Verhältnis der zytoplasmatischen gegenüber der nukleären Egr1-Anfärbung in den Gruppen 2 und 6 Stunden signifikant niedriger gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1). Ebenfalls der Anteil aller Egr1⁺ glialen Zellen war in den Gruppen 6 h und 1 Tag nach Bestrahlung signifikant höher gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1). Der Anteil der ungefärbten glialen Zellen war dagegen in den Gruppen 6 h und 1 Tag nach Bestrahlung signifikant niedriger gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1).

Hippokampale Regionen: In den Arealen CA 1 & 2 war die zytoplasmatische Egr1 Anfärbung in glialen Zellen in bestrahlten gegenüber den Kontrollgruppen signifikant höher ($p = 0,0039$; ANOVA). Der Anteil aller Egr1⁺ gefärbten glialen Zellen war ebenfalls in den bestrahlten Gruppen höher als in den Kontrollen ($p = 0,0031$; ANOVA). Der Anteil der ungefärbten glialen Zellen war entsprechend in den bestrahlten Gruppen niedriger gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0031$; ANOVA). In Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Bestrahlung war das Verhältnis der zytoplasmatischen gegenüber der nukleären Egr1-Anfärbung in der Gruppe 1 Tag signifikant höher gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1). CD68⁺ ramifizierte Zellen waren in CA 1 & 2 der bestrahlten Tiere gegenüber den Kontrollen signifikant höher ($p = 0,0251$; ANOVA). Eine signifikant höhere CD68-Expression um die Gefäße in den bestrahlten gegenüber den unbestrahlten Tieren ($p = 0,0007$; ANOVA) konnte auf die 2 und 6 h Gruppen zurückgeführt werden (siehe Tabelle 2).

In CA 3 konnte man ein signifikant höheres Niveau der nukleär Egr1⁺ Glia in den bestrahlten gegenüber den Kontrollgruppen ($p = 0,0243$; ANOVA) beobachten. Der Anteil aller Egr1⁺ gefärbten glialen Zellen war ebenfalls in den bestrahlten Gruppen höher als in den Kontrollen ($p = 0,0136$; ANOVA). Der Anteil der ungefärbten glialen Zellen war dagegen in den bestrahlten Gruppen niedriger gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0136$; ANOVA). Die Gesamtzahl von CD68⁺ Zellen (unabhängig von der Lokalisation) war ebenfalls in CA 3 signifikant höher in den bestrahlten Gruppen ($p = 0,0282$; ANOVA), was der 2 h Gruppe zugeordnet werden konnte (siehe Tabelle 2).

In den Regionen CA 1 - 3 war die zytoplasmatische Egr1 Anfärbung in glialen Zellen in bestrahlten gegenüber den Kontrollgruppen signifikant höher ($p = 0,0127$; ANOVA). Der Anteil aller Egr1⁺ gefärbten glialen Zellen war ebenfalls in den bestrahlten Gruppen höher als in den Kontrollen ($p = 0,0037$; ANOVA). Ebenfalls konnte man ein signifikant höheres Niveau der nukleär Egr1⁺ Glia in den bestrahlten gegenüber den Kontrollgruppen ($p = 0,044$; ANOVA) feststellen. Der Anteil der ungefärbten glialen Zellen war abhängig vom zeitlichen Verlauf in der Gruppe 1 Tag nach Bestrahlung signifikant niedriger gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1). Die Gesamtzahl von CD68⁺ Zellen in CA 1 - 3 (unabhängig von Lokalisation) war ebenfalls signifikant höher in den bestrahlten Gruppen ($p = 0,0163$; ANOVA), was der 2 h Gruppe zugeordnet werden konnte (siehe Tabelle 2). CD68⁺ ramifizierte Zellen der bestrahlten Tiere waren gegenüber den

Kontrollen signifikant höher ($p = 0,0015$; ANOVA). Eine signifikant höhere CD68-Expression um die Gefäße in den bestrahlten gegenüber den unbestrahlten Tieren ($p < 0,0001$; ANOVA) konnte auf die Gruppen 2 h, 6 h und 3 Tage nach Bestrahlung zurückgeführt werden (siehe Tabelle 2).

Im Gyrus dentatus war die Dichte an nukleär Egr1⁺ Glia in den bestrahlten gegenüber den Kontrollgruppen signifikant höher ($p = 0,0237$; ANOVA). Zusätzlich war das Verhältnis von zytoplasmatischer zu nukleärer Anfärbung in glialen Zellen der bestrahlten Gruppen signifikant niedriger gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0355$; ANOVA). Die nukleäre Expression konnte der Gruppe von Tieren zugeordnet werden, die 3 Tage überlebte (siehe Tabelle 1), während das Verhältnis zytoplasmatisch zu nukleär in der 6 h Gruppe signifikant niedriger war gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1). Ebenfalls im Gyrus dentatus waren die ramifizierten CD68⁺ ($p = 0,0001$; ANOVA) und die Summe der CD68⁺ Zellen signifikant höher gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0097$; ANOVA). Ebenfalls war das Verhältnis von perivaskulärer zu parenchymaler CD68-Anfärbung in den bestrahlten Tieren gegenüber den Kontrollen signifikant niedriger zugunsten des Parenchyms ($p = 0,0493$; ANOVA). Abhängig vom zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung waren die Gesamtzahl an CD68⁺ Zellen 2 h nach Bestrahlung und die parenchymale CD68-Anfärbung ebenfalls in der 2 h Gruppe signifikant höher gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 2).

In der Summe der Regionen CA 1 - 3 und Gyrus dentatus fanden sich signifikant mehr zytoplasmatische ($p = 0,0285$; ANOVA) und nukleäre Egr1-Anfärbung in glialen Zellen der bestrahlten Gruppen gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0465$; ANOVA). Zusätzlich war das Verhältnis von zytoplasmatischer zu nukleärer Anfärbung in glialen Zellen der bestrahlten Gruppen signifikant niedriger gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0285$; ANOVA). Der Anteil aller Egr1⁺ gefärbten glialen Zellen war ebenfalls in den bestrahlten Gruppen höher als in den Kontrollen ($p = 0,0067$; ANOVA). Der Anteil der ungefärbten glialen Zellen war dagegen in den bestrahlten Gruppen niedriger gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0067$; ANOVA). In Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Bestrahlung war das Verhältnis der gesamten Neuronen zu allen glialen Zellen in der Gruppe 1 Tag signifikant höher gegenüber den Kontrollen und der 2 h Gruppe (siehe Tabelle 1). Ungefärbte gliale Zellen waren signifikant niedriger in der 1 Tages-Gruppe verglichen mit den Kontrollen (siehe Tabelle 1). Ebenfalls in diesen Regionen waren die

ramifizierten CD68⁺ (p = 0,0001; ANOVA) und die Summe der CD68⁺ Zellen signifikant höher gegenüber den Kontrollen (p = 0,0112; ANOVA). In der zeitlichen Gruppe 2 Stunden nach Bestrahlung fanden wir eine signifikant höhere Gesamtzahl aller CD68⁺ Zellen (siehe Tabelle 2). Genauso waren perivaskuläre CD68⁺ Zellen 2 h und 3 Tage nach Bestrahlung signifikant höher exprimiert gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 2).

Weißer Substanz: Im Corpus callosum konnte man bei der Egr1-Expression einen signifikanten Effekt weder durch die unterschiedliche Narkose noch durch die Bestrahlung gegenüber den Kontrollen feststellen. Um die Seitenventrikel waren signifikant lediglich mehr zytoplasmatische Egr1⁺ gliale Zellen der bestrahlten Gruppen gegenüber den Kontrollen zu beobachten (p = 0,0111; ANOVA). In der weißen Substanz des hippocampalen Hilus war der relative Anteil der zytoplasmatisch Egr1⁺ Glia signifikant höher gegenüber den Kontrollen (p = 0,0398; ANOVA). Diese drei Regionen zu einer Einheit summiert (Weiße Substanz Großhirn) zeigten ebenfalls ein signifikant höheres relatives Niveau der zytoplasmatischen Egr1⁺ Glia verglichen mit den Kontrollen (p = 0,0226; ANOVA) und eine signifikant höhere nukleäre Egr1-Anfärbung in glialen Zellen (p = 0,0327; ANOVA). Zusätzlich war das Verhältnis von zytoplasmatischer zu nukleärer Anfärbung in glialen Zellen der bestrahlten Gruppen signifikant niedriger gegenüber den Kontrollen (p = 0,049; ANOVA). Der Anteil aller Egr1⁺ gefärbten glialen Zellen war weiterhin in den bestrahlten Gruppen höher als in den Kontrollen (p = 0,0078; ANOVA). Der Anteil der ungefärbten glialen Zellen war dagegen in den bestrahlten Gruppen niedriger (p = 0,0078; ANOVA). Die signifikant höhere gliale zytoplasmatische Egr1-Anfärbung konnte der 1 Tages-Gruppe zugeordnet werden (siehe Tabelle 1). Ebenfalls war der Anteil aller Egr1⁺ glialen Zellen in der 6 h Gruppe signifikant höher gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1). Der Anteil der ungefärbten glialen Zellen war gleichzeitig in der 6 h Gruppen signifikant niedriger (siehe Tabelle 1).

Gleichzeitig war in den bestrahlten Gruppen dieser Regionen das Verhältnis der perivaskulären zur parenchymalen CD68-Immunoreaktivität signifikant niedriger zugunsten der parenchymalen Lokalisation verglichen mit den Kontrollen (p = 0,0008; ANOVA). CD68⁺ ramifizierte Zellen waren in den bestrahlten Gruppen signifikant höher gegenüber den Kontrollen (p = 0,0348; ANOVA) genauso wie die parenchymalen CD68⁺ Zellen (p = 0,0061; ANOVA). Auch die relative Verteilung von parenchymal

CD68⁺ gefärbten zu allen CD68⁺ Zellen war signifikant höher gegenüber den Kontrollen und entsprechend niedriger in der Kategorie relative perivaskuläre CD68⁺ Zellen ($p = 0,0028$; ANOVA). In der speziellen Kategorie ramifizierte CD68⁺ Zellen im Parenchym zeigte sich ebenfalls in denselben Arealen ein signifikant höheres Niveau gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0493$; ANOVA).

Kleinhirn: In der weißen Substanz des Zerebellums (Stratum moleculare) war die zytoplasmatische Egr1-Anfärbung in glialen Zellen der bestrahlten Gruppe signifikant höher gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0177$; ANOVA), der Anteil aller Egr1⁺ gefärbten glialen Zellen war ebenfalls in den bestrahlten Gruppen höher als in den Kontrollen ($p = 0,0068$; ANOVA). Die Purkinjzellschicht exprimierte reichlich Egr1, was vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert war (siehe Abb. 5 f). Durch Anästhesie oder Bestrahlung konnte kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen festgestellt werden - im Mittel wurde Egr1 hier von 80 % der Ganglienzellen exprimiert. Das Stratum granulosum des Kleinhirns erwies sich als so zellreich, dass die absolute Zelldichte dort nur abgeschätzt werden konnte. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren. Im Mittel waren 220 granulöse Neurone pro mm² in den unbestrahlten Tieren positiv Egr1 gefärbt gegenüber 460/mm² in den bestrahlten Tieren. Im Mark des Kleinhirns (Zerebellum Medulla) fand sich hingegen ein signifikant höheres Niveau an nukleärer Egr1-Anfärbung in glialen Zellen der bestrahlten Tieren gegenüber den Kontrollen ($p = 0,012$; ANOVA). Dieser Effekt konnte der 2 h Gruppe zugeordnet werden (siehe Tabelle 1). Ebenfalls in dieser Region und dieser Gruppe war der Anteil aller Egr1⁺ glialen Zellen signifikant höher gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1). Ramifizierte CD68⁺ Zellen fanden sich in der Medulla des Kleinhirns auf einem signifikant höheren Niveau in den bestrahlten Gruppen gegenüber den Kontrollen ($p = 0,0127$; ANOVA). Ebenfalls signifikant mehr CD68⁺ Zellen konnten im Parenchym der bestrahlten gegenüber den nicht bestrahlten Tieren beobachtet werden ($p = 0,0399$; ANOVA). Zusätzlich waren signifikant mehr ramifizierten CD68⁺ Zellen innerhalb des Parenchyms der bestrahlten Gruppen gegenüber den Kontrollen zu beobachten ($p = 0,0132$; ANOVA) und weiterhin war in der 2 h Gruppe die Gesamtzahl der CD68⁺ Zellen ebenfalls signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht (siehe Tabelle 2).

Gesamtgewebe: Die Effekte auf die Egr1-Expression in bestrahlten gegenüber unbestrahlten Gruppen sind im allgemeinen Teil erläutert (siehe oben). Alle Ergebnisse in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Bestrahlung werden anschließend aufgeführt und sind zusätzlich in Tabelle 1 und Abb. 12 graphisch dargestellt.

Das Verhältnis der zytoplasmatischen gegenüber der nukleären Egr1-Anfärbung in glialen Zellen war in den Gruppen 2 und 6 Stunden signifikant niedriger gegenüber den Kontrollen und der 1 Tagesgruppe (siehe Tabelle 1, Abb. 12 e). Weiter war der absolute und relative Anteil an zytoplasmatisch Egr1⁺ glialen Zellen in der Gruppe 1 Tag nach Bestrahlung signifikant höher gegenüber den Kontrollen (und der 2 h Gruppe) (siehe Tabelle 1, Abb. 12 a). Auch der Anteil aller Egr1⁺ glialen Zellen war in den Gruppen 6 h und 1 Tag signifikant höher gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1, Abb. 12 c). Der Anteil der ungefärbten glialen Zellen war dagegen in den Gruppe 6 h und 1 Tag nach Bestrahlung signifikant niedriger gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1, Abb. 12 d).

Auch die Effekte auf die CD68-Expression in bestrahlten gegenüber unbestrahlten Tieren wurden im allgemeinen Teil besprochen (siehe oben). Alle Ergebnisse in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Bestrahlung werden anschließend aufgeführt und sind in Tabelle 2 und Abb. 13 graphisch dargestellt.

Das Verhältnis von perivaskulärer zu parenchymaler CD68-Immunoreaktivität war in den Gruppen von 2 Stunden und 3 Tagen nach Bestrahlung signifikant niedriger gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 2, Abb. 13 g). Die Gesamtzahl an CD68⁺ Zellen in der 2 h Gruppe war signifikant höher gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 2, Abb. 13 h). Weiterhin waren die CD68⁺ Zellen im Parenchym der 2 h Gruppe sowohl in absoluten wie auch in relativen Werten signifikant höher gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 2, Abb. 13 a,b). Die absolute perivaskuläre CD68-Anfärbbarkeit war ebenfalls signifikant höher (siehe Tabelle 2, Abb. 13 c), während der entsprechende relative Wert signifikant niedriger lag (siehe Tabelle 2, Abb. 13 d). Die ramifizierten CD68⁺ Zellen waren signifikant höher in den Gruppen 2 h und 3 Tage nach Bestrahlung (siehe Tabelle 2, Abb. 13 e), wohingegen der Anstieg der amöboiden CD68⁺ Zellen nicht signifikant war. Auch die ramifizierten CD68⁺ Zellen innerhalb des Parenchyms waren innerhalb der 3 Tages-Gruppe signifikant höher (siehe Tabelle 2, Abb. 13 f), während

sich die entsprechende ramifizierte CD68-Anfärbung um die Gefäße auf die 2 h Gruppe nach Bestrahlung zurückführen ließ (siehe Tabelle 2).

4.1.6 Doppelfärbungen

Die gleichzeitige Anfärbung von Egr1/GFAP war erfolgreich, die Kolo-kalisation von Egr1 in Astrozyten zu zeigen. In den meisten Fällen war die Egr1-Lokalisation dabei nukleär (Abb. 14 a), konnte aber auch zytoplasmatisch nachgewiesen werden (Abb. 14 b). Die GFAP-Anfärbbarkeit schien in den bestrahlten Tieren vor allem in der weißen Substanz erhöht (nicht nachgewiesen). Die Doppelfärbungen mit Egr1/CNPase und Egr1/CD68 konnten keine klare Kolo-kalisation von Egr1 in Oligodendrozyten und Mikroglia/Makrophagen zeigen, unter anderem wegen technischen Schwierigkeiten. Das hohe zytoplasmatische Signal in der CNPase-Färbung konnte beispielsweise gegen das Chromogen der Egr1-Färbung kaum im selben Kompartiment sinnvoll abgegrenzt werden. Dennoch ließ sich eine zytoplasmatische Kolo-kalisation in Oligodendrozyten durch Doppelfärbungen vermuten (Abb. 14 c,d).

Unter anderem auch wegen des zeitlich deutlich verlängerten Protokolls für Doppelfärbungen ließen sich bei allen Färbungen signifikante Verluste in sowohl der Erst- wie auch in der Zweit-anfärbung feststellen. Die Verarbeitungsschritte sahen teilweise eine Verdoppelung der effektiven Zeit vor, in der die Gewebeschnitte inkubiert wurden. Prozeduren, die das Gewebe nicht unerheblich beanspruchen, wie z.B. Antigendemaskierung mit Mikrowellenbehandlung oder die Blockierung des Gewebes mit Wasserstoffperoxid stellen immer auch eine Limitierung dar, was die qualitativen wie quantitativen Resultate eines so sensiblen Verfahrens wie der Immunhistochemie angeht.

Morphologisch waren die Anfärbungen glialer Zellen in der einfachen Immunhistochemie (siehe Abb. 14 e) vor allen Dingen Oligodendrozyten, was man an der Zellmorphologie und der Formation der Zellverbände erkennen konnte. In sehr vereinzelt Fällen von Egr1-Färbungen konnte unter hoher Vergrößerung Zellen erkannt

werden, die in ihrer sehr feinen und fragilen Konformation am ehesten mikroglialen Zellen entsprechen (siehe Abb. 14 f). Eine eindeutige Zuordnung durch Doppelfärbung gelang jedoch aus oben genannten Gründen leider nicht.

4.2 *Western blot Analysen*

Die Untersuchungen des Egr1-Proteins mit Western blot erfolgten vorerst an ZNS-Gewebe der Ratte, das zusammen mit den Isolierungsschritten der molekularbiologischen Methoden zur Gewinnung der DNA und RNA erfolgte. In einem direkten Vergleich der Primärantikörper gegen Egr1 von *Santa Cruz* (sc-110) und *Active Motif* (Abb. 15 a) wurden hippocampales Gewebe und die Positivkontrolle in Form von Nukleärem Extrakt (Hela, Active Motif) untersucht. Hierbei waren im Muster des Antikörpers von *Active Motif* zwei Banden festzustellen, die für die hippocampalen Proben ein ungefähres Molekulargewicht von 75 und 55 kDa und für die Positivkontrolle etwa 75 und 60 kDa aufwiesen. Der Primärantikörper von *Santa Cruz* (sc-110) hingegen wies für den Hippokampus insgesamt vier Banden auf mit ungefähren Gewichten von 75, 60, 50 und 35 kDa. Die größte unter diesen mit 75 kDa konnte sogar als Doppelbande unterschieden werden. Für die Positivkontrolle konnten wie bei *Active Motif* zwei Banden gesehen werden mit 75 und 55 kDa Gewicht. Im weiteren Verlauf wurde der zweite Antikörper von *Santa Cruz* (C-19) aufgrund stabilerer und verlässlicherer Ergebnisse in der Immunhistochemie entsprechend auch bei den Western blot Analysen gegenüber *Active Motif* und *Santa Cruz* sc-110 bevorzugt.

In einer weiteren Analyse (Abb. 15 b) wurden die beiden Isolierungsmethoden direkt miteinander verglichen. Als Primärantikörper diente hier *Santa Cruz* C-19 und als Positivkontrolle wie vorher das Nukleäre Extrakt (Hela, Active Motif). Kortikales Gewebe von unterschiedlichen Versuchsgruppen wurde einerseits mit Trizol und andererseits mit der Zellfraktionierungsmethode isoliert, wobei das Gewebe eines unbestrahlten Tieres in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion aufgetrennt wurde. Die kortikalen Gewebe von Tieren, die 2 Stunden nach Bestrahlung getötet wurden, und wiederum jene von Kontrolltieren dienten als direkter Vergleich. Hier zeigte

sich erneut für die Positivkontrolle (Hela) ein ungefähres Molekulargewicht von 75 kDa. In der zytoplasmatischen Fraktion ließen sich zwei Banden abgrenzen: einmal bei über 110 kDa und bei ca. 55 kDa. Hingegen in der nukleären Fraktion ergaben sich wiederum vier zu unterscheidende Banden bei ungefähr 110, 75, 55 und etwa 40 kDa. Die größte unter ihnen bei 110 kDa war als Doppelbande zu erkennen, wobei die untere der beiden prominenter erschien. Die 75 kDa Variante war in der zytoplasmatischen Fraktion nicht enthalten und die 55 kDa Version der nukleären Fraktion war wiederum als Doppelbande erkennbar. In den mit Trizol aufgereinigten Proben sind lediglich zwei Banden erkennbar mit einem Gewicht von 55 und 35 kDa. Dabei konnte sowohl qualitativ wie quantitativ kein Unterschied im Bandenmuster zwischen bestrahltem gegenüber Kontrollgewebe festgestellt werden. Auch unterschiedliche Regionen bzw. Gewebe innerhalb des ZNS zeigten keine qualitativen Unterschiedlichkeiten.

Durch eine weiterführende Untersuchung der zytoplasmatischen und nukleären Fraktion von ZNS-Gewebe durch Western blot mit erneuter Isolierung der Proteinfraction durch beide Methoden (siehe Abb. 15 c) konnte eine ungefähr 110 kDa schwere Variante in der zytoplasmatischen und vor allem eine ca. 75 kDa schwere in der nukleären Fraktion bestätigt werden. Da man davon ausgehen musste, dass in der nukleären Fraktion aufgrund inkompletter Auftrennung immer zytoplasmatische Verunreinigungen zu finden sein würden aber nicht umgekehrt, konnte eine schwache 110 kDa Bande in der nukleären Fraktion zwar festgestellt aber vernachlässigt werden. Wurde das Gewebe mit Trizol-Reagenz, d.h. unter denaturierenden Bedingungen isoliert und aufgetrennt, so waren jeweils eine schätzungsweise 75 kDa, 55 kDa und eine 35 kDa Version zu sehen. Unter denaturierenden Bedingungen war die 75 kDa Variante nur vergleichsweise schwach ausgebildet. Besonders ins Auge sprangen die 55 kDa und die 35 kDa Banden. Andererseits war in der nukleären Fraktion eine deutliche 55 kDa Bande zu beobachten.

5. *Diskussion*

„Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.“ (Albert Einstein)

Mit diesem Zitat möchte ich den Diskussionsteil eröffnen und damit ausdrücken, dass für die Interpretation der umfangreichen Ergebnisse Konzepte notwendig sind. Diese Konzepte sollen die einzelnen Bestandteile, die in Erfahrung gebracht wurden, zu einem sinnvollen Ganzen zusammenfügen. Gleichzeitig muss man dem Umstand Rechnung tragen, dass dem Bemühen, ein möglichst genaues Bild vom Ablauf der Reaktionen nach Bestrahlung zu zeichnen, um daraus Gewissheit, bzw. Wissen abzuleiten, enge Grenzen gesetzt sind. Reaktionen des Gehirns auf Läsionen wie Bestrahlung müssen als Prozesse verstanden werden, die zeitlich sehr differenziert und gleichzeitig mit vielen unbekanntem Faktoren ablaufen. Die Auswahl von fünf unterschiedlichen Zeitpunkten in unseren Untersuchungen gleicht somit einzelnen Momentaufnahmen eines Stückes, das wir nicht kontinuierlich von Anfang bis Ende verfolgen können. Aus technischen und organisatorischen Gründen zeigen diese Momentaufnahmen zudem nur einzelne, selektive Details und können in keinem Fall alles darstellen. Das nun folgende Kapitel wird sich der Aufgabe stellen, die gesammelten Fragmente genauer zu analysieren und sie in einem stimmigen Kontext zusammenzufügen, der dem tatsächlichen so nahe wie möglich kommen soll.

5.1 Egr1 und seine Verteilung im Normalhirn

5.1.1 Subzelluläre Lokalisation von Egr1

Egr1 ist vor allen Dingen in Neuronen stark exprimiert, wie das auch durch frühere Arbeiten bekannt ist (Waters et al 1990, Mack et al 1990). In unseren Untersuchungen war das vorherrschende Färbemuster des Proteins in der Immunhistochemie überwiegend nukleär. In einem an Neuronen sehr dichten Bereich wie dem Parietalen Kortex war Egr1 in über 50% der Neurone in den Kernen exprimiert (in unbestrahlten Tieren). Im selben Areal war der Anteil der Neurone, die Egr1 im Zytoplasma aufwiesen mit 4% sehr viel geringer (ein gleich großer Anteil der Neurone zeigte Egr1 gleichzeitig in beiden Kompartimenten). Dieser Unterschied ließ sich auch in anderen Regionen beobachten. Es bestand also eine große Diskrepanz zwischen der Lokalisation im Kern, die wir für einen Transkriptionsfaktor wie Egr1 erwarteten, und einer zytoplasmatischen Anfärbung. Die zytoplasmatische Lokalisation von Egr1 ist andererseits in Übereinstimmung mit früheren *in vitro* Beobachtungen in Phaeochromozytomzellen (Day et al 1990).

Wie verhält es sich nun mit glialen Zellen? Wir konnten in unserer Arbeit eine regelmäßige Anfärbung der Glia mit Egr1-Antikörpern nachweisen. Dort färbte sich das gliale Zytoplasma an. Beispielsweise zeigte etwa ein Viertel aller glialen Zellen in dem an Glia sehr reichen Areal des Corpus callosum das Protein in diesem Kompartiment. Eine nukleäre Lokalisation war dagegen in unbestrahlten Tieren ein sehr seltenes Ereignis (weniger als 1% aller glialen Zellen) und die gleichzeitige Anfärbung in Zytoplasma *und* Kern kam praktisch nicht vor. In glialen Zellen war die subzelluläre Verteilung demnach genau gegenteilig zu den neuronalen Zellen. Wie lässt sich dieses konträre Verhältnis verstehen?

5.1.2 *Egr1 als Aktivitätsmarker*

Bereits an dieser Stelle kann festgehalten werden, dass auch im Normalhirn Egr1 in Neuronen wie Glia auf einem sehr hohen Niveau exprimiert wird. Wie bereits besprochen, stellt Egr1 in vielen Bereichen eine Vermittlerrolle dar zwischen sofortigen Stimuli, die auf eine Zelle einwirken, und Prozessen, die länger anhalten. Beispielsweise leitet Egr1 die Expression einer Reihe von Zytokinen ein und spielt in der Vermittlung von Zellteilung, synaptischer Aktivität oder Apoptose eine wichtige Rolle. Demnach ist das Niveau, auf dem eine Zelle Egr1 exprimiert, sicherlich ein Maß für den Aktivierungszustand oder die generelle Aktivität dieser Zelle. Es spricht vieles dafür, dass der nukleäre Bestandteil der Egr1-Anfärbung dem funktionellen Anteil dieses Proteins entspricht. Hier können wir demnach Egr1 als Transkriptionsfaktor bei der Einleitung der Expression von nachgeschalteten *Downstream Genen* darstellen. Depolarisierbare Zellen wie Neurone haben im nicht geschädigten Gehirn durch die synaptische Informationsvermittlung sicherlich eine größere Transkriptionsaktivität als gliale Zellen. Dass Egr1 hier eine bedeutende Rolle spielt, spiegelt sich in den oben aufgeführten Zahlen wider: die Hälfte der Neurone exprimieren Egr1 im Zellkern.

Ein anderer Tatbestand kann Egr1 als Marker für die Aktivität von Zellen weiter bestätigen: Egr1 war im Kleinhirn in den neuronalen Schichten des Stratum ganglionare et granulosum auf einem hohen Niveau exprimiert. Dabei fiel bereits in geringen Vergrößerungen auf (siehe Abb. 5 e), dass sich dort das Verhältnis der Expressionsniveaus zwischen diesen beiden Zellschichten scheinbar reziprok zueinander verhält: war die Anzahl an Egr1⁺ Neuronen im Stratum granulosum besonders hoch, erschien die Expression von Egr1 in den unmittelbar benachbarten Neuronen der Purkinjezellschicht annähernd abgebrochen zu sein und umgekehrt. Wie wir wissen, wird die Aktivität der Purkinjezellen durch die Körnerzellschicht inhibiert und die Egr1-Expression der unterschiedlichen Neuronen scheint somit die Aktivität im Kleinhirn plastisch sichtbar machen zu können. Zellen, die per Definition schon eine hohe Aktivität durch eine unkontrollierte Teilung darbieten, sind neoplastische Zellen. Durch Färbungen von Gliomen unterschiedlicher Malignität konnte stets im Zytoplasma von Tumorzellen eine reichliche Egr1-Immunoreaktivität festgestellt werden (siehe Abb. 6 c,d).

Durch jüngst veröffentlichte Untersuchungen der unterschiedlichen mRNA-Varianten von Egr1 wissen wir, dass die vermehrte Translation der mRNA in Protein durch NMDA-Rezeptor-Agonisten induzierbar ist (Simon et al 2004). Dabei wird davon ausgegangen, dass aus einem mRNA-Pool durch Depolarisation die längere Version *egr1-lv* entsteht, die eine längere Halbwertszeit durch Polyadenylierung in synaptischen Ribosomen erfährt. Dies ist sicherlich ein Vorgang der innerhalb kürzester Zeit abläuft und eine schnelle und ökonomische Verarbeitung von Informationen zwischen Neuronen gewährleistet. In Neuronen scheint demnach quantitativ im Fall von Egr1 eine nahtlose Umsetzung der mRNA in Protein und die direkt nachfolgende Funktion als Transkriptionsfaktor zu überwiegen.

Wie könnte man aber die Lokalisation von Egr1-Protein außerhalb des Zellkerns in Glia und manchen Neuronen erklären und was könnte dieses regelmäßige Vorkommen dort bedeuten? Wie wir wissen, ist der Transport des gebildeten Proteins in den Kern abhängig von energieverbrauchenden Prozessen und findet sein morphologisches Korrelat im *NLS (Nuclear Localization Signal)*. Es ist anzunehmen, dass die Freilegung und Präsentation dieses Signals reguliert werden kann. So könnte man auch bereits an dieser Stelle spekulieren, dass es in Glia und teilweise in Neuronen einen Transduktionsweg geben könnte, der nach der Translation des Proteins vorerst zu einem Abbruch des Signalwegs führt und auf diesem Weg das Protein im Zytoplasma belässt. Eine selektive Regulation des Transports in den Zellkern eines bereits gebildeten Proteins für eine anschließende funktionelle Aktivität erscheint durchaus möglich und sinnvoll. Denn es würde eine sehr viel schnellere Bereitstellung des Transkriptionsfaktors Egr1 und damit seines funktionellen Aspektes zulassen. Um diese Hypothese weiter zu diskutieren, sollen nun die Veränderungen durch Bestrahlung erörtert werden.

5.2 Egr1 und Veränderungen durch Bestrahlung

5.2.1 Gliale Zellen reagieren auf Bestrahlung

Wie in Abbildung 10 a zu sehen, war ein signifikant verändertes Expressionsniveau von Egr1 auf Seiten der Neurone nicht zu beobachten. Tendenziell war die nukleäre Anfärbung in Neuronen annähernd aller Regionen dagegen generell verringert und nicht etwa gesteigert. Durch die Dissertation von Frau Wölfel konnte gezeigt werden, dass weitgehend in allen Regionen nach Bestrahlung die Expression der langen Egr1-mRNA-Variante *egr1-lv* signifikant geringer war verglichen mit den Kontrollen. Im Gesamtgewebe war ein Rückgang um 64% zu verzeichnen und konnte der 2 h-Gruppe und teilweise der Gruppe 3 Tage nach Bestrahlung zugeordnet werden. Dieser Rückgang war besonders in kortikalen Geweben stark ausgeprägt (im Parietalen Kortex um fast 94% nach 2 h; im Frontalen Kortex um 88% nach 2 h, bzw. um fast 92% nach 3 Tagen, mit freundlicher Genehmigung von Fr. Wölfel). Wie bereits besprochen, wissen wir um die synaptische Induzierbarkeit von *egr1-lv* und können zusammen mit den immunhistochemischen Ergebnissen festhalten, dass Neurone nach Bestrahlung in ihrem Aktivitätsniveau keinesfalls gesteigert, sondern vielerleiher reduziert zu sein scheinen. Dieser Effekt mag einen protektiven Charakter innehaben, der die Neurone vor oxidativem Stress in Form von anfallenden reaktiven Sauerstoffradikalen (*ROIs*) durch eine geringere Aktivität, bzw. einen gesenkten Grundumsatz schützt.

Die frühe zelluläre Auseinandersetzung mit den Folgen der Bestrahlung leistete überraschenderweise die Glia, welche deutlich auf diese Art der Behandlung reagierte und Egr1 in unterschiedlicher Art und Weise höher exprimierte. Bis auf wenige Ausnahmen waren alle Effekte in allen unterschiedlichen Arealen in ihrem zeitlichen Verlauf gleichartig. Quantitativ deutlich ausgeprägte Veränderungen ließen sich am aussagekräftigsten an zusammengefassten Arealen wie z.B. dem Gesamtgewebe veranschaulichen. Die Veränderungen im zeitlichen Kontext am Beispiel des Gesamtgewebes sind demnach repräsentativ und durch Abb. 12 illustriert.

5.2.2 Zeitlicher Verlauf der subzellulären Lokalisation von Egr1 in glialen Zellen

Die stärksten Effekte waren durch gliale Zellen zu verzeichnen, die Egr1 im Zytoplasma exprimierten: am ausgeprägtesten 6 Stunden und 1 Tag nach Bestrahlung (Abb. 12 a, siehe auch Tabelle 1). Dieser Anstieg verlief weitestgehend stetig mit einer signifikanten Erhöhung der zytoplasmatischen Egr1-Immunoreaktivität zu diesen Zeitpunkten und einem Rückgang auf basale Werte nach 3 Tagen. Die nukleäre Expression von Egr1 startete wesentlich früher und zwar bereits 2 Stunden nach Bestrahlung. Dieser Anstieg war jedoch nur in der Medulla des Kleinhirns signifikant. Ein zweiter Anstieg ließ sich nach 3 Tagen verzeichnen. Dieser Effekt war nur im Gyrus dentatus signifikant nachzuweisen. Jedoch waren beide tendenziellen Bewegungen in der Höhe der nukleären Expression von Egr1 in glialen Zellen auch im Gesamtgewebe nachzuvollziehen (siehe Abb. 12 b). Egr1⁺ gliale Zellen unabhängig von der subzellulären Lokalisation (Glia positiv Egr1 gefärbt, s. Abb. 12 c) waren im selben Zeitfenster wie die zytoplasmatisch angefärbte Glia signifikant erhöht: 6 Stunden und 1 Tag nach Bestrahlung. Spiegelbildlich verhielt es sich mit der ungefärbten Glia, die in diesem Zeitraum signifikant verringert war (siehe Abb. 12 d).

5.2.3 Die beiden subzellulären Lokalisationen von Egr1 in glialen Zellen entsprechen einer negative Korrelation

Von besonderer Bedeutung ist das Verhältnis der beiden glialen Egr1-Lokalisationen zueinander (Verhältnis Glia Egr1 zytoplasmatisch / nukleär, siehe Abb. 12 e und Tabelle 1). Diese Größe verknüpft unmittelbar diese beiden relevanten Bestandteile miteinander, ohne dass dafür die Gesamtzahl der Glia oder der betrachtete Flächeninhalt notwendig ist. Sie scheint deswegen ein besonders sensitiver Parameter zu sein, um Veränderungen möglichst genau und zeitnah beschreiben zu können. Dieser Wert war nach 2 und 6 Stunden signifikant auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes verringert, stieg signifikant im Vergleich zum 6 h-Wert nach einem Tag auf seinen

höchsten Wert, um nach 3 Tagen auf ein ähnlich niedriges Niveau wie nach 2 h abzusinken. Dieser Verlauf fasst die quantitative Verteilung *beider* Lokalisationen für Egr1 in glialen Zellen im zeitlichen Muster zusammen: der Quotient sank nach 2 Stunden mehr durch Zunahme der nukleären als durch Abnahme der zytoplasmatischen Lokalisation; nach 6 Stunden war der Wert annähernd unverändert durch einen gleichzeitigen Rückgang der nukleären und eine langsame Zunahme der zytoplasmatischen Lokalisation; nach einem Tag überwog klar die zytoplasmatische gegenüber der nukleären Egr1-Anfärbung und fiel nach 3 Tagen einerseits durch Abnahme der zytoplasmatischen und eine erneute Zunahme der nukleären Lokalisation von Egr1. Die subzelluläre Lokalisation verhält sich also offensichtlich gegenläufig zueinander: ist Egr1 in den Nuklei von vielen glialen Zellen lokalisiert, so ist der Anteil der zytoplasmatisch angefärbten Glia - direkt mit diesem letzteren Wert verglichen - geringer ausgeprägt. Es lässt sich also vermuten, dass dieses Muster einer voneinander abhängigen negativen Korrelation entspricht. Sollten sich beide Lokalisationen wenig oder gar positiv aufeinander auswirken, so wäre einerseits das oben dargestellte Muster nicht zu beobachten und auf der anderen Seite eine kombinierte Färbung von Kern *und* Zytoplasma weit häufiger. Aus der Untersuchung der Bindungsstelle für Egr1-Protein in seinem eigenen Promotorbereich (*EBS*) ist bekannt, dass die Bindung von Egr1-Protein daran vermutlich eine inhibitorische Regulation der Transkription des Egr1-Gens im Sinne eines *negativen Feedbacks* inne hat (Cao et al 1993). Auch dieser Umstand könnte die negative Korrelation der beiden subzellulären Lokalisationen des Proteins weiter bestätigen.

5.2.4 *Egr1 im Zusammenhang mit Proliferation und Apoptose*

Ein Einfluss durch Proliferation und Apoptose scheint unwesentlich zu sein oder sich gegenseitig aufzuheben, da in Abb. 12 g keinerlei signifikante Abweichungen zwischen den Gruppen zu verzeichnen sind. Da wir von der besonderen Strahlensensibilität der Oligodendrozyten (Kurita et al 2001) und einer Aktivierung und Proliferation der

Astrozyten (Hwang et al 2005) nach Bestrahlung wissen, können wir allein anhand der unveränderten Dichte an glialen Zellen weder das eine noch das andere ausschließen. Die kürzere Version der Egr1-mRNA *egr1-sv* ist in den bestrahlten Gruppen verglichen zu den Kontrollen um 51% signifikant verringert und zeigt ihren niedrigsten Stand nach 6 Stunden. Da dieses Ereignis wiederum sehr nah an dem Zeitpunkt der höchsten Apoptoserate (nach 8 Stunden) seinen größten Effekt zeigt, drängt sich die Frage auf, ob dieser Rückgang von *egr1-sv* mit einer ablaufenden Apoptose in Zusammenhang stehen könnte. Da bis heute nicht ausreichend viel über die mRNA und ihre Kinetik bekannt ist, kann die Annahme, dass ein Rückgang der mRNA gleichbedeutend ist mit einem Rückgang der Translation, im Fall von Egr1 nicht bewiesen werden. Es könnte sich auch in der Art und Weise abspielen, dass aus einem Pool von mRNA *egr1-sv* bei der Translation verbraucht wird und dieser Verbrauch erst ein gewisses Maß überschreiten muss, bis neue mRNA transkribiert wird.

In den Doppelfärbungen konnte weiterhin die nukleäre Egr1-Färbung vorwiegend in Astrozyten gefunden werden. Dennoch waren auch vereinzelte Astrozyten im Zytoplasma für Egr1 positiv, jedoch zu einem weit geringeren Anteil als bei Oligodendrozyten, welche durch morphologische Identifizierung den Großteil der zytoplasmatisch Egr1 positiven glialen Zellen darstellten. Ob diese Unterschiede tatsächlich bestehen, d.h. ob vor allem Astrozyten durch eine nukleäre Lokalisation von Egr1 in Zusammenhang mit einer reaktiven Gliose, bzw. Proliferation nach Bestrahlung stehen oder ob die zytoplasmatische Egr1-Anfärbung in Oligodendrozyten in Zusammenhang mit Apoptose zu verstehen ist, konnte mit den von uns durchgeführten Methoden nicht zufriedenstellend geklärt werden. Um über diese Frage eine veritable Aussage treffen zu können, müssten weitere spezifische immunhistochemische Färbungen oder entsprechende *in vitro* Untersuchungen an Astrozyten- bzw. Oligodendrozytenlinien durchgeführt werden.

5.2.5 Hinweise auf eine differentielle Expression von Egr1 im Hippokampus nach Bestrahlung

An dieser Stelle muss angefügt werden, dass trotz weitgehender Übereinstimmung im Expressionsmuster von Egr1 zwischen den untersuchten Arealen es doch vereinzelt regionale Unterschiede gab. Diese Unterschiede beschränkten sich allein auf die Hippokampusformation. Alle anderen Regionen schienen mit der Summe aller Areale im Gesamtgewebe in Übereinstimmung. In der Region CA 1&2 war das Verhältnis der glialen Egr1-Lokalisation von zytoplasmatisch zu nukleär ein Tag nach Bestrahlung signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen (siehe Tabelle 1). In den meisten anderen Regionen war dieses Verhältnis zwar auch etwas erhöht, unterschied sich aber nicht signifikant von den Kontrollwerten wie in diesem Fall. Bei näherer Betrachtung kam dieses Verhältnis auch weniger durch ein Ansteigen der zytoplasmatisch Egr1 positiv gefärbten Glia zustande, sondern vielmehr durch einen abrupten Abfall der nukleär Egr1 positiven Glia und der gesamten Dichte glialer Zellen selektiv zum Zeitpunkt 1 Tag nach Bestrahlung. Die beiden zuletzt genannten Tendenzen waren zwar nicht signifikant aber in ihrem Verlauf von anderen Regionen abweichend.

Andererseits wurde das Verhältnis von allen gezählten Neuronen zu allen glialen Zellen unabhängig von einer Anfärbung jeweils mituntersucht. In der zusammengefassten Region CA 1,2,3 und Gyrus dentatus war dieses Verhältnis von durchschnittlich 1,6 : 1 in den Kontrollen auf 2,5 : 1 in der 1-Tages-Gruppe signifikant angestiegen (siehe Tabelle 1). Wiederum ist auch hier im Expressionsmuster tendenziell ein rascher Einbruch einerseits bei dem Anteil der nukleär Egr1 positiv gefärbten Glia und bei der Gesamtdichte an glialen Zellen selektiv ein Tag nach Bestrahlung zu verzeichnen. Ist es denkbar, dass aufgrund dieser beiden Verhältnisgrößen regionale Unterschiede, die nur für den Hippokampus gelten, detektieren werden können? Durch zahlreiche Arbeiten wurde (wie in der Einleitung bereits vorgestellt) entdeckt, dass Strahlenschäden vor allem auch im Hippokampus zu erwarten sind. Die Folgen für Lernen, Gedächtnis und die Ausreifung von Vorläuferzellen in dieser Region sind gut untersucht. In diesem Licht betrachtet erscheint es nachvollziehbar, dass im Hippokampus bestimmte Zellen besonders strahlensensibel reagieren. Eine mögliche Hypothese lautet also, dass selektiv ein Tag nach Bestrahlung Zellen zugrunde gehen und sich dies in den oben

beschriebenen Verhältnissen niederschlägt. Durch die Arbeit von Monje et al. wissen wir, dass Vorläuferzellen im Hippokampus durch Bestrahlung in besonderer Weise geschädigt werden und diese *NPCs* (*Neural Precursor Cells*) signifikant nach Bestrahlung verringert sind. In unserer Arbeit konnten wir nur zwischen phänotypisch ausgereiften Neuronen und Glia unterscheiden. Vorläuferzellen wie die *NPCs* wurden durch ihre Morphologie dabei aller Wahrscheinlichkeit nach unter der Kategorie „Glia“ eingeordnet. Unsere Vermutung äußert sich also in die Richtung, dass ein Zelluntergang, der diese *NPCs* möglicherweise mitbetrifft, für die Veränderungen der beiden oben beschriebenen Verhältnisse verantwortlich gemacht werden könnte. Zur Klärung dieser Frage müsste in weiterführenden Arbeiten spezifische immunhistochemische Färbungen angewandt werden, die die Vorläuferzellen eindeutig charakterisieren und diese Arbeitshypothese untersuchen.

5.3 Frühe Aktivierung von Mikroglia / Makrophagen im bestrahlten ZNS

Überraschenderweise deutet die Expression von CD68 auf eine Aktivierung der Mikroglia / Makrophagen zu einem früheren Zeitpunkt hin, als die meisten Reaktionen von *Egr1* auf Bestrahlung beobachtet werden konnten. Schon innerhalb von 2 Stunden konnte man einen Anstieg im monozytären System mit anschließendem raschen Abfall auf Ausgangswerte beobachten. In manchen der untersuchten Arealen konnte man einen zweiten Anstieg drei Tage nach der Bestrahlung feststellen, möglicherweise als Ausdruck für eine zweite Aktivierung (siehe Tabelle 2). Alle relevanten Ereignisse innerhalb des zeitlichen Verlauf von 20 min bis 3 Tage kann auch anhand des Gesamtgewebes in Abb. 13 nachvollzogen werden. In unbestrahlten Tieren lag demnach die Relation von perivaskulären zu parenchymalen CD68⁺ Zellen in einem Verhältnis von durchschnittlich 5,7 : 1 (Abb. 13 g). Durch Bestrahlung sank dieses Verhältnis auf 1,3 : 1 nach 2 Stunden und auf 1,6 : 1 nach 3 Tagen. In absoluten Zahlen waren nach 2 Stunden sowohl signifikant mehr CD68 positive Zellen im Parenchym (Abb. 13 a) wie auch etwas geringer ausgeprägt um die Gefäße zu zählen (Abb. 13 c). Deren Relation zueinander hatte sich aber zu oben beschriebenen Zeitpunkten zugunsten des Parenchyms

verschoben (Abb. 13 b,d). Ob nun diese selektiv zu den Zeitpunkten 2 h und 3 Tage nach Bestrahlung mit CD68 anfärbbare Mikroglia / Makrophagen, die ohne räumlichen Bezug zur Vaskulatur aktiviert wurde, ortsständige ruhende Mikroglia repräsentiert oder ob es sich dabei um von den Gefäßen eingewanderte Zellen handelt, ist unklar. Da wir vom Färbeverhalten der Mikroglia wissen, dass ruhende, d.h. nicht aktivierte Zellen nur sehr wenige Oberflächenantigene präsentieren, erscheint die Überlegung der kurzzeitigen Aktivierung von ortsständiger Mikroglia im Parenchym die plausible Erklärung. Eine Migration von monozytären Zellen ins Gewebe mit anschließender Deaktivierung kann aber auch nach so kurzen Zeitabständen nicht völlig ausgeschlossen werden und sollte in weiterführenden Arbeiten überprüft werden.

Die absolute Summe der CD68⁺ Zellen pro mm² (Abb. 13 h) stieg auf das 3-fache innerhalb von 2 Stunden. Die Dichte an parenchymalen CD68⁺ Zellen (Abb. 13 a) wuchs sogar auf das 9-fache verglichen zu den Kontrollen. Unser spezielles Interesse galt der Kategorie von ramifizierten CD68⁺ Zellen innerhalb des Parenchyms, da diese Zellmorphologie am ehesten dem Phenotyp der aktivierten Mikroglia entspricht (siehe Abb. 8). Diese Zellspezies war 3 Tage nach Bestrahlung 5-fach erhöht im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 13 f), wohingegen die absolute Zahl an ramifizierten CD68⁺ Zellen sich zu den Zeitpunkten 2 Stunden und 3 Tage lediglich verdoppelt hatte (Abb. 13 e). Da sich die signifikanten Veränderungen auf die beiden Zeitpunkte beschränken, nehmen wir einen zeitlichen Verlauf der Mikroglia / Makrophagenaktivierung in zwei Schritten an – einmal unmittelbar nach 2 Stunden und in einer zweiten verzögerten Reaktion 3 Tage nach Bestrahlung. Die eindeutige und starke Reaktion der CD68⁺ Zellen nach 2 Stunden spiegelt allem Anschein nach die modulierende Rolle dieser Zellen in einer allgemeinen entzündungsähnlichen Reaktion in Antwort auf die Bestrahlung wider. Der Anstieg zu einem Zeitpunkt von 2 Stunden nach läsionaler Bestrahlung ist die bisher früheste histologische Veränderung und unterstreicht die herausragende Rolle der Mikroglia als einen zellulären Faktor der Aktivierung. Eine signifikante Zunahme der morphologisch eindeutigen Mikroglia in Form eines Anstiegs der ramifizierten CD68⁺ Zellen im Parenchym nach 3 Tagen scheint ein zweizeitiges Aktivierungsgeschehen wie oben beschrieben vorauszusetzen. Interessant wäre die Untersuchung, wie sich diese Kategorie der Mikroglia in einem weiteren zeitlichen Verlauf jenseits der 3 Tage entwickeln würde.

5.4 Sequenz der frühen Reaktionen nach Bestrahlung

Eine Abfolge, die die Ereignisse sowohl der Egr1- als auch der CD68-Expression im zeitlichen Verlauf graphisch besser verdeutlicht, ist in Abb. 16 a dargestellt. Die meisten Effekte der glialen Egr1-Expression, die wir beobachteten, fanden innerhalb dieses zeitlichen Rahmens von 2 Stunden bis 3 Tage nach Bestrahlung statt und könnten möglicherweise durch die CD68-Aktivierung in Mikroglia initiiert und eingeleitet worden sein. Die zweite Aktivierung nach 3 Tagen könnte im weiteren Verlauf zu ähnlichen Veränderungen der Egr1-Expression führen wie die erste nach 2 Stunden. Eine maximale Apoptoserate der Oligodendrozyten wurde 8 Stunden nach Bestrahlung beschrieben (Kurita et al 2001). Da dies zeitlich eng mit der hohen zytoplasmatischen Expression von Egr1 in glialen Zellen zusammenhängt, könnte man die zweite CD68-Aktivierung in Zusammenhang mit Veränderungen sehen, die durch Egr1 als potentem Induktor der Apoptose in glialen Zellen ausgelöst werden und möglicherweise darauf aufbauend zu einer entzündlichen Reaktion nach 3 Tagen führen. Eine ähnliche Abfolge einer Aktivierung in zwei Schritten wird im Fall von Egr1 bei vermehrter Bildung von *ROIs* durch Hyperoxie in Alveolarzellen beobachtet (Jones & Agani 2003). Dort wurde ebenfalls 2 Stunden und 4 Tage nach kontinuierlicher vermehrter O₂-Exposition eine entzündungsähnliche Reaktion beobachtet, die maßgeblich durch Egr1 vermittelt wurde.

5.5 *Liegt Egr1 als Dimer vor?*

Das Egr1-Protein sollte aufgrund seiner *Coding sequence* ein errechnetes Gewicht von 55 kDa besitzen. Durch die Analyse der zytoplasmatischen und nukleären Fraktion von ZNS-Gewebe mit Hilfe der Western Blot Analysen konnte eine ungefähr 110 kDa schwere Variante in der zytoplasmatischen und vor allem eine ca. 75 kDa schwere in der nukleären Fraktion gefunden werden. Wurde das Gewebe mit Trizol-Reagenz, d.h. unter denaturierenden Bedingungen isoliert und aufgetrennt, so war eine 55 kDa und eine 35 kDa Version zu sehen. Abb. 16 b erläutert eine Hypothese, die diese verschiedenen Versionen und Lokalisationen des Egr1-Proteins erklären könnte. Diese unterschiedlichen Versionen eines Proteins könnten durch die Überlegung verstanden werden, dass das Egr1-Protein möglicherweise in beiden subzellulären Kompartimenten als Homodimer mit unterschiedlichen molekularen Gewichten vorliegt.

Das im Zytoplasma vorherrschende 110 kDa schwere Protein könnte demnach als Dimerform eines Pro-Transkriptionsfaktors außerhalb des Zellkerns deponiert und auf äußere Reize hin aktiviert werden. (Bei der 55 kDa Version könnte es sich um ein komplettes Monomer des 110 kDa Dimers handeln.) Änderungen des zellulären Milieus wie in unserem Fall der Anstieg von reaktiven Sauerstoffradikalen *ROIs* könnten dazu führen, dass posttranslational von dem präexistenten 110 kDa-Dimer Regionen abspaltet werden, die möglicherweise das Signal für die Kernlokalisierung *NLS (Nuclear Localization Signal)* vorher verdeckten und dieses anschließend freigeben, d.h. demaskieren. Dies hätte die 75 kDa Version zur Folge, die in den Nukleus transportiert wird und zu einem Großteil auch dort zu identifizieren ist. Die 35 kDa Version spiegelt höchstwahrscheinlich ein Monomer des bereits trunkierten 75 kDa Dimers wider.

Unter denaturierenden Bedingungen ist die 75 kDa Variante nur sehr unwesentlich ausgebildet (siehe Abb. 15 b,c). Gleichzeitig treten bei dieser Isolierungsmethode besonders die beiden potentiellen Monomere mit 55 kDa und die 35 kDa hervor. Argumente für die Hypothese der Funktionalität des Dimers als Transkriptionsfaktor wären ebenfalls die Feststellungen, dass jene 35 kDa Version als Produkt aus einem im

Kern lokalisierten trunkierten Dimer anscheinend nenneswert nicht natürlich vorliegt, sondern lediglich durch die Denaturierung entsteht und andererseits in der nukleären Fraktion durch Zellfraktionierung eine eher geringe 55 kDa Bande zu beobachten ist. Zur Beantwortung dieser Frage wäre es sinnvoll, Proben, die unter *milden*, d.h. nicht-denaturierenden Bedingungen isoliert wurden, mit einem Reduktionsmittel wie β -Mercaptoethanol zu inkubieren, um die Schwefelbrücken, die für den Zusammenhalt des Dimers höchstwahrscheinlich verantwortlich sind, völlig aufzulösen. Anschließend zusammen mit identischen aber unbehandelten Proben in einer Elektrophorese aufgetrennt, könnte man direkt ablesen, ob sich potentielle Dimerbanden zugunsten von Monomeren auflösen.

Während der Etablierung der Primärantikörper gegen Egr1 fiel auf, dass der Antikörper von *Active motif* fast ausschließlich das Zytoplasma von glialen Zellen anfärbt. Eine nukleäre Immunoreaktivität war weder in den Kontrolltieren noch in den bestrahlten Gruppen zu finden. Wir wissen, dass der Antikörper spezifisch gegen das N-terminale Ende des Egr1-Proteins (AS 24 – 37) gerichtet ist. Es erscheint möglich, dass der Antikörper trunkierte Versionen nicht erkennt, sollte er gegen Areale gerichtet sein, die durch eine posttranslationale Modifikation abgetrennt werden. Dies wäre im Fall der N-terminalen Region von Egr1 durchaus plausibel.

Ein weiteres Detail, welches die Theorie stützen könnte, dass bereits gebildetes Egr1-Protein durch Aktivierung eines regulierten Transportvorgangs in den Zellkern geschleust werden könnte, ist die Beobachtung zweier Doppelbanden in Abb. 15 b. Sowohl die 110 wie auch die 55 kDa Version des nukleären Proteins zeigen eine schwache Doppelkonturierung, die sicherlich Ausdruck einer Phosphorylierung ist. Dies würde bedeuten, dass das komplette Dimer mit 110 kDa einmal in einer phosphorylierten und ein anderes Mal in einer nicht-phosphorylierten Form im Zytoplasma vorkommt und darüber reguliert werden könnte. Auch das 55 kDa Protein weist diese Doppelbande auf und stützt dadurch wiederum die Beziehung zum 110 kDa Dimer. Die Dimerisierung von Regulationsproteinen durch Phosphorylierung ist ein Phänomen, das jüngst in Bakterien untersucht wurde. Dieser Aktivierungsweg wird als weitverbreitet angenommen (Toro-Roman et al 2005).

5.6 *Schlussfolgerungen*

Die berichteten Veränderungen für Egr1 in glialen Zellen wie die Aktivierung der Mikroglia konnten zu einem früheren Zeitpunkt festgestellt werden als die meisten bereits beschriebenen histologischen Ereignisse in Antwort auf Bestrahlung. Anhand der Ergebnisse, die in unbestrahlten wie bestrahlten Tieren gesammelt wurden, kann Egr1 als ein wichtiger Marker für zelluläre Aktivität betrachtet werden. Umstände, die dies belegen, sind die hohe basale Expression in Neuronen bei einem gleichzeitigen Rückgang nach Bestrahlung und die Induzierbarkeit in glialen Zellen durch Bestrahlung. Auch im Kleinhirn lässt sich die Aktivität der Zellschichten durch eine gegenläufige Egr1-Expression direkt sichtbar machen. Eine reichliche Egr1-Immunoreaktivität in gliomatösen Tumorzellen belegt weiterhin Egr1 als einen wichtigen Aktivitätsmarker.

Infolge der während der Zeit nach der Bestrahlung zu verzeichnenden Veränderungen der subzellulären Lokalisation von Egr1 gehen wir von zwei funktionell unterschiedlichen Aspekten des Proteins aus. Wir proklamieren, dass die nukleäre Anfärbung den funktionellen Transkriptionsfaktor Egr1 darstellt. Da in den Doppelfärbungen vorwiegend Astrozyten nukleär Egr1 exprimierten, gehen wir davon aus, dass dieser Anstieg mit einer astrozytären Proliferation im Sinne einer Gliose in Antwort auf Bestrahlung zu erklären ist. Ein Anstieg wiederum der zytoplasmatischen Anfärbung zeigte sich überwiegend in Oligodendrozyten zu Zeitpunkten, für die beschrieben ist, dass sie mit Apoptose in Zusammenhang stehen. Warum aber scheinbar Astrozyten auf Bestrahlung mit einer vermehrten Proliferation und Oligodendrozyten möglicherweise apoptotisch reagieren, sollte Inhalt weiterer Untersuchungen sein. Egr1 scheint folglich in unterschiedlichen Zellspezies unterschiedliche Prozesse einzuleiten. Ein weiterer Hinweis, der den nukleären Anteil mit dem funktionellem Aspekt von Egr1 belegt, ist die Reduktion von *egr1-lv*, der langen, NMDA-Rezeptor abhängigen Version der Egr1-mRNA, die durch Bestrahlung beobachtet werden kann. Demnach sind Neurone durch Bestrahlung in ihrer Aktivität reduziert, wohingegen die aktive Beantwortung der ionisierenden Strahlung durch die Glia erfolgt.

Unsere Experimente haben gezeigt, dass auch im Fall von Bestrahlung die Mikroglia eine herausragende Rolle spielt. Die Mikroglia wurde schon mehrfach als ein zellulärer Faktor für pathologische Veränderungen im ZNS beschrieben, der zu sehr frühen Zeitpunkten aktiviert wird. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Beobachtung und lassen den Schluss zu, dass die Aktivierung der Mikroglia in Antwort auf Bestrahlung in zwei Schritten abläuft, bereits nach 2 Stunden und 3 Tage nach Bestrahlung. Dieses zeitliche Muster zeigt starke Parallelen zu der Expression von nukleärem Egr1 in Glia zu denselben Zeitpunkten 2 Stunden und 3 Tage und ist Bestandteil einer Theorie der frühen Aktivierung von glialen Zellen nach Bestrahlung.

In dieser Arbeit wird die Überzeugung vertreten, dass Egr1 im Zytoplasma wie im Zellkern als Dimer vorliegt. Der Transport von unterschiedlichen Proteinvarianten wird aller Wahrscheinlichkeit nach durch eine posttranslationale Modifikation vollzogen, die sich der Trunkierung und Phosphorylierung des zytoplasmatischen Proteins bedient. Die unterschiedlichen Varianten des Egr1-Proteins im Western Blot stehen dabei als Vertreter für die jeweiligen subzellulär vorherrschenden Typen dieses Proteins.

Tiefer gehendes Verständnis von molekular ablaufenden Prozessen ist eine Grundvoraussetzung für potentielle Nutzungs- und Anwendungsmöglichkeiten in der Diagnostik und Therapie von Erkrankungen. Diese Arbeit stellt eine Regulationsweise eines wichtigen Transkriptionsfaktors in seiner zeitlichen, inter- und intrazellulären Abhängigkeit vor. Das *Early Growth Response Gene 1* (Egr1) wie die Aktivierung von Mikroglia sind wichtige Faktoren, die bei der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen eine Rolle spielen. Obwohl man generell Bestrahlung als eine effektive antiproliferative Behandlung betrachtet, wird hier eine Sequenz von früher Aktivierung auf läsionale ionisierende Strahlung vorgestellt, die in ihrer Dynamik dem Beginn einer entzündungsähnlichen Reaktion gleicht. Es bleibt abzuwarten, ob eine weitere Aufklärung der Funktionsweise von Egr1 und die Mitbeteiligung der Mikroglia im Erkennen und Behandeln von Erkrankungen in naher Zukunft genutzt werden können.

6. Zusammenfassung

Zielsetzung: Es wurden die frühen Effekte von γ -Bestrahlung auf die Expression, die subzelluläre Lokalisation und räumliche Verteilung des strahleninduzierbaren Transkriptionsfaktors Egr1 (*Early Growth Response Gene 1*) ebenso wie auf die Aktivierung der Mikroglia untersucht. Es wird angenommen, dass beide Faktoren, Egr1 als ein *Immediate Early Gene* und die Mikroglia als ein zellulärer Marker, frühe Effekte im ZNS-Gewebe in Antwort auf Bestrahlung maßgeblich bestimmen. Zu diesem Zweck wurde ihr zeitlicher Verlauf näher studiert.

Materialien & Methodik: Männliche *sprague dawley* Ratten (n = 21; 7 Wochen alt) wurden in 7 Gruppen entweder einer einzeitigen Ganzkörperbestrahlung von 10 Gray ausgesetzt oder als Kontrollen scheinbestrahlt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten von 20 min, 2 h, 6 h, 1 Tag und 3 Tagen getötet. Gehirngewebe wurde mit Hilfe der Immunhistochemie, bzw. mit Western blot Analysen auf Proteinebene und mit PCR-Methoden auf molekularbiologischer Ebene untersucht.

Ergebnisse: Die Expression von Egr1 in Neuronen war nach Bestrahlung im Gegensatz zu glialen Zellen reduziert. Die Egr1-Expression im Zytoplasma von glialen Zellen war hingegen in den meisten Regionen 6 Stunden bis 1 Tag nach Bestrahlung signifikant höher im Vergleich zu den Kontrollen. Die nukleäre Expression von Egr1 in glialen Zellen war wiederum bereits nach 2 Stunden und teilweise auch nach 3 Tagen signifikant höher. Die Aktivierung der Mikroglia / Makrophagen, aufgezeigt durch den Marker CD68, geschah schon zu den Zeitpunkten 2 Stunden und 3 Tagen nach Bestrahlung. In der Analyse von zellfraktionierten ZNS-Proben durch Western blot erschien in der zytoplasmatischen Fraktion eine 110 kDa schwere Variante und in der nukleären vorwiegend eine etwa 75 kDa und ebenfalls eine 55 kDa schwere Version des Egr1-Proteins.

Schlussfolgerungen: Die berichteten Veränderungen für Egr1 in glialen Zellen wie die Aktivierung der Mikroglia konnten zu einem früheren Zeitpunkt festgestellt werden als die meisten bereits beschriebenen histopathologischen Ereignisse in Antwort auf Bestrahlung. Hier wird die mögliche Abfolge von frühen Aktivierungsvorgängen innerhalb von Stunden skizziert, die die unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen von Egr1-Protein erklärt. Es wird die Hypothese erhoben, dass Egr1 als Dimer in beiden Zellkompartimenten vorkommt, in einer Aktivierung seine Struktur im Zytoplasma durch Trunkierung und Phosphorylierung verändert und anschließend in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor nach einem engen zeitlichen Muster in den Zellkern transportiert wird.

Die Antwort auf Bestrahlung geschieht vor allen Dingen durch die Glia. Dagegen ist die neuronale Expression von Egr1 reduziert, was die Bedeutung von Egr1 als Marker für Aktivität unterstreicht. Durch ein besseres Verständnis von Struktur und Funktionsweise dieses wichtigen Proteins könnten sich in naher Zukunft möglicherweise Anwendungen in Diagnostik und Therapie entzündlicher oder maligner Prozesse ergeben.

7. Abbildungen

Abb. 1

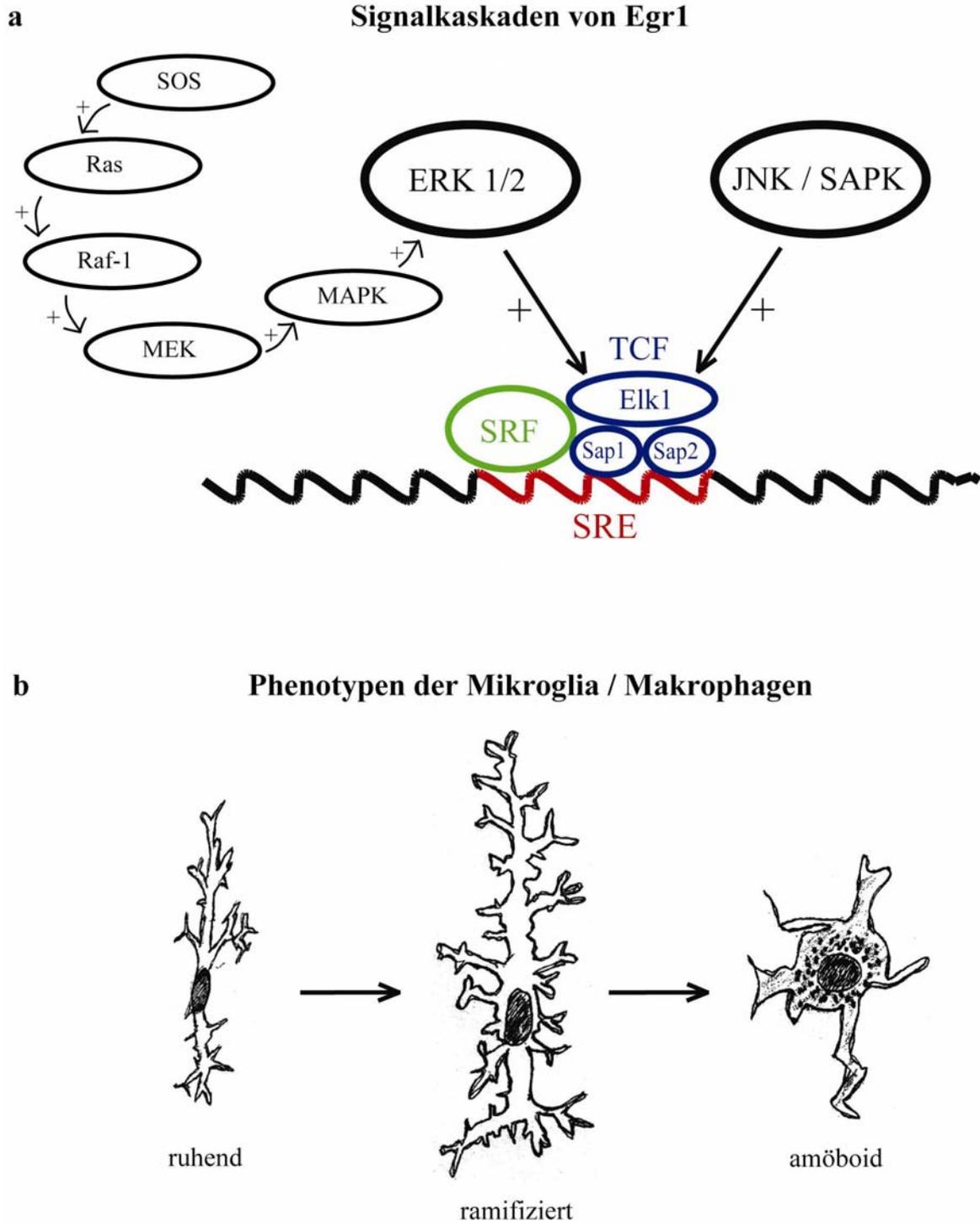


Abb. 1: **a** veranschaulicht die Signalkaskade der Egr1-Transkription über das *Serum Response Element* (SRE). **b** zeigt die unterschiedlichen morphologischen Phenotypen der Mikroglia / Makrophagen abhängig vom Aktivierungsniveau.

Abb. 2 Versuchsaufbau

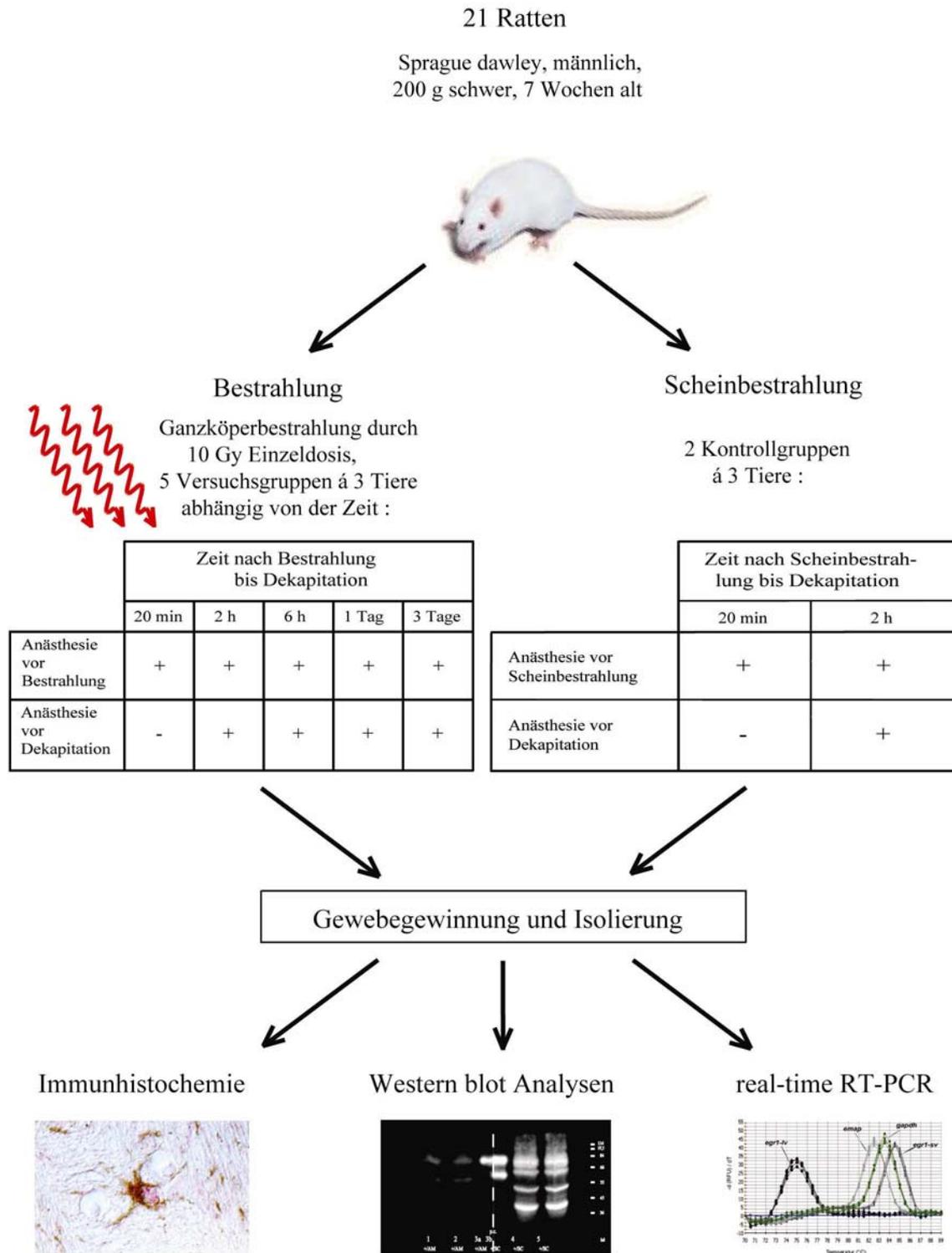


Abb. 2 illustriert den Versuchsaufbau mit der Unterteilung in Versuchsgruppen und Kontrollen, die unterschiedlichen Überlebenszeiten und die angewendeten Methoden.

Abb. 3 Gewebepräparation und Zählmethode

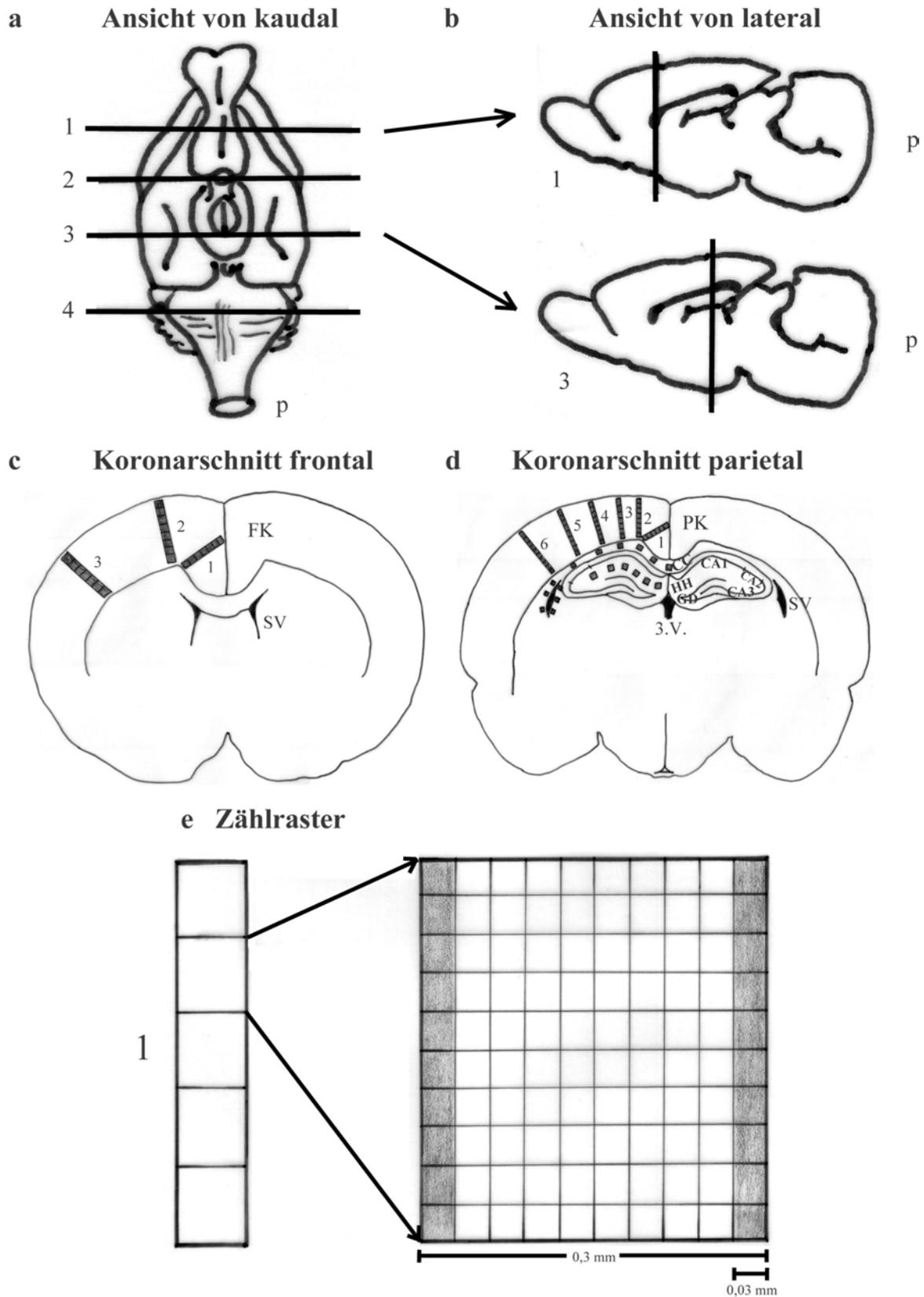


Abb. 3: **a** Ansicht des Rattenhirns von kaudal mit Schnittebenen (p = posterior), **b** Seitansicht, **c** und **d** Hirnregionen, **e** Raster des Zähllokulars mit repräsentativen Zählstreifen (grau unterlegt).

Abb. 4 Regionen und Kategorien von Egr1 und CD68

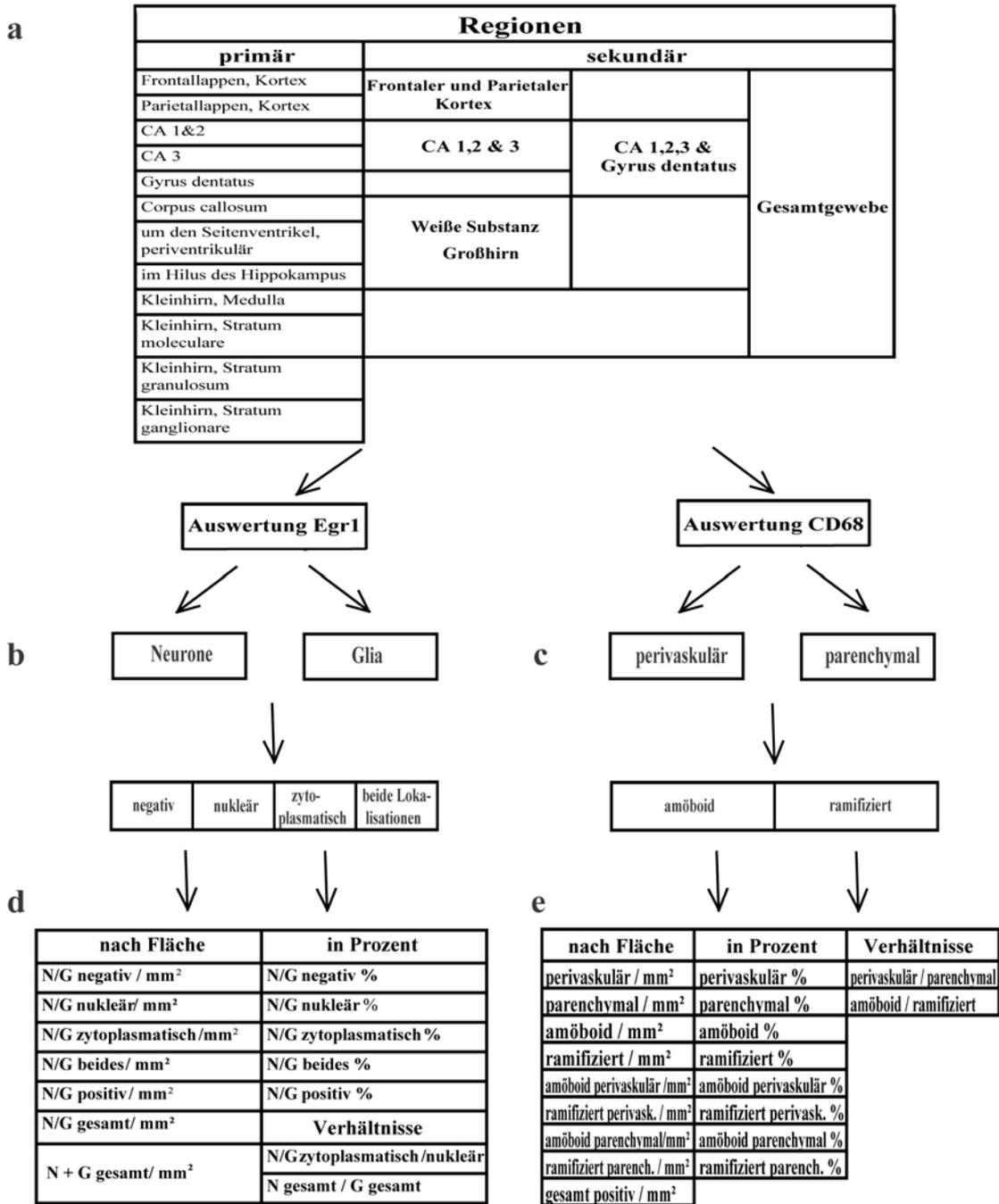


Abb. 4: **a** zeigt die Auswahl der Regionen im ZNS der Ratte, die untersucht wurden. Die einzelnen Regionen sind unter *primär* aufgeführt, alle zusammengefasste Regionen sind unter *sekundär* zu finden. **b** illustriert die Unterscheidung in Neurone gegenüber Glia und die Einteilung der unterschiedlichen Lokalisation der Egr1-Immunoreaktivität. In **c** ist die Auswertung der CD68-Anfärbung nach Lokalisation in Bezug zu den Gefäßen und nach Morphologie der gefärbten Zellen. **d** ist eine Zusammenstellung der unterschiedlichen Kategorien der Egr1-Anfärbung, die einerseits nach Fläche, in Prozent oder nach Verhältnissen vorgenommen wurde (N = Neurone, G = Glia). **e** listet die Kategorien der CD68-Anfärbung nach den gleichen Kriterien wie **d** auf.

Abb. 5 Übersichts- und Detailaufnahmen der ZNS-Regionen

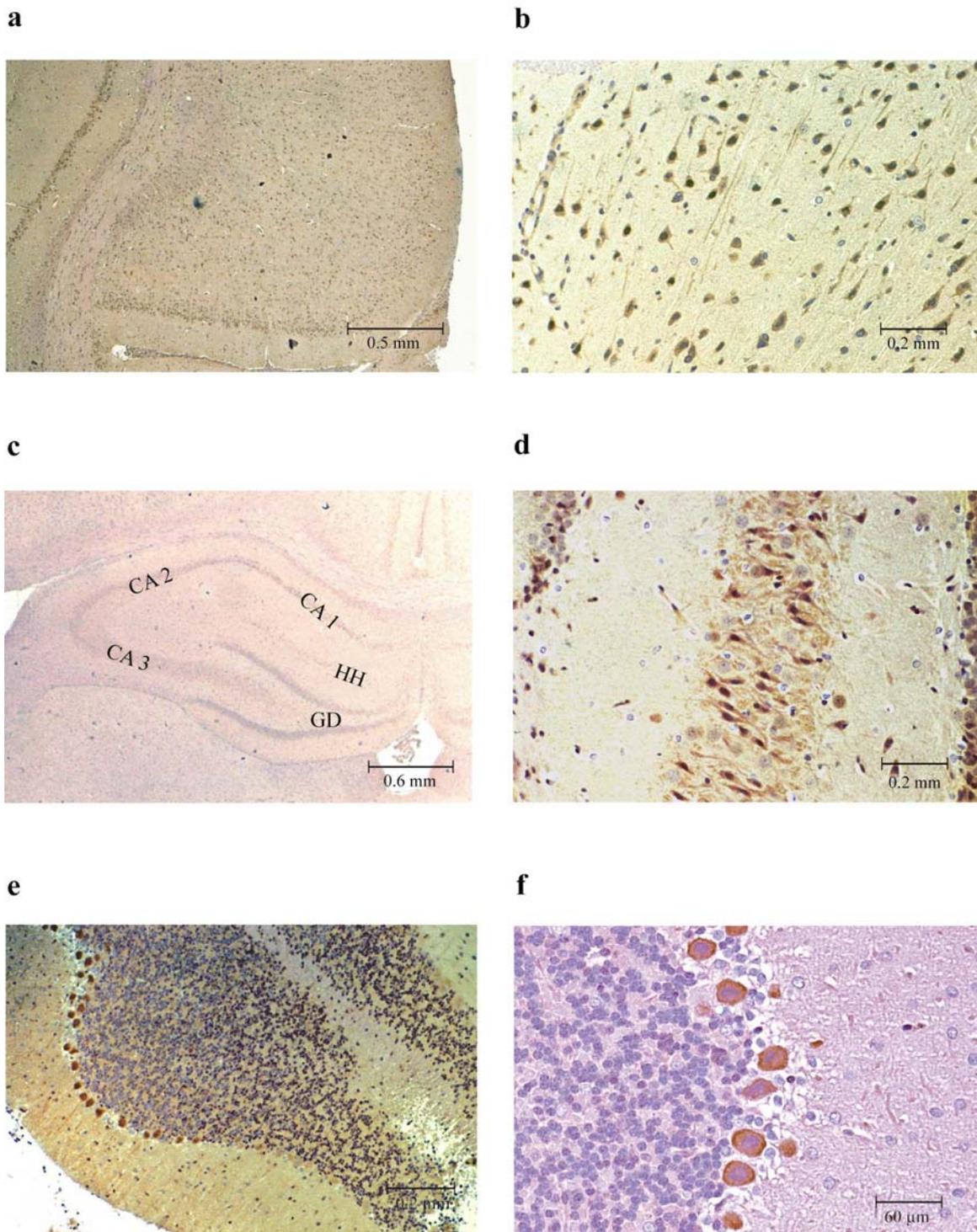
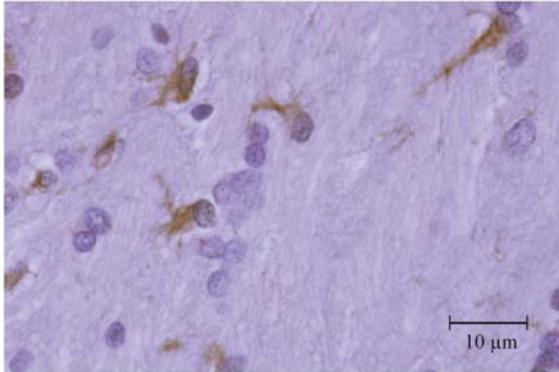


Abb. 5: **a** zeigt Parietalen Kortex in 100-facher Vergrößerung und **b** in Detailaufnahme mit 200-facher Vergrößerung; **c** zeigt die Hippokampusformation in 40-facher Vergr., und **d** in 400-facher Vergr.; **e** bildet einen Ausschnitt aus dem Kleinhirn ab in einer 100-fachen Übersichtsaufnahme und **f** in 400-facher Vergrößerung. (Egr1 = DAB, braun; HE-Gegenfärbung).

Abb. 6 Egr1-Färbungen

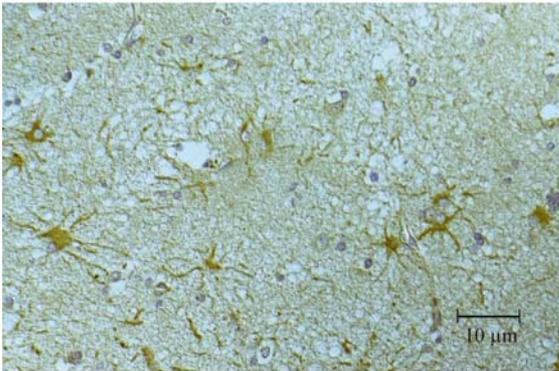
a



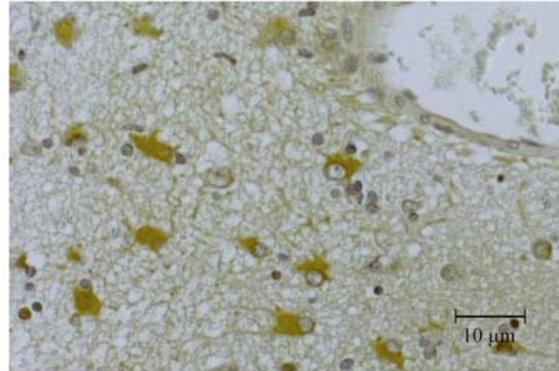
b



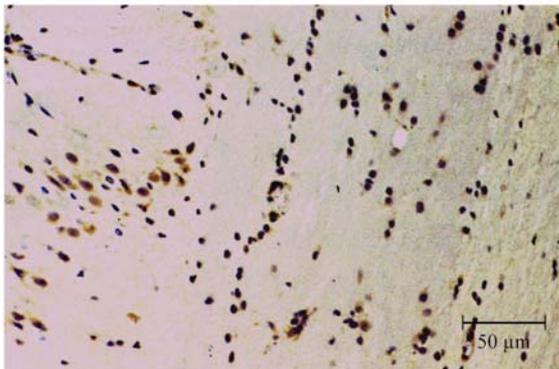
c



d



e



f

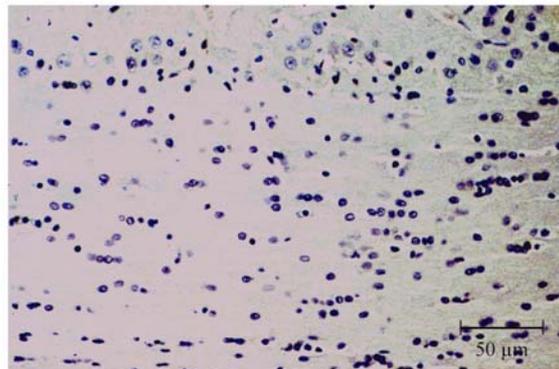


Abb. 6: **a** zeigt eine Egr1-Färbung glialer Zellen im Balken mit *sc-110*, 400-fache Vergr.; **b** ebenfalls *sc-110* im Parietalen Kortex, 1000-fache Vergr.; **c** *sc-110* in einem glialen Tumor (Astrozytom), 400-fache Vergr.; **d** *sc-110* in einem weiteren glialen Tumor mit oligodendroglialer Komponente, 400-fache Vergr.; **e** bildet eine Egr1-Färbung im Balken mit *C-19* ab, 100-fache Vergr. und **f** zeigt eine fehlende Färbung nach Immunopräzipitation mit *C-19 Blocking Peptide* und Antikörper als Negativ- und Spezifitätskontrolle. (Egr1 = DAB, braun; HE-Gegenfärbung).

Abb. 7 Färbungen mit Egr1 und EMAP II

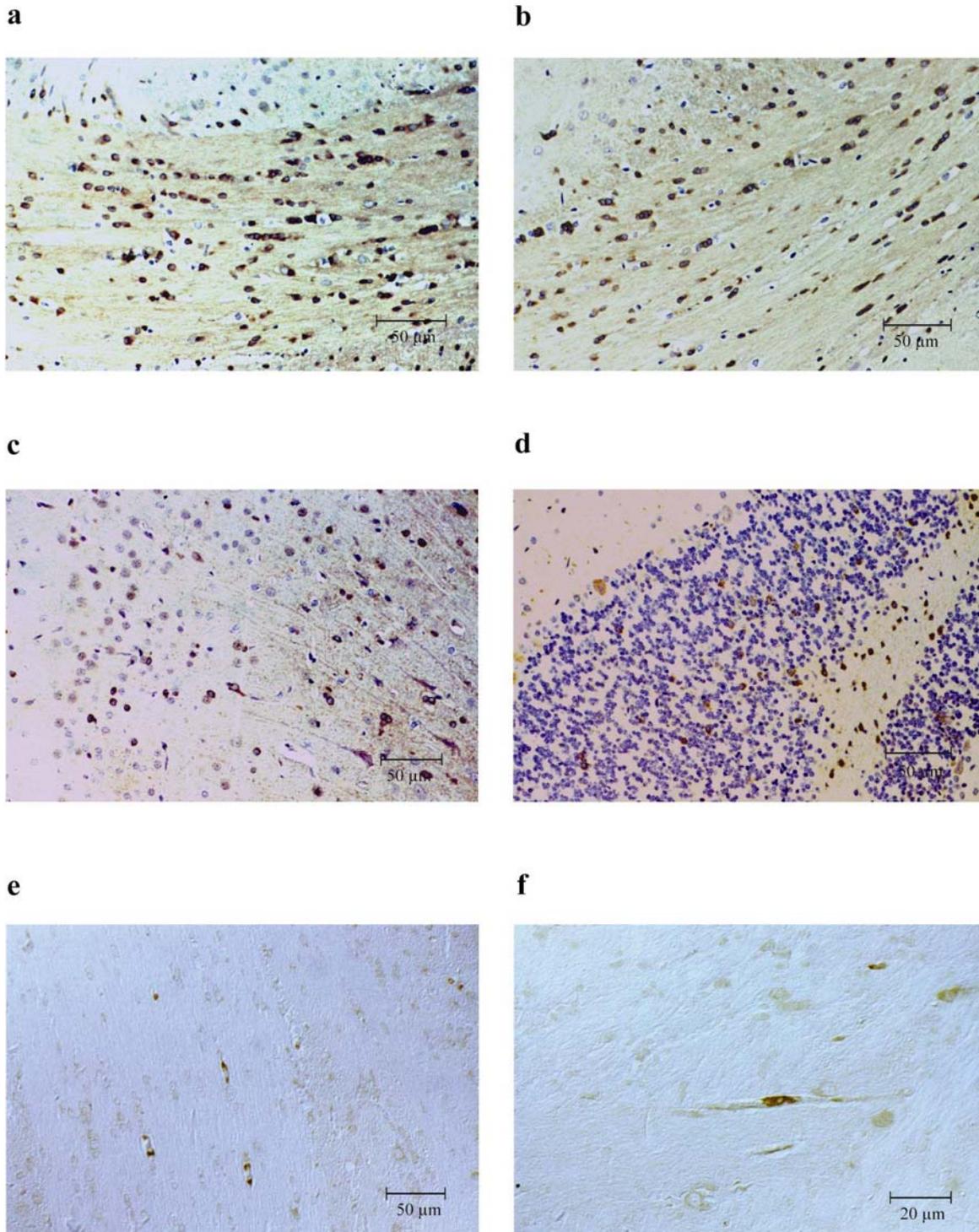
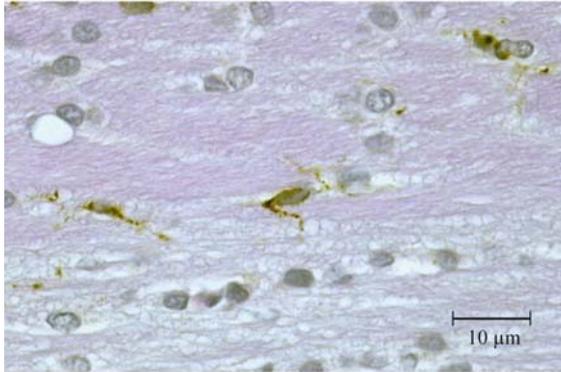


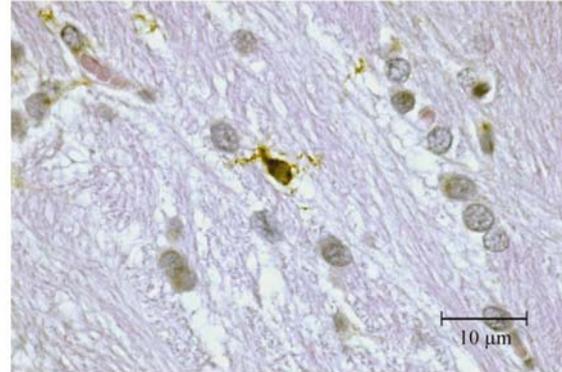
Abb. 7: a - d zeigen Egr1-Färbungen mit *Active motif* im Balken (a und b), Parietalen Kortex (c) und Kleinhirn (d) (100-fache Vergr.; Egr1 = DAB, braun; HE-Gegenfärbung); e und f zeigen Färbungen mit EMAP II im Balken (100-facher (e) und 400-facher (f) Vergrößerung; EMAP II = DAB; ohne Gegenfärbung).

Abb. 8 CD68-Färbungen

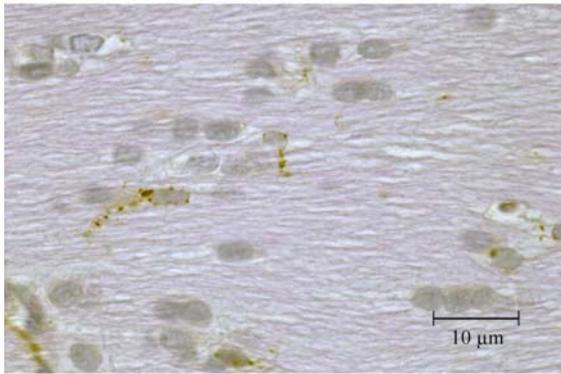
a



b



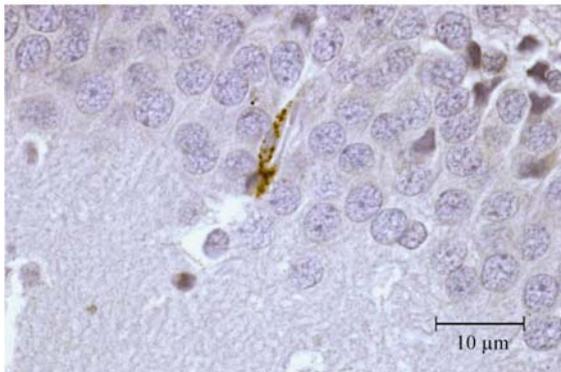
c



d



e



f

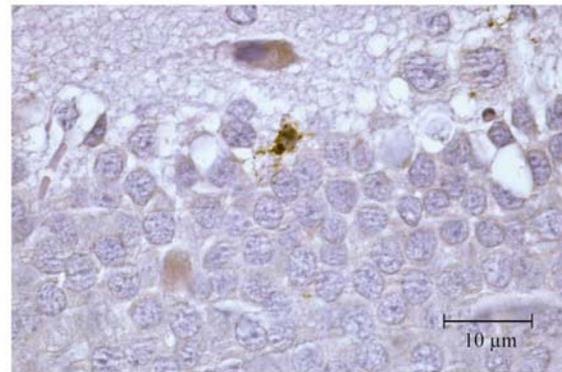


Abb. 8: a - d zeigen CD68-Färbungen im Corpus callosum und e und f im Gyrus dentatus ein und drei Tage nach Bestrahlung, 400-fache Vergrößerung mit Hämalaun-Gegenfärbung.

Abb. 9 Vergleich bestrahltes Gewebe gegenüber Kontrollen

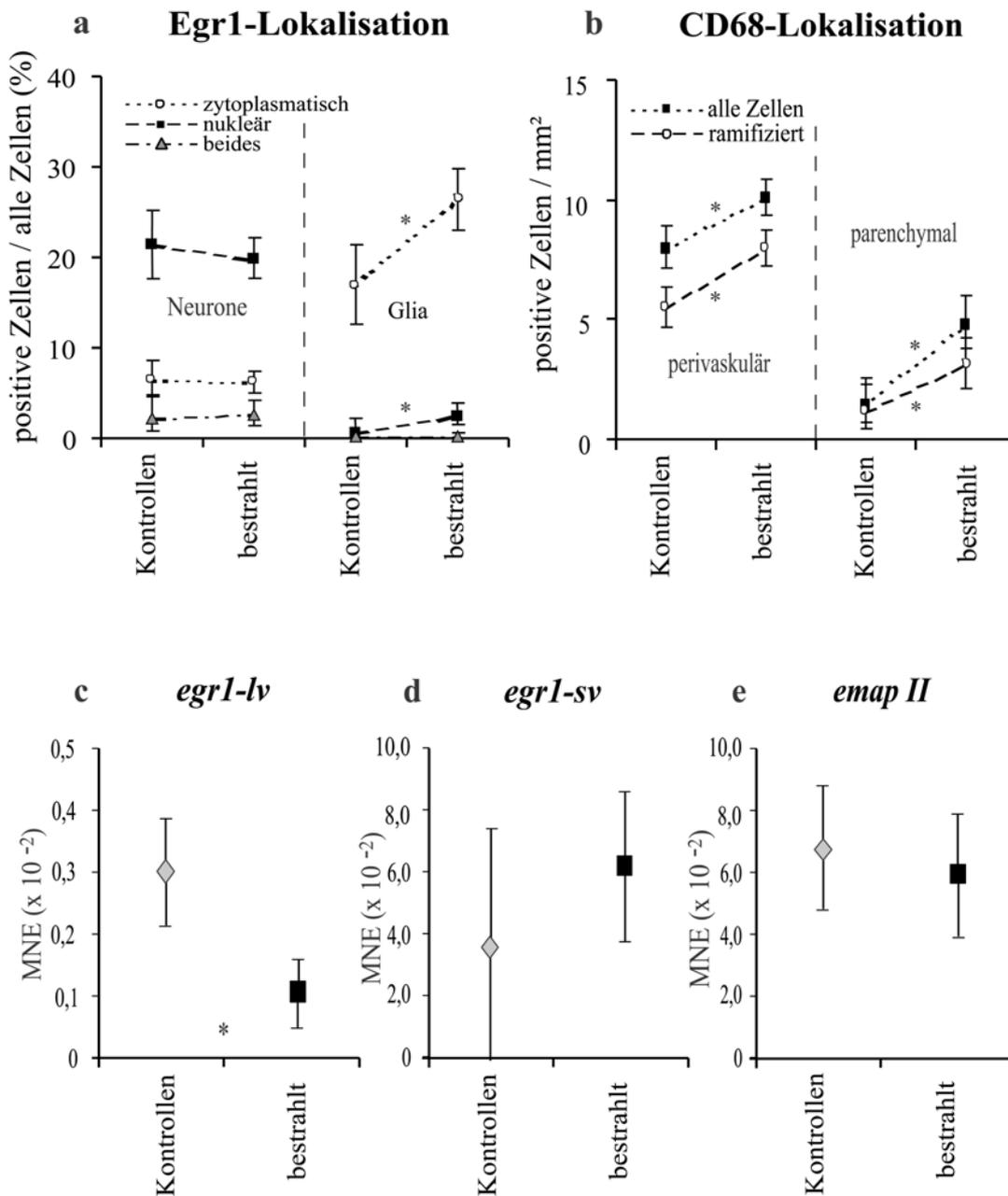


Abb. 9: **a** illustriert die subzellulären Egr1-Lokalisationen in Neuronen und Glia im Gesamtgewebe von bestrahlten Tieren (n = 15) gegenüber den Kontrollen (n = 6; Mittelwerte und obere bzw. untere 95%-Konfidenzintervalle; * = signifikant unterschiedlich zu Kontrollen; p < 0,05; ANOVA); **b** zeigt die räumliche und morphologische Verteilung von CD68⁺ Zellen in bestrahltem und unbestrahltem Gehirngewebe; **c – e** stellt die unterschiedlichen mRNA-Expressionsniveaus von *egr1* und *emap II* dar (MNE = Mean normalized Expression und oberes bzw. unteres 95%-Konfidenzintervall; * = signifikant unterschiedlich; p < 0,05; ANOVA; mit freundlicher Genehmigung von Frau S. Wölfel).

Abb. 10 Räumliche Verteilung von Egr1

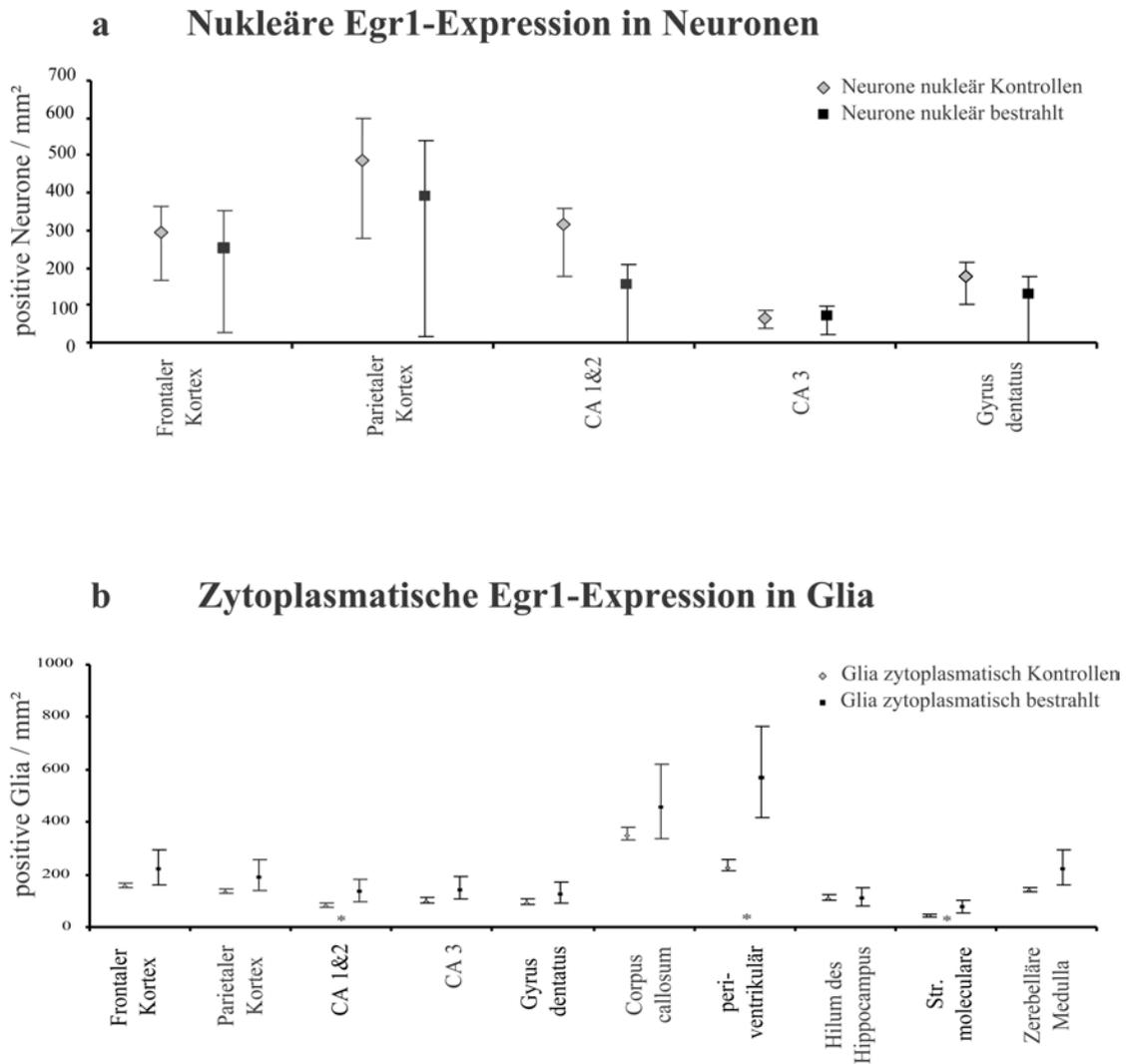


Abb. 10 zeigt die räumliche Verteilung von nukleärem Egr1 in Neuronen (**a**) und zytoplasmatischem Egr1 in Glia (**b**) in den verschiedenen Hirnarealen von bestrahlten Tieren (n = 15) gegenüber den Kontrollen (n = 6; Mittelwerte und obere bzw. untere 95%-Konfidenzintervalle; * = signifikant unterschiedlich zu Kontrollen; $p < 0,05$; ANOVA).

Abb. 11 Räumliche Verteilung von CD68

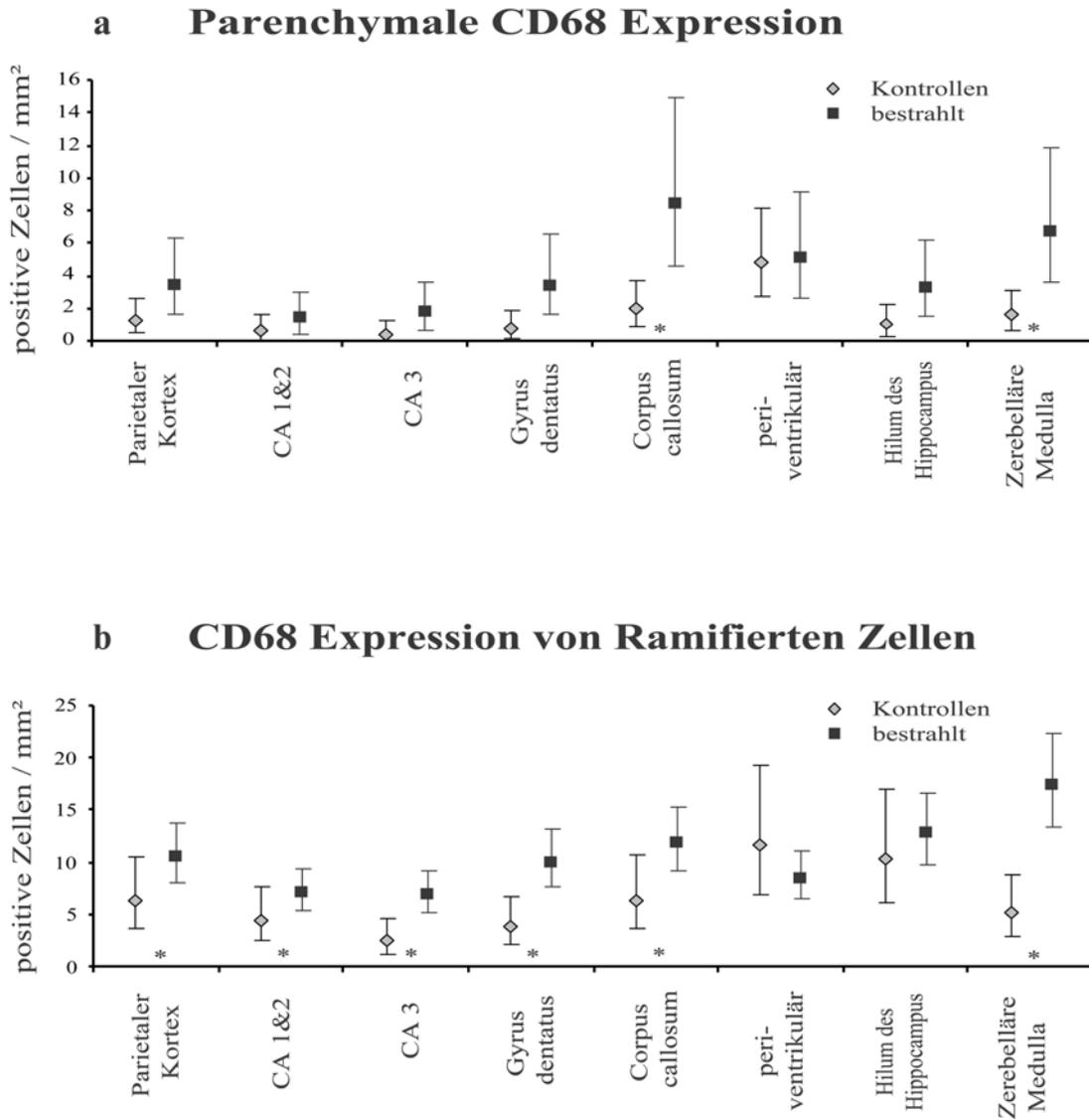


Abb. 11 zeigt die räumliche Verteilung der CD68-Immunoreaktivität im Parenchym **(a)** und von ramifizierter Mikroglia / Makrophagen **(b)** in den verschiedenen Hirnarealen von bestrahlten Tieren (n = 15) gegenüber den Kontrollen (n = 6; Mittelwerte und obere bzw. untere 95%-Konfidenzintervalle; * = signifikant unterschiedlich zu Kontrollen; p < 0,05; ANOVA).

Abb. 12 Zeitlicher Verlauf der glialen Egr1-Aktivierung

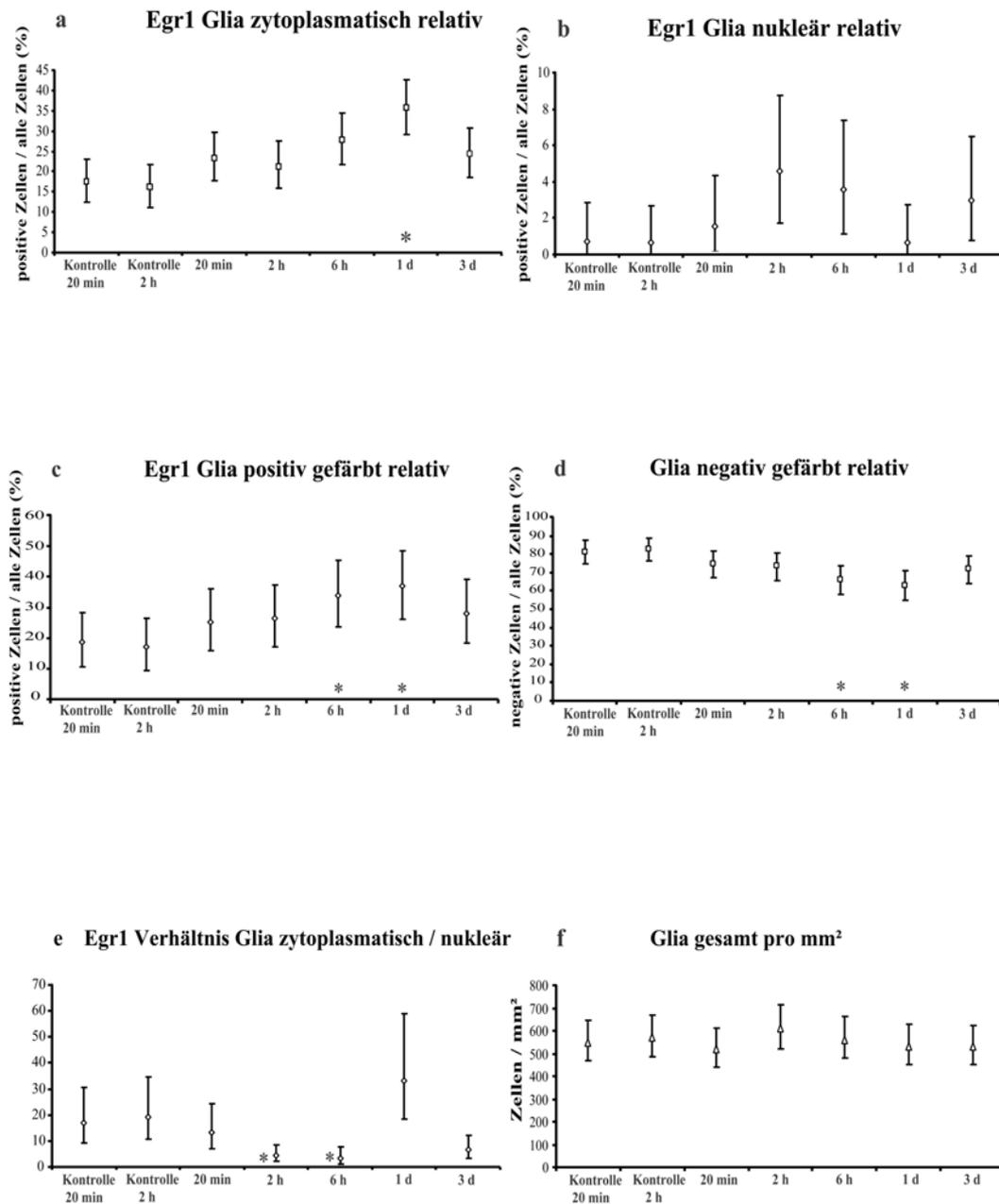


Abb. 12: a – f zeigt die Egr1-Expression der unterschiedlichen Kategorien in ihrem zeitlichen Verlauf von 20 Minuten bis 3 Tage nach Bestrahlung (jeweils n = 3) im Vergleich zu den Kontrollen, die 20 min und 2 Stunden (jeweils n = 3) überlebten. (Mittelwerte und obere bzw. untere 95%-Konfidenzintervalle; * = signifikant unterschiedlich zu Kontrollen; p < 0,05; ANOVA).

Abb. 13 Zeitlicher Verlauf der CD68-Aktivierung

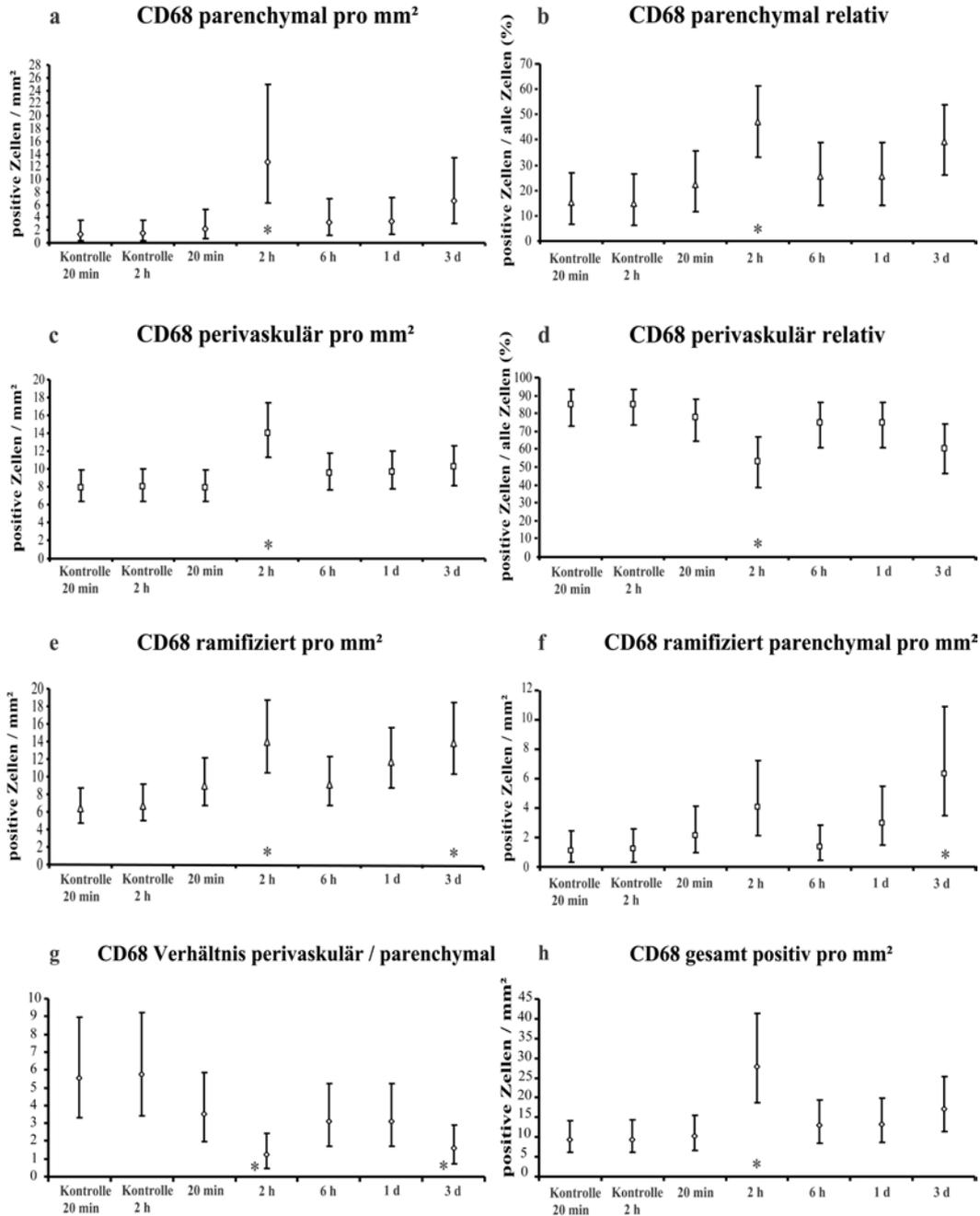


Abb. 13: a – h zeigt die CD68-Expression der unterschiedlichen Kategorien in ihrem zeitlichen Verlauf von 20 Minuten bis 3 Tage nach Bestrahlung (jeweils n = 3) im Vergleich zu den Kontrollen, die 20 min und 2 Stunden (jeweils n = 3) überlebten. (Mittelwerte und obere bzw. untere 95%-Konfidenzintervalle; * = signifikant unterschiedlich zu Kontrollen; p < 0,05; ANOVA).

Abb. 14 Egr1 in Doppelfärbungen

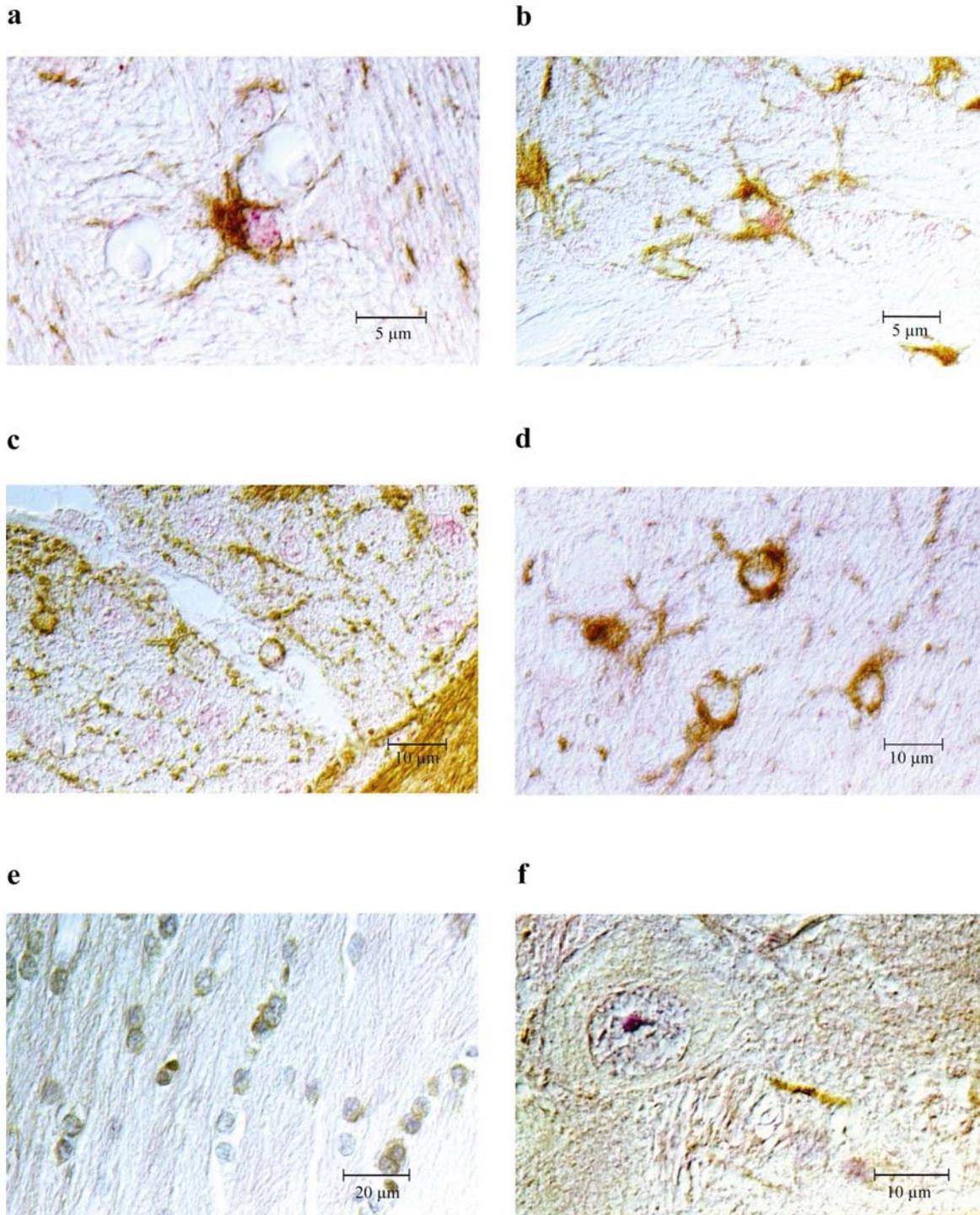


Abb. 14: a - d zeigen Egr1-Doppelfärbungen mit *C-19* (Fast red) und GFAP (DAB) im Balken (a und b, 1000-fache Vergr.); *C-19* (Fast red) und CNPase (DAB) im Balken (c, 400-fache und d, 1000-fache Vergr.). In a und b lässt sich eine Kolokalisation der beiden Antigene im Zellkern und Zytoplasma von Astrozyten nachweisen. In c und d hingegen kann eine zytoplasmatische Kolokalisation in Oligodendrozyten zwar vermutet werden, ist aber nicht klar zu unterscheiden. Aufgrund von Einfachfärbungen mit *C-19* im Balken (e, 400-fache Vergr., Egr1 = DAB) kann morphologisch aber auf zytoplasmatisch Egr1⁺ Oligodendrozyten geschlossen werden. Vereinzelt feine Egr1⁺ Zellen (f, Balken, 1000-fache Vergr., Egr1 = DAB) weisen morphologische Ähnlichkeiten mit Mikroglia auf.

Abb. 15 Egr1 Western blot Analysen

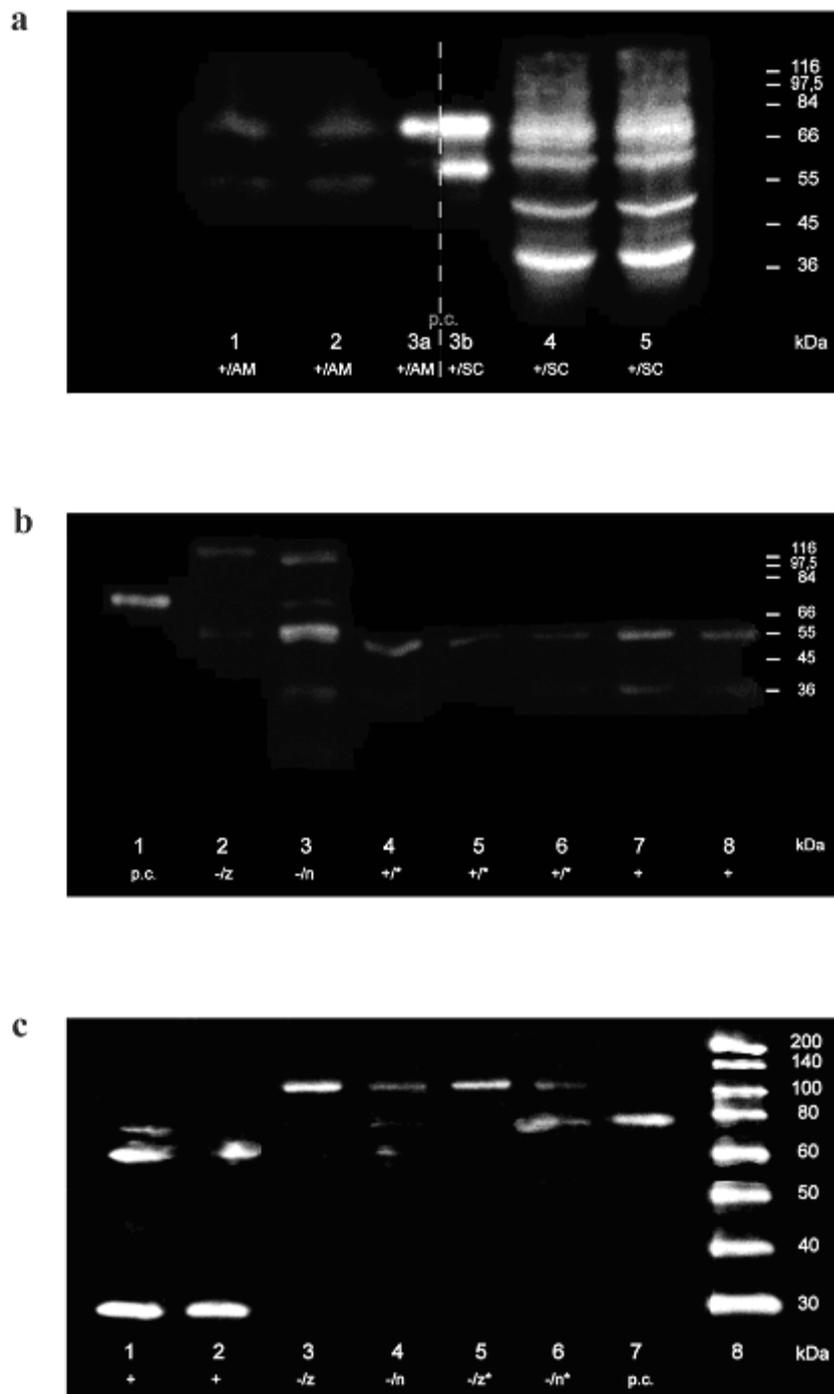


Abb. 15: In **a - c** sind die Ergebnisse der Egr1 Western Blot Analysen festgehalten. **a** zeigt auf der linken Seite einen Immunoblot von unbestrahlten Kortex-Proben mit *Active motif* (AM), der ab der Mitte von Spur 3 mit *sc-110* gefärbt wurde (Spur 3 entspricht der Positivkontrolle (p.c.) mit Hela Nuclear Extract, ganz rechts findet sich der Marker mit Angabe der Molekulargewichte (kDa), + entspricht einer denaturierenden Proteinisolierung, bzw. Trizol). In **b** werden mit kortikalen und hippocampalen Proben die beiden Isolierungsmethoden miteinander verglichen (mit *C-19*, - = Zellfraktionierung, + = Trizol, z = zytosomatische und n = nukleäre Fraktion, * = bestrahlte Proben). **c** zeigt eine erneute Auftrennung von zytosomatischer und nukleärer Fraktion mit kortikalen und hippocampalen Proben (mit *C-19*).

Abb. 16

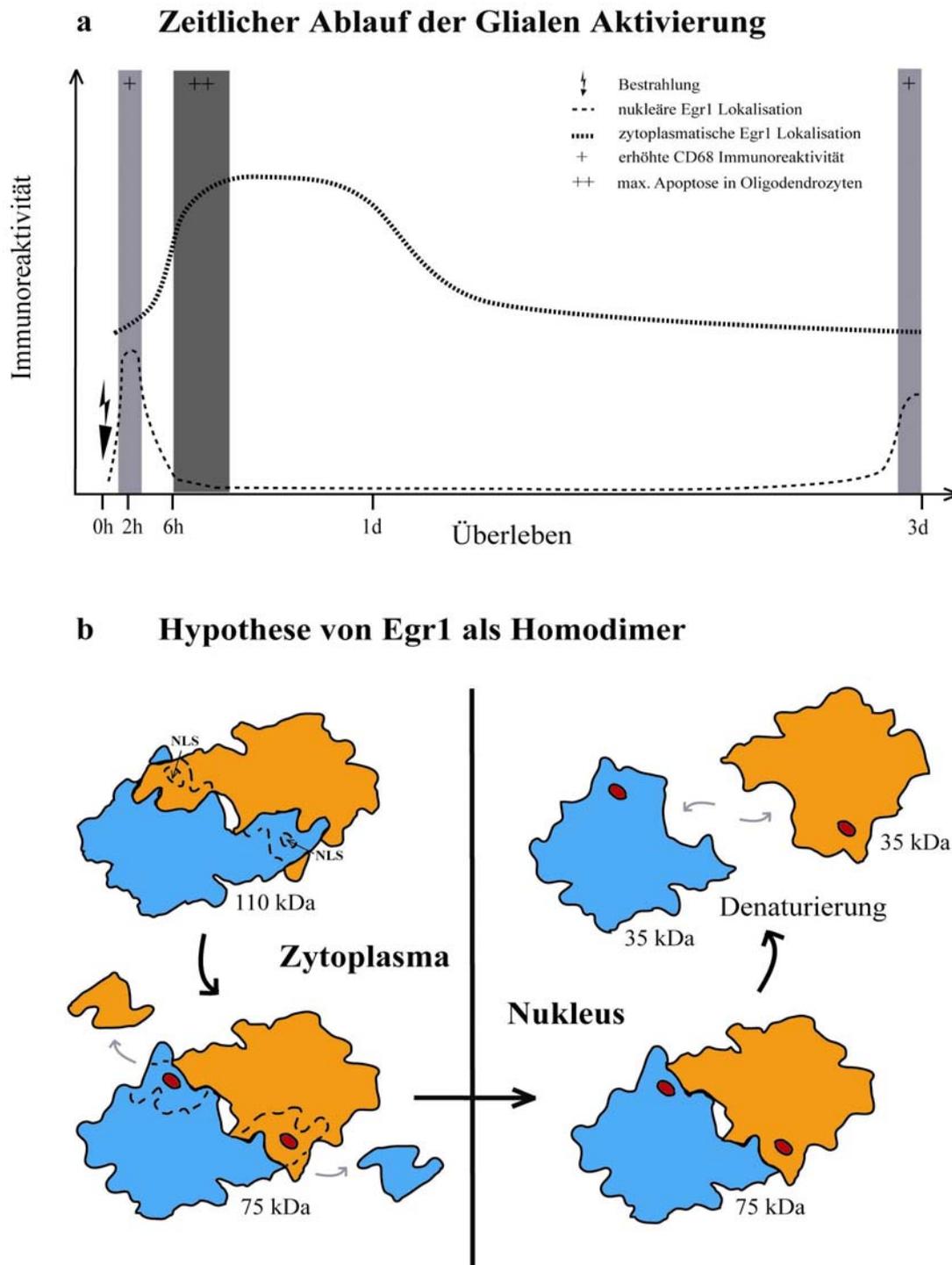


Abb. 16: **a** illustriert den zeitlichen Ablauf der Egr1-Expression in glialen Zellen. Zwei Stunden nach Bestrahlung exprimiert Glia vermehrt nukleäres Egr1 und zeitgleich geschieht die Aktivierung der Mikroglia / Makrophagen durch CD68-Expression. Die zytosmatische Egr1-Expression hat ihr höchstes Niveau 6 Stunden und 1 Tag nach Bestrahlung, wohingegen die nukleäre Egr1-Expression nach 3 Tagen erneut ansteigt. Die größte Apoptoserate wurde in anderen Studien 8 Stunden nach Bestrahlung beobachtet. In **b** wird die Hypothese eines Egr1-Dimers skizziert, wonach von einem 110 kDa-Dimer im Zytoplasma Regionen abgespalten werden, die das NLS markieren, was zum Transport in den Kern führt. Durch Denaturierung entsteht ein Monomer.

8. Tabellen

Tabelle 1: Zeitlicher Verlauf der Egr1-Expression

Areale	Lokalisation der Egr1-Immunoreaktivität, bzw. Kategorien	Kontrolle 20 min CI	Kontrolle 2 h CI	20 min CI	2 h CI	6 h CI	1 d CI	3 d CI	p-value ANOVA
Frontaler Kortex	Verhältnis Glia zytoplasmatisch / nukleär	∅ 6 - 36	↔ 21 - 169	∅ 13 - 106	↓ 2 - 12	↓ 1 - 12	∅ 19 - 158	∅ 4 - 23	0,0069
Parietaler Kortex	Glia zytoplasmatisch pro mm ²	∅ 105 - 182	↔ 96 - 165	∅ 115 - 191	↔ 83 - 143	↑ 183 - 315	↑ 218 - 376	∅ 163-281	0,0006
	Glia zytoplasmatisch relativ (%)	∅ 12 - 36	↔ 10 - 22	∅ 17 - 32	↔ 11 - 23	↑ 26 - 43	↑ 32 - 49	∅ 32 - 49	0,0012
	Glia positiv gefärbt relativ (%)	∅ 18 - 29	↔ 11 - 22	∅ 21 - 35	↔ 15 - 28	↑ 32 - 47	↑ 33 - 49	↑ 25 - 40	0,0005
	Glia negativ gefärbt relativ (%)	∅ 71 - 84	↔ 78 - 89	∅ 65 - 79	∅ 72 - 85	↓ 53 - 68	↓ 51 - 67	↓ 60 - 75	0,0005
Frontaler und Parietaler Kortex	Verhältnis Glia zytoplasmatisch / nukleär	∅ 5 - 26	↔ 20 - 93	∅ 6 - 28	↓ 2 - 10	↓ 1 - 11	∅ 14 - 93	∅ 5 - 25	0,007
	Glia positiv gefärbt relativ (%)	∅ 14 - 29	↔ 12 - 26	∅ 24 - 41	∅ 17 - 33	↑ 29 - 46	↑ 28 - 46	∅ 24 - 41	0,017
	Glia negativ gefärbt relativ (%)	∅ 71 - 86	↔ 74 - 88	∅ 59 - 76	∅ 67 - 83	↓ 54 - 71	↓ 55 - 72	∅ 59 - 76	0,017
CA 1 & 2	Verhältnis Glia zytoplasmatisch / nukleär	∅ 2 - 19	↔ 8 - 26	∅ 5 - 19	∅ 3 - 13	∅ 2 - 12	↑ 37 - 275	∅ 3 - 12	0,0088
CA 1,2, & 3	Glia negativ gefärbt pro mm ²	∅ 329 - 635	↔ 433 - 836	∅ 214 - 413	∅ 410 - 792	∅ 270 - 521	↓ 200 - 387	∅ 285-550	0,0194
Gyrus dentatus	Verhältnis Glia zytoplasmatisch / nukleär	∅ 3 - 36	↔ 8 - 42	∅ 5 - 21	∅ 3 - 15	↓ 0 - 4	∅ 1 - 22	∅ 1 - 6	0,0232
	Glia nukleär pro mm ²	∅ 0 - 9	↔ 0 - 4	∅ 1 - 49	∅ 3 - 89	∅ 4 - 109	↔ 0 - 4	↑ 6 - 145	0,0087
CA 1,2,3 & Gyrus dentatus	Verhältnis Neurone gesamt / Glia gesamt	∅ 1,6 - 2,3	↔ 1,3 - 1,9	∅ 1,7 - 2,3	↔ 1,2 - 1,8	∅ 1,6 - 2,2	↑ 2,2 - 3,0	∅ 1,9 - 2,6	0,0055
	Glia negativ gefärbt pro mm ²	∅ 326 - 627	↔ 405 - 778	∅ 224 - 413	∅ 368 - 708	∅ 286 - 550	↓ 192 - 370	∅ 274-526	0,0419
Weißer Substanz Großhirn	Glia zytoplasmatisch relativ (%)	∅ 10 - 29	↔ 10 - 29	∅ 16 - 36	∅ 13 - 33	∅ 24 - 46	↑ 34 - 58	∅ 17 - 38	0,0223
	Glia positiv gefärbt relativ (%)	∅ 11 - 31	↔ 11 - 31	∅ 17 - 40	∅ 17 - 41	∅ 27 - 52	↑ 36 - 62	∅ 20 - 44	0,0275
	Glia negativ gefärbt relativ (%)	∅ 69 - 89	↔ 69 - 89	∅ 60 - 83	∅ 59 - 82	∅ 48 - 73	↓ 38 - 64	∅ 56 - 80	0,0275
Zerebellum Medulla	Glia nukleär pro mm ²	∅ 0 - 4	↔ 0 - 4	∅ 0 - 17	↑ 13 - 341	∅ 3 - 100	↔ 0 - 7	∅ 0 - 30	0,0091
	Glia nukleär relativ (%)	∅ 0 - 1	↔ 0 - 1	∅ 0 - 2	↑ 2 - 8	∅ 1 - 6	∅ 0 - 1	∅ 0 - 2	0,0108
	Glia positiv gefärbt pro mm ²	∅ 65 - 379	↔ 51 - 298	∅ 54 - 315	↑ 255-1480	∅ 133 - 778	∅ 144 - 836	∅ 34 - 200	0,042
Gesamtgewebe	Verhältnis Glia zytoplasmatisch / nukleär	∅ 9 - 31	↔ 11 - 35	∅ 7 - 24	↓ 2 - 9	↓ 1 - 8	↔ 18 - 59	∅ 3 - 12	0,0012
	Glia zytoplasmatisch pro mm ²	∅ 71 - 127	↔ 68 - 121	∅ 90 - 161	∅ 96 - 171	∅ 116 - 206	↑ 142 - 252	∅ 95 - 169	0,0213
	Glia zytoplasmatisch relativ (%)	∅ 12 - 23	↔ 11 - 22	∅ 18 - 30	↔ 16 - 27	∅ 22 - 34	↑ 29 - 43	∅ 21 - 36	0,0045
	Glia positiv gefärbt relativ (%)	∅ 13 - 25	↔ 11 - 24	∅ 18 - 33	∅ 19 - 34	↑ 26 - 42	↑ 29 - 45	∅ 21 - 36	0,0083
	Glia negativ gefärbt relativ (%)	∅ 75 - 87	↔ 76 - 89	∅ 67 - 82	∅ 66 - 81	↓ 58 - 74	↓ 55 - 71	∅ 64 - 79	0,0083

Tabelle 1: Hier wird der Ablauf der Egr1-Expression abhängig von der Zeit nach Bestrahlung in den verschiedenen untersuchten Geweben tabellarisch dargestellt. Die nukleäre Expression in glialen Zellen geschieht nach 2 Stunden und 3 Tagen, während die zytoplasmatische Egr1-Anfärbung vor allem nach 6 Stunden und einem Tag zu beobachten ist. (CI = obere und untere 95%-Konfidenzintervalle, ↑ / ↓ = signifikant höher / niedriger zu ↔; ∅ = nicht signifikant unterschiedlich zu ↔; min / h / d = Minuten / Stunden / Tage nach Bestrahlung; p-value der ANOVA).

Tabelle 2: Zeitlicher Verlauf der CD68-Expression

Areale	Lokalisation der CD68 Immunoreaktivität, bzw. Kategorien	Kontrolle 20 min CI	Kontrolle 2 h CI	20 min CI	2 h CI	6 h CI	1 d CI	3 d CI	p-value ANOVA
Parietaler Kortex	parenchymal pro mm ²	∅ 0-4	↔ 0-4	∅ 0-4	↑ 5-25	↔ 0-3	∅ 1-7	∅ 2-14	0,0146
	perivaskulär pro mm ²	∅ 5-8	↔ 4-7	∅ 6-9	↑ 7-11	↑ 7-11	∅ 6-9	∅ 7-10	0,0174
CA 1 & 2	gesamt positiv CD68 mm ²	∅ 2-6	↔ 2-7	∅ 3-11	↑ 11-30	∅ 4-12	∅ 5-15	∅ 6-17	0,0054
CA 1,2, & 3	gesamt positiv CD68 mm ²	∅ 3-9	↔ 3-10	∅ 4-14	↑ 11-30	∅ 5-14	∅ 5-14	∅ 6-18	0,0449
	perivaskulär CD68 mm ²	∅ 4-6	↔ 4-6	∅ 5-8	↑ 8-11	↑ 7-9	∅ 6-9	↑ 7-10	0,0005
Gyrus dentatus	gesamt positiv CD68 mm ²	∅ 4-13	↔ 4-12	∅ 6-22	↑ 15-43	∅ 7-19	∅ 7-21	∅ 8-23	0,048
	parenchymal pro mm ²	∅ 0-6	↔ 0-3	∅ 0-11	↑ 4-41	∅ 0-4	∅ 0-8	∅ 1-12	0,0448
CA 1,2,3 & Gyrus dentatus	gesamt positiv CD68 mm ²	∅ 4-11	↔ 4-10	∅ 6-16	↑ 13-34	∅ 6-15	∅ 6-17	∅ 7-19	0,0317
	perivaskulär CD68 mm ²	∅ 4-7	↔ 4-7	∅ 5-9	↑ 8-13	∅ 7-10	∅ 7-10	↑ 8-11	0,0035
Zerebellum Medulla	gesamt positiv CD68 mm ²	∅ 4-25	↔ 2-16	∅ 6-31	↑ 30-148	∅ 6-32	∅ 4-21	∅ 13-68	0,0129
Gesamtgewebe	Verhältnis perivaskulär / parenchymal	∅ 3-9	↔ 3-9	∅ 2-6	↓ 1-2	∅ 2-5	∅ 2-5	↓ 1-3	0,0086
	gesamt positiv CD68 mm ²	∅ 6-14	↔ 6-14	∅ 7-15	↑ 19-41	∅ 9-19	∅ 9-20	∅ 11-25	0,0112
	parenchymal pro mm ²	∅ 0-4	↔ 0-4	∅ 1-5	↑ 6-25	∅ 1-7	∅ 1-7	∅ 3-13	0,0092
	parenchymal relativ (%)	∅ 6-27	↔ 6-27	∅ 12-36	↑ 33-61	∅ 14-39	∅ 14-39	∅ 26-54	0,0158
	perivaskulär pro mm ²	∅ 6-10	↔ 6-10	∅ 6-10	↑ 11-17	∅ 7-12	∅ 8-12	∅ 8-13	0,0143
	perivaskulär relativ (%)	∅ 73-94	↔ 73-94	∅ 64-88	↓ 39-67	∅ 61-86	∅ 61-86	∅ 46-74	0,0158
	ramifiziert CD68 mm ²	∅ 5-9	↔ 5-9	∅ 7-12	↑ 10-19	∅ 7-12	∅ 9-16	↑ 10-18	0,0053
	ramifiziert im Parenchym CD68 mm ²	∅ 0-2	↔ 0-3	∅ 1-4	∅ 2-7	∅ 0-3	∅ 1-5	↑ 3-11	0,0115
	ramifiziert perivaskulär CD68 mm ²	∅ 4-7	↔ 4-7	∅ 6-8	↑ 8-12	∅ 6-10	∅ 7-10	∅ 6-9	0,0088

Tabelle 2: In dieser Tabelle wird der Ablauf der CD68-Expression abhängig von der Zeit nach Bestrahlung in den verschiedenen untersuchten Arealen dargestellt. Die Expression in Mikroglia / Makrophagen geschieht 2 Stunden und 3 Tage nach Bestrahlung. (CI = obere und untere 95%-Konfidenzintervalle, ↑ / ↓ = signifikant höher / niedriger zu ↔; ∅ = nicht signifikant unterschiedlich zu ↔; min / h / d = Minuten / Stunden / Tage nach Bestrahlung; p-value der ANOVA).

9. Abkürzungen

1 x N	einmalige Narkose bei Tieren, die 20 min überlebten
2 x N	zweite Narkose bei allen übrigen Tieren
A	Adenosin Base
ABC	Avidin Biotin Komplex
A.d.	Aqua dest.
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin Triphosphat
bp	Basenpaare
C ₂ H ₂	Cys ₂ His ₂ Zinkfingerklasse
CA	Cornu ammonis innerhalb der Hippocampusformation
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CC	Corpus callosum, Balken
CD	Cluster of differentiation, Oberflächenmarker
cDNA	Copy DNA
CI	Konfidenzintervall
CNPase	Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase
CPE	Zytoplasmatisches Polyadenylierungselement
CRE	cAMP-like Response Element
CSF	Colony Stimulating Factor
C	Cytosin Base
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBS	Egr1 Binding Site
EGF	Endothelial Growth Factor
Egr1	Early Growth Response Gene 1 (Protein)
egr1	egr1 (Gen)
<i>egr1</i>	<i>egr1</i> (mRNA)
<i>egr1-sv</i>	<i>egr1</i> short version (kurze mRNA)
<i>egr1-lv</i>	<i>egr1</i> long version (lange mRNA)
Egr1 ⁺	positiv für Egr1 (in Immunhistochemie, Western blot, PCR)
Egr1 ^{-/-}	Egr1 knock-out, bzw. homozygot Egr1 defiziente Tiere
EMAP II	Endothelial-Monocyte-Activating-Polypeptide II (Protein)
<i>emap II</i>	EMAP II (mRNA)
ERK 1/2	Extracellular Signal-regulated Protein Kinase 1/2
G	Guanosin Base
GD	Gyrus dentatus innerhalb der Hippocampusformation
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GTP	Guanosin Triphosphat
Gy	Gray
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h	Stunde
HE	Hämatoxylin und Eosin Gegenfärbung

Hela	humane Krebszelllinie
HH	Hilus des Hippocampus, weiße Substanz
HRP	Horse Radish Peroxidase
IFN	Interferon
IGF	Insuline-like Growth Factor
IL	Interleukin
JNK/SAPK	c-Jun N-terminal Protein Kinase / Stress-Activated Protein Kinase
kDa	Kilo Dalton
LH	Luteinisierendes Hormon
M / mM	Mol, molares Gewicht
min	Minute
mRNA	Messenger-RNA
mw	Mittelwert in Form des geometrischen Mittels
n	Anzahl der Tiere / Proben
Na	Natrium
NGF	Nerve Growth Factor
NLS	Nuclear Localization Signal
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	Phosphate Buffer Saline / Pufferlösung
PDGF-A	Platelet Derived Growth Factor A
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog Gene
PVDF	Polyvinylidenfluorid-Membran
ROI	Reaktive Oxygen Intermediates
RT	Reverse Transkription <i>oder</i> Raumtemperatur
sec	Sekunde
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Factor
SV	Seitenventrikel
TBS	Tris base buffered Saline / Pufferlösung
TBS-T	Tris base buffered Saline mit 0,1% Tween 20 (Detergenz)
TCF	Ternary Complex Factor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TPA	Tetradecanoyl Phorbol Acetat
U	Uridin Base
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslated Region
UV-C	Ultraviolette Strahlung C
V	Volt
W	Watt
w/v	weight per volume
ZNS	Zentrales Nervensystem

10. Literaturverzeichnis

Literature Cited

1. Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, Jiang C, Schuman EM. 2001. Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* 30(2):489-502
2. Baskaran R, Wood LD, Whitaker LL, Canman CE, Morgan SE, Xu Y, Barlow C, Baltimore D, Wynshaw-Boris A, Kastan MB, Wang JY. 1997. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* 387(6632):516-9
3. Cao X, Mahendran R, Guy GR, Tan YH. 1993. Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J. Biol. Chem.* 268(23):16949-57
4. Chow BM, Li YQ, Wong CS. 2000. Radiation-induced apoptosis in the adult central nervous system is p53-dependent. *Cell Death. Differ.* 7(8):712-20
5. Christy BA, Lau LF, Nathans D. 1988. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85(21):7857-61
6. Cole AJ, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF. 1989. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* 340(6233):474-6
7. Datta R, Taneja N, Sukhatme VP, Qureshi SA, Weichselbaum R, Kufe DW. 1993. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90(6):2419-22
8. Day ML, Fahrner TJ, Aykent S, Milbrandt J. 1990. The zinc finger protein NGFI-A exists in both nuclear and cytoplasmic forms in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 265(25):15253-60
9. Deininger MH, Pater S, Strik H, Meyermann R. 2001. Macrophage/microglial cell subpopulations in glioblastoma multiforme relapses are differentially altered by radiochemotherapy. *J. Neurooncol.* 55(3):141-7
10. Del-Rio Hortega P. 1932. in *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* (Penfield, W., ed.), pp. 481-534. 481-534 pp.
11. Dorn C, Ou Q, Svaren J, Crawford PA, Sadovskiy Y. 1999. Activation of luteinizing hormone beta gene by gonadotropin-releasing hormone requires the synergy of early growth response-1 and steroidogenic factor-1. *J. Biol. Chem.* 274(20):13870-6
12. Dziema H, Oatis B, Butcher GQ, Yates R, Hoyt KR, Obrietan K. 2003. The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 17(8):1617-27
13. Fischer AJ, McGuire JJ, Schaeffel F, Stell WK. 1999. Light- and focus-dependent expression of the transcription factor ZENK in the chick retina. *Nat. Neurosci.* 2(8):706-12

14. Gashler AL, Swaminathan S, Sukhatme VP. 1993. A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor *Egr-1*. *Mol. Cell Biol.* 13(8):4556-71
15. Hallahan DE, Dunphy E, Virudachalam S, Sukhatme VP, Kufe DW, Weichselbaum RR. 1995. *C-jun* and *Egr-1* participate in DNA synthesis and cell survival in response to ionizing radiation exposure. *J. Biol. Chem.* 270(51):30303-9
16. Hebert MA, Serova LI, Sabban EL. 2005. Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus. *J. Neurochem.* 95(2):484-98
17. Heffner TG, Hartman JA, Seiden LS. 1980. A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13(3):453-6
18. Herdegen T, Walker T, Leah JD, Bravo R, Zimmermann M. 1990. The *KROX-24* protein, a new transcription regulating factor: expression in the rat central nervous system following afferent somatosensory stimulation. *Neurosci. Lett.* 120(1):21-4
19. Hughes P, Lawlor P, Dragunow M. 1992. Basal expression of *Fos*, *Fos-related*, *Jun*, and *Krox 24* proteins in rat hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 13(4):355-7
20. Hwang SY, Jung JS, Kim TH, Lim SJ, Oh ES, Kim JY, Ji KA, Joe EH, Cho KH, Han IO. 2005. Ionizing radiation induces astrocyte gliosis through microglia activation. *Neurobiol. Dis.*
21. Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S. 2001. A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat. Neurosci.* 4(3):289-96
22. Jones N, Agani FH. 2003. Hyperoxia induces *Egr-1* expression through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *J. Cell Physiol* 196(2):326-33
23. Jungling S, Cibelli G, Czardybon M, Gerdes HH, Thiel G. 1994. Differential regulation of chromogranin B and synapsin I gene promoter activity by cAMP and cAMP-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem.* 226(3):925-35
24. Knight C, Slade JP, Carter D. 2000. The nuclear, 75 kDa form of early growth response protein-1/nerve growth factor-induced A protein is primarily restricted to LH beta-subunit-expressing cells in rat anterior pituitary. *Eur. J. Endocrinol.* 143(6):817-21
25. Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19(8):312-8
26. Kurita H, Kawahara N, Asai A, Ueki K, Shin M, Kirino T. 2001. Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in the adult rat brain. *Neurol. Res.* 23(8):869-74
27. Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff AH, Polish JA, Goda P, Gavrilina G, Milbrandt J. 1996. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor *NGFI-A (Egr-1)*. *Science* 273(5279):1219-21
28. Lemaire P, Revelant O, Bravo R, Charnay P. 1988. Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85(13):4691-5
29. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. 1995. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 270(22):13333-40
30. Li YQ, Jay V, Wong CS. 1996. Oligodendrocytes in the adult rat spinal cord undergo radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 56(23):5417-22

31. Mack K, Day M, Milbrandt J, Gottlieb DI. 1990. Localization of the NGFI-A protein in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 8(2):177-80
32. Mackillop WJ, Groome PA, Zhang-Solomons J, Zhou Y, Feldman-Stewart D, Paszat L, Dixon P, Holowaty EJ, Cummings BJ. 1997. Does a centralized radiotherapy system provide adequate access to care? *J. Clin. Oncol.* 15(3):1261-71
33. Madden SL, Rauscher FJ, III. 1993. Positive and negative regulation of transcription and cell growth mediated by the EGR family of zinc-finger gene products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 684:75-84
34. Malkani S, Rosen JB. 2001. N-Methyl-D-aspartate receptor antagonism blocks contextual fear conditioning and differentially regulates early growth response-1 messenger RNA expression in the amygdala: implications for a functional amygdaloid circuit of fear. *Neuroscience* 102(4):853-61
35. Manome Y, Kunieda T, Wen PY, Koga T, Kufe DW, Ohno T. 1998. Transgene expression in malignant glioma using a replication-defective adenoviral vector containing the Egr-1 promoter: activation by ionizing radiation or uptake of radioactive iododeoxyuridine. *Hum. Gene Ther.* 9(10):1409-17
36. Martinez JM, Baek SJ, Mays DM, Tithof PK, Eling TE, Walker NJ. 2004. EGR1 is a novel target for AhR agonists in human lung epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 82(2):429-35
37. Mercier G, Turque N, Schumacher M. 2001. Rapid effects of triiodothyronine on immediate-early gene expression in Schwann cells. *Glia* 35(2):81-9
38. Merseburger AS, Hennenlotter J, Simon P, Ohneseit PA, Kuehs U, Kruck S, Koch E, Vogel U, Stenzl A, Kuczyk MA. 2005. Cathepsin D expression in renal cell cancer-clinical implications. *Eur. Urol.* 48(3):519-26
39. Meyer RG, Kupper JH, Kandolf R, Rodemann HP. 2002. Early growth response-1 gene (Egr-1) promoter induction by ionizing radiation in U87 malignant glioma cells in vitro. *Eur. J. Biochem.* 269(1):337-46
40. Milbrandt J. 1987. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 238(4828):797-9
41. Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD. 2002. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat. Med.* 8(9):955-62
42. Nakagawa M, Bellinzona M, Seilhan TM, Gobbel GT, Lamborn KR, Fike JR. 1996. Microglial responses after focal radiation-induced injury are affected by alpha-difluoromethylornithine. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 36(1):113-23
43. Pines A, Romanello M, Cesaratto L, Damante G, Moro L, D'andrea P, Tell G. 2003. Extracellular ATP stimulates the early growth response protein 1 (Egr-1) via a protein kinase C-dependent pathway in the human osteoblastic HOBIT cell line. *Biochem. J.* 373(Pt 3):815-24
44. Reinacher PC, Blum C, Gass P, Karger CP, Debus J. 1999. Quantification of microglial late reaction to stereotactic irradiation of the rat brain using computer-aided image analysis. *Exp. Neurol.* 160(1):117-23
45. Roman DD, Sperduto PW. 1995. Neuropsychological effects of cranial radiation: current knowledge and future directions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31(4):983-98
46. Russo MW, Sevetson BR, Milbrandt J. 1995. Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92(15):6873-7

47. Schlingensiepen KH, Luno K, Brysch W. 1991. High basal expression of the zif/268 immediate early gene in cortical layers IV and VI, in CA1 and in the corpus striatum--an in situ hybridization study. *Neurosci. Lett.* 122(1):67-70
48. Schluesener HJ, Seid K, Zhao Y, Meyermann R. 1997. Localization of endothelial-monocyte-activating polypeptide II (EMAP II), a novel proinflammatory cytokine, to lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis and uveitis: expression by monocytes and activated microglial cells. *Glia* 20(4):365-72
49. Sells SF, Muthukumar S, Sukhatme VP, Crist SA, Rangnekar VM. 1995. The zinc finger transcription factor EGR-1 impedes interleukin-1- inducible tumor growth arrest. *Mol. Cell Biol.* 15(2):682-92
50. Seyfert VL, McMahon SB, Glenn WD, Yellen AJ, Sukhatme VP, Cao XM, Monroe JG. 1990. Methylation of an immediate-early inducible gene as a mechanism for B cell tolerance induction. *Science* 250(4982):797-800
51. Shinohara C, Gobbel GT, Lamborn KR, Tada E, Fike JR. 1997. Apoptosis in the subependyma of young adult rats after single and fractionated doses of X-rays. *Cancer Res.* 57(13):2694-702
52. Simon P, Schott K, Williams RW, Schaeffel F. 2004. Posttranscriptional regulation of the immediate-early gene EGR1 by light in the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* 20(12):3371-7
53. Stewart PA, Vinters HV, Wong CS. 1995. Blood-spinal cord barrier function and morphometry after single doses of x-rays in rat spinal cord. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 32(3):703-11
54. Stuart JR, Kawai H, Tsai KK, Chuang EY, Yuan ZM. 2005. c-Abl regulates Early Growth Response Protein (EGR1) in response to oxidative stress. *Oncogene*
55. Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PC, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Curran T, . 1988. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 53(1):37-43
56. Surma-aho O, Niemela M, Vilkki J, Kouri M, Brander A, Salonen O, Paetau A, Kallio M, Pyykkonen J, Jaaskelainen J. 2001. Adverse long-term effects of brain radiotherapy in adult low-grade glioma patients. *Neurology* 56(10):1285-90
57. Toro-Roman A, Wu T, Stock AM. 2005. A common dimerization interface in bacterial response regulators KdpE and TorR. *Protein Sci.* 14(12):3077-88
58. Tourtellotte WG, Nagarajan R, Bartke A, Milbrandt J. 2000. Functional compensation by Egr4 in Egr1-dependent luteinizing hormone regulation and Leydig cell steroidogenesis. *Mol. Cell Biol.* 20(14):5261-8
59. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.* 266(1-2):37-56
60. van der Kogel AJ. 1986. Radiation-induced damage in the central nervous system: an interpretation of target cell responses. *Br. J. Cancer Suppl* 7:207-17
61. Varnum BC, Lim RW, Kujubu DA, Luner SJ, Kaufman SE, Greenberger JS, Gasson JC, Herschman HR. 1989. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tetradecanoyl phorbol acetate induce a distinct, restricted subset of primary-response TIS genes in both proliferating and terminally differentiated myeloid cells. *Mol. Cell Biol.* 9(8):3580-3
62. Virolle T, Adamson ED, Baron V, Birle D, Mercola D, Mustelin T, de B, I. 2001. The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat. Cell Biol.* 3(12):1124-8

63. Waters CM, Hancock DC, Evan GI. 1990. Identification and characterisation of the *egr-1* gene product as an inducible, short-lived, nuclear phosphoprotein. *Oncogene* 5(5):669-74
64. Wei F, Xu ZC, Qu Z, Milbrandt J, Zhuo M. 2000. Role of EGR1 in hippocampal synaptic enhancement induced by tetanic stimulation and amputation. *J. Cell Biol. P.*
65. Wells DG, Dong X, Quinlan EM, Huang YS, Bear MF, Richter JD, Fallon JR. 2001. A role for the cytoplasmic polyadenylation element in NMDA receptor- regulated mRNA translation in neurons. *J. Neurosci.* 21(24):9541-8
66. Wells DG, Richter JD, Fallon JR. 2000. Molecular mechanisms for activity-regulated protein synthesis in the synapto-dendritic compartment. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10(1):132-7
67. Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ. 1995. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269(5222):403-7
68. Wu L, Wells D, Tay J, Mendis D, Abbott MA, Barnitt A, Quinlan E, Heynen A, Fallon JR, Richter JD. 1998. CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* 21(5):1129-39
69. Yan SF, Fujita T, Lu J, Okada K, Shan-Zou Y, Mackman N, Pinsky DJ, Stern DM. 2000. *Egr-1*, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat. Med.* 6(12):1355-61

11. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich Herrn Prof. Meyermann für die Vergabe der Arbeit und für die allseitige Unterstützung danken. Er hat die Arbeit in weiten Teilen maßgeblich bestimmt.

Herrn Dr. Dr. Simon schulde ich ganz besondere Dankbarkeit für seine enge und intensive Betreuung der Arbeit. Seine zahlreichen Ideen und Anregungen führten oft auf den richtigen Weg, seine Geduld und freundliche Art waren scheinbar nie zu zerrütten!

Frau Wölfel war meine unermüdliche und motivierende Mitstreiterin während dieser Arbeit. Nach dem Motto: doppelt hält besser, haben wir uns unzählige Male gegenseitig den Rücken gestärkt – immer dann, wenn es der andere besonders nötig hatte.

Herrn Prof. Schlüsener möchte ich ebenfalls für seine Hilfe und Unterstützung mit den Tieren meinen Dank ausdrücken – ohne ihn wäre die Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. Wick aus der Neurologie habe ich die freundliche Überlassung der Räumlichkeiten im Verfügungsgebäude der Universität Tübingen zu verdanken. Er und seine Mitarbeiter haben bereitwillig Einführungen und Auskunft gegeben.

Vielen Dank weiterhin Herrn Doktor Koneczny für sein stetes Interesse und ganz besonders Herrn Doktor Schiel für das Korrekturlesen.

Aus dem Institut für Hirnforschung gilt allen Mitarbeitern meine Dankbarkeit für ihre technische Unterstützung, Rat & Tat, Aufmunterung und ihr Interesse. Besonders hervorheben möchte ich: die motivierende Einstellung von Herrn Dr. Mittelbronn während des Doktorandenseminars, hilfreiche Tips durch Herrn Dr. Beschorner, der kompetente Blick von Frau Trautmann, Herrn Bekure's nahezu magischer Umgang mit dem Mikrotom, der mir ewig in Erinnerung bleiben wird, Herrn Nguyen's ebenfalls magische Anwesenheitskräfte bei den Western Blots und last but not least der enge fachliche wie zwischenmenschliche Kontakt zu den anderen Doktoranden, der einem oft genug auf die Beine geholfen hat und die Zeit intensiver Forschung angenehmer bereitete.

12. Lebenslauf

Geburtsdaten 19.05.1978 in Schwäbisch Hall

Schulausbildung

1985 – 1998 Rollhof-Grundschule / Erasmus-Widmann-Gymnasium
in Schwäbisch Hall

Zivildienst

1998 – 1999 im OP-Bereich der Chirurgischen Universitätsklinik
Tübingen

Studium

04 / 2000 – 03 / 2005 Studium an der Eberhard Karls Universität Tübingen
03 / 2002 Physikum
03 / 2003 1. Staatsexamen
03 / 2005 2. Staatsexamen
18.04.2005 – 02.04.2006 Praktisches Jahr an der Technischen Universität Dresden
08.05.2006 3. Staatsexamen
13.06.2006 Approbation als Arzt

Beruf

seit 01.09.2006 Assistenzarzt an der Klinik für Neurologie der
Friedrich-Schiller-Universität Jena