

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**„Subakute Proteomveränderungen des sich
entwickelnden Gehirns nach Schädelhirntrauma“**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Ron Lehnert
aus Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. H. Ikonomidou
2. Priv.-Doz. Dr. med. R. Bauer
3. Prof. Dr. med. F. Heppner

Datum der Promotion: 18.09.2009

Abkürzungen und Datenbanken

ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom
AMPA	alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure
APS	Ammoniumpersulfatlösung
ATP	Adenosintriphosphat
aV	„amount“-Variante
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DG	1,2-Diacylglycerol
ESI	Elektrospray ionization
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GCS	Glasgow Coma Scale
GEF	Guanine nucleotide exchange factors
GID	Guanindiphosphat-Dissoziationsinhibitor
H ₂ O	Wasser
ICD	International Classification of Disease
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IP3	Inositol-(1,4,5)-Triphosphat
LC	Liquid Chromatography = Flüssigchromatographie
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
mV	Mobilitätsvariante
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
paV	„presence/absence“-Variante
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PIP2	Phosphoinositol-2-phosphat
RAN	Ras-related nuclear protein = Ras-verwandtes nukleäres Protein
ROS	Reactive oxygen species = freie Sauerstoffradikale
SDS	Sodiumdodecylsulfat = Natriumdodecylsulfat
SHT	Schädelhirntrauma
SSW	Schwangerschaftswoche
TAE	10 mmol EDTA (pH 8.0), 2,3 % (v/v) Essigsäure und 0,5 M Tris
TE	10 mmol Tris pH 8.01 und 0,1 mmol EDTA
TKM	10 mmol Tris pH 7.6, 10 mmol KCl, 2 mmol EDTA und 4 mmol MgCl ₂
TNF	Tumornekrosefaktor
ZNS	Zentrales Nervensystem
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Ingenuity Pathway Analysis	http://www.ingenuity.com
MASCOT	http://www.matrixscience.com/
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Swiss-Prot/ TrEMBL	http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-ful

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Datenbanken.....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Definition und Epidemiologie des Schädelhirntraumas	1
1.2 Folgeschäden von Schädelhirntraumata bei Kindern.....	2
1.3 Vulnerabilität des Gehirns während der Entwicklung.....	4
1.4 Hirnschädigung infolge eines mechanischen Traumas bei Kindern	5
1.5 Aktuelle Therapieoptionen.....	7
1.6 Aussagekraft von Proteomuntersuchungen	8
1.7 Zielsetzung der Studie.....	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Tierversuche	10
2.2 Geschlechtsbestimmung	11
2.3 Probenaufarbeitung	13
2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung	15
2.5 Zweidimensionale Großgelelektrophorese (2-DE)	16
2.5.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)	16
2.5.2 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	21
2.6 Silberfärbung der 2-DE Gele	24
2.7 Trocknung der 2-DE Gele.....	26
2.8 Analyse der 2-DE Proteinmuster	26
2.8.1 Visuelle Auswertung	27
2.8.2 Computergestützte Auswertung	27

2.9	Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie	28
2.10	Analyse mittels Proteindatenbanken	29
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Trauma-induzierte Gehirnproteomveränderungen bei infantilen Mäusen.....	30
3.2	Oxidativer Stress, Entzündung, Apoptose und Neuroprotektion.....	31
3.3	Aufrechterhaltung von Zellfunktion und -wachstum	31
3.4	Neuronale Differenzierung.....	32
3.5	Weitere Proteine	32
4	Diskussion.....	40
4.1	Trauma-induzierte Veränderungen des Gehirnproteoms.....	40
4.2	SHT verursacht Apoptose, mikrogliale Aktivierung und oxidativen Stress	41
4.3	Proteine neuronaler Migration und axonaler Aussprossung	46
4.4	Proteine der Aufrechterhaltung von Zellfunktion und Zellwachstum	49
4.5	Proteine der Cholesterinbiosynthese und andere Proteine.....	50
4.6	Moonlighting-Funktion der Proteine	50
4.7	Netzwerkanalyse	51
4.8	Schlussbemerkungen	55
	Zusammenfassung.....	56
	Schriftenverzeichnis	58
	Publikationsliste	68
	Curriculum Vitae.....	69

Danksagung70

Eidesstattliche Erklärung.....71

1 Einleitung

1.1 Definition und Epidemiologie des Schädelhirntraumas

Unter dem Begriff Schädelhirntrauma (SHT) werden durch äußere Gewalteinwirkung erlittene Funktionsstörungen des Gehirns zusammengefasst, bei denen Schädel (Weichteile, Knochen) und Gehirn (Hirnhäute, Hirnsubstanz, Gefäße) in unterschiedlichem Maße betroffen sein können [1, 95]. Im englischsprachigen Raum existieren dafür die beiden Begriffe „head injury“ und „traumatic brain injury (TBI)“; genauere, selten verwendete Bezeichnungen sind „craniocerebral trauma“ und „closed head injury (CHI)“.

Die heute allgemein übliche Einteilung in leichte, mittelschwere und schwere Hirnverletzungen orientiert sich an der Dauer und Schwere der posttraumatischen Bewusstseinsstörung beziehungsweise an der antero- und retrograden Amnesie. Mit der Glasgow Coma Scale (GCS) kann die Einschätzung des Bewusstseinszustandes quantitativ ausgedrückt werden.

Das SHT ist eine der häufigsten Ursachen für die Mortalität und die Morbidität von Kindern und Erwachsenen in den industrialisierten Ländern [20, 48, 116]. Allein in Deutschland wurden im Jahr 2005 91.400 Kinder unter 15 Jahren mit Kopfverletzungen stationär behandelt (Abbildung 1) [24]. Obgleich die Versorgung in Mitteleuropa einen hohen Standard erreicht hat, bleibt das SHT eine der Haupttodesursachen für Kinder [122]. Nicht selten bleiben bei überlebenden Kindern lebenslange Folgen mit mentaler und motorischer Behinderung zurück. Dies stellt einen bedeutenden individuellen und volkswirtschaftlichen Schaden dar, da biologische und soziale Entwicklungsprozesse noch nicht abgeschlossen und eine höhere Anzahl an Lebensjahren zu erwarten sind. Ergebnisse umfangreicher Untersuchungen der Altersverteilung von SHT in den Vereinigten Staaten von Amerika entsprechen im Wesentlichen denen Deutschlands. Pro Jahr erleiden mehr als eine Million Personen ein SHT und ein Sechstel dieser Fälle wird im Krankenhaus aufgenommen [39]. Jährlich erleiden 100.000 bis 200.000 Kinder ein SHT. Dieses ist damit für über 50% der Todesfälle von Kindern verantwortlich. In der Gruppe der unter Vierjährigen sind mindestens zwei Drittel der schweren SHT durch Kindesmisshandlung verursacht [49]. Die tatsächliche Inzidenz des SHT liegt sicherlich weitaus höher, da in vielen dieser Studien weder vor-, nach- und teilstationär, noch ambulant behandelte oder unbehandelte Patienten berücksichtigt wurden [23, 39, 55, 100]. Eine Studie aus dem Jahr 2004 lässt vermuten, dass ein bedeutender Anteil an

Kindern mit SHT unbehandelt bleibt [94]. In der entsprechenden Untersuchung einer Gruppe von Kindern unter zwei Jahren, bei denen eine Misshandlung vermutet wurde, fand man mittels bildgebender Verfahren bei 29% radiologische Hinweise auf ein zurückliegendes SHT ohne entsprechende neurologische Symptome.

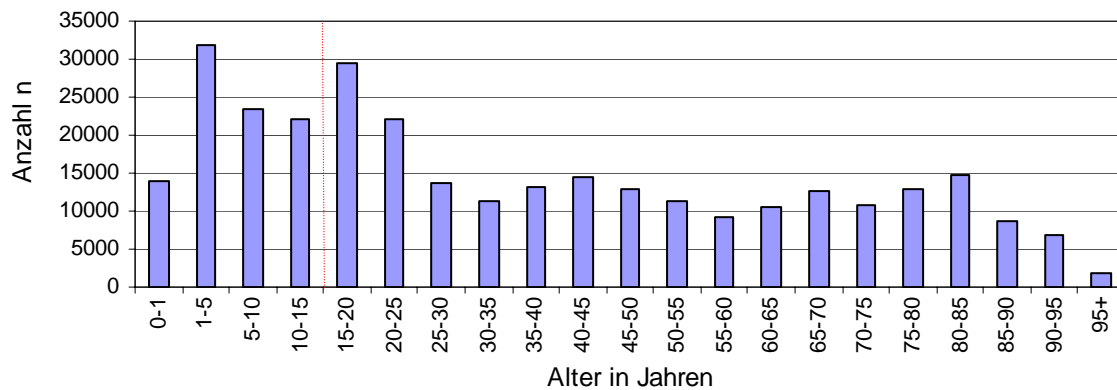


Abbildung 1: Altersverteilung vollstationärer Patienten mit Kopfverletzungen in Deutschland im Jahre 2005

Altersverteilung der 308.191 aus dem Krankenhaus entlassenen vollstationären Patienten und Patientinnen mit Kopfverletzungen im Jahr 2005 in Deutschland. Diese Summe ergibt sich nach der Internationalen Klassifikation der Krankheiten ICD-10 S00-S09 und schließt Sterbe- und Stundenfälle ein [24]. Die Gruppe der unter 15-jährigen ist mit 91.426 Betroffenen (30%) überproportional repräsentiert.

Es stellt sich die Frage, warum Kinder unter 15 Jahren überproportional ein SHT erleiden. Dies liegt unter anderem an ihrem Kopf-Körper-Verhältnis, ihrer eher schwach ausgebildeten Halsmuskulatur, entwicklungsabhängiger mangelhafter Koordination und Aufmerksamkeitsdefizite sowie einer oftmals falschen Gefahreinschätzung [49]. Zu äußeren Ursachen für pädiatrische SHT zählen bei Säuglingen und Kleinkindern hauptsächlich Stürze und Misshandlungen („battered child syndrome“, „shaken impact syndrome“) [9, 49, 113, 123]; bei älteren Kindern kommen vorwiegend Unfälle im Straßenverkehr (Kinder als Fußgänger und Radfahrer) und Unfälle während verschiedener Freizeitaktivitäten vor [49]. In der Altersgruppe unter einem Jahr ist die Wahrscheinlichkeit ein SHT zu erleiden bei Jungen wie Mädchen gleich groß. Ältere Jungen unter 15 Jahren haben dagegen ein zweifach höheres Risiko als Mädchen im gleichen Alter [13, 47, 49, 94, 113, 123].

1.2 Folgeschäden von Schädelhirntraumata bei Kindern

Nicht selten verursachen SHT lebenslange Folgen mit schweren mentalen und motorischen Behinderungen, und es stellt sich die Frage, wie man deren Ausmaß prognostizieren und minimieren kann. Die Einschätzung der Schwere eines SHT erfolgt

nach der GCS, welche aber für eine Einzelfallprognose keine sichere Basis ist, denn auch leichte SHT werden nicht immer folgenlos überstanden [102]. Das heißt, obwohl 90% der Kinder nur leichtere SHT haben, finden sich Angaben über subjektive SHT-Folgen in bis zu 30% der Fälle [95].

Im Verlauf auftretende motorische und somatosensorische Störungen sind ausschließlich vom Ort der Schädigung abhängig, haben eine unsichere Beziehung zur SHT-Schwere und keine Korrelation zum Schädigungsalter. Neuropsychologische Defizite, wie Störungen der Aufmerksamkeit, des Gedächtnisses und lokalisationsbezogene Störungen visuo-räumlicher und sprachlicher Funktionen, sind dagegen vom Schädigungsort und -alter abhängig. Sie sind bei Kindern nach SHT erst im Langzeitverlauf zu beurteilen. In klinischen Studien wird deutlich, dass das Alter entscheidend Morbidität und Mortalität nach SHT beeinflusst, wobei die unter Vierjährigen die schlechtesten Ergebnisse zeigen [3, 85]. Koskiniemi et al. beschrieben in einer Kohorte von 39 Kindern mit schwerem SHT vor dem vierten Lebensjahr, dass 59% eine normale Schule besuchten, aber als Erwachsene nur 23% in der Lage waren Vollzeit zu arbeiten. Für die Prognose nach einem SHT sind folgenden Faktoren entscheidend: (i) der individuelle Entwicklungsstand des Kindes vor dem SHT, (ii) das Alter des Kindes zum Zeitpunkt des SHT, (iii) die Art, das Ausmaß und der Ort der unfallbedingten Hirnschädigung, (iv) der Beginn und die Art der durchgeführten Erstversorgung, (v) die Akutbehandlung und Rehabilitation sowie (vi) das familiäre und soziale Umfeld [95].

Im Folgenden sollen einige Erkrankungen nach SHT dargestellt werden. Nach SHT wurden verschiedene psychiatrische Erkrankungen wie Schizophrenie, Depression und bipolare Erkrankungen [2, 100] sowie Verhaltensstörungen wie Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) beschrieben [55, 100, 102]. Die Entwicklung einer posttraumatischen Epilepsie, deren Inzidenz mit 3-12% angegeben wird, kann in Abhängigkeit von Anfallsart und -häufigkeit zu einer wesentlichen Verschlechterung der posttraumatischen Situation führen [6, 7, 23, 84, 95]. Außerdem kann es bei Kindern 3-36 Monate nach einem schweren SHT zu einer Reduktion des Balken- (=Corpus Callosum) Wachstums kommen [96]. Der Balken verbindet vor allem die linke und die rechte Hirnhälfte und somit alle wichtigen Untereinheiten des zerebralen Kortex inklusive der Fasern assoziativer Regionen. Sein Wachstum könnte die Reifung integrativer Fähigkeiten unterstützen. Des Weiteren kann es nach SHT sowohl bei Kindern als auch Erwachsenen zu neuroendokrinen Störungen, wie z. B. der Hypothalamus-Hypophysenachse, kommen [4, 28, 41, 105].

Wie erwähnt, beeinflussen verschiedene Faktoren das Ausmaß der Schädigung nach SHT, wobei das Alter eine der wichtigsten Einflussgrößen zu sein scheint. Das heißt, es gibt eine bestimmte Zeitspanne, in welcher das sich entwickelnde Gehirn besonders empfindlich auf äußere Einwirkungen reagiert. Dies könnte die besonders schlechten Langzeitergebnisse von Kindern mit SHT vor der Einschulung erklären [85, 95]. Verschiedene feinstrukturelle Veränderungen könnten diesen Störungen zugrunde liegen. Die Feineinstellung neuronaler Verbindungen während der Entwicklung wird durch Interaktionen mit der Umwelt reguliert. Dies geschieht durch Veränderungen der Genexpression [26] und / oder durch DNA-Methylierung [2]. Die Entwicklung neuronaler Verschaltungen kann als epigenetischer Prozess angesehen werden: Viele verschiedene Komponenten müssen zur richtigen Zeit am richtigen Ort zusammenkommen [90].

1.3 Vulnerabilität des Gehirns während der Entwicklung

Eine für das reife Gehirn harmlose Verletzung kann zu einer ausgeprägten Neurodegeneration im unreifen Gehirn führen. Der Zeitpunkt der größten Empfindlichkeit des sich entwickelnden Gehirns gegenüber äußeren Einwirkungen, wie z. B. SHT, fällt mit dem Gipfel des Gehirnwachstumsschubes zusammen. Diese Entwicklungsphase beginnt beim Menschen im letzten Trimenon der Schwangerschaft und erstreckt sich über die ersten Lebensjahre (Abbildung 2) [35]. Die Ursache der hohen Morbidität und Mortalität Neugeborener und Kleinkinder nach einem SHT liegt vermutlich an einer Störung von wichtigen Entwicklungsschritten während dieser Phase der Gehirnentwicklung.

Betrachtet man die Zunahme des Gehirngewichts in Prozent des Gehirngewichts eines Erwachsenen gegenüber der Zeit, so fällt auf, dass es beim Menschen ab dem dritten Trimenon der Schwangerschaft zu einer raschen Zunahme des Gehirngewichts kommt. Diese Wachstumsphase, die im Englischen auch als „growth spurt phase“ bezeichnet wird, erstreckt sich über die ersten Lebensjahre. Ratte und Maus sind dagegen eher postnatale Hirnentwickler; bei ihnen findet die entsprechende Entwicklungsphase in den ersten postnatalen Lebenswochen statt. Somit sind beispielsweise sieben Tage alte Mäuse oder Ratten hinsichtlich ihrer Gehirnentwicklung ein gutes Modell für menschliche Säuglinge.

Während dieser Periode kommt es nach Abschluss der neuronalen Proliferation zur Zunahme an Gliazellen (gliale Multiplikation; engl. myelination gliosis), zur konsekutiven

Myelinisierung, zur Ausbildung neuronaler Schaltkreise und zu Reorganisationsprozessen; zu Letzteren gehört unter anderem die physiologische Apoptose. Der zeitliche Ablauf der physiologischen Gehirnentwicklung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Pathologische Prozesse treffen dementsprechend auf ein sich in Veränderung befindendes System und können physiologische Prozesse der Gehirnentwicklung des Menschen beeinflussen.

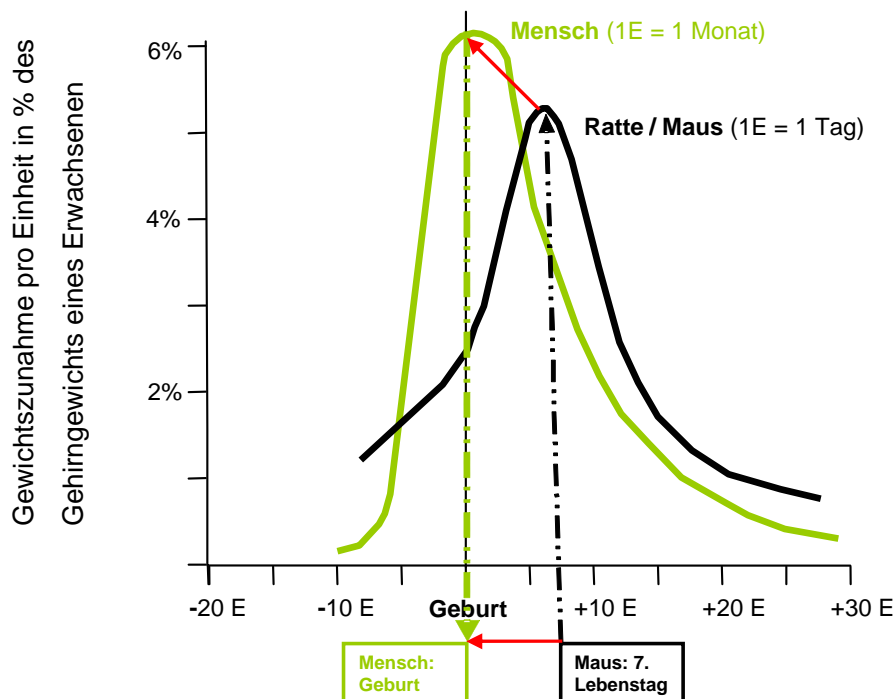


Abbildung 2: Gehirnwachstumsschub bei den Spezies Mensch und Ratte / Maus

Die Beschleunigung des menschlichen Gehirnwachstums im Vergleich mit der Spezies Maus (modifiziert nach Dobbing) [35]. Die Einheiten auf der x-Achse entsprechen je nach Spezies verschiedenen Zeitpunkten. Der 7. Lebenstag der Maus entspricht ungefähr dem Zeitpunkt der Geburt des menschlichen Säuglings.

1.4 Hirnschädigung infolge eines mechanischen Traumas bei Kindern

Unter Einwirkung eines mechanischen Traumas kommt es zu einer sofortigen, primären und einer verzögerten, sekundären Schädigung, die noch Stunden oder Tage später auftreten kann. Die primäre mechanische Verletzung kann diffuse axonale Verletzungen, intraparenchymale Kontusionen und/oder intrakranielle Hämatomer beinhalten [116]. Diesen Ereignissen folgt oftmals eine sekundäre Kaskade von biochemischen, zellulären und molekularen Störungen als auch extrazerebralen Komplikationen, die weitere Schäden verursachen können [115, 116].

Tabelle 1: Die strukturelle Hirnentwicklung beim Menschen [54, 90]

Phase	Beschreibung	Herschkowitz 1988 [54]	Lagercrantz 2001 [90]
1	neuronale Induktion	3 – 4 SSW	3 – 4 SSW
2	Neuroblastenproliferation	8 – 25 SSW	
3	neuronale Migration	8 – 34 SSW	12 – 24 SSW
4	neuronale selektive Aggregation	8 – 34 SSW	12 – 25 SSW
5	neuronale Differenzierung und Ausbildung neuronaler Schaltkreise	5 SSW – 4 Jahre	25+ SSW
6	programmierter Zelltod (Kortex)	25 SSW – 16 Jahre	25+ SSW
7	selektive Synapsenauslöschung (Kortex)	25 SSW – 16 Jahre	25+ SSW
8	Myelinisierung	25 SSW– 20 Jahre	40+ SSW

Meilensteine der Entwicklung des humanen ZNS nach Herschkowitz und Lagercrantz. Beginnend mit einer Periode maximaler neuronaler Proliferation, sind gliale Proliferation und Myelinisierung, ein explosiver Anstieg der dendritischen Komplexität, die Bildung von synaptischen Verbindungen und Reorganisationsereignisse gefährdete Prozesse während der Phase des Gehirnwachstumsschubes [35, 90]. SSW = Schwangerschaftswoche

An dem Ort der direkten Traumaeinwirkung kommt es zur glutamatvermittelten, erregungstoxischen Neurodegeneration mit Ödembildung [61, 62]. Die Freisetzung und Akkumulation potenziell schädigender Faktoren wie Calcium und exzitatorischen Aminosäure-Neurotransmittern (Glutamat, Aspartat), sowie die anschließende Aktivierung Neurotransmitter-spezifischer Rezeptoren, gilt als Initiator der sekundären Schädigung. Trotz der hohen Inzidenz an SHT und deren schweren Folgeschäden im Kindesalter ist der Kenntnisstand des Pathomechanismus kindlicher SHT gering. Im unreifen Gehirn der Ratte und der Maus verursacht ein mechanisches Trauma einen akuten exzitotoxischen Zelltod im Kontussionsbereich. Dieser breitet sich rasch innerhalb von vier Stunden aus [20, 62, 115]. Anschließend folgt der lokalen Antwort verzögert eine apoptotische Neurodegeneration, die deutlich stärker ausgeprägt ist und verschiedene Gehirnregionen ipsi- und kontralateral zum Kontussionsherd betrifft [20, 62, 115]. Die Schwere der apoptotischen Neurodegeneration nach SHT ist altersabhängig [17-20, 43, 44, 62, 115] und bei Ratten und Mäusen nach dem 14. Lebenstag

nicht mehr nachweisbar. Der traumainduzierte Zelltod ist mit oxidativem Stress, einer Aktivierung des intrinsischen und extrinsischen apoptotischen Signalweges als auch einer Zunahme der Transkription von Neurotrophinen verbunden [17-19, 43, 44, 83, 115]. Dieses rein mechanische Konzept erklärt aber noch nicht die selektive Verwundbarkeit von Gehirnregionen.

1.5 Aktuelle Therapieoptionen

Für die Therapie des SHT stehen pharmakologische, neurochirurgische, physiotherapeutische/physikalische, psychologische sowie ergotherapeutische Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung, welche aber die Folgeschäden dadurch nicht wesentlich reduzieren. In der klinischen Praxis behandelte man jahrelang SHT mit Kortikosteroiden bis Ergebnisse einer großen, multizentrischen Studie an 10,008 Erwachsenen mit klinisch signifikanter Kopfverletzung darauf hindeuteten, dass diese zu keiner Verringerung der Mortalität führt [37]. Experimentelle Studien zeigen aber einen Vorteil von 17α -Östradiol bei frühkindlichen SHT [51, 101]. Da es bei schwerem SHT nicht selten zu neuroendokrinen Störungen der Hypothalamus-Hypophysenachse kommt, wurde an 97 Patienten eine Therapie mit einer Kombination von Insulin-like-growth-factor 1 (IGF-1) und Wachstumshormon (GH) getestet, die bei moderatem bis schwerem SHT eine Verbesserung der Stoffwechselendpunkte erzielte [53]. Die Dopaminagonisten Pramipexol oder Amantadin zeigten bei 10 Patienten zwischen 8 bis 21 Jahren, welche auf herkömmliche Therapien nicht ansprachen, Erfolge [111]. Eine Studie an 80 Kindern legt anhand eines verbesserten „Pediatric Evaluation of Disability Inventory“ (PEDI) nahe, dass mehr Trainings- und Behandlungseinheiten wie Physiotherapie, funktionelles Training der Eigenpflege und physikalische Therapie nach SHT vorteilhaft sind [36]. Eine temporäre Kühlung des Kopfes oder Körpers ist ebenso eine therapeutische Option bei SHT [5, 58], wobei momentan nur für hypoxisch-ischämische Enzephalopathie klinisch kontrollierte Studien die Wirksamkeit belegen [67].

Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR- α)-aktivierendes Fenofibrat zeigte Einfluss auf neuroprotektive Effekte nach SHT [14]. Perfluorocarbon verbessert bei Ratten zwar die zerebrale Oxygenierung und mitochondriale Funktion, führt aber auch zu einer Zunahme der Bildung freier Radikale [32, 87]. Die Gabe von rekombinantem humanem Erythropoietin (rHuEPO) verbesserte bei Ratten und Mäusen die Ergebnisse nach SHT [38, 40].

1.6 Aussagekraft von Proteomuntersuchungen

Das Proteom ist definiert als die Gesamtheit aller durch das Genom exprimierten Proteine inklusive ihrer durch ko- und posttranslationale Modifikationen entstandenen Isoformen. Es ist damit ein dynamisches System und von Organ zu Organ, von Zelle zu Zelle und zwischen subzellulären Kompartimenten unterschiedlich. Das Proteom verändert sich zudem im Verlauf der Entwicklung. Vergleichende Proteomuntersuchungen ermöglichen die Identifizierung von Proteinen, die beispielsweise im Rahmen einer Erkrankung dysreguliert werden. Hierbei stellt auch heute noch die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) in Kombination mit der Massenspektrometrie (MS) die Methode der Wahl mit dem größten Auflösungsvermögen von bis zu 10,000 Proteinspots dar. Durch die hochauflösende 2-DE nach Klose werden Proteingemische in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (Mw) aufgetrennt. Bei der isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine nach Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt. Nach Erreichen des isoelektrischen Punktes verlieren sie ihre Mobilität. Die Proteine haben sehr unterschiedliche pI und können so voneinander getrennt werden. Saure und basische Aminosäuren eines Proteins tragen je nach pH-Wert des umgebenden Mediums unterschiedliche Ladungen. Am sogenannten pI eines Proteins beträgt seine Nettoladung, d. h. die Summe der Ladungen seiner einzelnen Aminosäuren, null. An diesem pH-Wert ist die elektrophoretische Beweglichkeit bei der Isoelektrischen Fokussierung (IEF) ebenfalls null, was bei der IEF genutzt wird. Ein Proteinspot ist das nach einer entsprechenden Anfärbung sichtbar werdende Protein als „Fleck“ auf einem 2-DE Gel. Auf Letzterem kann ein Protein durch einen oder mehrere Spots (Isospots) repräsentiert sein, die durch ko- und/oder posttranslationale Modifikationen des primären Proteins, Proteinprozessierung oder Proteinabbau entstehen. Modifikationen können zu Veränderungen des pI, des Mw und/oder der Konformation eines Proteins führen und dementsprechend eine Veränderung der Position eines Spots auf einem 2-DE Gel und/oder einer Spotintensität (z. B. relative Reduktion der relativen Konzentration eines unmodifizierten Proteins) zur Folge haben. Mobilitätsvarianten (mV) sind Spots, die durch eine Modifizierung ihres pI und/oder Mw ihre Position im 2-DE Gel ändern. Ein Spotkomplex sind Proteinisospots, die eine Anordnung mehrerer Spots innerhalb einer dicht beieinanderliegenden Gruppe bilden. Eine Proteinfamilie ist die Bezeichnung aller Isospots eines Proteins auf einem 2-DE Gel. Veränderungen der Spotintensität in 2-DE Gelen können nach Einwirken einer Noxe resultieren, durch (i)

eine Veränderung der Gesamtkonzentration eines Proteins (Spotfamilie) oder (ii) eine Veränderung eines oder mehrerer Isospots innerhalb einer Spotfamilie. Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zum Messen des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses m/z von Teilchen. Bei 2-DE Proteomics Untersuchungen kommen zwei Verfahren zum Einsatz: MALDI-MS („matrix assisted laser desorption ionization MS“) und ESI-MS („electrospray ionization MS“).

Untersuchungen von Proteinveränderungen im Liquor von Kleinkindern nach SHT wurden bereits durchgeführt [46]. Hierbei wurde nach pathophysiologischen Unterschieden zwischen unfallverursachtem SHT und SHT nach häuslicher Gewalt (inflicted TBI) gesucht. Außerhalb des Liquorraumes verändert Schädelhirntrauma bei Ratten (P7) die Expression vieler Proteine im Gehirngewebe [70, 82, 107]. Abgesehen von den bereits veröffentlichten Ergebnissen unserer Untersuchungen gibt es keine vergleichenden Proteomuntersuchungen an einem Modell für frühkindliches SHT.

1.7 Zielsetzung der Studie

Das Ziel der vorliegenden Studie war es Veränderungen des unreifen Proteoms nach SHT, die akut ipsilateral zum Kontusionsherd auftreten, zu identifizieren. Die Veränderungen der akut kontralateral zum Kontusionsherd gelegenen Hirnhälfte wurden von uns gleichzeitig mit untersucht [73], aber sind nicht Gegenstand der vorliegenden Dissertation. Somit kann Einblick in Entwicklungsprozesse, die durch SHT gestört werden, als auch in einsetzende Reparaturprozesse, gewährt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Für die Versuche kamen 4-5 g schwere, sieben Tage alte (P7) *C57BL/6* Mäuse der Gattung *Mus musculus domesticus* zur Anwendung. Die Tierexperimente wurden vor Beginn der Versuchsdurchführung bei der zuständigen Behörde genehmigt (Reg 0152/03). Die neonatalen Mäuse wurden einzeln in einem Diethyläthertopf (Merck, Darmstadt, Deutschland) narkotisiert, anschließend ihre Kopfhaut in der Medianlinie durchtrennt und somit das Schädeldach (Calvaria) freigelegt. Ein mechanisches Hirntrauma wurde mittels einer 1996 von Ikonomidou et al. [61, 62] beschriebenen stereotaktischen Trauma-Apparatur gesetzt (Abbildung 3). Dabei wurde ein Gewicht von 10 g aus einer Höhe von 10,5 cm auf eine indirekt auf das Schädeldach über der linken Hirnhemisphäre einwirkende Fußplatte fallen gelassen. Es wurde darauf geachtet, dass es maximal zu einer Periostperforation der Calvaria kam. Anschließend wurden die klaffenden Wundränder des Kopfhautschnittes mit Cyanacrylatklebstoff (Roti®-Coll, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verschlossen. Bis zum Nachlassen der Diethylätherwirkung wurden die traumatisierten Mäuse auf einer Wärmematte gelagert und anschließend zurück in den Käfig zu ihrem Muttertier gesetzt. Als Kontrolltiere dienten neonatale Mäuse jeweils desselben Wurfes und desselben Geschlechtes, die ebenfalls einer Äthernarkose ausgesetzt wurden. Alle Tiere wurden 12 Stunden nach der Behandlung gewogen und durch Dekapitation getötet. Das Gehirn wurde entnommen, die linke und rechte Hemisphäre nach Entfernung des Riech- und Kleinhirns jeweils getrennt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Riechhirn und Kleinhirn wurden für eine Geschlechtsbestimmung mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) ebenfalls schockgefroren und gelagert. Im Rahmen der hier vorliegenden Studie wurde die linke Hemisphäre untersucht. In dieser sind, bei Berücksichtigung von Vorergebnissen unserer Arbeitsgruppe, unter anderem Proteinveränderungen zu erwarten, die mit exzitatorischem Zelltod in Verbindung stehen [16, 18, 19, 43, 60]. Die Ergebnisse der Untersuchung der rechten Gehirnhälften, welche ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe analysiert wurden und in denen hauptsächlich apoptotischer Zelltod stattfindet [17, 20, 44, 65], werden in Kapitel 4 aufgeführt und diskutiert. Beide Hirnhälften wurden von der Proteinextraktion bis zur Massenspektrometrie gleich bearbeitet und prozessiert [73].

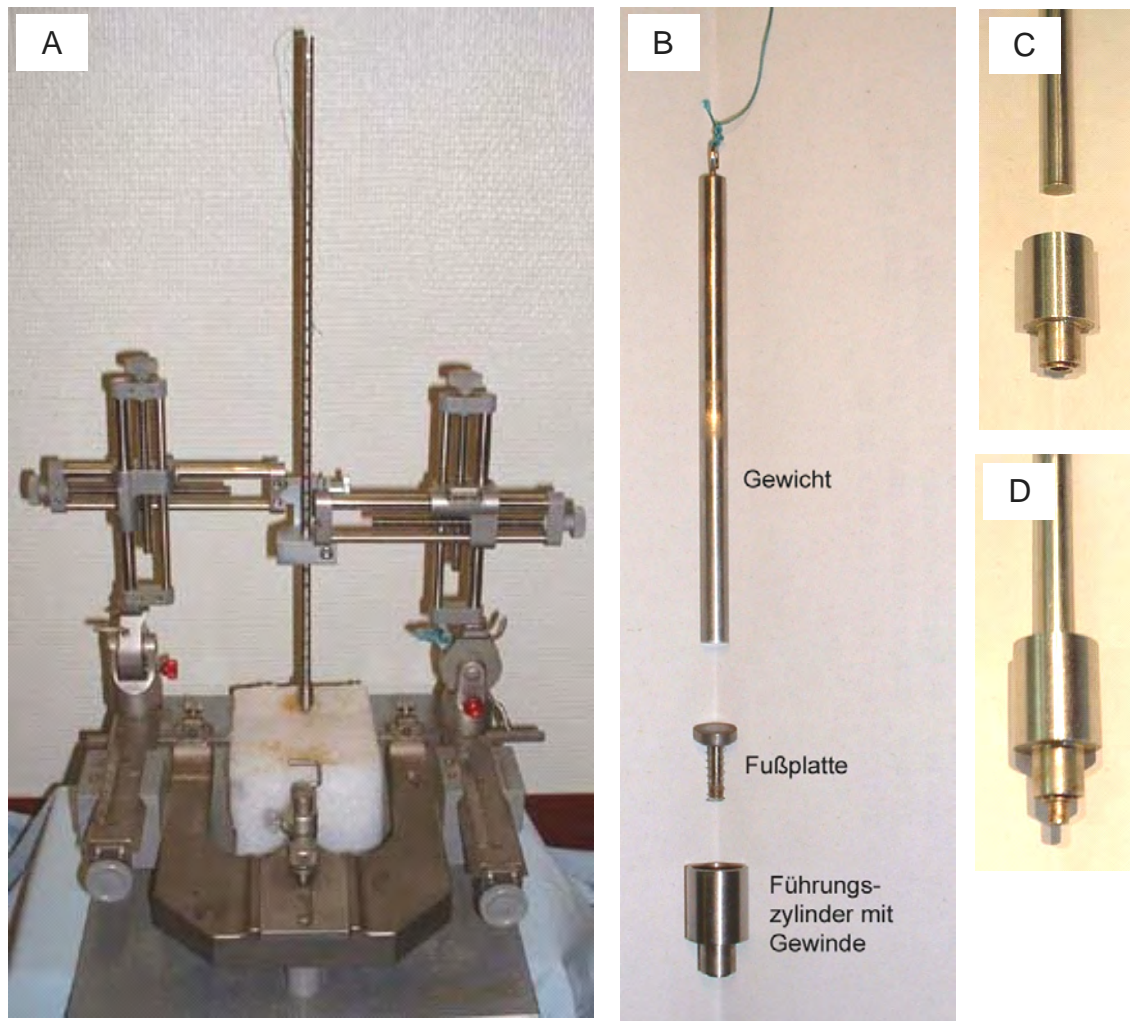


Abbildung 3: Aufbau der stereotaktischen Traumaapparatur

A) Gesamtansicht: In der Mitte sieht man das Fallrohr, welches nach unten von einem Führungszylinder mit einer darin beweglichen Fußplatte abgeschlossen wird. Die narkotisierten Versuchstiere wurden auf den weißen, sehr festen Schaumstoffquader gelegt, der Schädel manuell fixiert und das, in der X,Y,Z-Ebene bewegliche, Fallrohr mit der Fußplatte über der exponierten linken Hemisphäre platziert. **B)** Die Einzelkomponenten ohne Fallrohr. Das Gewicht fällt auf die gefederte Fußplatte, welche sich im Führungszylinder heben und senken kann. **C)** Es befindet sich kein Gewicht im Führungszylinder, wodurch sich die Fußplatte durch die Kraft der Rückholfeder im Führungszylinder befindet. **D)** Das Gewicht befindet sich im Führungszylinder, wodurch sich die Fußplatte in der maximalen Position außerhalb des Führungszylinders befindet und das SHT verursacht.

2.2 Geschlechtsbestimmung

Das Geschlecht neonataler Mäuse wurde mittels eines modifizierten Protokolls nach Lambert et al. bestimmt [93]. Dies war notwendig, um nachfolgend durch einen Vergleich nur von Proben gleichen Geschlechts geschlechtsspezifische Proteomunterschiede zu vermeiden. Zur DNA-Extraktion wurden circa 1 mg Riech- und Kleinhirn mit jeweils 100 µl TKM-Puffer homogenisiert und zu diesem Gemisch weitere 400 µl TKM-Puffer sowie 37,5 µl 10% SDS hinzugegeben. Der TKM-Puffer bestand aus 10 mmol Tris pH 7.6, 10 mmol KCl, 2 mmol EDTA und 4 mmol MgCl₂. Um die Proteine zu denaturieren, wurde dieses Gemisch für 30 Minuten bei 55 °C inkubiert, anschließend

200 µl 0,9% NaCl zur Präzipitation hinzugegeben und bei 12000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. 500 µl des Überstandes wurden zur Präzipitation mit 900 µl 100% eisgekühltem Ethanol vermischt und bei 4 °C mit 7500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde mit der Pipette abgenommen, 300 µl 70% Ethanol dazugegeben, das Pellet gelöst und erneut bei 4 °C mit 7500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten getrocknet. Anschließend wurden die Pellets in 100 µl TE-Puffer gelöst und für 10 Minuten bei 55 °C inkubiert. Der TE-Puffer bestand aus 10 mmol Tris pH 8.01 und 0,1 mmol EDTA. Der Ansatz für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) bestand aus den in Tabelle 2 aufgeführten Reagenzien.

Tabelle 2: PCR-Ansatz für die Geschlechtsbestimmung

Reagenz	Menge
DNA	2 µl
mIL-31 Primer F (10 µmol)	2 µl
mIL-3 Primer R (10 µmol)	2 µl
SRY2-Primer F (10 µmol)	2 µl
SRY-Primer R (10 µmol)	2 µl
Puffer 10x (cMg + Ammoniumsulfat)	5 µl
dNTP3 10 mmol	1,1 µl
Taq (5U/µl)	0,3 µl
aqua bidest	35,6 µl

¹mIL-3 (mouse Interleukin-3), ²SRY (Sex determining Region of Y), ³dNTP (Desoxynucleotidtriphosphat)

Für die PCR wurden 38 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 50 °C gewählt. Anschließend wurden die PCR-Produkte (15 µl Probenaliquot) in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt. Die Elektrophorese fand in TAE Puffer (pH 7.7) statt, welcher aus 10 mmol EDTA (pH 8.0), 2,3% (v/v) Essigsäure und 0,5 M Tris bestand. Anschließend wurden die Agarosegele mit Ethidiumbromid 1 µg/ml für 30 Minuten gefärbt und auf dem UV-Tisch ausgewertet.

2.3 Probenaufarbeitung

Die Gehirnproben wurden mittels der Gesamtextraktionsmethode nach Klose aufgearbeitet [75, 79, 109].

Homogenisieren

Die gefrorenen Hirnproben wurden gewogen und die jeweiligen Mengen für Puffer-P - CHAPS (Probengewicht $\times 1.6 = \Sigma 1$) sowie Proteasenhemmer H1 ($\Sigma 1 \times 0.02$) und H5 ($\Sigma 1 \times 0.08$) berechnet (Tabelle 3). Puffer-P bestand aus 50 mM TRISMA®Base (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 100 mM KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 20% (w/v) Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland). Der Puffer-P - CHAPS bestand aus 900 μ l Puffer-P + 65 mg 3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio] – Propansulfonat = CHAPS) und 38,0 μ l bidestilliertem Wasser. Proteasehemmer H1 bestand aus Protease-Inhibitor Pepstatin A (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Zur Herstellung von H1 wurden 0,0048 g Pepstatin A in 50 ml Ethanol (reinst; Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 37 °C und 0,174 g PMSF in 10 ml Ethanol (reinst) gelöst und beide Lösungen zu gleichen Teilen gemischt. H5 bestand aus zwei Tabletten Complete® (Roche, Mannheim, Deutschland), welche in 4 ml Puffer P gelöst wurden. Die hinzugegebenen Volumina wurden anhand des Probengewichtes berechnet.

Die Gehirnprobe und die berechnete Menge des Puffer P - CHAPS sowie des Hemmers H5 und H1 wurden nacheinander auf einem Löffel in flüssigem Stickstoff gefroren, und in einen ebenso in flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser aus Halbedelstein (WITA, Berlin, Deutschland) zermahlen. Das Pulver wurde in einen 1,5-ml-Eppendorf-Behälter gefüllt und bei -80 °C gelagert.

Ultraschallbehandlung

Zur weiteren Homogenisierung der bereits zermahlenden Gehirnproben wurden diese mit Ultraschall behandelt. Hierzu wurde dem tiefgefrorenen Homogenat eine jeweils genau berechnete Anzahl (Tabelle 3) von Glaskugeln mit einem Durchmesser von 2 – 2.5 mM (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben, durch Rühren mit einem Metalldraht das Homogenat rasch aufgetaut und anschließend einer Ultraschallbehandlung in Eiswasser (Ultraschallbad Sonorex RK31, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland) zugeführt. Die Ultraschallbehandlung erfolgte jeweils für 15 s, gefolgt von 45 s Probenkühlung im Eiswasser, wobei das Homogenat mit einem dünnen Metalldraht zum

besseren Wärmeaustausch gerührt wurde. Anschließend wurde die Probe für 60 s auf Eis gelagert. Nach sechs Durchgängen wurden die Glaskugeln entfernt.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Arbeitsschritte für die Gesamtextraktion

Arbeitsschritt	
1. Homogenisieren	
Probengewicht [mg]	
Puffer P - CHAPS (Probengewicht x 1,6)	$\Sigma 1$ (Gewicht Probe + Puffer P - CHAPS)
Hemmer 5 ($\Sigma 1 \times 0,08$) [μ l]	
Hemmer 1 ($\Sigma 1 \times 0,02$) [μ l]	$\Sigma 2$ ($\Sigma 1 + H1 + H5$)
2. Ultraschallbehandlung (6 x 15 s; Pause jeweils 1:45 min)	
Kugelanzahl ($\Sigma 2 \times 0,034$)	
3. Proteinasehemmung bei 4 °C (30 min)	$\Sigma 3$ (Gew. Extrakt) [mg]
Benzonase ($\Sigma 3 \times 0,025$) [μ l]	
Puffer P - MgCl ₂ ($\Sigma 3 \times 0,021$) [μ l]	$\Sigma 4$ ($\Sigma 3 +$ Puffer P - MgCl ₂ + Benzonase) [mg]
4. Kontrollfaktor Gew. Extrakt / Gew. Probe [mg]	
5. Aliquot Proteinbestimmung (15 μ l pro Probe)	
6. Neubestimmung des Extraktgewichtes	$\Sigma 5$ (Gew. Extrakt 1) [mg]
7. Proteindenaturierung bei RT 30 min	
Harnstoff 6,5 M ($\Sigma 5 \times 0,78$) [mg]	
Thioharnstoff 2,0 M ($\Sigma 5 \times 0,3$) [mg]	$\Sigma 6$ (Gew. Extrakt 2) [mg]
8. 200 μl Aliquot (AL) für die 2-DE (Silberfärbung)	
Gewicht AL [mg]	
DTT ($([\Sigma 4/\Sigma 6] \times AL \times 0,1)$) [μ l]	
Ampholine 2-4 ($([\Sigma 4/\Sigma 6] \times AL \times 0,1)$) [μ l]	

Puffer P = 50 mM TRISMA®Base + 100 mM KCl + 20% (w/v) Glycerin, Puffer P - CHAPS = 900 µl Puffer-P + 65 mg 3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio] - Propan-Sulfonat = CHAPS) + 38,0 µl bidestilliertem Wasser, Proteasehemmer H1 = Protease-Inhibitor Pepstatin A (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) + Phenylmethylsulfonyl-fluorid (PMSF), H1 = 0,0048 g Pepstatin A in 50 ml Ethanol bei 37 °C + 0,174 g PMSF in 10 ml Ethanol gelöst und beide Lösungen zu gleichen Teilen gemischt, H5 = 2 Tabletten Complete® gelöst in 4 ml Puffer P, Gew = Gewicht, DTT = Dithiothreitol

Proteinasehemmung

Beim nächsten Arbeitsschritt der Gesamtextraktion wurden zu dem aufgetauten Homogenat Benzonase (Merck, Darmstadt, Deutschland; Gewicht Homogenat x 0.025) und Puffer P - MgCl₂ (Gewicht Homogenat x 0.021) unter Rühren hinzugegeben (Tabelle 3). Die Suspension wurde bei 4 °C für 30 Minuten mit Magnetrührfischen gerührt, um ein Herauslösen von Membranproteinen durch CHAPS zu ermöglichen. Ein Aliquot von 15 µl wurde für eine Bestimmung der Proteinkonzentration mittels eines Bicinchinonic Acid (BCA) Protein Assays entnommen.

Proteindenaturierung

In einem weiteren Schritt wurde die Probe mit 6,5 M Harnstoff und 2,0 M Thioharnstoff versetzt und die Extrakt-Suspensionen bei Raumtemperatur 30 Minuten gerührt, damit Harnstoffe ihre chaotrophe Wirkung entfalten können. Harnstoff bricht Wasserstoffbindungen auf und denaturiert Proteine (Tabelle 3).

Probenaliquotherstellung

Für die 2-DE wurden jeweils 200 µl Aliquot der aufgearbeiteten Proben mit Dithiothreitol (DTT) sowie Ampholin 2-4 vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Tabelle 3). Die DTT-Lösung reduziert Disulfidbrücken und denaturiert Proteine.

2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Eine Bestimmung der Proteinkonzentration aller Proben erfolgte mit dem BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, USA). Eine Eichkurve wurde durch die Messung der Absorptionskoeffizienten mehrerer Proben einer 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) – Verdünnungsreihe hergestellt (Tabelle 4).

Anschließend wurde die BCA-Arbeitslösung hergestellt, indem man 50 Teile der Reagenz A (enthält BCA) mit einem Teil der Reagenz B (enthält CuSO₄) mischte und dies zu den Proteinproben hinzu gab. Die BCA-Arbeitslösung wurde im Wasserbad 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf die NUNC®-Mikrowellplatten aufgetragen. Die Konzentration wurde colorimetrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

Tabelle 4: Liste von Standardverdünnungen mit einem Bereich von 25 µg/ml bis 2000 µg/ml

BSA Volumen	Verdünnungsvolumen	Finale BSA Konzentration
300 µl Standardalbumin	0 µl	2000 µl/ml
(A) 375 µl Standardalbumin	125 µl	1500 µl/ml (A)
(B) 325 µl Standardalbumin	325 µl	1000 µl/ml (B)
(C) 175 µl von (A)	175 µl	750 µl/ml (C)
(D) 325 µl von (B)	325 µl	500 µl/ml (D)
(E) 325 µl von (D)	325 µl	250 µl/ml (E)
(F) 325 µl von (E)	325 µl	125 µl/ml (F)
(G) 100 µl von (F)	400 µl	25 µl/ml (G)

2.5 Zweidimensionale Großgelelektrophorese (2-DE)

Die Proteinproben der ipsilateralen Hirnhälften wurden mithilfe der hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) nach Klose aufgetrennt [78-80]. Bei dieser Methode werden Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI; IEF = isoelektrische Fokussierung) und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (Mw; SDS-PAGE = Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennt. Durch die Kombination dieser beiden Techniken, IEF und SDS-PAGE, wird eine besonders hochauflösende Auftrennung von bis zu 10,000 Proteinen und Proteinisofomen erreicht (Abbildung 4).

2.5.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Der für die isoelektrische Fokussierung notwendige pH-Gradient im Gel von pH 2 bis 11 wurde mit Hilfe von Ampholingemischen hergestellt. Chemisch ausgedrückt sind Trägerampholyte Oligoamino-oligocarboxyl-Säuren, welche bedingt durch diverse Synthesansätze, unterschiedliche pIs haben. Dieser lineare pH-Gradient pH, wird nach Anlegen des Gleichstroms durch die Anordnung der Ampholyte entsprechend ihres pI rasch aufgebaut. Die sauren Ampholyte bewegen sich zur Anode und die basischen zur Kathode, bis die Komponenten des Systems einen dauerhaften Zustand erreicht haben. Daraufhin wandern die sich langsamer bewegenden, aufzutrennenden Polypeptide in einem vorhandenen pH-Gradienten. Der pI eines Proteins ist der pH-Wert, bei dem die

Gesamtladung dieses Proteins null und dementsprechend auch die elektrophoretische Mobilität null ist. In der IEF bewegt sich ein Protein innerhalb des gegebenen pH-Bereiches solange im elektrischen Feld Richtung Kathode, bis es zu der Stelle im Gel gelangt, an der der pH seinem pI entspricht. Proteine mit einem isoelektrischen Punkt außerhalb des gegebenen pH-Bereiches verbleiben an der Anode oder durchqueren das gesamte Gel. Da weitporige Gele verwendet werden, spielt die Größe der Polypeptide letztendlich keine Rolle – entscheidend ist deren pI .

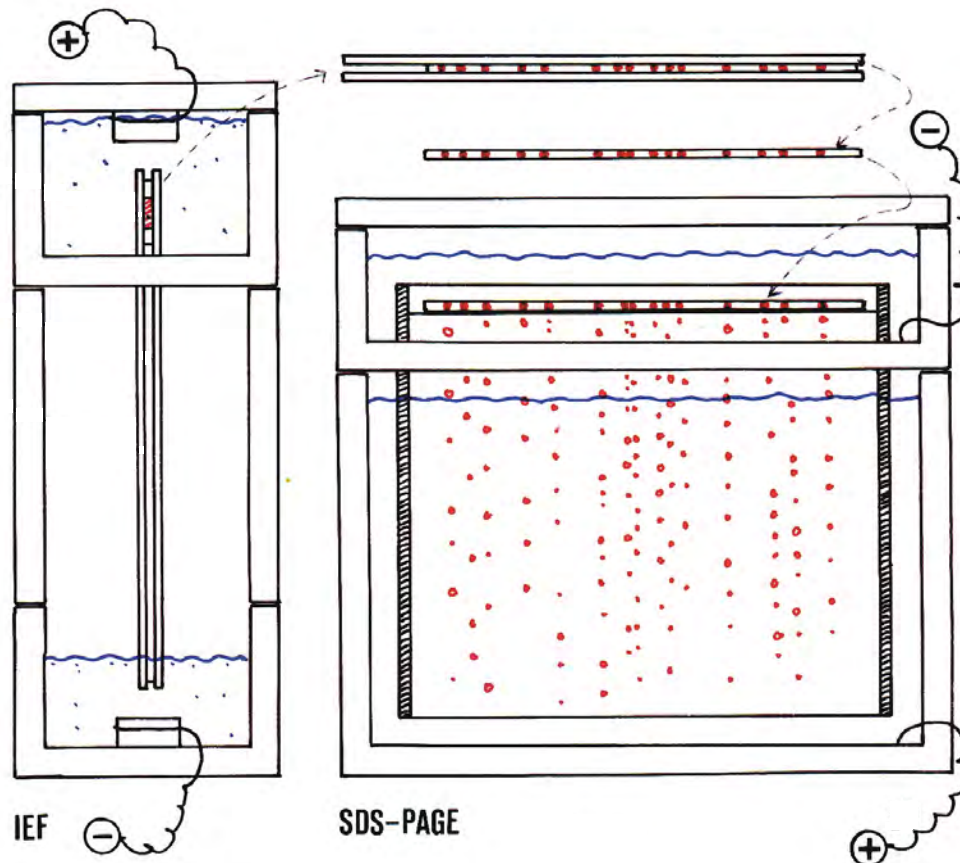


Abbildung 4: Darstellung der zweidimensionalen Großgelelektrophorese (2-DE)

In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF) werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Das IEF-Gel wird dann für die zweite Dimension mit einer Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) kombiniert, wobei die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Gelherstellung

Um die IEF-Gele herzustellen, wurden zylindrische Glasröhrchen (Schott-Geräte GmbH, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von 0,9 mm (analytische Gele) oder 1,5 mm (Präparationsgele für Massenspektrometrie) und einer Länge von 44,8 cm verwendet. Es wurde großer Wert auf die Reinheit der Innenflächen der Gelröhrchen gelegt, um eine gleichförmige Adhäsion der Gele zu gewährleisten und eine

Kontamination der Gele zu verhindern. Die Reinigung der Gelröhrchen erfolgte durch eine einstündige Inkubation in auf 50 °C erhitzter 6% Deconex-12-Lösung und anschließende Reinigung in auf 90 °C erhitzter 0.1 M HCl Lösung. Vor der Trocknung wurden die Röhrchen sorgfältig mit bidestilliertem Wasser gespült.

Zum Gießen der IEF-Gele wurden sechs gereinigte Glasröhrchen in einen Gießständer eingespannt und wie in Abbildung 5 dargestellt mit Nylonfäden bestückt. Separation- (Tabelle 5) und Cappelösung (Tabelle 6) wurden in einem 30 °C warmen Wasserbad über einen Zeitraum von 30 Minuten erwärmt und anschließend durch Anlegen eines Vakuums entgast. Zum Separationsgel wurden 50 µl einer 0,8%-Ammoniumpersulfat-lösung (APS) hinzugegeben, vermennt und durch Hochziehen der Nylonfäden bis zur ersten Markierung (siehe Abbildung 5) in die Glasröhrchen gefüllt. Beim nächsten Arbeitsschritt wurden 20 µl einer 0,8%-APS-Lösung mit der Cappelösung vermennt und durch Ziehen an den Nylonfäden bis in die Glasröhrchen gezogen, bis die Nylonfäden die zweite Markierung erreichten (Abbildung 5). Umgehend wurden die Gelröhrchen am unteren Ende mit Filterpapier abgetupft zur Entfernung von Gelresten und mithilfe der Nylonfäden die Lösung bis zur dritten Markierung hochgezogen. Dadurch bildete sich am unteren Ende des Gelröhrchens ein Luftpolster von circa 5 mm Länge. Die Gesamtlänge der IEF-Gele war 40,8 cm, bestehend aus 40 cm Separations- und 0,8 cm Cappel.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Separationsgels

Komponente	Stammlösung	Endlösung	Endkonzentration
Acrylamid	3,5 g	10 ml	3,5% w/v
PDA	0,3 g in 20 ml ddH ₂ O ¹		0,3% w/v
Trägerampholytemix		5 ml	4% v/v
Harnstoff		27 g	54% w/v = 9 M
Glycerol	14,3 g in 50 ml ddH ₂ O ¹	8,75 ml	5% w/v
TEMED	60 µl in 10 ml ddH ₂ O ¹	5 ml	0,06% v/v
Persulfat	0,08 g in 10 ml ddH ₂ O ¹	25 µl	0,02% w/v

Der Trägerampholytemix bestand aus einem Teil Servalyte pH 2.0 - 11 (Serva), einem Teil Pharmalyte pH 3,5 - 10 (Pharmacia), 3 Teilen Pharmalyte pH 4,0 - 6,5, 2 Teilen Pharmalyte 5,0 - 8,0 und einem Teil Pharmalyte 6,5 - 9,0. Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Das Endvolumen der Gellösung war 48,75 ml; jedes Aliquot enthielt 975 µl. ¹ bidestilliertes Wasser, PDA = Piperazin Diacrylamid, TEMED = (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)

Nach einer Polymerisationszeit von 25 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Nylonfäden entfernt. Um eine Dehydrierung während der Lagerung zu vermeiden, wurde jeweils ein Tropfen bidestilliertes Wasser in die beiden Enden der Glasröhrchen gegeben, diese mit Parafilm gut abgedichtet und die IEF-Gele anschließend bei 40 °C über einen Zeitraum von 40 min inkubiert. Die Gele polymerisierten weitere drei Tage vor der Anwendung.

Tabelle 6: Komponenten der Caggelösung

Komponente	Stocklösung	Endlösung	Endkonzentration
Acrylamid	6 g +	4,4 ml	12% w/v
PDA	0,065 g in 10 ml dd ddH ₂ O ¹		0,13% w/v
Trägerampholytmix		2,2 ml	4% v/v
Harnstoff		27 g	54% w/v = 9 M
Glycerol	14,3 g in 50 ml dd ddH ₂ O ¹	3,85 ml	5% w/v
TEMED	60 µl in 10 ml dd ddH ₂ O ¹	2,2 ml	0,06% v/v
Persulfat	0,08 g in 10 ml dd ddH ₂ O ¹	10 µl	0,02% w/v

Der Trägerampholytemix bestand aus einem Teil Servalyte pH 2.0 - 11 (Serva), einem Teil Pharmalyte pH 3,5 - 10 (Pharmacia), 3 Teilen Pharmalyte pH 4,0 - 6,5, 2 Teilen Pharmalyte 5,0 - 8,0 und einem Teil Pharmalyte 6,5 - 9,0. Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Das Endvolumen der Gellösung war 21,45 ml, jedes Aliquot enthielt 350 µl. ¹ bidestilliertes Wasser, PDA = Piperazin Diacrylamid, TEMED = (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

Probenauftrag und IEF-Lauf

Für die Elektrophorese wurden gewöhnlich vier Gelröhrchen mit der Caggelseite nach unten in eine IEF-Elektrophoresekammer (Wita, Berlin, Deutschland) eingespannt. Vor dem Probenauftrag wurde das untere Kammerreservoir und die unteren gelfreien Enden der Gelröhrchen mit 400 ml Ethylendiamin-Lösung (5% v/v Ethylendiamin, 9 M Harnstoff, 5% v/v Glycerin) gefüllt. Daraufhin wurden die Geloberflächen der anodischen Seite mit feinen Filterpapierstreifen getrocknet und mit einer 2-mm-Schicht Sephadex-Lösung bedeckt. Durch die Sephadex-Lösung werden Proteine, die zu Anfang des Laufes Komplexe bilden aufgefangen. Die Sephadex-Suspension enthielt Sephadex G-200 Superfine (Pharmacia), welches für fünf Stunden bei 90 °C in bidestilliertem Wasser aufgeweicht, dann mit 25% w/v Glycerin gewaschen und schließlich mit 9 M Harnstoff, 70 mM DTT und 2% v/v Ampholingemisch (Bestandteile wie in der Separationsgellösung) vermengt wurde. Um die Proben vor einer Ausfällung durch den sauren Puffer zu schützen, wurden diese mit einer 0,5 cm hohen Schicht an

Schutzlösung bedeckt, bevor der Rest des Glasröhrchens und die obere Kammer (Anodenkammer) mit 500 ml Phosphorsäurelösung (7,27 w/v Phosphorsäure, 3 M Harnstoff) gefüllt wurde. Die Schutzlösung bestand aus 5 M Harnstoff, 5% w/v Glycerin und 2% w/v Servalyte 2-4. Die IEF wurde durch das Anschließen der oberen Kammer an die Anode und der unteren Kammer an die Kathode eines Spannungsgerätes (Power Pac 3000, BioRad, Deutschland) gestartet. Das Spannungsgerät wurde so eingestellt, dass während der gesamten Elektrophoresezeit von 25 Stunden (Std.) und 40 min bei Raumtemperatur die Spannung anstieg. Die elektrophoretischen Bedingungen waren wie folgt: 1 Std. bei 100 V, 1 Std. bei 300 V, 23 Std. bei 1000 V, 30 min bei 1500 V und 10 min bei 2000V. Die Stromwerte des Spannungsgerätes wurden auf Maximalwerte von 10 mA und 10 W eingestellt.

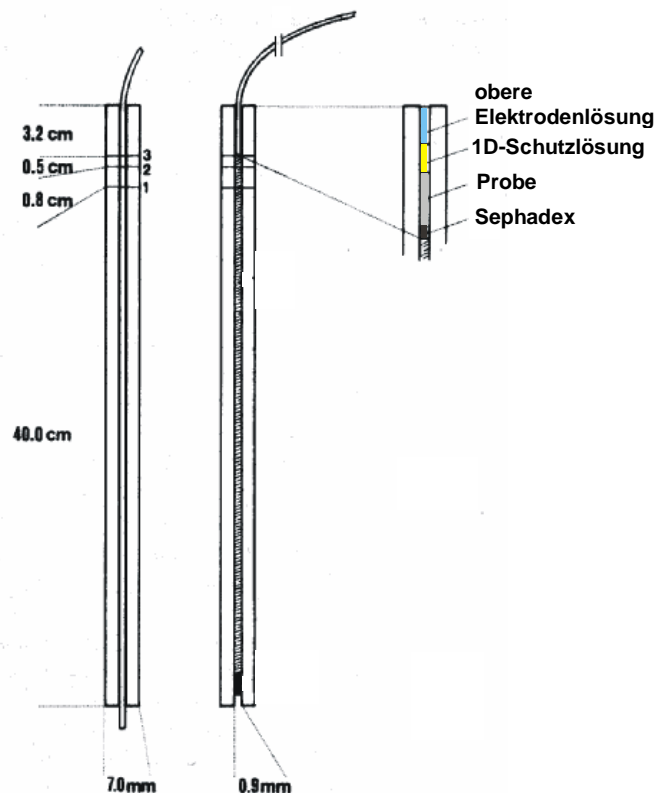


Abbildung 5: Darstellung eines Glasröhrchens zur Herstellung von IEF-Gelen

Nach Eintauchen der Röhrchen in die Gellösung wurden die Nylonfäden hochgezogen. Zuerst nach Ansaugen der Separationsgellösung bis zur Markierung 1, durch Ansaugen der Capgellösung bis zur Markierung 2 und schließlich bis zur Markierung 3 um am Ende des Röhrchens einen gelfreien Raum zu erhalten.

Die Inkubationslösung bestand aus 125 mM Tris-Puffer mit einem pH von 6.8, 40% w/v Glycerin, 3% w/v SDS (99% Reinheit, Sigma) und 65 mM DTT (Bio-Rad). Nach der IEF wurden erst die zur Anode gelegene Gelhälfte (saure Seite) und dann die zur Kathode hin gelegene Gelhälfte (basische Seite) von der basischen Seite aus mit einem Nylon-

faden auf mit Inkubationslösung beschichtete Gelschienen ausgestoßen (Abbildung 6). Die erste Hälfte der Gele (saure Seite) wurde aus dem Glasröhrchen von der basischen Seite mit einem Nylonfaden auf eine mit Inkubationslösung beschichtete Gelschiene ausgestoßen. Anschließend wurde die Inkubationslösung unter Schräghalten der Gelschienen mit Kimwipes weitestgehend aufgesaugt und die Schienen mit den Gelen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefroren. Die Hauptfunktion des Inkubationsschrittes ist der Austausch von möglichst viel Protein-assoziiertem Harnstoff durch Sodiumdodecylsulfat (SDS).

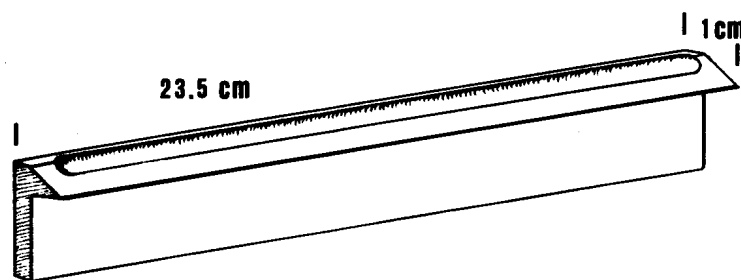


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Gelschiene

Die Gelschiene wird mit Inkubationslösung beschichtet, die Gele direkt darauf ausgestoßen und die Inkubationslösung mit Kimwipes abgesaugt. Anschließend wird die Gelschiene direkt weiterverwendet oder bis zum Start der SDS-PAGE tiefgefroren gelagert.

2.5.2 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die anionischen Eigenschaften von SDS ausgenutzt. SDS bildet mit Proteinen Komplexe und dissoziiert Proteine in ihre individuellen Untereinheiten wie Polypeptide. Diese binden SDS an ihre Hauptketten in einem konstanten Gewichtsverhältnis (1.4 g SDS pro 1g Polypeptid) [25, 52]. So entsteht aus SDS und denaturiertem Protein ein Komplex mit stark negativer Ladung. Die Ladung ist annähernd proportional zur Masse des Proteins und wesentlich größer als die ursprüngliche, nun ziemlich unbedeutende, Ladung des nativen Proteins. Diese SDS-Polypeptid-Komplexe wandern in Polyacrylamid-Gelen, und ihre elektrophoretische Beweglichkeit ist eine lineare Funktion des Logarithmus ihres Molekulargewichtes.

Gießen der SDS-PAGE-Gele

Um eine gute Adhäsion der Gele an den Glasplatten zu erreichen, wurden die Glasplatten gründlich mit bidestilliertem Wasser und Ethanol gereinigt. Gele der zweiten Dimension hatten eine Standardgröße von 28 cm (Laufänge) x 23.2 cm (Breite) x 0,75 mm (Geldicke bei analytischen Gelen, Abbildung 7 A+B). Gele mit einer Dicke von 1,5 mm wurden nur für die anschließende Proteinidentifikation mittels Massenspektro-

metrie benutzt. Die Gießformen für die SDS-PAGE-Gele wurden durch das Verschließen zweier senkrecht stehender Glasplatten mit zwischenliegenden Abstandhaltern (Spacer) von 0,75 mm bzw. 1,5 mm Dicke vorbereitet. Die beiden Glasplatten mit den zwischenliegenden Spacern wurden auf jeder Seite mit Schmierfett und Kunststoffklemmen verschlossen und senkrecht in einen Gießständer eingespannt. Die mit Gel füllbare Gießform wird nachfolgend als Gelzelle bezeichnet. Dabei wurde die untere Seite der Gelzelle durch eine Gummidichtung verschlossen und die Gelzelle waagrecht austariert, um nach dem Gießen eine waagerechte Geloberfläche zu erhalten. Zu jeder Portion der auf 40 °C über einen Zeitraum von 30 min vorgewärmten Gellösung (Tabelle 7) wurden 4,5 ml einer 1,28% APS Lösung hinzugegeben und diese Mischung sofort über einen Gießtrichter zwischen die Glasplatten gefüllt (Abbildung 7 A+B). Kleine Luftblasen zwischen den Glasplatten wurden mit einem feinen Draht entfernt. Ohne Verzögerung wurden 1,2 ml (analytische Gele) oder 2,4 ml (Präparationsgele) 40% Glycerin unter die Gellösung in die Gelzelle gepresst, um an dieser Stelle später das IEF-Gel auftragen zu können.

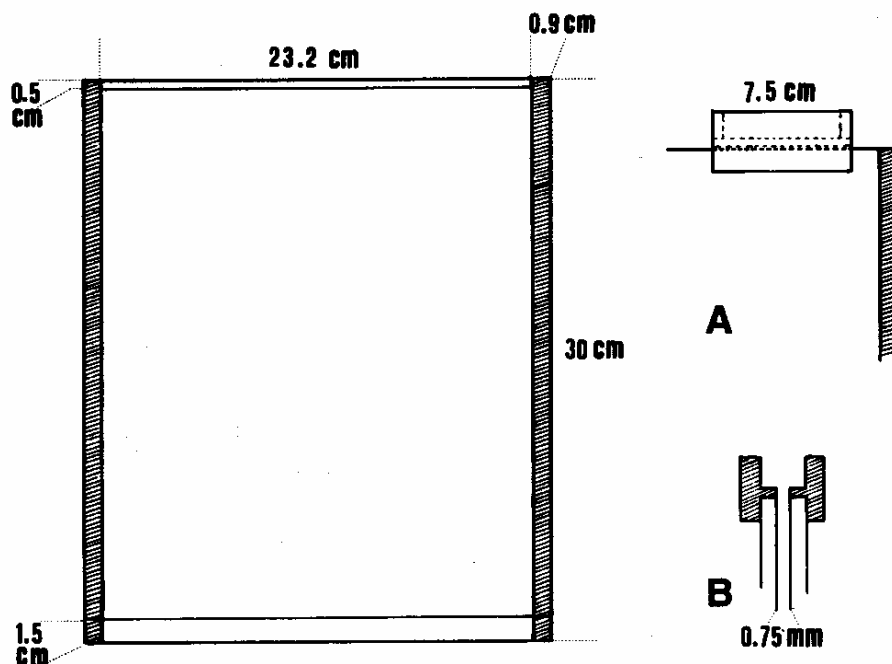


Abbildung 7: Schema der Gelzelle des Elektrophoreseapparates.

Die horizontale Linie unter der oberen Kante der Glasplatte zeigt das Niveau der Fläche des Trenngels. Die horizontale Linie 1,5 cm über der unteren Kante wurde in das Glas eingezt und markiert das Ende der Elektrophorese. Die schraffierten Streifen auf jeder Seite des Geles stellen die Abstandhalter (Spacer) zwischen den Glasplatten dar. Ein spezieller Plastiktrichter zum Einfüllen der Gellösung in die Gießform ist (A) in der Frontalansicht und (B) im Querschnitt dargestellt.

Tabelle 7: Komponenten des SDS-PAGE-Gels

Komponente	Stocklösung	Endlösung	Endkonzentration
Acrylamid	498 g +		15% w/v
Bisacrylamid	6,64 g in 1660 ml	1660 ml	0,2% w/v
TEMED	960 µl +		0,03% v/v
SDS	3,2 g +		0,1% w/v
Tris	110.408 g +		375 mM
Tris-HCl	45,436 g in 1400 ml ddH ₂ O	1400 ml	375 mM
Persulfat	6,4 g in 500 ml ddH ₂ O	4,5 ml	0,08% w/v

Aliquots von 67,5 ml wurden von der Endlösung genommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Kurz vor dem Gießen der SDS-Gele wurden 4,5 ml Persulfatlösung hinzu gegeben um die Polymerisation zu starten. Für alle Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Das Endvolumen der Gellösung war 3000 ml.
¹ bidestilliertes Wasser, PDA = Piperazin Diacrylamid, TEMED = (N, N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Nach einer Polymerisierungszeit von 30 min wurde die Gelzelle umgedreht. Das Glycerin wurde abgegossen und die Geloberfläche wiederholt mit Schutzlösung gespült (375 mM Tris/Tris-HCl, 0.1% w/v SDS). Das obere Ende des Gels wurde dann mit Parafilm abgedichtet und, nach einer weiteren Stunde bei Raumtemperatur, wurden die Gele über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

SDS-PAGE-Lauf

Elf Liter Elektrophoreselösung wurden frisch hergestellt, in das untere Reservoir (Anode) der 2D-Elektrophoresekammer gefüllt und auf $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlt. Der Puffer enthielt 25 mM Tris (Sigma), 192 mM Glycin und 0,1 w/v SDS (Sigma) [88].

Der gemessene pH-Wert war 8,69 bei $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ (2-DE Lauftemperatur) und 8,55 bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Raumtemperatur). Anschließend wurden 1,5 Liter Elektrophoreselösung, derselben Zusammensetzung, mit 500 µl Bromphenolblau (50 mg Bromphenolblau gelöst in 150 ml bidestilliertem Wasser) für das obere Reservoir (Kathode) vermischt. Die Bromphenolblaulinie hilft bei der Identifizierung der Gelfront und des Endpunktes des Gellaufes. Bevor im nächsten Arbeitsschritt die IEF-Gele auf die SDS-PAGE-Gele transferiert werden konnten, musste die Schutzlösung auf den SDS-Gelen abgegossen und die verbleibende Schutzlösung mit Filterpapier abgesaugt werden, um einen guten Kontakt zwischen SDS- und IEF-Gelen zu erreichen. IEF-Gelhälften (saure Seite und basische Seite) wurden nach raschem Auftauen vorsichtig von links nach rechts

zwischen die beiden Glasplatten auf das obere Ende des SDS-Gels appliziert und mit Agarose-Lösung (125 mM Tris pH 6,8, 0,10% SDS, 1% w/v Agarose) bedeckt (Abbildung 8).

Daraufhin wurden die Gelzellen in die Elektrophoresekammer (Desaphor VA300, Desaga, Deutschland) eingesetzt und Letztere bis zu den oberen Kanten der Gelzellen mit 1,5 Liter Elektrophoresepuffer befüllt. Der SDS-PAGE-Lauf wurde mit dem Spannungsgerät (Power Pac 3000, Bio-Rad) unter Verwendung einer initialen Stromstärke von 65 mA (130 mA für Präparationsgele) für 15 min und einer nachfolgenden Stromstärke von 85 mA (150 mA für Präparationsgele) durchgeführt. Die Puffer-temperatur wurde während des SDS-PAGE-Laufes durch ein Kühlungssystem bei 15 °C gehalten. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die Bromphenolblaulinie 1,5 cm oberhalb der unteren Glaskante erreicht hatte und die Gele sofort fixiert (50% v/v Ethanol, 10% Essigsäure), um einen Auflösungsverlust durch postelektrophoretische Diffusion zu vermeiden.

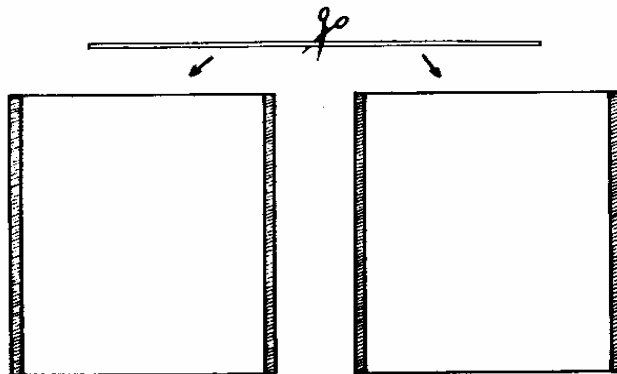


Abbildung 8: Transfer eines 40-cm-IEF-Gels auf zwei SDS-PAGE-Gele

Wie im Kapitel 2.5.1 beschrieben, wurde das IEF-Gel aus dem 1D-Röhrchen ausgestoßen, in zwei Hälften geschnitten, wodurch man eine „saure Seite“ und eine „basische Seite“ erhielt. Diese wurden jeweils auf ein 30x20 cm 2D-Gel transferiert.

2.6 Silberfärbung der 2-DE Gele

Es gibt verschiedene Methoden, um Polypeptide in Polyacrylamid-Gelen zu detektieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Silberfärbemethode von Heukeshoven und Dernick [56] in der von Jungblut und Seiffert [71] für Desaga-Gele modifizierte Form verwendet um die Proteinmuster darzustellen. Die für die Massenspektrometrie (MS) verwendeten Gele wurden mit einer MS-kompatiblen Silberfärbung gefärbt, weil diese im Gegensatz zu der Standard-Silberfärbung nicht mit der MS interferiert [57].

Die Silberfärbung wurde 1979 von Switzer et al [134] als eine neue Färbemethode eingeführt, welche 100-fach sensitiver als die Coomassie-Blau-Färbung ist. Mit Coomassie-Blau-Färbung reichen bereits 0,1 µg (ungefähr 2 pmol) eines Proteins aus, damit ein Proteinspot erkennbar wird. Mit der Silberfärbung können deutlich geringere Mengen von circa 0,02 µg detektiert werden. Obgleich die Silberfärbung die empfindlichste nicht radioaktive Proteindetektierungsmethode ist, hat sie einige Nachteile: Sie ist labortechnisch sehr aufwendig und erfordert viele Schritte. Der Hauptmechanismus der Silberfärbung ist die Reduzierung von Silbernitrat zu metallischem Silber, welches sich in Form von Silberkörnern an Proteinspots anlagert. Diese Anlagerung wird zu einem gewissen Grad durch verschiedene Gruppen innerhalb des Proteins beeinflusst, sodass manche Proteine dadurch nicht angefärbt werden. Man kann also aus der Farbeintensität eines bestimmten Spots keinen direkten Schluss auf die absolute Menge des Proteins ziehen. Innerhalb des linearen Bereiches können Unterschiede in der Konzentration eines Spots bestimmt werden.

Ablauf der Silberfärbung

Alle folgenden Schritte wurden in Plastikwannen durchgeführt, welche auf einem Schüttler kontinuierlich bewegt wurden, um eine gute Zirkulation der jeweiligen Lösung ohne Schädigung des Gels zu gewährleisten. Nach jedem Schritt wurde die Lösung mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Die 2-DE Gele wurden aus der Fixierlösung entnommen und jeweils in einem Liter Inkubationslösung (30% v/v Ethanol, 0,5 v/v Glutaraldehyd, 4,1% w/v Natriumacetat, 0,2% w/v Natriumthiosulfat) für 2 Stunden eingeweicht. Daraufhin wurden die Gele zweimal 20 Minuten in 3,5 Liter bidestilliertem Wasser gewaschen und für 20 Minuten in einem Liter Silberfärbelösung (0,1% w/v Silbernitrat, 0,01 v/v Formaldehyd) inkubiert. Die Entwicklung der Silberfärbung geschah wie folgt: Um Silber von der Geloberfläche zu entfernen, wurde das Gel kurz mit bidestilliertem Wasser gespült und anschließend für eine Minute in einem Liter Waschlösung (2,5% w/v Natriumcarbonat) inkubiert. Diese wurde abgesaugt und ein Liter Entwicklungslösung (2,5% w/v Natriumcarbonat, 0,01% w/v Formaldehyd) hinzugegeben. Einzelne Proteinspots waren nach wenigen Sekunden sichtbar und in weniger als sechs Minuten ausreichend entwickelt. Die Silberfärbung wurde durch Inkubation in einer Stopp-Lösung beendet, und die Gele wurden anschließend mehrmals mit Wasser gespült.

2.7 Trocknung der 2-DE Gele

Um die Ergebnisse der 2-DE Läufe zu konservieren, wurden die silbergefärbten Gele getrocknet. Zu diesem Zweck wurden die Gele zwischen zwei Zellophanfolien (Alba Einmachhaut, Gehring & Neidweiser, Deutschland) auf eine flache Trockenplatte mit Filterpapier gelegt. Die Kanten der Zellophanfolien wurden so zugeschnitten, dass sie das Gel um ungefähr 1 cm überragen. Zwischen den Schichten befindliches überschüssiges Wasser und Luftblasen wurden herausgestrichen. Die Gele wurden in einem modifizierten Trockenschrank (Memmert-Wärmeschrank UL60, Deutschland) für ungefähr 3 Stunden bei 80 °C Vakuum-getrocknet, anschließend beschriftet und trocken gelagert.

2.8 Analyse der 2-DE Proteinmuster

Nach der Bestimmung des Geschlechts und des Gehirngewichtes sowie der Proteinkonzentrationsbestimmung hatten wir die Proteinproben der traumatisierten Tiere und der Kontrolltiere „gematcht“ und dadurch 10 Paare, mit jeweils einem traumatisierten Tier und einem Kontrolltier, erhalten. Probenpaare jeweils einer behandelten Maus und eines Kontrolltieres liefen während der IEF und der SDS-PAGE zusammen, um die Vergleichbarkeit zu verbessern.

Obwohl zahlreiche Computerprogramme zur Auswertung angeboten werden, zeigen diese immer noch deutliche Schwächen. Die Programme sind nicht in der Lage überlappende Proteinspots, insbesondere in Bereichen hoher Spotdichte, richtig zu interpretieren. Weiterhin zeigen einige Spots eine charakteristische Rot- oder Grünfärbung, welche von Auswertungsprogrammen nicht richtig erkannt werden. Alle Spots müssen also noch einmal manuell kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert werden. Da dieses Vorgehen keine Arbeitserleichterung bringt, entschieden wir uns die Gele erst visuell auszuwerten und anschließend die Veränderungen in einem Auswertungsprogramm zu quantifizieren. Frühere Studien, welche die Effizienz der visuellen Auswertung untersuchten, zeigten, dass sogar 1.1-fache (dunkle Spots: 1.2-fache) Unterschiede mit 100% Wahrscheinlichkeit von 10 Testpersonen (4 erfahrene und 6 unerfahrene Wissenschaftler) erkannt wurden, wenn das umgebende Gebiet frei von anderen Proteinspots war. In Gebieten mit hoher Spotdichte konnten Spots unterschieden werden, wenn sie sich um den Faktor 2 unterschieden und selbst Unterschiede > 1.5-fach wurden mit 80-90% Wahrscheinlichkeit erkannt. Die Autoren schlossen daraus, dass die visuelle Auswertung eine sichere Methode ist [137].

2.8.1 Visuelle Auswertung

Die Gele wurden eingescannt und die Spotmuster innerhalb eines Pärchens verglichen (Einzel-Pärchen-Vergleich). Dabei wurden das Gel der behandelten Maus (Traumagel) und des Kontrolltieres (Kontrollgel) übereinandergelegt und qualitative sowie quantitative Veränderungen eingezeichnet. Wir unterschieden zwischen „presence/absence“-Varianten (paV), „amount“-Varianten (aV) und Mobilitätsvarianten (mV). Bekanntermaßen handelt es sich bei Einzel-Pärchen-Vergleich in den meisten Fällen um „amount“-Varianten, das heißt mengenmäßige Veränderungen, seltener kommen „presence/absence“-Varianten (A mit Proteinspot/B ohne Proteinspot) oder Mobilitätsvarianten, das heißt Proteinspots, welche sich zu einer unterschiedlichen Position auf dem Gel bewegen, was für eine Änderung des pI und/oder des Molekulargewichts hindeutet, vor. Nur quantitative Veränderungen von mehr als 20% wurden berücksichtigt. Im vierten Schritt fand der Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Pärchen (Pärchen-Kreuzvergleich) statt, um die Reproduzierbarkeit der Veränderungen zu prüfen. Dazu wurde das repräsentativste Gel als Mastergel ausgewählt und die Veränderungen der einzelnen Pärchen eingezeichnet. Im fünften Schritt wurden all diejenigen Spots markiert, welche bei mindestens 7 von 10 Gelpaaren gleichgerichtet verändert waren. Der Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben ergab, dass quantitative und qualitative Spotveränderungen bei mindestens 7/10 Gelpaaren gleichgerichtet verändert sein müssen, um von einer signifikanten Veränderung zu sprechen. Im sechsten Schritt fand die computergestützte Auswertung einzelner Spots statt, wobei die Veränderungen der Dichte näher bestimmt und statistisch ausgewertet wurden (siehe Kapitel 2.8.2).

2.8.2 Computergestützte Auswertung

Repräsentativ veränderte Proteinspots wurden in allen 2-DE Gehirnpoteinmustern mithilfe des Computerprogramms Proteomweaver™ Imaging Software Version 2.1 (Definiens, München, Deutschland) bewertet. Zuerst wurden die Gele mit einer Bildtiefe von 16-bit und einer Auflösung von 300 dpi eingescannt und in die Proteomweaver™ Imaging Software geladen. Nach der Gelnormalisierung und der automatischen Spotdetektion wurde die Spotzuordnung innerhalb des Gelpaares (Spotmatching) überprüft und falls notwendig editiert. Durch die automatische Spotnormalisierung wurden die Intensitäten so adjustiert, dass sie zwischen den verschiedenen Gelen vergleichbar wurden. Die relative Intensität individueller Spots in 2-DE Gelen der Trauma- und

Kontrollmäuse wurde mittels Quantifizierung des Spotvolumens der 16-bit-Graustufenbilder bestimmt. Bei diesen Proteinspots wurden die relativen Spotintensitäten mittels densitometrischer Messung bestimmt. Mittels Student's t-Test wurden die signifikanten Unterschiede zwischen den Probepaaren bestimmt ($p < 0,05$).

2.9 Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie

Für die Proteinidentifizierung mittels MS wurden 40 μl ($\sim 20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) Proteinextrakt auf 1,5 mm Durchmesser IEF-Gelen und 1 mm dicken SDS-PAGE Gelen aufgetrennt, die resultierenden 2-DE Gele mittels eines MS-kompatiblen Silberfärbungsprotokoll gefärbt [126]. Die relevanten Proteinspots wurden aus den 2-DE Gelen ausgestanzt und einem In-Gel Trypsinverdau unterzogen [29]. Die tryptischen Fragmente wurden mittels LC/ESI-MS und MS/MS mit einem LCQ Deca XP IT Gerät (Thermo Finnigan, Waltham, MA, USA.) analysiert. Die LC war direkt an eine ESI-MS Analyse gekoppelt. Die Proteinspot-Eluate von 15 μl wurden auf ein PepMap C18 Nano-Vorsäule (5 μm , 100 \AA , 300 μm id x 1mm; LC Packings, Amsterdam, Niederlanden) unter Verwendung einer 0,1% v/v TFA bei einer Flussrate von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ geladen. Die Peptide wurden auf einer PepMap C18 100 Säule (Länge 75 μm id x 15 cm, LC Packings) aufgetrennt. Der Eluierungsgradient wurde durch Mischung von 0,1% v/v Ameisensäure in Wasser (Lösung A) und 0,1% v/v Ameisensäure in ACN (Lösung B) bei einer Flussrate von 200 nl/min aufgebaut. Der Gradient wurde bei 5% v/v Lösung B linear auf 50% v/v Lösung B nach 40 min gesteigert. Die ESI/MS Datengewinnung wurde während des LC-Laufes durchgeführt. Drei Suchmodi, (i) Vollscan, (ii) Zoomscan der stärksten Ionen im Vollscan und (iii) MS/MS Scan der stärksten Ionen im Vollscan wurden nacheinander angewendet. Die Isolationsbreite der Vorläuferionen wurde auf 4,50 m/z , die normalisierte Kollisionsenergie auf 35%, das kleinste benötigte Signal auf 10×10^4 , die Zoomscan Massenbreite niedrig/hoch auf 5,00 m/z , gesetzt. Der dynamische Ausschluss wurde aktiviert und die Ausschlussmassenbreite niedrig/hoch auf 3,00 m/z gesetzt. Die Rohdaten wurden mittels TurboSEQUENT (BioWorks, Thermo Fischer, Waltham, MA, USA) Algorithmus extrahiert und autolytische Trypsinfragmente und bekannte Keratinpeptide später gefiltert. Alle von TurboSEQUENT generierten DTA-Datensätze wurden zusammengeführt und ins MASCOT-Datenformat (MGF) konvertiert. Die Massenspektren wurden mit unserer hauseigenen MASCOT-Lizenz mit automatischer Suche in den NCBI-Datenbanken analysiert. Die MS/MS Ionensuche wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: (i) Taxonomie: mammalia, (ii)

proteolytische Enzyme: trypsin, (iii) Maximum der akzeptierten Nichtspaltungen: 1, (iv) Massenwert: monoisotopic, (v) Peptidmassentoleranz: (1 Da), (vi) Fragmentmassentoleranz (1 Da) und (vii) variable Modifikationen: „oxidation of methionine and acrylamid adducts (propionamide) on cysteine“. Nur Proteine mit einer Trefferquote von $p < 0,01$ mit wenigstens drei identifizierten Peptiden und zwei unabhängigen Identifikationen wurden als identifiziert gewertet.

2.10 Analyse mittels Proteindatenbanken

Die Recherche der biologischen Funktion der 18 bei SHT signifikant veränderten Proteine (Kandidatenproteine) erfolgte primär in folgenden Datenbanken: Swiss-Prot/TrEMBL und NCBI Blast. Außerdem wurde in der (bio)medizinischen Datenbank Pubmed mit entsprechenden Verknüpfungen der Schlagworte thematisch passende Publikationen recherchiert, welche sich mit den Kandidatenproteinen im Zusammenhang mit SHT beschäftigten.

In der Internet-basierten Applikation Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, Redwood City, California, USA www.ingenuity.com) wurde ein Netzwerk generiert, welches darstellt, welche weiteren Proteine mit den Fokusproteinen verbunden sind. Dazu wurde eine Microsoft Excel Datei mit der Swiss-Prot/TrEMBL Zugangsnummer oder NCBI-Referenznummer der 18 bei SHT statistisch signifikant veränderten Proteine (Kandidatenproteine) in die Applikation geladen, von der IPA-Applikation erkannt und anschließend auf ein globales molekulares Netzwerk überlagert, welches auf Informationen aus der Ingenuity Signalweg Informationsbank (Ingenuity Pathways Knowledge Base) basiert. Netzwerke dieser Kandidatenproteine wurden dann algorithmisch auf Grundlage ihrer Konnektivität generiert.

3 Ergebnisse

3.1 Trauma-induzierte Gehirnproteomveränderungen bei infantilen Mäusen

Um die durch ein Schädelhirntrauma (SHT) verursachten subakuten Proteomveränderungen zu identifizieren, trennten wir die Gesamtextrakte der ipsilateral zum Kontusionsherd befindlichen Hirnhälfte (rechte Hemisphäre) der Trauma- und Kontrolltiere (12 Stunden nach der Behandlung) mittels 2-DE-Großgelelektrophorese auf. Die Proteine wurden in der ersten Dimension entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (pI) und in der zweiten Dimension entsprechend ihres Molekulargewichtes (Mw) aufgetrennt. Nach der Silberfärbung der 2-DE Gele entdeckten wir pro Probe ungefähr 6000 Spots (Abbildung 9).

Auf einem 2-DE Gel wird ein Protein entweder durch einen Spot repräsentiert oder bildet ein Muster multipler Spots (Isospots), verursacht durch ko- und/oder posttranslationale Modifikationen des primären Proteinproduktes. Proteinisospots innerhalb eines Spot-Komplexes, d. h. Anordnungen von verschiedenen Isospots innerhalb eines dichten Bereiches in 2-DE Proteinmustern, welche dieselbe Veränderung auch bei Hyperoxie zeigten, wurden mit nur einer Spot-Nummer bezeichnet [76]. Mitglieder einer Spotfamilie, z. B. die Gesamtheit aller Isospots eines Proteins innerhalb von 2-DE Proteinmustern, können über das 2-DE Gel verteilt sein. Deshalb würde die Detektierung aller Mitglieder einer Spotfamilie die Identifizierung aller sichtbaren Proteinspots in einem 2-DE Gel durch die Massenspektrometrie (MS) erfordern. Wir identifizierten nur die Proteine mittels MS, welche durch ein mechanisches Hirntrauma verändert waren und können deshalb nicht ausschließen, dass noch andere, unveränderte Proteinspots für eine spezifische Spotfamilie existieren. Unterschiede in der Spot-Intensität, welche auf dem 2-DE Gel als Antwort auf ein SHT entdeckt werden könnten, resultierten (i) aus einer Änderung der Gesamtproteinkonzentration (Spotfamilie) oder (ii) aus einer Änderung von einem oder mehreren Isospots innerhalb einer Spotfamilie.

Mit unserer Methode identifizierten wir eines oder wenige Mitglieder eines Signalweges, welche an der Pathogenese einer traumavermittelten Gehirnschädigung beteiligt sein können. Dieser Ansatz ermöglicht nicht die Detektion aller Mitglieder eines bestimmten Signalweges. Dies liegt teilweise an einer Unterrepräsentierung von geringmengeriger, hydrophober, sehr saurer oder basischer als auch sehr niedrig- oder hochmolekularer Proteine in 2-DE-Gelen.

Durch einen Vergleich des Gehirnpoteoms mittels 2-DE Proteinmustern entdeckten wir reproduzierbare qualitative Unterschiede in 18 Proteinspots bei infantilen Mäusen nach SHT im Vergleich zur Kontrollgruppe zum Untersuchungszeitpunkt am 7. Tag (P7; Abbildung 9 und 10). Diese Veränderungen waren alle quantitativer Natur (30 bis 300% Abnahme oder Zunahme; Tabelle 8). LC/ESI-MS und MS/MS ermöglichten die Identifizierung von 18 einzelnen Proteinen (Tabelle 9). Die bei jungen Mäusen veränderten Proteine sind verbunden mit oxidativem Stress, Inflammation, Apoptose, Aufrechterhaltung von Zellfunktion und -wachstum, neuronaler Differenzierung und Neuroprotektion.

3.2 Oxidativer Stress, Entzündung, Apoptose und Neuroprotektion

Wir identifizierten 12 Stunden nach einem SHT Veränderungen von fünf Gehirnproteinen, die auf eine traumainduzierte gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) und auf eine gesteigerte Apoptoserate im sich entwickelnden murinen Gehirn hinweisen (Abbildung 10, Tabelle 8). Die Konzentration eines Isoproteins von **Peroxiredoxin 6 (Prdx6)**, welches an der Abwehr freier Radikale beteiligt ist, stieg subakut an. Dies kann als eine physiologische Antwort auf oxidativen Stress verstanden werden. Zudem fanden wir einen Anstieg der Konzentration von Spots des **stress-induzierten Phosphoproteins 1 (Sti1)**, des **Hitzeschockproteins 90-beta (Hsp84)**, des **DJ-1 Proteins (Dj1)** und der Metallopeptidase **zytosolische nichtspezifische Di-peptidase 2 (Cndp2)** als Antwort auf das mechanische Hirntrauma.

3.3 Aufrechterhaltung von Zellfunktion und -wachstum

Als mögliche Reaktion auf eine größere Menge ubiquitiniertes Proteine stieg 12 Stunden nach einem SHT die Menge der **Proteasom-Untereinheit alpha Typ 1 (Psmc2)** und die Menge der **Proteasom 26S-ATPase Untereinheit (Psmc6)** (Abbildung 10, Tabelle 8). Die **Konzentration der Chaperonin Untereinheit 6a (Cct6A)**, die mit anderen Untereinheiten ein Chaperon bildet und damit an der Proteinfaltung beteiligt ist, stieg ebenfalls an. Des Weiteren war die Konzentration der ATP-abhängigen RNA-Helikase **DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) Box Polypeptide 3 (Ddx3)** erhöht. Außerdem fanden wir eine Erhöhung der **Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase (Gpd)** Konzentration, welche als Oxidoreduktase an der Glykolyse beteiligt ist.

3.4 Neuronale Differenzierung

Als Antwort auf ein SHT nahm die Menge des **Ras-verwandten nukleären Proteins (Ran)** subakut zu (Abbildung 10, Tabelle 8). Zusätzlich kam es zu einem signifikanten akuten Konzentrationsanstieg des Rho-GTPase nachgeschalteten Effektorproteins **Collapsin Response Mediator Protein 2 (Crmp2)**. Des Weiteren zeigte sich ein Anstieg der Konzentration des **Armado Repeat Containing 6 Proteins (Armc6)**, welches ein Teil von Desmosomen ausmacht.

3.5 Weitere Proteine

Wir identifizierten 12 Stunden nach einem SHT bei 5 weiteren Gehirnproteinen Veränderungen. Die Konzentration des **Apolipoprotein A-IV Precursors (ApoA4)**, welches ein Hauptbestandteil der High Density Lipoproteine (HDL) und der Chylomikronen ist, nahm zu. Die Menge der **Diphosphomevalonat Decarboxylase (Mvd)**, welche eine Rolle bei der Cholesterinbiosynthese spielt, nahm ebenfalls zu. Die Menge der, für die reversible Hydratation des Kohlendioxids zuständigen **Carboanhydrase 2 (Ca2)**, stieg ebenfalls an. Die Konzentration des **putativen Beta Aktin Proteins (pActb)**, welches für die äußere Zellform sowie intrazelluläre Transporte verantwortlich ist, stieg an. Im Rahmen eines erhöhten Sauerstoffbedarfs und Transportaufkommens 12 Stunden nach SHT kam es zu einer Erhöhung des **Hämoglobin Alpha, adult chain 1 (HbaA1)**.

Tabelle 8: Gehirnproteinveränderungen infantiler Mäuse als Antwort auf ein SHT

Zugangsnummer	Spot-Nr.	Protein	Quantitative Veränderungen
Oxidativer Stress, Entzündung, Apoptose und Neuroprotektion			
O08709	8	Peroxiredoxin 6 (Prdx6)	▲ 2,2*
Q60864	10	Stress-induced phosphoprotein 1 (Sti1)	▲ 2,1*
P11499	1	Heat shock proteine 90-beta (Hsp84)	▼ 0,3**
Q99LX0	9	DJ-1 protein (Dj1)	▲ 1,7***
Q9D1A2	3	Cytosolic nonspecific dipeptidase 2 (Cndp2)	▲ 2,7*
Aufrechterhaltung der Zellfunktion und Zellwachstum			
P46471	4	Proteasome subunit alpha type 1 (Psmc2)	▲ 1,6***
P62334	13	Proteasome 26S ATPase subunit (Psmc6)	▲ 1,5*
Q52KG9	11	Chaperonin subunit 6a (Cct6A)	▲ 2,1*
gi675362	12	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3 (Ddx3)	▲ 2,0**
P16858	14	Glycerol 3 phosphate dehydrogenase (Gpd)	▲ 1,7**
Neuronale Differenzierung			
gi16758182	16	Ras-related nuclear protein (Ran)	▲ 3,0***
O08553	2	Collapsin response mediator protein 2 (Crmp2)	▲ 2,1**
Q8K2S7	5	Armadillo repeat containing 6 protein (Armc6)	▲ 2,5**
Proteine keiner funktionellen Gruppe			
P06728	7	Apolipoprotein A-IV precursor (ApoA4)	▲ 1,8***
Q99JF5	5	Diphosphomevalonate decarboxylase (Mvd)	▲ 2,5**
P00920	15	Carbonic anhydrase 2 (Ca2)	▲ 1,9*
gi49868	6	Putative beta actin protein (putative ActB)	▲ 2,5***
Q91VB8	17	Hemoglobin alpha, adult chain 1 (HbaA1)	▲ 1,4***

Für jedes veränderte Protein ist eine Swiss-Prot/TrEMBL Zugangsnummer oder eine NCBI-Referenznummer, die 2-DE Spotnummer, der Proteinname und seine Abkürzung, der Median der Ratio der Spotintensitätsdifferenz kalkuliert als Ratio der höheren Spotintensität zur schwächeren Spotintensität ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) angegeben. Nach oben ▲ und nach ▼ gerichtete Dreiecke zeigen eine Zu-/Abnahme der Spotintensität bei Traumamäusen im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren an.

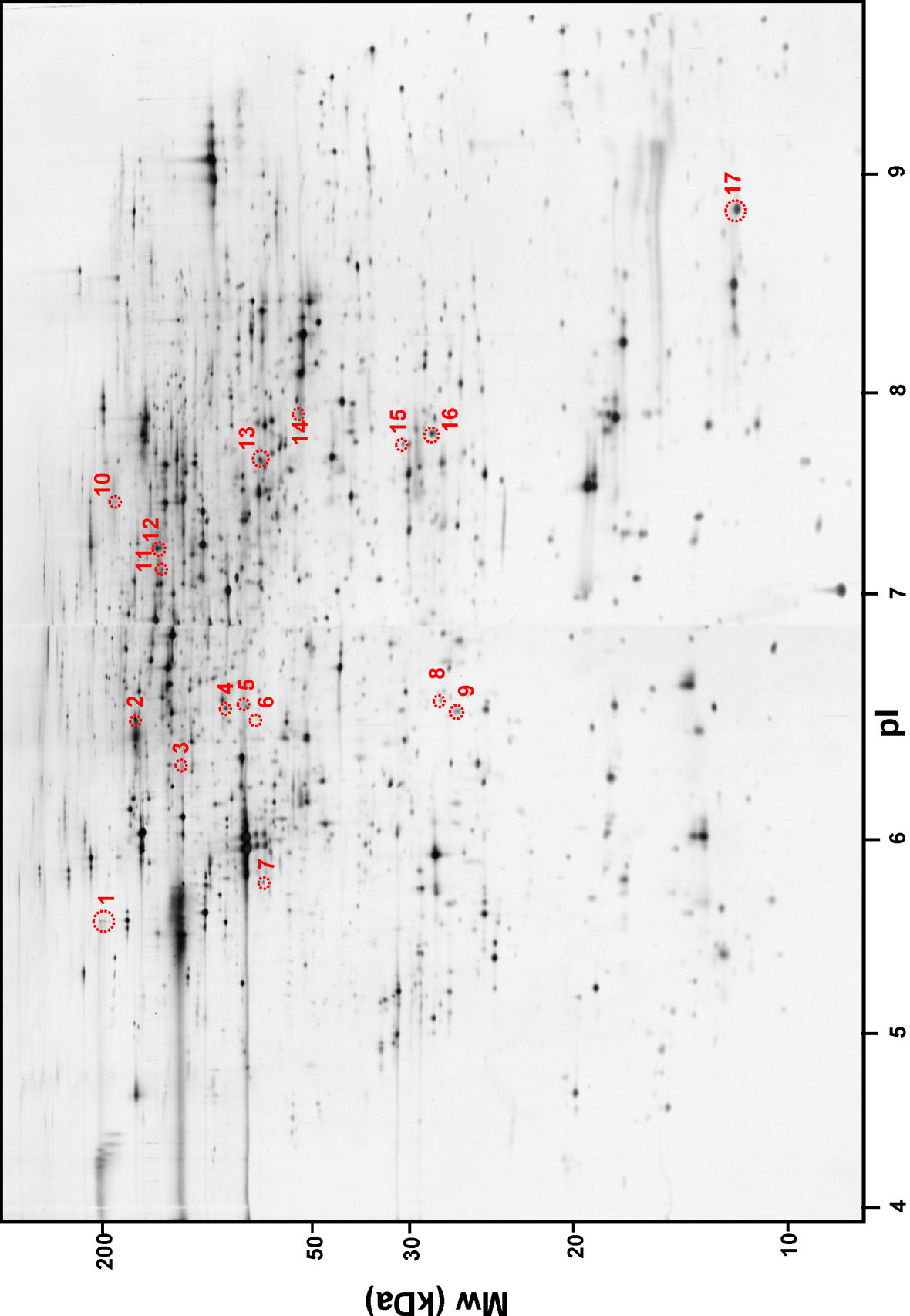


Abbildung 9: 2-DE Übersichtsgel der subakut veränderten Gehirnproteine einer neugeborenen Maus nach SHT

Ein 2-DE Übersichtsgel bestehend aus einer „sauren“ und einer „basischen“ Hälfte. Ein repräsentatives 2-DE Gehirnproteinmuster (Gesamtproteinextrakt; ipsilaterale Hemisphäre ohne Kleinhirn (*Cerebellum*) und Riechhirn (*Rhinencephalon*)) mit einer Auflösung von über 6000 einzelnen Proteinspots einer 7-Tage alten männlichen Maus, welche am 7. postnatalen Tag einem SHT ausgesetzt wurde. Die Gehirnproteine wurden in der ersten Dimension entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (pI) und in der zweiten Dimension entsprechend ihres Molekulargewichts (MW) aufgelöst. Auf einem 2-DE Gel wird ein Protein durch einen Spot oder, Co- und/oder posttranslationale Modifikationen des primären Proteinproduktes beziehungsweise durch die Proteinverarbeitung verursacht, durch ein Muster multipler Spots (Isospots) repräsentiert. Proteinisospots innerhalb einzelner Spot-Komplexe, Anordnung von verschiedenen Isospots in einer dichten Anhäufung in 2-DE Mustern, welche dieselben Veränderungen nach SHT zeigten, sind nur durch eine Spotnummer gekennzeichnet. Die Proteinspots wurden durch Silberfärbung dargestellt. Die Nummern markieren 18 statistisch signifikant veränderte Proteinspots. Zur Erläuterung der Proteinspotnummern wird auf Tabelle 8 verwiesen.

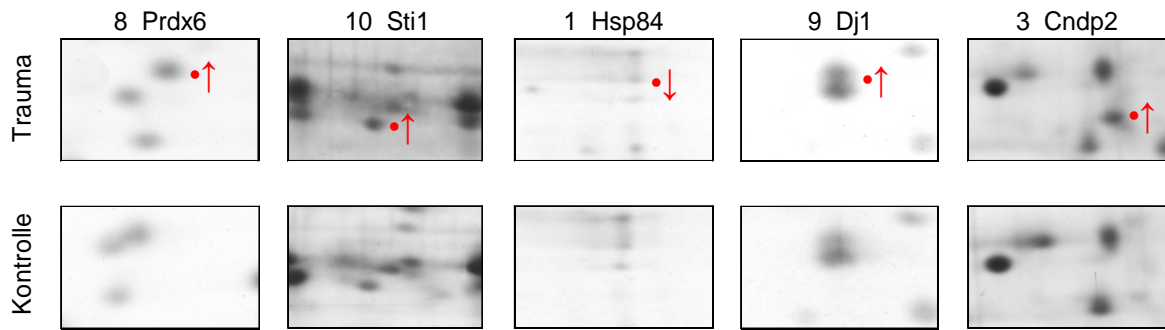
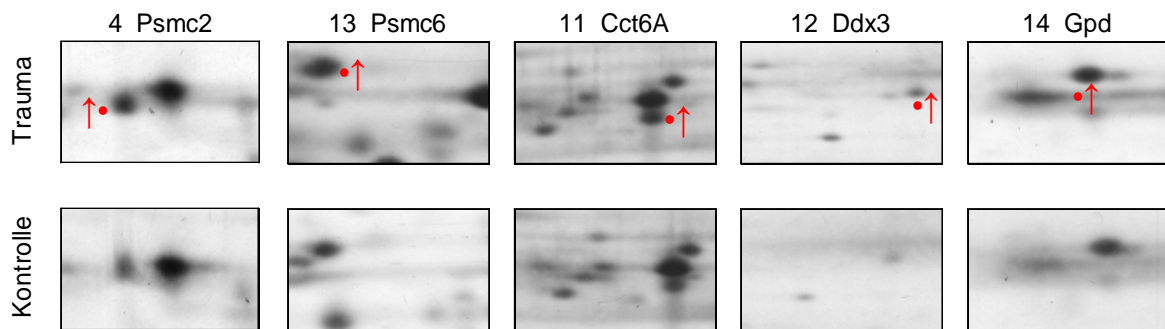
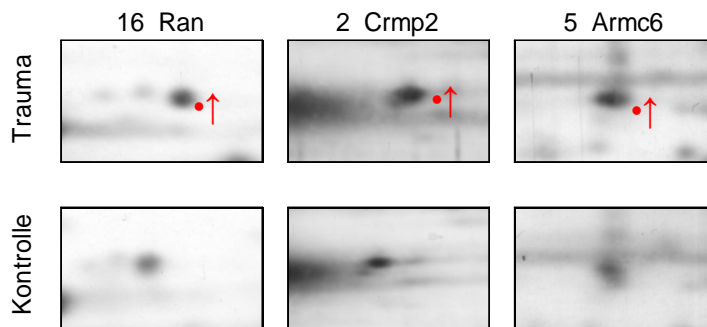
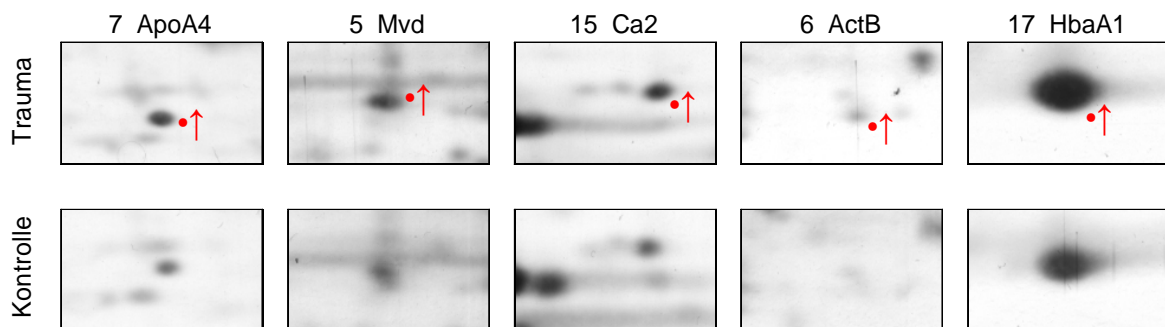
A Apoptose, oxidativer Stress, Entzündung**B Aufrechterhaltung der Zellfunktion und Wachstum****C Neuronale Differenzierung****D keine funktionelle Gruppe**

Abbildung 10: Übersicht der subakut nach SHT veränderten Proteine

Der Vergleich der Gehirnproteome sieben Tage alter (P7) Mäuse und Kontrolltiere nach SHT zeigt reproduzierbare Veränderungen in der Intensität von 18 Proteinen als Antwort auf das SHT. Unterschiede in der Spot-Intensität auf den 2-DE Gelen als Antwort auf das SHT resultieren aus einer Veränderung der totalen Konzentration eines Proteins (Spot-Familie) oder eine Änderung von einem oder mehreren Isospots innerhalb einer Spot-Familie. Manche Proteine wie Crmp2 werden durch verschiedene Isospots auf dem 2-DE Gel repräsentiert. Die Proteine werden 4 Gruppen zugeordnet (A) oxidativer Stress, Entzündung, Apoptose; (B) Aufrechterhaltung von Zellfunktion, -wachstum; (C) Migration, Axonwachstum, -führung und (D) weitere. Veränderte Proteinspots sind jeweils durch rote Punkte an ihrer rechten Seite markiert und durch Nummern gekennzeichnet (siehe Tabelle 8), die Aufwärts- und Abwärtspeile markieren eine Zu- oder Abnahme der Spotintensität traumatisierter Mäuse im Vergleich zu ihren unbehandelten Geschwistertieren. Für die Erklärung der Abkürzungen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 9: Identifizierung der Proteine in der Massenspektrometrie

Nr.	Hit	Bemerkung	gi-Nr.	SWISS Prot	Expect	max. Score	Anzahl Peptide	Sequenz-abd. [%]	Int-abd. [%]	MW [kDa]	pI	Name
1		bs-Spektrum	gi 194027	P11499		114	20	27		83	4.97	heat-shock protein hsp84
2		(Phosph). s-Spekt.	gi 40254595	O08553	1.1e-016	208	26 / 31	45 / 54	90 / 94	62	5.95	collapsin response mediator protein 2
3		(Oxidation)	gi 12697592	Q9D1A2	3.2e-006	306	19	17		53	5.43	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)= Cytosolic nonspecific dipeptidase
4		s-Spektrum	gi 13529470	P46471	2.3e-030	345	29	61	90	49	5.72	Psmc2 protein = 26S protease regulatory subunit 7 (Mss1 protein)
5	Mix 1		gi 33416493	Q8K2S7	7.4e-006	288	15	12		51	5.65	Armadillo repeat containing 6 (Armc6) protein
	Mix 2		gi 13539580	Q99JF5	4.8e-007	173	6	9		44	5.98	diphosphomevalonate decarboxylase
6		(Oxidation)	gi 49868	none	0.0011	85	5	12		39	5.78	put. beta-actin (aa 27-375)
7		bs-Spektrum	gi 91885	P06728	2.8e-019	234	28	58	88	45	5.77	apolipoprotein A-IV precursor
8		r-Spektrum	gi 4139186	O08709	0.0012	78	7	34	48	25	5.98	Peroxiredoxin-6 = 1-Cys peroxiredoxin protein
9		Oxidation Propionam.	gi 55741460	Q99LX0	3.3e-005	408	25	46		20	6.32	DJ-1 protein = Park7
10			gi 74146284	Q60864	3.9e-006	946	43	37		63	6.4	Stress-induced phosphoprotein 1 (Histi) = (Hsc70/Hsp90-organizing protein) (Hop)
11		(Oxidation)		Q52KG9	3.5e-007	834	54	38				chaperonin subunit 6a (zeta) = Cct6a
12		Oxidation/ Propionamid e	gi 6753620	none	3.3e-005	744	42	27		73	6.73	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked; D-E-A-D (aspartate-glutamate-alanine-asp
13			gi 27754103	P62334	9.00E-17	943	69	66		44	7.1	proteasome 26S ATPase subunit 6

14	2mc. s-Spektrum	gij53237011	P16858	2.6e-006	401	25	29			36	7,59	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
15		gij12832236	P00920	0.00057	236	20	41			29	6,49	carbonic anhydrase II
16	s-Spek. mamm.	gij32425497		8.1e-009	135	18	53	63	25	7,13		RAN protein
17		gij28175802	Q91VB8	3.4e-006	529	97	91		15	7,96		Hemoglobin alpha, adult chain 1 (Hba-a1)

Die Ergebnisse der LC/ESI-MS und MS/MS mit einem LCQ Deca XP IT. Die Massenspektren wurden mit unserer hausinternen MASCOT-Lizenz mit auto-matischer Suche in den NCBI-Datenbanken analysiert. Die MS/MS Ionensuche wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: (i) Taxonomie: mammalia, (ii) proteolytische Enzyme: trypsin, (iii) Maximum der akzeptierten Nichtspaltungen: 1, (iv) Massenwert: monoisotopic, (v) Peptid-massentoleranz: (1 Da), (vi) Fragmentmassentoleranz (1 Da) und (vii) variable Modifikationen: „oxidation of methionine and acrylamid adducts (propionamide) on cysteine“. Nur Proteine mit einer Trefferquote von $p < 0,01$ mit wenigstens drei identifizierten Peptiden und zwei unabhängigen Identifikationen wurden als identifiziert gewertet. Hit = Anzahl der identifizierten Proteine pro Spot, Bemerkung = variable Modifikationen: „oxidation of methionine and acrylamid adducts (propionamide) on cysteine“, gi-Nr = NCBI-Referenznummer, SWISS Prot = Swiss-Prot/TrEMBL Zugangsnummer, Expect = Wahrscheinlichkeit p, MW = Molekulargewicht, pI = isoelektrischer Punkt

4 Diskussion

Unsere Studie ist der erste Bericht über subakute Veränderungen des Gehirnproteoms neonataler Mäuse, die einem mechanischen Schädelhirntrauma (SHT) durch Aufschlag am 7. postnatalen Tag (P7) ausgesetzt wurden. Dabei erfolgte die Untersuchung der Proteinveränderungen, in der zum Kontusionsherd ipsilateralen Gehirnhälfte, im Rahmen eines größeren Projektes bei dem auch die kontralaterale Gehirnhälfte analysiert wurde [73]. Die Verifikation der 2-DE Ergebnisse mittels Immunhistochemie und RT-PCR wurde ebenso durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführt und publiziert [73]. Vor diesem Hintergrund können die Ergebnisse der ipsilateralen Hemisphäre nicht einzeln, sondern nur im Zusammenhang mit den Ergebnissen der kontralateralen Hemisphäre diskutiert werden.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein SHT in der frühen Entwicklung nicht nur Zelltod, oxidativen Stress und Inflammation im Gehirn auslöst, sondern eventuell auch Entwicklungsprozesse, wie neuronale Differenzierung, beeinflusst.

Veränderungen des Gehirnproteoms traten sowohl nah (ipsilateral) als auch, erstaunlicherweise, weit entfernt (kontralateral) vom Kontusionsherd auf. Dies spricht dafür, dass der initial lokale Prozess im Bereich des Kontusionsherdes selbst in weit entfernten Hirnarealen Veränderungen induzieren kann.

4.1 Trauma-induzierte Veränderungen des Gehirnproteoms

Um die durch SHT verursachten subakuten Proteomveränderungen bei jungen Mäusen (P7) zu identifizieren, untersuchten wir die Gesamtproteinextrakte ipsilateral zum Kontusionsherd 12 Stunden nach einem SHT mittels 2-DE. Auf dieser Seite verursacht ein mechanisches Trauma im unreifen Gehirn der Ratte und der Maus einen akuten exzitotoxischen Zelltod. Dieser breitet sich rasch innerhalb von vier Stunden aus [20, 62, 115]. Dieser lokalen Antwort folgt verzögert eine apoptotische Neurodegeneration, die deutlich stärker ausgeprägt ist und verschiedene Gehirnregionen ipsi- und kontralateral zum Kontusionsherd betrifft [20, 62, 115]. Die kontralateral zum Kontusionsherd gelegene Hirnhälfte wurde durch unsere Arbeitsgruppe untersucht [73]. Beide Hirnhälften wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit von der Proteinextraktion bis zur Massenspektrometrie exakt gleich bearbeitet und prozessiert (siehe Material und Methoden). Die Proteine wurden in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (Mw) aufgetrennt. Nach der Silber-

färbung der 2-DE Gele wurden circa 6000 Proteinspots pro Probe sichtbar. Im Vergleich des Gehirnpoteoms von Mäusen mit mechanischen SHT zu Kontrolltieren fanden wir 12 Stunden nach SHT reproduzierbare Unterschiede in 18 Proteinspots (Student's t-Test, $p < 0,05$; Abbildung 9 und 10). Diese Veränderungen bewegten sich in einem Bereich von 30 bis 300% (Tabelle 8). Die Massenspektrometrie ermöglichte die Identifizierung der 18 Proteinspots (Tabelle 9). Subakute Proteomveränderungen traten bei unseren Untersuchungen hauptsächlich ipsilateral zum Kontussionsherd auf, obwohl die subakute Dysregulation von 10 Proteinen kontralateral zum Kontussionsherd darauf schließen lässt, dass ein lokaler Einfluss zu einer diffusen Unterbrechung der Hirnfunktion beziehungsweise -morphologie führt [73]. Diese akuten funktionellen und morphologischen Veränderungen können zu weiteren funktionellen und morphologischen Veränderungen während der Periode des raschen Gehirnwachstums führen und somit für die irreversiblen Schäden verantwortlich sein, welche im reifen Gehirn nach SHT auftreten. Diese Ergebnisse stimmen mit denen unserer histologischen Voruntersuchungen überein [73].

4.2 SHT verursacht Apoptose, mikrogliale Aktivierung und oxidativen Stress

Wir identifizierten in der zum Kontussionsherd ipsilateralen Gehirnhälfte subakute Veränderungen von fünf Gehirnpoteinen, welche auf eine traumainduzierte Zunahme der Apoptoserate und der Produktion von freien Sauerstoffradikalen (ROS) im sich entwickelnden Gehirn zurückzuführen sein könnten. Sowohl der Anstieg der Konzentration des redoxregulierenden Proteins Peroxiredoxin 6 (Prdx6), des Dj-1 Proteins (Dj1) als auch des stressinduzierten Phosphoproteins 1 (Sti1) und des - der Gruppe der Hitzeschockproteine (Hsp) 90 zugehörige - Hsp84 spiegelt möglicherweise die physiologische Aktivierung des endogenen Antioxidanzien-Abwehrmechanismus zur Verhinderung eines oxidativen Schadens wieder.

Eine neuroprotektive Wirkung der Peroxiredoxine gegen oxidativen Stress und ihre Funktion im Zusammenhang mit Zellproliferation wurde in einem Modell NMDA-Rezeptor-vermittelter Gehirnläsionen und sauerstoffinduzierter Schädigung der Lunge bei neugeborenen Pavianen dargelegt [31, 114]. Ergänzend zu unseren Teilergebnissen der Steigerung der Konzentration von Prdx6 auf der ipsilateralen Seite, konnte eine Steigerung der Konzentration von Prdx1 kontralateral zur Traumaseite bei den gleichen Modelltieren gezeigt werden [73]. Es zeigte sich eine geringere Konzentration von Prdx2 in Gehirnen neonataler Mäuse 12 Stunden nach Hyperoxie

[76] und eine erhöhte Konzentration von Prdx1 im Kortex neugeborener Mäuse, welche mit dem NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK801 oder dem GABA-Rezeptor-Agonisten Phenobarbital an P7 nach der Geburt behandelt wurden [74]. Weiterhin wurde eine Fehlregulation von Prdx1 bei erwachsenen Mausmodellen von neurodegenerativen und nichtneurodegenerativen Erkrankungen gezeigt [136]. Die Konzentration von Prdx6 war im frontalen Kortex von Patienten mit Morbus Parkinson erhöht [86]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen unserer Proteomanalyse konnte im Rahmen unseres Arbeitsgruppenprojektes eine gesteigerte Rate von Zelltod im Gehirn 7 Tage alter Ratten 24 Stunden nach einem mechanischen SHT mittels TUNEL-Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 11) [73].

Dabei trat der Zelltod bilateral, hauptsächlich im Bereich des Kortex, des Nucleus thalamicus, des Gyrus dentatus, des Hippocampus, des Subiculums und des Striatums auf. Wie wir bereits berichteten, verursacht SHT bei 7 Tage alten Ratten eine sich rasch ausbreitende exzitatorische Neurodegeneration, welche auf die zum Kontussionsherd ipsilaterale Hemisphäre beschränkt bleibt. Erst ungefähr 6 Stunden nach einem Trauma wird eine verzögerte und apoptotische Neurodegeneration auf der kontralateralen Seite sichtbar. Überraschenderweise tritt diese aber auch in vielen anderen Hirnregionen auf, welche weit entfernt vom Kontussionsherd liegen [20, 115]. Diese traumainduzierte Apoptose ist mit einer Aktivierung des intrinsischen und extrinsischen apoptotischen Signalweges und einem Anstieg der Transkription von Neurotrophen verbunden [18, 19, 43, 44, 115]. Um der Frage nachzugehen, welcher Mechanismus den apoptotischen Anteil des traumainduzierten Gehirnschadens initiiert und unterhält, untersuchte unsere Arbeitsgruppe im Rahmen des Projektes die Aktivierung von Mikrogliazellen als ein Vermittler von Inflammation und oxidativem Stress nach kindlichem SHT durch immunhistochemische Färbung mit Griffonia simplicifolia Isolektin B4 (GSA I-B4; Abbildung 12) [73]. GSA I-B4 markiert selektiv (alpha)-D-Galaktose in Glykokonjugaten an Zelloberflächen sämtlicher Typen von Mikrogliazellen als auch anderen Makrophagen und endothelialen Zellen [21, 66]. Mikrogliazellen stammen von zirkulierenden Monozyten ab, welche vorwiegend während der Embryonalentwicklung in das Gehirn einwandern [10, 42]. Obwohl Mikrogliazellen ursprünglich amöboid und aktiv phagozytisch sind, reifen sie schnell zu sogenannten ramifizierten Mikrogliazellen. Diese zeigen einen Verlust von Oberflächenantigenen, welche charakteristisch für Zellen monozytisch-makrophagischer Herkunft sind [50, 121]. Unsere Arbeitsgruppe fand im unreifen Gehirn der Ratte nach einem SHT eine starke Zunahme amöboider und sich im Übergang

befindlicher Mikroglia innerhalb des kortikalen Kontussionsgebietes, aber auch an entfernten Stellen im Bereich des Kortex, des Thalamus, der weißen Gehirnsubstanz, des Striatums und des Hippocampus [73].

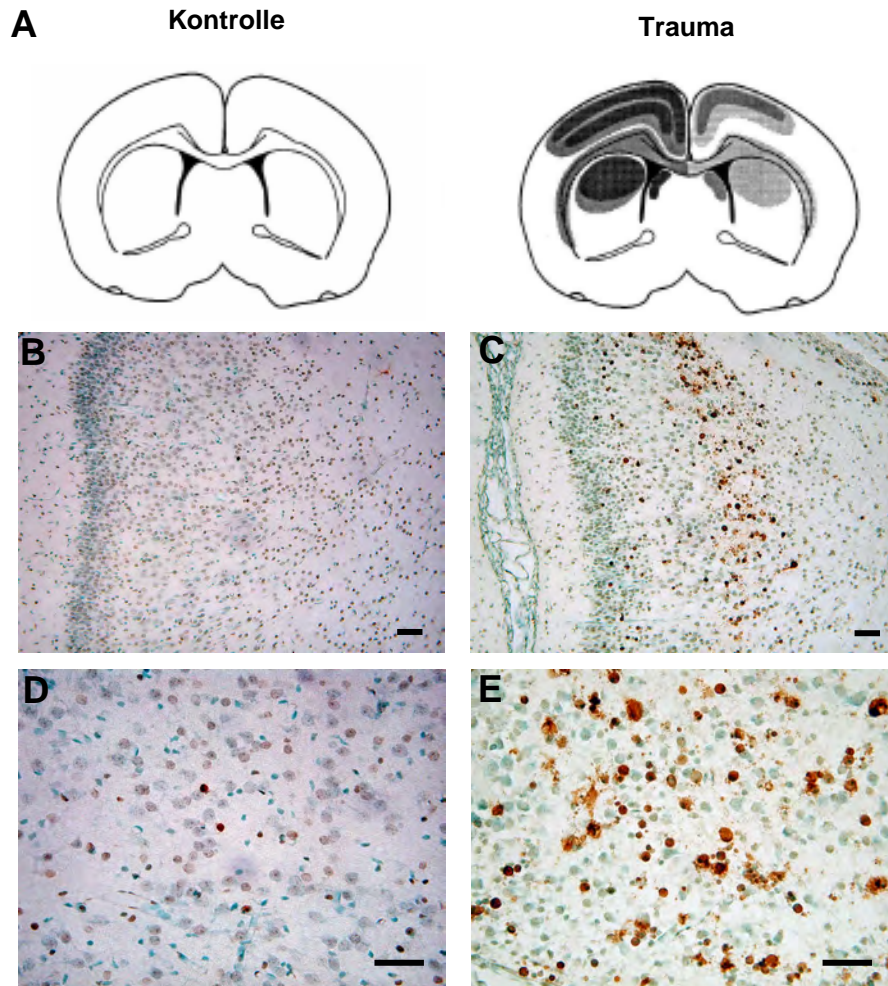


Abbildung 11: Strukturelle Veränderungen durch SHT in der TUNEL-Färbung [73]

(A) Schematische Darstellung der Verteilung der TUNEL positiven Zellen (schattierte Gebiete) in Gehirnquerschnitten von P7 Ratten 24 Stunden nach SHT verglichen mit Kontrolltieren. TUNEL positive Zellen sind Markerzellen für apoptotischen Zelltod. Dunklere Gebiete in den Gehirnquerschnitten stehen für eine höhere Dichte degenerierter Zellen. (B-E) lichtmikroskopische Aufnahmen zeigen TUNEL-positive Zellkerne im Kortex retrosplenialis (B, C) und Thalamus (D, E). Bei den Kontrolltieren wurden nur wenig TUNEL-positive Profile gefunden, wohingegen sich eine massive Neurodegeneration 24 Stunden nach SHT in den Abschnitten II und IV (D, E) zeigte. Maßbalken = 50 μ m.

Ramifizierte Mikroglia stellten sich als Zellen mit einem kleinen Zellkörper sowie langen und weitverzweigten Fortsätzen dar, während amöboide Mikroglia ovale oder runde Zellen mit relativ kurzen, kräftigen Fortsätzen waren. Die Mikroglia-Aktivierung war bereits 12 Stunden nach einem SHT nachweisbar, erreichte nach 36-48 Stunden ihren Höhepunkt, um dann ab dem Tag 5 nach dem SHT wieder abzusinken.

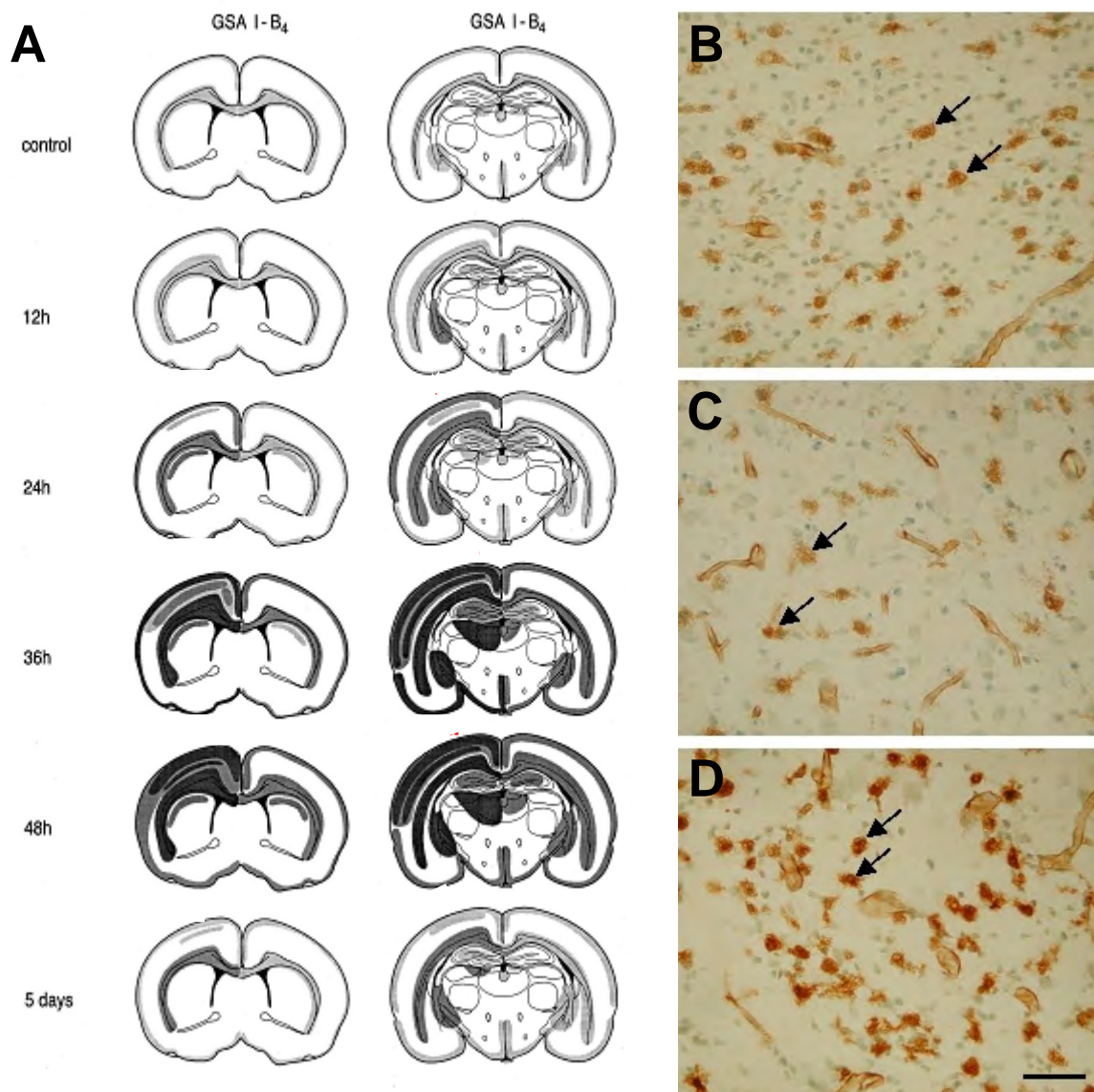


Abbildung 12: Fortschreiten mikroglialer Aktivierung in infantilen Nagergehirnen nach SHT [73]

Es zeigt sich ein starker Anstieg amöboider und sich im Übergang befindlicher Mikroglia innerhalb des kortikalen Kontusionsgebietes, aber auch auf der gegenüberliegenden Seite in Kortex, Thalamus, weißer Substanz, Striatum und Hippocampus als Antwort des unreifen Gehirns auf ein SHT. (A) Schematische Darstellung der Verteilung der GSA I-B4-positiven Zellen (schattierte Gebiete) in posterioren Gehirnquerschnitten von P7 Ratten verglichen mit Kontrolltieren zu verschiedenen Zeitpunkten 12 Stunden bis 5 Tage nach SHT. Dunklere Gebiete in den Gehirnquerschnitten stehen für eine höhere Dichte GSA I-B4-positiver Zellen. (B-D) lichtmikroskopische Aufnahmen zeigen GSA I-B4-positive Zellen im Kortex retrosplenialis (B), Thalamus (C) und Corpus callosum (D) 36 Stunden nach SHT. Die Pfeile zeigen auf GSA I-B4-positiven Zellen (Maßbalken = 50 µm).

Die mikrogliale Reaktion geschah mit einer Zeitdifferenz von mindestens 6 Stunden nach Auftreten des apoptotischen Zelltodes. Sie war am stärksten in Gebieten, die stark von apoptotischer Neurodegeneration betroffen waren, nachweisbar, konnte aber auch im Bereich des Thalamus und der weißen Hirnsubstanz nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen wurde eine mikrogliale Aktivierung als Folge

eines SHT in adulten Rattenmodellen und bei menschlichen Traumaopfern beschrieben [33, 45, 106]. In welchem Ausmaß die Mikroglia-Aktivierung eine Reaktion auf einen beginnenden Zelltodprozess ist zur Pathogenese des apoptotischen Zelltods selbst beiträgt, ist noch unklar. Des Weiteren wurde Mikrogliazellen eine Rolle bei der Gewebereparatur und –reorganisation des sich entwickelnden Gehirns nach Verletzungen eingeräumt [22, 112].

Die Menge von Hämoglobin alpha, adult chain 1 (HbaA1) nahm ipsilateral zum Kontussionsherd nach SHT zu, was sehr wahrscheinlich auf intrakranielle Blutungen zurückzuführen ist. Hämoglobin findet sich physiologischerweise in millimolarer Konzentration im Blut. Extravasales Hämoglobin hingegen ist ein Prooxidant und ein mutmaßliches Neurotoxin. Es ist bekannt, dass nichttoxische Konzentrationen von Hämoglobin die neurotoxische Wirkung der Glutamatrezeptor-Agonisten α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoaxol Propionische Säure (AMPA) und Kainat erhöht. AMPA und Kainat werden bei erregungstoxischem Zelltod freigesetzt. In einer Konzentration von 0,25 – 1,0 μ g potenziert Hämoglobin die Neurotoxizität geringer Konzentrationen von AMPA und Kainat. Es steigert den neuronalen Zellverlust um 150% bei 6 μ M AMPA und um 90% bei 30 μ M Kainat [120].

Die Häm-Oxygenase in aktivierten Astrozyten und Mikroglia spaltet das Häm in Biliverdin, wobei Eisen stark neurotoxisches Eisen freigesetzt wird [15]. Die Konzentration des schweren Polypeptids 1 des Eisentransporterproteins Ferritin war in unseren Untersuchungen bei 7 von 10 Trauma-Kontrollpaaren statistisch nicht signifikant erhöht ($p = 0,1$). Dieser Trend könnte eine Reaktion auf die zahlreichen freien Eisenionen sein und ein Versuch des Körpers den oxidativen Schaden zu reduzieren. Eine lediglich geringe Erhöhung der Ferritin-Expression konnte auch in anderen Studien gefunden werden [15]. Die Ergebnisse von Bishop et al. deuten darauf hin, dass Eisen im extrazellulären Raum mehrere Tage als Neurotoxin und ROS-Donator wirken kann, bevor es an intrazelluläres Ferritin gebunden und inaktiviert wird.

Klinische und experimentelle Studien des adulten SHT legen nahe, dass oxidativer Stress eine Schlüsselrolle bei frühen neuronalen und vaskulären Schäden als auch bei der Progression der sekundären Gehirnverletzung durch Entzündungsprozesse spielt [83, 106, 116]. Nach SHT verstärkt das aus zerstörten Zellen freigesetzte Calcium die glutamatvermittelte exzitatorische Toxizität, was zu einem Anstieg der endogenen Produktion freier Radikale führt und den Zelltod auslöst [116]. Die Kaskaden des oxidativen Schadens werden ferner durch Entzündung, eine Abnahme der endogenen

antioxidativen Abwehrmechanismen und einer Freisetzung von Übergangsmetallen unterhalten [116]. Solch eine Abnahme der antioxidativen Reserve konnte im Liquor von Kindern mit Kopfverletzungen nachgewiesen werden [11, 83].

Das Gehirn ist aufgrund seiner hohen Rate an oxidativer Stoffwechselaktivität, der begrenzten Fähigkeit zur Neurogenese, des hohen Membran-Zytoplasma-Verhältnisses und des hohen Niveaus an Übergangsmetallen besonders empfindlich für solche oxidativen Schäden. Diese Vulnerabilität wird beim unreifen Gehirn durch die geringere antioxidative Reserve zusätzlich verstärkt [83, 116].

4.3 Proteine neuronaler Migration und axonaler Aussprossung

Proteinveränderungen, welche nach SHT beim unreifen murinen Gehirn entdeckt wurden, weisen auf eine Dysregulation der neuronalen Migration und Differenzierung, insbesondere eine Störung des Wachstums und der Wegleitung von Axonen, hin. Das Ras-verwandte nukleäre Protein (Ran), Collapsin Response Mediator Protein 2 (Crmp2) und seine Isoformen sowie das Armadillo Repeat Containing 6 Protein (Armc6) waren subakut bei SHT dysreguliert (Tabelle 8, Abbildung 9 und 10).

Erreicht wird die Wachstumskegelführung durch Regulation von (i) Polymerisation/ Depolymerisation der Aktin-, Mikrotubuli- und Zytoskelett-assoziierten Komponenten (ii) Transmembranadhäsion und Signalmolekülen (iii) sekundären Botenstoff-Signalwegen z. B. der Hauptregulatoren der Aktin- und Mikrotubuli-Bewegungen, der kleinen GTPasen aus der Rho-Familie und (iv) Proteine wie Myosin, die am antero- und retrograden Transport beteiligt sind [72]. Die GTP-gebundene Rho-Klasse der GTPasen moduliert die zytoskelettale Morphologie durch eine große Vielfalt von Effektor-Molekülen [63, 106, 108, 128]. Molekulare Führungssignale kontrollieren direkt oder indirekt zytoskelettale Bewegungen durch das Modulieren der Funktion der kleinen GTPase-Regulatoren aus der Rho-Familie wie Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) und Guaninenukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) (Abbildung 13) [117]. GDI-Proteine binden an die GDP-Form von Rho-GTPasen, verlangsamen die Rate der GDP-Dissoziation von Rho-GTPasen und reduzieren damit die Aktivität dieser Proteine (Abbildung 13).

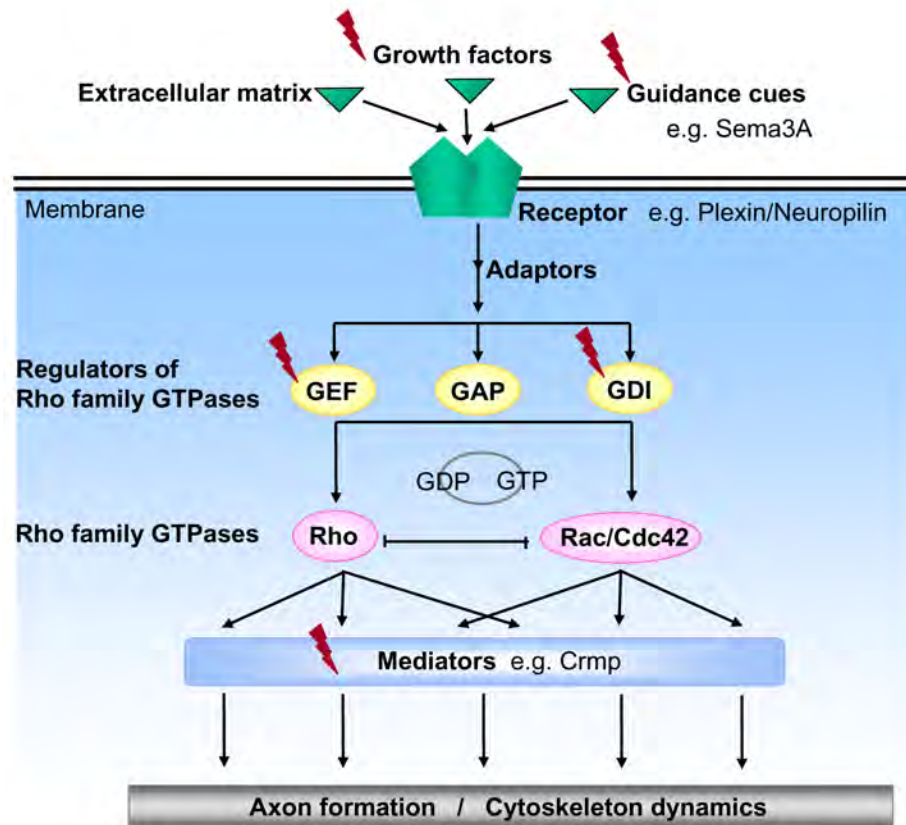


Abbildung 13: Dysregulation der Proteine neuronaler Migration und Differenzierung

Ein vereinfachtes Schema des angehenden Signalweges der Rho-Familie der kleinen GTPasen; Proteine/Proteingruppen, welche durch SHT dereguliert werden, sind durch kleine rote Blitze gekennzeichnet. Extrazelluläre Signale (extrazelluläre Matrix, Wachstumsfaktoren, Führungssignale) kontrollieren direkt oder indirekt die Dynamik des Zytoskeletts durch die Regulatoren der Rho-Familie der kleinen GTPase-Regulatoren aus der Rho-Familie wie Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) und Guaninenukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs). GTP-gebundene Rho-Familie GTPasen modulieren die Zytoskelett-Morphologie durch eine große Bandbreite von Effektor Molekülen einschließlich Crmp.

Deshalb könnte die Wachstumskegel-Führung durch den subakuten Anstieg des Rho-Guanindiphosphat-Dissoziationsinhibitors 1 (RhoGDI1) kontralateral zur Traumaseite beeinflusst werden. RhoGDI1 bindet an die Guanindiphosphat (GDP)-Form der Rho-GTPasen, vermindert die Rate der GDP-Dissoziation von GTPasen. Dadurch wird die Aktivität dieser Proteine vermindert [117]. Eines der bekanntesten Navigationssignale ist Semaphorin 3A (Collapsin 1), das über Plexin und Neuropilin Rezeptoren u.a. Rho-GTPasen aktiviert, die wiederum indirekt über Collapsin Response Mediator Protein (CRMP) Isoformen zu einem Kollaps von Wachstumskegeln führen. Ran, ein Mediator des Semaphorin3A (Sema3A)-Signales am Plexin-A/Neurophilin-A Rezeptorkomplex und des nachgeschalteten Crmps [130], war auf der Traumaseite signifikant hochreguliert. Eine Überexpression von Ran bewirkt in Gegenwart von Plexin A1 eine

Hemmung der nicht-neuronalen Zellausbreitung und hemmt stark den axonalen Auswuchs *in vitro* und *in vivo*, während eine Suppression der Ran-Expression die Sema3A-Empfindlichkeit reduzierte. Außerdem ist das hochregulierte *Armc6* an einer großen Auswahl von zellularen Funktionen einschließlich der des Austauschfaktors für Ras-verbundene, kleine G-Proteine beteiligt.

Als ein weiteres Anzeichen für eine abweichende Wachstumskegelführung nach SHT, beobachteten wir einen signifikanten mRNA-Anstieg der Rho-GTPase nachgeschalteten Effektoren *Crmp2* und *-4* im retrosplenialen Kortex der Ratte und eine Zunahme der *Crmp2*-Proteinmenge in Proteinextrakten der Gehirnhälften (ohne Kleinhirn und Riechhirn) ipsilateral zur Traumaseite (Tabelle 8, Abbildung 9 und 10). Wir fanden auch eine Abnahme von *Crmp2* kontralateral zur Traumaseite [73].

Die Funktion der *Crmp*-Proteine, die zunächst als Mediatoren von Sema3A/Collapsin-induzierten Wachstumskegellkollaps identifiziert wurden, bestimmen das Axon-Dendrit-Schicksal, die Ausbildung neuronaler Polarität und den Kinesin-I-abhängigen Transport von Proteinen zu den Wachstumskegeln [63, 99, 128]. Im Einklang mit früheren Studien [99] beobachteten wir eine hohe Konzentration an *Crmp2* und *-4* Proteinen im Gehirn von *C57BL/6* Mäusen während früher Stufen der Entwicklung und eine massive Verringerung dieser nach Abschluss des Gehirnwachstums innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen [77]. Die oben beschriebenen Proteomveränderungen mit einer raschen Hochregulierung der *Crmp2*-Konzentration im sich entwickelnden Gehirn nach SHT können Ausdruck einer Schädigung des Gehirns u.a. durch abnorme neuronale Aussprossung und/oder Verlust neuronaler Polarität sein. Alternativ können die Proteinveränderungen auch im Rahmen von rasch einsetzenden Reparaturprozessen auftreten. Hierzu sind folgende Beobachtungen von Bedeutung. (i) Eine *Crmp2*-Überexpression führt in Primärkulturen hippocampaler Neuronen zu einem Verlust der neuronalen Polarität und induzierte die Ausbildung einer vermehrten Anzahl von Axonen [63]. (ii) Eine *Crmp2*-Überexpression führte in Kulturen von Hinterhorn ganglien zu einer beschleunigten Regeneration verletzter Neuronen [128, 129]. (iii) Darüber hinaus zeigen Nematoden mit mutierten *Crmp*-homologen *C. elegans* Gen eine Koordinationsstörung und weisen Störungen der axonalen Wegleitung mit vorzeitiger Terminierung der Aussprossung auf [8].

Folglich könnten Mechanismen, die dem Anwachsen und der Wegleitung von Neuriten während der Entwicklung zugrunde liegen, in Zusammenhang mit der Regeneration nach SHT-induzierter Neurodegeneration stehen. Die schnelle Hochregulierung von

Crmp-Proteinen im sich entwickelnden Gehirn nach SHT hingegen könnte sich als nachteilig herausstellen und ZNS-Schäden durch die Ausbildung aberranter Axone und/oder einen Verlust neuronaler Polarität verursachen. Die oben diskutierten Erkenntnisse und die Veränderung von Gehirnproteinen, welche mit neuronaler Migration und axonalem Auswuchs in unserem SHT-Modell von Nagern einhergehen, weisen auf SHT-induzierte morphologische Alterationen wie Ausbildung aberranter Axone und Dendriten und/oder einen Verlust neuronaler Polarität hin.

4.4 Proteine der Aufrechterhaltung von Zellfunktion und Zellwachstum

Die Proteasom-Untereinheit Alpha Typ 1 (Psmc2) und die Proteasom 26S-ATPase Untereinheit (Psmc6) zeigten 12 Stunden nach einem SHT erhöhte Konzentrationen (Tabelle 8, Abbildung 9 und 10). Nach zellulärem Stress oder Gewebeschäden spielt das Proteasom eine kritische Rolle bei der Proteindegradierung und der Signaltransduktion. Die Zellen regulieren ihre Proteinexpression, um sich an funktionelle Notwendigkeiten anzupassen. Bei erwachsenen Ratten, die einem SHT ausgesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass es zu mRNA-Veränderungen der Proteasom-Untereinheiten kommt [135]. Die Menge der Chaperonin Untereinheit 6a (Cct6A), die mit anderen Untereinheiten ein Chaperon bildet und damit an der Proteinfaltung beteiligt ist, stieg ebenfalls an. Bei älteren C57/Bl6-Wildtyp- oder ApoE-Knockout-Mäusen wurde gezeigt, dass eine zunehmende Expression der Chaperonin Untereinheit 5 mit oxidativem Stress assoziiert ist [30].

Die Menge des Armadillo Repeat Containing Protein 6 (Armc6), welches ein Bestandteil von Desmosomen ist, war ebenfalls erhöht. Desmosomen stellen eine enge Verbindung zwischen zwei Zellen in tierischen Geweben her und verstärken somit den mechanischen Zusammenhalt. Des Weiteren nahm die Menge der ATP-abhängigen RNA-Helikase DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) Box Polypeptide 3 (Ddx3) 12 Stunden nach SHT zu. Ddx3 findet sich vorübergehend in zytoplasmatischen Stressgranula unter zellulären Stressbedingungen, was für eine Rolle der translationalen Kontrolle spricht. Es verbindet sich mit Translationaktivierungskomplexen und begünstigt eine effektive Übersetzung von mRNA [91]. Außerdem fanden wir eine Erhöhung der Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase (Gpd) welche als Oxidoreduktase an der Glykolyse beteiligt ist. Als Antwort auf Stressoren und Glukokortikoide stieg die Synthese des hippokampalen Gpd an. Nach Stromstößen des Schwanzes (engl. „tail shock“) von Ratten über einen Zeitraum von 30 min zeigte sich ein Anstieg der Konzentration von

Gpd im Hippocampus. Dies deutet darauf hin, dass die Induktion von Gpd funktionelle Konsequenzen bei der zellulären Adaptation gegenüber Stress hat [104]

4.5 Proteine der Cholesterinbiosynthese und andere Proteine

Wir identifizierten 12 Stunden nach SHT bei fünf weiteren Gehirnproteinen Veränderungen (Tabelle 8, Abbildung 9 und 10). Die Konzentration des Apolipoprotein A-IV Precursors (ApoA4) Proteins, welches ein Hauptbestandteil der High Density Lipoproteine (HDL) und der Chylomikronen ist, und eine Rolle bei der zerebralen und peripheren Cholesterin- und Lipoprotein-Homöostase spielt, nahm zu. ApoA4 gehört zu den Komponenten des Glia-/Neuron-Cholesterin-Transporters und zählt zur Gruppe polymorpher Gene, welche im Zusammenhang mit der Entstehung der Alzheimerkrankheit genannt werden [27, 110]. Die Menge der Diphosphomevalonat-Decarboxylase (Mvd), welche eine Rolle bei der Cholesterinbiosynthese spielt, war ebenfalls 12 Stunden nach SHT erhöht, was vermutlich auf ein Absinken oder einen erhöhten Bedarf von 24S-Hydroxycholesterin-Konzentrationen nach SHT zurückzuführen ist [133]. Die Mengen der, für die reversible Hydratation des Kohlendioxids zuständigen Carboanhydrase 2 (Ca2) sowie die Konzentration des putativen Beta Aktin Proteins (pActb), welches für die äußere Zellform sowie intrazelluläre Transporte verantwortlich ist, stiegen ebenfalls an.

4.6 Moonlighting-Funktion der Proteine

Es ist naheliegend, die Proteine, welche im Rahmen eines Krankheitszustandes verändert sind, entsprechend ihrer Funktion in Kategorien zu ordnen und dementsprechend geordnet zu diskutieren. Dies ist eine starke Vereinfachung, denn Proteine haben eine bestimmte Hauptfunktion, können aber unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen auch Nebenfunktionen übernehmen. Dies erhöht die Netzwerk-Komplexität und wird als „moonlighting“ oder „gene sharing“ bezeichnet [68, 69, 131]. Dabei werden zwei oder mehr verschiedene Funktionen von einer Polypeptidkette gesteuert. Moonlighting-Proteine sind keine Proteine, welche (i) verschiedene Funktionen entweder durch Genfusion oder multiple Splice-Varianten haben, (ii) keine Proteine mit derselben Funktion an verschiedenen Orten, oder (iii) Proteinfamilien, in welchen verschiedene Mitglieder verschiedene Funktionen haben, wenn jedes individuelle Mitglied nur eine Funktion hat.

Bedeutende zelluläre Aktivitäten und biochemische Signalwege bei der Entstehung von Krebs sind mit multifunktionalen oder „moonlighting“ Proteinen assoziiert. Moonlighting-

Proteine können zur Koordination zellulärer Aktivitäten vorteilhaft sein, aber sie erschweren die funktionelle Bestimmung der Proteine in normalen und kranken Zellen. Erschwerend zur Entwicklung einer Behandlung kommt hinzu, dass Methoden, welche eine Funktion eines Moonlighting-Proteins im Rahmen einer Krankheit korrigieren, unerwünscht andere Funktionen des Proteins beeinflussen, was zu Nebenwirkungen führen kann [68, 69].

Bei der Ingenuity Analyse zeigte sich, dass Proteine neben ihrer Hauptfunktion noch weitere Funktionen haben, welche bei SHT einen Einfluss haben könnten. Beim DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) Box Polypeptide 3 (Ddx3) ist dies die Fähigkeit zur Bindung von Fibroblasten sowie ein Einfluss auf den Zelltod von Fibroblasten. Das Apolipoprotein A-IV Precursor (ApoA4) führt zur Adhäsion von roten Blutkörperchen und entfernt Superoxide. Das Dj-1 Protein hat mittels Langzeit-Depression (LTD = long term depression) Einfluss auf die Abschwächung der synaptischen Übertragung von Neuronen und anderen ZNS-Zellen. Die Chaperonin Untereinheit 6a (Cct6A) vermittelt ebenso wie das Hitzeschockprotein 90-Beta (Hsp84) posttranslationale Modifikationen der Proteine [64].

4.7 Netzwerkanalyse

Neben der direkten Funktion, der 12 Stunden nach SHT veränderten 18 Gehirnproteine, zeigt sich bei der Ingenuity Netzwerk-Analyse eine rege Interaktion mit anderen Proteinen, die bereits für frühe Veränderungen infolge eines SHT bekannt sind. Dies sind Proteine aus der Tumornekrosefaktor-(TNF)-Superfamilie, Interleukin 4 (Il-4), V-MYC Myelocytomatose viral Onkogen Homolog (Myc), Jun Onkogen (c-Jun), Amyloid Beta (a4) Precursor Protein (App), Progesteron, Hitzeschockprotein 70 (Hsp70), Insulin-like growth factor 1 (Igf-1), Insulin-like growth factor 1 Rezeptor (Igf1R), Arrestin beta 2 (Arreb2) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (Abbildung 14).

Die Schlüsselrolle während der Inflammationsreaktion nach einem SHT spielen Immunmediatoren, welche bereits wenige Minuten nach dem Trauma ausgeschüttet werden. Sie führen zu einer Kaskade der Expression von Adhäsionsmolekülen, zellulärer Infiltration und zusätzlicher Ausschüttung inflammatorischer Moleküle und Wachstumsfaktoren. Dies kann sowohl zur Regeneration als auch zum Tod einer Zelle führen. Es zeigt sich, dass die Neuroinflammation sowohl eine nützliche als auch eine schädliche Wirkung hat [103]. Der am wichtigsten scheinende Immunmodulator ist dabei Tumornekrosefaktor (TNF), - ein Zytokin, welches den Gewebsschaden und das

funktionelle Ergebnis nach SHT bei Mäusen beeinflusst. Im SHT-Tiermodell zeigten (TNF- α /Fas-/-) Mäuse eine verbesserte motorische Funktion und einen verbesserten Erwerb räumlichen Gedächtnisses [12]. TNF- α wird bekanntermaßen sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen exprimiert und nimmt nach SHT quantitativ zu. Die Aktivierung des TNF- α -Rezeptors führt zu einer Aktivierung von NF- κ B, welches wahrscheinlich eine antiapoptotische Rolle spielt. *TNF- α Rezeptor* Knockout-Mäuse (*TNF- α -R KO*) zeigten ein schlechteres Resultat als Wildtyp-Mäuse nach SHT. Dies deutet darauf hin, dass endogenes TNF- α nach SHT neuroprotektiv wirkt [22, 127]. Wiederum deuten die Ergebnisse eines klinisch relevanten Rattenmodells darauf hin, dass die Gabe eines TNF- α -Antagonisten 15 min vor und 60 min nach einem SHT die Ergebnisse einer Serie standardisierter motorischer Aufgaben verbesserte. Die alleinige Gabe des TNF- α -Antagonisten nach dem SHT führte zu keiner Verbesserung der Ergebnisse. Dies bedeutet zusammenfassend, dass eine gesteigerte neuronale Expression von TNF- α nach SHT zur nachfolgenden neurologischen Fehlfunktion beiträgt [81]. Lotocki et al beobachteten, dass der TNF- α -Rezeptor 1 und seine Zwischensignale in sogenannte Lipid Rafts eingebaut wurden. Diese Neuverteilung von TNF- α -Rezeptor 1 in Lipid Rafts und Nonraft-Regionen der Plasmamembranen könnte die Diversität der Signalantworten im normalen Gehirn und nach SHT regulieren [98]. Die gliale Antwort bei einem Modell sekundären Zelltodes zeigte, dass alte Mäuse eine stärkere *TNF- α* -Antwort als junge Mäuse und diese wiederum eine stärkere *Interferon- γ* Antwort als ältere Mäuse aufwiesen [125]. Diese unterschiedliche Expression von Zytokinen und Chemokinen während des sekundären neuronalen Zelltodes nach SHT bei alten und jungen Mäusen könnte eine Erklärung für die größere Vulnerabilität Neugeborener im Vergleich zu reiferen Säugergehirnen nach SHT sein.

Bei den akuten Veränderungen nach SHT steht die Expression der sogenannten Immediately Early Genes (IEGs), der Hitzeschockproteine (HSPs) und der Zytokine im Vordergrund. Die Expression der IEGs *c-FOS*, *c-Jun* und *junB* waren im Kortex und Hippocampus bereits 5 min nach experimentellem SHT bei Ratten erhöht. Nach 2 Stunden war die Expression der *c-FOS* und *junB* mRNA wieder auf Ausgangsniveau zurückgegangen – die Expression der *c-Jun* mRNA blieb bis zu 6 Stunden erhöht. Die Expression der Zytokine *IL-1* und *TNF- α* wurde bereits 1 Stunde nach SHT induziert und blieben bis zu 6 Stunden nach SHT erhöht [118]. Bei der Untersuchung von humanen Gehirngewebeproben nach SHT konnte festgestellt werden, dass bei Patienten welche sich einer Operation in weniger als 24 Stunden nach Trauma unter-

zogen, eine starke Expression von sowohl proinflammatorischen Zytokinen *IL-1-β*, *IL-6* mRNA und *Interferon-γ* als auch der antientzündlichen Zytokine *IL-4* festgehalten werden. Bei Patienten, welche sich einer Operation nach 3 bis 5 Tagen unterzogen, war die *IL-4* Expression im Vergleich zu den früher operierten Patienten signifikant geringer [59]. Eine schnelle Induktion von Hsp70 ist eine zentrale Komponente der Stressantwort und konnte nach Gehirnschädigungen verschiedenster Ursache wie Hyperthermie, Ischämie, Epilepsien und SHT beobachtet werden. Bei 61 Liquorproben von 20 Neugeborenen und Kindern konnte ein Anstieg der Hsp70-Konzentration festgestellt werden [92]. Bei einem SHT-Rattenmodell zeigte die Hsp-70 Immunofluoreszenz einen stetigen Anstieg innerhalb von 4 bis 48 Stunden nach SHT, welcher nach 48 Stunden in einer allgegenwärtigen Expression gipfelte [34]. In einem Knalltrauma-Modell wurden v-myc und beta-App während der ersten 3 Wochen nach einem 200-dB-Knall untersucht. Bereits 2 Stunden danach war die v-myc Immunoreaktivität im zerebralen Kortex, Thalamus und Hippocampus erhöht und erreichte einen maximalen Wert nach 18 Stunden in Neuronen und Astrozyten. Eine abnormale Ablagerung von beta-App war nach 6 Stunden sichtbar und die Immunoreaktivität erreichte ihren maximalen Wert ebenfalls nach 18 Stunden. Die beobachteten Effekte waren ähnlich den beim Menschen nach SHT und bei Morbus Alzheimer [124]. Bei P7-Ratten zeigte sich nach SHT eine Abnahme des *Bcl-2* im Zusammenhang mit einer Zunahme der *c-Jun* mRNA Werte [20]. Beim sich entwickelnden, adulten und/oder verletzten Nervensystem kommt es zu einem Anstieg der c-Jun. In diesem Zusammenhang deuten funktionelle Studien auf eine doppelte Rolle der c-Jun sowohl bei Vermittlung von Neurodegeneration und von Zelltod als auch bei Plastizitäts- und Reparaturmechanismen hin [119].

Hypoxie/Ischämie (HI) moduliert die G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinase-2- und die beta-Arrestin-1-Konzentrationen im Gehirn neonataler Ratten, d. h. HI führt sowohl zu einem Anstieg der beta-Arrestin-1 Proteinkonzentration als auch der *beta-Arrestin-1* mRNA Expression 6 und 12 Stunden nach SHT. Es ist davon auszugehen, dass dies zum HI-induzierten Gehirnschaden beiträgt [97]. Akute HI führt bei P7 (neonatalen) aber nicht bei P42 (adulten) Mäusen zur Wasserstoffperoxid-(H₂O₂)-Ansammlung. Trotz der Vergleichbarkeit der Schädigung sammelte sich nach 2, 12, 24 Stunden signifikant weniger H₂O₂ im P42 Gehirn im Vergleich zum P7 Gehirn an. Da unreife Neuronen empfindlicher auf toxische H₂O₂-Effekte reagieren als reife Neuronen, erklärt diese gesteigerte Ansammlung im unreifen Gehirn die verheerenden Auswirkungen selbst milderer HI-Schädigungen [89].

Änderungen der Insulin-like-growth-factor (IGF) Achse deuten auf autokrine/parakrine Wirkung von IGF-1 moduliert durch die Anwesenheit von stimulierenden versus hemmenden IGFBPs während der Wundheilung im Rattengehirn ein bis sieben Tage nach SHT hin [132]. IGF wirkt nach SHT antientzündlich und die Gabe von IGF-1 in Kombination mit Wachstumshormon verbessert nach mittelschweren- und schweren SHT das Resultat [53].

4.8 Schlussbemerkungen

Während akute Gehirnproteinveränderungen der Traumaseite in der Phase des raschen Gehirnwachstums sehr wahrscheinlich direkte Effekte des SHT auf den Zellmetabolismus repräsentieren, deuten die Unterschiede im Gehirnproteom kontralateral zur Traumaseite am ehesten auf sekundäre, möglicherweise irreversible morphologische Veränderungen (eine möglicherweise beginnende Verschiebung im normalen Entwicklungsprogramm) und/oder Reorganisationsereignisse hin. Im Vergleich zum erwachsenen Gehirn stört SHT ein vulnerables und sich entwickelndes System des unreifen Nagetieres erheblich, denn der zelluläre Phänotyp, die Proteinkonzentrationen, -zusammensetzungen und -interaktionen unterliegen entsprechend dem festgelegten Entwicklungsprogramm noch schnellen Änderungen.

Bisher war wenig über die Auswirkungen von SHT auf die dynamischen Prozesse des sich entwickelnden Gehirns bekannt und deshalb ist die Bestimmung dieser altersabhängigen Proteinveränderungen und ihrer Auswirkungen auf die Gehirnentwicklung von kritischer Bedeutung. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die vergleichende Analyse des Gehirnproteoms Einblicke in die Natur der Entwicklungsereignisse bietet, welche durch SHT gestört werden. Beeinträchtigungen neben der akuten erregungstoxischen und verzögerten apoptotischen Neurodegeneration, Entzündung und oxidativen Stress wurden deutlich. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass im sich entwickelnden Gehirn, SHT neuronale Migration und abnormalen axonalen Auswuchs bewirken kann. Angehende Studien werden funktionelle und morphologische Aspekte dieser Effekte aufdecken.

Zusammenfassung

Das Schädelhirntrauma (SHT) ist ein Hauptgrund für Morbidität und Mortalität bei Kindern und Erwachsenen. Im Jahr 2005 wurden allein in Deutschland über 300.000 Patienten mit Kopfverletzungen aus dem Krankenhaus entlassen, wobei die Gruppe der unter 15-Jährigen mit 30% überproportional vertreten ist. Im Vergleich zum erwachsenen Gehirn ist das sich entwickelnde kindliche Gehirn besonders anfällig für Störungen, da die diffizilen Schritte der strukturellen Hirnentwicklung beim Menschen bis hin zur Adoleszenz ablaufen und fehleranfällig sind. Nach bisherigen Ergebnissen führen SHT zu einer sofortigen primären Schädigung und zu einer sekundären, verzögerten Schädigung. Für die Therapie des SHT stehen pharmakologische, neurochirurgische sowie physio- und psychotherapeutische Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung.

Um Einblick in die molekularen Mechanismen zu erhalten, welche durch ein frühkindliches SHT beeinflusst werden, untersuchten wir mittels eines Tiermodelles die subakuten Proteinveränderungen 12 Stunden nach SHT.

Ein mechanisches Hirntrauma wurde mittels einer stereotaktischen Trauma-Apparatur bei sieben Tage alten (P7) Mäusen gesetzt, die Tiere 12 Stunden nach Trauma dekapitiert und die Proteine aus den entnommenen Gehirnhälften anhand standardisierter Protokolle extrahiert. Mithilfe der zweidimensionalen Großgelelektrophorese (2-DE) konnte eine Auflösung von bis zu 6000 Proteinspots erreicht werden. Anschließend wurden die 2-DE Gele visuell sowie computergestützt ausgewertet und reproduzierbare mengenmäßige Veränderungen mittels LC/ESI-MS und MS/MS analysiert. Dieses Verfahren wird als „Peptide Mass Fingerprinting“ (Peptidmassenfingerabdruck) bezeichnet. Die ermittelten Massenspektren konnten mithilfe entsprechender Datenbanken 18 kartierten Proteinen zugeordnet und deren Funktion ermittelt werden. Zusätzlich wurde in der Internet-basierten Applikation Ingenuity Pathway Analysis ein Netzwerk generiert, das darstellt, welche weiteren Proteine mit den identifizierten Proteinen verbunden sind. Es wurden sieben Tage alte (P7) Mausgehirne untersucht, die Analysen beschränkten sich auf die ipsilateral zum Kontussionsherd befindliche Hirnhälfte. Der Vergleich der Gehirnproteome der Trauma- und Kontrolltiere zeigte als Antwort auf ein SHT reproduzierbare Veränderungen der Intensität von 18 Proteinen. Die quantitativen Veränderungen des redoxregulierenden Proteins Peroxiredoxin 6 (Prdx6), des Dj-1 Proteins (Dj1), des stressinduzierten Phosphoproteins 1 (Sti1), des Hitzeschockproteins 84 (Hsp84) und der Metallopeptidase zytosolische nichtspezifische Dipeptidase 2

(Cndp2) deuten darauf hin, dass SHT zu Apoptose, Inflammation und oxidativem Stress führt. Des Weiteren dysreguliert ein SHT Proteine der neuronalen Migration als auch der axonalen und dendritischen Aussprossung, wie Ras-verwandtes nukleäres Protein (Ran), Collapsin Response Mediator Protein 2 (Crmp2) und seine Isoformen sowie Armadillo Repeat Containing 6 Protein (Armc6). Die Konzentrationen der Proteine, die an der Aufrechterhaltung von Zellfunktion und Zellwachstum beteiligt sind, i.e. Proteasom-Untereinheit Alpha Typ 1 (Psmc2), Proteasom 26S-ATPase Untereinheit (Psmc6), Chaperonin Untereinheit 6a (Cct6A), DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) Box Polypeptide 3 (Ddx3) und Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase (Gpd) waren 12 Stunden nach SHT erhöht. Die Konzentration von Apolipoprotein A-IV Precursor (ApoA4) Protein, welches ein Hauptbestandteil der High Density Lipoproteine (HDL) und der Chylomikronen ist, nahm zu. Die Menge der Diphosphomevalonat Decarboxylase (Mvd), welche eine Rolle bei der Cholesterinbiosynthese spielt, nahm ebenfalls zu. Neben der direkten Funktion der 12 Stunden nach SHT veränderten 18 Gehirnproteine zeigt sich bei der Analyse des Proteinnetzwerkes eine deutliche Interaktion mit anderen Proteinen, die bereits für frühe Veränderungen infolge eines SHT bekannt sind.

Die Ergebnisse stellen dar, wie ein SHT das sich entwickelnde Säugergehirn auf Proteinebene verändert, was weiterführende Studien zu den molekularen Pathomechanismen kindlicher SHT und deren Behandlung anregt.

Schriftenverzeichnis

1. Roche Lexikon Medizin. 5. Auflage Aufl. München/Jena: Urban & Fischer; 2003:2112
2. Abdolmaleky HM, Smith CL, Faraone SV, et al. Methylomics in psychiatry: Modulation of gene-environment interactions may be through DNA methylation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;127:51-9.
3. Adelson PD, Kochanek PM. Head injury in children. *J Child Neurol* 1998;13:2-15.
4. Agha A, Rogers B, Mylotte D, et al. Neuroendocrine dysfunction in the acute phase of traumatic brain injury. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:584-91.
5. Aibiki M, Maekawa S, Ogura S, Kinoshita Y, Kawai N, Yokono S. Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma* 1999;16:225-32.
6. Annegers JF, Coan SP. The risks of epilepsy after traumatic brain injury. *Seizure* 2000;9:453-7.
7. Annegers JF, Hauser WA, Coan SP, Rocca WA. A population-based study of seizures after traumatic brain injuries. *N Engl J Med* 1998;338:20-4.
8. Arimura N, Menager C, Fukata Y, Kaibuchi K. Role of CRMP-2 in neuronal polarity. *J Neurobiol* 2004;58:34-47.
9. Barlow KM, Minns RA. Annual incidence of shaken impact syndrome in young children. *Lancet* 2000;356:1571-2.
10. Barron KD. The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci* 1995;134 Suppl:57-68.
11. Bayir H, Kagan VE, Tyurina YY, et al. Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatr Res* 2002;51:571-8.
12. Bermpohl D, You Z, Lo EH, Kim HH, Whalen MJ. TNF alpha and Fas mediate tissue damage and functional outcome after traumatic brain injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:1806-18.
13. Berney J, Favier J, Froidevaux AC. Paediatric head trauma: influence of age and sex. I. Epidemiology. *Childs Nerv Syst* 1994;10:509-16.
14. Besson VC, Chen XR, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, exerts neuroprotective effects in traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 2005;388:7-12.
15. Bishop GM, Robinson SR. Quantitative analysis of cell death and ferritin expression in response to cortical iron: implications for hypoxia-ischemia and stroke. *Brain Res* 2001;907:175-87.

16. Bittigau P, Ikonomidou C. Glutamate in neurologic diseases. *J Child Neurol* 1997;12:471-85.
17. Bittigau P, Sifringer M, Felderhoff-Mueser U, Ikonomidou C. Apoptotic neurodegeneration in the context of traumatic injury to the developing brain. *Exp Toxicol Pathol* 2004;56:83-9.
18. Bittigau P, Sifringer M, Felderhoff-Mueser U, Hansen HH, Ikonomidou C. Neuro-pathological and biochemical features of traumatic injury in the developing brain. *Neurotox Res* 2003;5:475-90.
19. Bittigau P, Pohl D, Sifringer M, et al. Modeling pediatric head trauma: mechanisms of degeneration and potential strategies for neuroprotection. *Restor Neurol Neurosci* 1998;13:11-23.
20. Bittigau P, Sifringer M, Pohl D, et al. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol* 1999;45:724-35.
21. Boya J, Carbonell AL, Calvo JL, Borregon A. Microglial cells in the central nervous system of the rabbit and rat: cytochemical identification using two different lectins. *Acta Anat (Basel)* 1991;140:250-3.
22. Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, et al. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 1996;2:788-94.
23. Bruns J, Jr., Hauser WA. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia* 2003;44 Suppl 10:2-10.
24. Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen im Krankenhaus (einschl. Sterbe- und Stundenfälle). Fachserie 12, Reihe 621. City: Bundesamt S; 2007. (Accessed 2007, at <http://www-ec.destatis.de>.)
25. Cantor CR, P.R. S. Techniques for the study of biological structure and function. In: *Biophysical Chemistry, Part II*. San Francisco: W.H. Freeman and Company; 1980.
26. Carmichael ST. Gene expression changes after focal stroke, traumatic brain and spinal cord injuries. *Curr Opin Neurol* 2003;16:699-704.
27. Carter CJ. Convergence of genes implicated in Alzheimer's disease on the cerebral cholesterol shuttle: APP, cholesterol, lipoproteins, and atherosclerosis. *Neurochem Int* 2007;50:12-38.
28. Casanueva FF, Ghigo E, Polak M, Savage MO. The importance of investigation of pituitary function in children and adolescents following traumatic brain injury. *J Endocrinol Invest* 2006;29:764-6.
29. Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 1991;32:778-82.

30. Choi J, Forster MJ, McDonald SR, Weintraub ST, Carroll CA, Gracy RW. Proteomic identification of specific oxidized proteins in ApoE-knockout mice: relevance to Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1155-62.
31. Das KC. Thioredoxin system in premature and newborn biology. *Antioxid Redox Signal* 2004;6:177-84.
32. Daugherty WP, Levasseur JE, Sun D, Spiess BD, Bullock MR. Perfluorocarbon emulsion improves cerebral oxygenation and mitochondrial function after fluid percussion brain injury in rats. *Neurosurgery* 2004;54:1223-30; discussion 30.
33. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005;8:752-8.
34. DeGracia DJ, Kreipke CW, Kayali FM, Rafols JA. Brain endothelial HSP-70 stress response coincides with endothelial and pericyte death after brain trauma. *Neurol Res* 2007;29:356-61.
35. Dobbing J. The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics* 1974;53:2-6.
36. Dumas HM, Haley SM, Carey TM, Ni PS. The relationship between functional mobility and the intensity of physical therapy intervention in children with traumatic brain injury. *Pediatr Phys Ther* 2004;16:157-64.
37. Edwards P, Arango M, Balica L, et al. Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months. *Lancet* 2005;365:1957-9.
38. Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, et al. Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metab Brain Dis* 2004;19:195-206.
39. Eiben CF, Anderson TP, Lockman L, et al. Functional outcome of closed head injury in children and young adults. *Arch Phys Med Rehabil* 1984;65:168-70.
40. Eid T, Brines M. Recombinant human erythropoietin for neuroprotection: what is the evidence? *Clin Breast Cancer* 2002;3 Suppl 3:S109-15.
41. Einaudi S, Bondone C. The effects of head trauma on hypothalamic-pituitary function in children and adolescents. *Curr Opin Pediatr* 2007;19:465-70.
42. Esiri MM, al Izzi MS, Reading MC. Macrophages, microglial cells, and HLA-DR antigens in fetal and infant brain. *J Clin Pathol* 1991;44:102-6.
43. Felderhoff-Mueser U, Ikonomidou C. Mechanisms of neurodegeneration after paediatric brain injury. *Curr Opin Neurol* 2000;13:141-5.
44. Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Pesditschek S, et al. Pathways Leading to Apoptotic Neurodegeneration Following Trauma to the Developing Rat Brain. *Neurobiology of Disease* 2002;11:231-45.
45. Fetler L, Amigorena S. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science* 2005;309:392-3.

46. Gao WM, Chadha MS, Berger RP, et al. A gel-based proteomic comparison of human cerebrospinal fluid between inflicted and non-inflicted pediatric traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007;24:43-53.
47. Goldstein FC, Levin HS. Epidemiology of pediatric closed head injury: incidence, clinical characteristics, and risk factors. *J Learn Disabil* 1987;20:518-25.
48. Goldstein M. Traumatic brain injury: a silent epidemic. *Ann Neurol* 1990;27:327.
49. Greenwald BD, Burnett DM, Miller MA. Congenital and acquired brain injury. 1. Brain injury: epidemiology and pathophysiology. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84:S3-7.
50. Guillemin GJ, Brew BJ. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 2004;75:388-97.
51. Hagberg H, Jacobsson B. Brain injury in preterm infants--what can the obstetrician do? *Early Hum Dev* 2005;81:231-5.
52. Hames BD, Rickwood D. Gel Electrophoresis of proteins. In: *The Practical Approach Series*. second edition ed. New York: Oxford University Press; 1990.
53. Hatton J, Kryscio R, Ryan M, Ott L, Young B. Systemic metabolic effects of combined insulin-like growth factor-I and growth hormone therapy in patients who have sustained acute traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2006;105:843-52.
54. Herschkowitz N. Brain development in the fetus, neonate and infant. *Biol Neonate* 1988;54:1-19.
55. Herskovits EH, Megalooikonomou V, Davatzikos C, Chen A, Bryan RN, Gerring JP. Is the spatial distribution of brain lesions associated with closed-head injury predictive of subsequent development of attention-deficit/hyperactivity disorder? Analysis with brain-image database. *Radiology* 1999;213:389-94.
56. Heukeshoven J, Dernick R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 1988;9:28-32.
57. Heukeshoven J, Dernick R. Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis* 1988;9:60-1.
58. Hickey RW, Kochanek PM, Ferimer H, Alexander HL, Garman RH, Graham SH. Induced hyperthermia exacerbates neurologic neuronal histologic damage after asphyxial cardiac arrest in rats. *Crit Care Med* 2003;31:531-5.
59. Holmin S, Hojeberg B. In situ detection of intracerebral cytokine expression after human brain contusion. *Neurosci Lett* 2004;369:108-14.
60. Ikonomidou C, Turski L. Excitotoxicity and neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol* 1995;8:487-97.
61. Ikonomidou C, Turski L. Prevention of trauma-induced neurodegeneration in infant and adult rat brain: glutamate antagonists. *Metab Brain Dis* 1996;11:125-41.

62. Ikonomidou C, Qin Y, Labruyere J, Kirby C, Olney JW. Prevention of trauma-induced neurodegeneration in infant rat brain. *Pediatr Res* 1996;39:1020-7.
63. Inagaki N, Chihara K, Arimura N, et al. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 2001;4:781-2.
64. IPA IPA. In: Ingenuity® Systems; 2008.
65. Ishimaru MJ, Ikonomidou C, Tenkova TI, et al. Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 1999;408:461-76.
66. Ivacko JA, Sun R, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic brain injury induces an acute microglial reaction in perinatal rats. *Pediatr Res* 1996;39:39-47.
67. Jacobs S, Hunt R, Tarnow-Mordi W, Inder T, Davis P. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD003311.
68. Jeffery CJ. Multifunctional proteins: examples of gene sharing. *Ann Med* 2003;35:28-35.
69. Jeffery CJ. Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet* 2003;19:415-7.
70. Jenkins LW, Peters GW, Dixon CE, et al. Conventional and functional proteomics using large format two-dimensional gel electrophoresis 24 hours after controlled cortical impact in postnatal day 17 rats. *J Neurotrauma* 2002;19:715-40.
71. Jungblut PR, Seifert R. Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alterations in cytosolic protein pattern of HL-60 leukemic cells. *J Biochem Biophys Methods* 1990;21:47-58.
72. Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 1999;68:459-86.
73. Kaindl AM, Zabel C, Stefovskaja V, et al. Subacute proteome changes following traumatic injury of the developing brain: Implications for a dysregulation of neuronal migration and neurite arborization. *Proteomics Clinical Applications* 2007;1:640-9.
74. Kaindl AM, Koppelstaetter A, Nebrich G, et al. Brief alteration of NMDA or GABAA receptor mediated neurotransmission has long-term effects on the developing cerebral cortex. *Mol Cell Proteomics* 2008.
75. Kaindl AM, Sifringer M, Zabel C, et al. Acute and long-term proteome changes induced by oxidative stress in the developing brain. *Cell Death Differ* 2005.
76. Kaindl AM, Sifringer M, Zabel C, et al. Acute and long-term proteome changes induced by oxidative stress in the developing brain. *Cell Death Differ* 2006;13:1097-109.
77. Kaindl AM, Koppelstaetter A, Nebrich G, et al. Brief alteration of NMDA or GABAA receptor mediated neurotransmission has long-term effects on the developing cerebral cortex. In: *Mol Cell Proteomics*; 2008.

78. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975;26:231-43.
79. Klose J. Large-gel 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol* 1999;112:147-72.
80. Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 1995;16:1034-59.
81. Knobloch SM, Fan L, Faden AI. Early neuronal expression of tumor necrosis factor-alpha after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J Neuroimmunol* 1999;95:115-25.
82. Kochanek AR, Kline AE, Gao WM, et al. Gel-based hippocampal proteomic analysis 2 weeks following traumatic brain injury to immature rats using controlled cortical impact. *Dev Neurosci* 2006;28:410-9.
83. Kochanek PM, Clark RS, Ruppel RA, et al. Biochemical, cellular, and molecular mechanisms in the evolution of secondary damage after severe traumatic brain injury in infants and children: Lessons learned from the bedside. *Pediatr Crit Care Med* 2000;1:4-19.
84. Koletzko B, von Harnack G. *Kinderheilkunde*. 11. Auflage Aufl. Berlin: Springer; 2000:653
85. Koskiniemi M, Kyykka T, Nybo T, Jarho L. Long-term outcome after severe brain injury in preschoolers is worse than expected. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1995;149:249-54.
86. Krapfenbauer K, Engidawork E, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G. Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Res* 2003;967:152-60.
87. Kwon TH, Sun D, Daugherty WP, Spiess BD, Bullock MR. Effect of perfluorocarbons on brain oxygenation and ischemic damage in an acute subdural hematoma model in rats. *J Neurosurg* 2005;103:724-30.
88. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
89. Lafemina MJ, Sheldon RA, Ferriero DM. Acute hypoxia-ischemia results in hydrogen peroxide accumulation in neonatal but not adult mouse brain. *Pediatr Res* 2006;59:680-3.
90. Lagercrantz H, Ringstedt T. Organization of the neuronal circuits in the central nervous system during development. *Acta Paediatr* 2001;90:707-15.
91. Lai MC, Lee YH, Tarn WY. The DEAD-box RNA Helicase DDX3 Associates with Export mRNPs as well as TAP and Participates in Translational Control. *Mol Biol Cell* 2008.

92. Lai Y, Kochanek PM, Adelson PD, Janesko K, Ruppel RA, Clark RS. Induction of the stress response after inflicted and non-inflicted traumatic brain injury in infants and children. *J Neurotrauma* 2004;21:229-37.
93. Lambert JF, Benoit BO, Colvin GA, Carlson J, Delville Y, Quesenberry PJ. Quick sex determination of mouse fetuses. *J Neurosci Methods* 2000;95:127-32.
94. Laskey AL, Holsti M, Runyan DK, Socolar RR. Occult head trauma in young suspected victims of physical abuse. *J Pediatr* 2004;144:719-22.
95. Lentze MJ, Schaub J, Schulte FJ, Spranger J. Pädiatrie. 2. Auflage Aufl. Berlin/Heidelberg: Springer; 2002:1446-54
96. Levin HS, Benavidez DA, Verger-Maestre K, et al. Reduction of corpus callosum growth after severe traumatic brain injury in children. *Neurology* 2000;54:647-53.
97. Lombardi MS, van den Tweel E, Kavelaars A, Groenendaal F, van Bel F, Heijnen CJ. Hypoxia/ischemia modulates G protein-coupled receptor kinase 2 and beta-arrestin-1 levels in the neonatal rat brain. *Stroke* 2004;35:981-6.
98. Lotocki G, Alonso OF, Dietrich WD, Keane RW. Tumor necrosis factor receptor 1 and its signaling intermediates are recruited to lipid rafts in the traumatized brain. *J Neurosci* 2004;24:11010-6.
99. Malorni W, Iosi F, Mirabelli F, Bellomo G. Cytoskeleton as a target in menadione-induced oxidative stress in cultured mammalian cells: alterations underlying surface bleb formation. *Chem Biol Interact* 1991;80:217-36.
100. Massagli TL, Fann JR, Burington BE, Jaffe KM, Katon WJ, Thompson RS. Psychiatric illness after mild traumatic brain injury in children. *Arch Phys Med Rehabil* 2004;85:1428-34.
101. McClean J, Nunez JL. 17alpha-Estradiol is neuroprotective in male and female rats in a model of early brain injury. *Exp Neurol* 2008;210:41-50.
102. McKinlay A, Dalrymple-Alford JC, Horwood LJ, Fergusson DM. Long term psychosocial outcomes after mild head injury in early childhood. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:281-8.
103. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 2002;8:101-5.
104. Nicols NR, Dokas L, Ting SM, et al. Hippocampal responses to corticosterone and stress, one of which is the 35,000 M(r) protein, glycerol phosphate dehydrogenase. *J Neuroendocrinol* 1996;8:867-76.
105. Niederland T, Makovi H, Gal V, Andreka B, Abraham CS, Kovacs J. Abnormalities of pituitary function after traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 2007;24:119-27.
106. Norton WT. Cell reactions following acute brain injury: a review. *Neurochem Res* 1999;24:213-8.

107. Opii WO, Nukala VN, Sultana R, et al. Proteomic identification of oxidized mitochondrial proteins following experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007;24:772-89.
108. Otomo T, Otomo C, Tomchick DR, Machius M, Rosen MK. Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1. *Mol Cell* 2005;18:273-81.
109. Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 2004;279:18614-22.
110. Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Tsolaki M, et al. A cluster of cholesterol-related genes confers susceptibility for Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 2005;66:940-7.
111. Patrick PD, Blackman JA, Mabry JL, Buck ML, Gurka MJ, Conaway MR. Dopamine agonist therapy in low-response children following traumatic brain injury. *J Child Neurol* 2006;21:879-85.
112. Penkowa M, Carrasco J, Giralt M, Moos T, Hidalgo J. CNS wound healing is severely depressed in metallothionein I- and II-deficient mice. *J Neurosci* 1999;19:2535-45.
113. Perez-Arjona E, Dujovny M, Vinas F, et al. CNS child abuse: epidemiology and prevention. *Neurol Res* 2002;24:29-40.
114. Plaisant F, Clippe A, Vander Stricht D, Knoop B, Gressens P. Recombinant peroxiredoxin 5 protects against excitotoxic brain lesions in newborn mice. *Free Radic Biol Med* 2003;34:862-72.
115. Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, et al. N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2508-13.
116. Potts MB, Koh SE, Whetstone WD, et al. Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. *NeuroRx* 2006;3:143-53.
117. Quinn CC, Gray GE, Hockfield S. A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth. *J Neurobiol* 1999;41:158-64.
118. Raghupathi R, McIntosh TK, Smith DH. Cellular responses to experimental brain injury. *Brain Pathol* 1995;5:437-42.
119. Raivich G, Behrens A. Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Prog Neurobiol* 2006;78:347-63.
120. Regan RF, Panter SS. Hemoglobin potentiates excitotoxic injury in cortical cell culture. *J Neurotrauma* 1996;13:223-31.
121. Rezaie P, Cairns NJ, Male DK. Expression of adhesion molecules on human fetal cerebral vessels: relationship to microglial colonisation during development. *Brain Res Dev Brain Res* 1997;104:175-89.

122. Rickels E. Das Schädel-Hirn-Trauma. *Intensivmedizin* 2003;40:658-71.
123. Rivara FP. Epidemiology and prevention of pediatric traumatic brain injury. *Pediatr Ann* 1994;23:12-7.
124. Saljo A, Bao F, Shi J, Hamberger A, Hansson HA, Haglid KG. Expression of c-Fos and c-Myc and deposition of beta-APP in neurons in the adult rat brain as a result of exposure to short-lasting impulse noise. *J Neurotrauma* 2002;19:379-85.
125. Sandhir R, Puri V, Klein RM, Berman NE. Differential expression of cytokines and chemokines during secondary neuron death following brain injury in old and young mice. *Neurosci Lett* 2004;369:28-32.
126. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850-8.
127. Sullivan PG, Bruce-Keller AJ, Rabchevsky AG, et al. Exacerbation of damage and altered NF-kappaB activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury. *J Neurosci* 1999;19:6248-56.
128. Suzuki Y, Nakagomi S, Namikawa K, et al. Collapsin response mediator protein-2 accelerates axon regeneration of nerve-injured motor neurons of rat. *J Neurochem* 2003;86:1042-50.
129. Swann JW, Hablitz JJ. Cellular abnormalities and synaptic plasticity in seizure disorders of the immature nervous system. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2000;6:258-67.
130. Togashi H, Schmidt EF, Strittmatter SM. RanBPM contributes to Semaphorin3A signaling through plexin-A receptors. *J Neurosci* 2006;26:4961-9.
131. Tompa P, Szasz C, Buday L. Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem Sci* 2005;30:484-9.
132. Walter HJ, Berry M, Hill DJ, Logan A. Spatial and temporal changes in the insulin-like growth factor (IGF) axis indicate autocrine/paracrine actions of IGF-I within wounds of the rat brain. *Endocrinology* 1997;138:3024-34.
133. Wang Y, Muneton S, Sjovall J, Jovanovic JN, Griffiths WJ. The effect of 24S-hydroxycholesterol on cholesterol homeostasis in neurons: quantitative changes to the cortical neuron proteome. *J Proteome Res* 2008;7:1606-14.
134. Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1969;244:4406-12.
135. Yao X, Liu J, McCabe JT. Alterations of cerebral cortex and hippocampal proteasome subunit expression and function in a traumatic brain injury rat model. *J Neurochem* 2007.
136. Zabel C, Sagi D, Kaindl AM, et al. Comparative proteomics in neurodegenerative and non-neurodegenerative diseases suggest nodal point proteins in regulatory networking. *J Proteome Res* 2006;5:1948-58.

137. Zeindl-Eberhart E, Grohe G, Klose J. Analysis of protein patterns from different organs and cell fractions of trisomy 19 mice. *Hum Genet* 1987;77:371-8.

Publikationsliste

Publikationen:

Kaindl AM, Zabel C, Stefovskaja V, **Lehnert R**, Siffringer M, Klose J, Ikonomidou C. Subacute proteome changes following traumatic injury of the developing brain: Implications for a dysregulation of neuronal migration and neurite arborisation. *Proteomics Clin Appl.* 2007;1(7):640-649

Lehnert R, Mueller M, Liekfeld A. Zyklotorsion und Asphärizität im Liegen. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 2007 Aug;224(8):664-669.

Publizierte Abstracts:

Ron Lehnert, Claus Zabel, Vanya Stefovskaja, Marco Siffringer, Joachim Klose, Chrysanthi Ikonomidou, Angela M. Kaindl, 18th European Students Conference, Oct. 7 – 11, 2007, Berlin, Subacute proteome changes following traumatic injury of the developing brain: Implications for a dysregulation of neuronal migration and neurite arborisation

Ron Lehnert, Claus Zabel, Vanya Stefovskaja, Marco Siffringer, Joachim Klose, Chrysanthi Ikonomidou, Angela M. Kaindl, 37th annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 3 - 7, 2007, San Diego, USA, Subacute proteome changes following traumatic injury of the developing brain: Implications for a dysregulation of neuronal migration and neurite arborisation

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Danksagung

Ganz herzlich bedanken, möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Chrysanthy Ikonomidou für die Überlassung des Themas sowie dem Referat Forschung der Charité - Universitätsmedizin Berlin für das Stipendium der studentischen Forschungsförderung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Angela Kaindl für die vielfältige Unterstützung, die hervorragende Betreuung der Arbeit und die Ermutigung diesen Weg zu gehen.

Für die fachliche und praktische Unterstützung danke ich der AG Ikonomidou, insbesondere Marco Sifringer und Vanya Stefovskaja, der AG Klose insbesondere Yvonne Kläre, Janine Stuwe und Claus Zabel für die Unterstützung beim Erlernen der Methoden sowie Madeleine Diedrich für das Korrekturlesen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Markus Schülke und seiner AG für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten insbesondere Frau Angelika Zwirner für die labortechnische Unterstützung.

Für die unermüdliche Unterstützung und Geduld danke ich meinen Eltern und meiner Freundin.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Ron Lehnert, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Subakute Proteomveränderungen des sich entwickelnden Gehirns nach Schädelhirntrauma“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“