

## IV. Ergebnisse

### A. *Beschreibung der grundlegenden Analysen der Genexpression*

Die Auswertung der Daten, der Mikroarray-Analysen verliefen jeweils ähnlich. Um im Weiteren nicht jeweils die verwendete Vorgehensweise erneut zu erklären, werden diese Schritte hier grundsätzlich beschrieben. Zu beachten ist dabei, dass in den Messungen zur Ischämie den verschiedenen Zeitpunkten und Geweben stets nur eine Messung der gepoolten Einzelproben unterliegen, wohingegen die Messungen zur Alzheimer Erkrankung jeweils auf einer Gruppengröße von  $n = 6$  beruhen.

#### 1.1. Normalisierung und Gruppenanalyse

Um die verschiedenen Mikroarraychips einer Gruppe miteinander vergleichen zu können, wurden die Daten vorab normalisiert. Dazu wurden die einzelnen Messwerte an den Median der gesamten Werte eines Mikroarraychips angepasst, welches eine Varianz der Mikroarraychips verringert.

Zur Identifizierung von Extremwerten innerhalb der Proben wurde eine Gruppenanalyse durchgeführt. Dies ermöglicht zum Einen eine Qualitätsanalyse des Versuches durch zueinander Gruppierung der Analysegruppen (z. B. Erkrankung, Kontrolle, ipsilateral, kontralateral) und Experimentgruppen (z. B. Striatum, Cortex, Frontal, Temporal). Zum Anderen können Extremwerte identifiziert werden, welche sich nicht zu den Analyse- bzw. Experimentgruppen zuordnen lassen.

#### 1.2. Ermittlung der am stärksten regulierten Gene

Da die Auswertung von Mikroarrays, aufgrund der hohen vorhandenen Datenmenge, eine Reduzierung der Daten erfordert, bedient man sich der ermittelten differentiellen Expressionswerte (F) und der berechneten Signifikanz (P) und bestimmt jene Gene welche die höchste differentielle Expression zeigen und gleichzeitig einer gewissen Signifikanz erfüllen. Somit werden nur Gene mit einbezogen, welche in den gesamten analysierten Gruppen ähnliche Veränderungen zeigten.

Um für Vergleiche verschiedener Experimente oder Modelle gleich große Gruppen zu erhalten, wurden jeweils die hundert am stärksten exprimierten Gene ausgewählt.

### **1.3. Analyse der Beteiligung verschiedener Prozesse**

Um Veränderungen der in der Neurodegeneration beteiligten Prozesse zu identifizieren, wurden jene Prozesse, welche in der Einleitung bereits als Haupt-Prozesse eingeführt wurden, genauer betrachtet.

Dazu wurde die Anzahl an Genen der einzelnen Hauptprozesse durch Division der Anzahl auf einem Mikroarraychip vorhandenen Gene standardisiert und als prozentuale Veränderung angegeben. Diese Veränderungen wurden dann zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen verglichen.

## **B. Genexpressionsanalyse der MCAO - Ischämie**

### **B. 1. Versuchsablauf**

Zur Untersuchung einer Neurodegeneration mit dem Verlauf einer akuten Neuroinflammation wurde das Tiermodell der MCAO gewählt, in welchem Mäuse eine Ischämie einer Hirnhälfte erleiden, wodurch es zu einer Sauerstoffunterversorgung und nachfolgender Neurodegeneration kommt. Da die Ischämie stets nur auf einer Seite induziert wurde, war es möglich, die veränderte Genexpression durch Vergleich der geschädigten und ungeschädigten Seite zu ermitteln. Das Ziel war es dann, einzelne Prozesse zu unterscheiden, welche die Neurodegeneration mit einer akuten Neuroinflammation beschreiben.

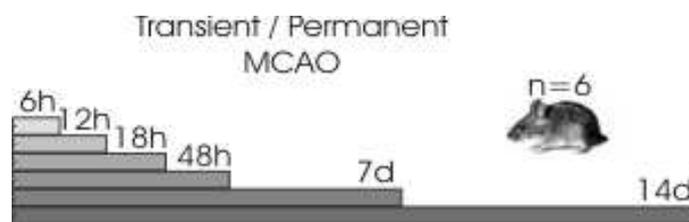
Da basierend auf Veröffentlichungen anzunehmen war, dass es nach einer gewissen Zeit auch zu Prozessen einer chronischen Neuroinflammation kommt, sollte auch diese Hypothese überprüft werden. Dazu wurden in dieser Arbeit die Genexpressions-Veränderungen zu sechs Zeitpunkten analysiert, angefangen von sechs Stunden bis hin zu vierzehn Tagen. Durch einen Vergleich der regulierten Prozesse zu frühen und späteren Zeitpunkten sollte dann eine Unterscheidung zwischen akuten und chronischen Prozessen erfolgen.

Um die Auswirkungen der Hypoxie auf die Genexpression im Hirngewebe zu analysieren, wurde bei Mäusen ein Verschluss der A. cerebri media durchgeführt. Dabei kommt es zur Unterbrechung der Blutzufuhr zu einer Hemisphäre (ipsilateral), wodurch diese hypoxischen Schaden erfährt. Die zweite Hemisphäre (kontralateral) bleibt dabei im wesentlichen ungeschädigt.

Zusätzlich sollten die Unterschiede zwischen permanenter Hypoxie und transienter Hypoxie mit folgender Reperfusion untersucht werden. Dazu wurde der Arterienverschluss im transienten Fall nach zwei Stunden wieder geöffnet, im permanenten Fall aber über den gesamten Versuchszeitraum von bis zu 14 Tagen aufrecht erhalten. An sechs festgelegten Zeitpunkten nach der MCAO wurden die Tiere getötet und das Gehirn entnommen. Um den Verlauf kurz nach der Ischämie, aber auch deren spätere Auswirkungen untersuchen zu können, wurden drei „frühe Zeitpunkte“ (6h, 12h, 18h) und drei „späte Zeitpunkte“ (2, 7, 14 Tage) nach Setzen der Okklusion ausgewählt. Die entnommenen Gehirne wurden in Cortex und Striatum aufgeteilt und aus beiden Hirnarealen wurden RNA und Protein extrahiert.

Die Aufteilung in Cortex und Striatum erfolgte, weil auf Grund der Blutversorgung die stärksten Effekte im Striatum zu erwarten sind. Das Signal im Cortex wird geringer ausgeprägt sein und könnte bei gemeinsamer Aufarbeitung zu einer Reduktion des Gesamtsignals führen. Dabei wurde jeweils ipsi- und kontralaterale Seite verglichen.

Für den Fall, dass der Vergleich der Ipsi- und kontralateralen Seite nicht ausreicht, um die Effekte der Hypoxie zu messen, wurden weitere Kontrolltiere mitgeführt, bei denen die operativen Eingriffe jedoch ohne Okklusion durchgeführt wurden. Diese „schein-operierten“-Tiere (S-OP) wurden für beide Modelle für den Zeitpunkt 6h mitoperiert und gemeinsam mit den anderen Daten analysiert.



**Abbildung 5: Schematischer Ablauf der geplanten Experimente.** Zur Untersuchung der Ischämie wurden je sechs Tiere zu sechs festgelegten Zeitpunkten nach der Okklusion getötet und Proben für die Analysen entnommen.

Dieser Versuchsplan führt zu folgender Anzahl an Proben:

- zwei Modelle (transient/ permanent) 2x
- je sechs verschiedene Zeitpunkte 6x
- je sechs Einzeltiere 6x
- für jedes Tier zwei Hirnhälften (ipsi-/ kontralateral) 2x
- von jeder Hirnhälfte jeweils das Striatum und der Cortex 2x

Daraus resultieren 288 Proben. Da aus technischen Gründen die Mikroarrayanalyse aller Proben nicht möglich war, wurden die Proben der Einzeltiere vereint („gepoolt“), wodurch nur noch 48 Proben analysiert werden mussten. Dazu wurden jeweils gleiche RNA-Mengen der Proben der sechs Einzeltiere eines Zeitpunktes vereint und gemeinsam analysiert. Die Einzeltierproben wurden aufgehoben zur späteren Evaluierung der „Pool-Daten“.

### 1.1. Überblick über die durchgeführten Untersuchungen

Zunächst wurden die Mikroarraydaten daraufhin untersucht, ob der Versuchsablauf korrekt war. Dazu wurden die Daten mittels einer Gruppenanalyse untersucht und ermittelt, ob sich die erwarteten Gruppen herausbilden (s. IV.B.2.1).

Anschließend wurde durch Bestimmung der signifikant regulierten Gene ein Überblick über die verschiedenen Modelle, die gewählten Gewebe und den zeitlichen Ablauf erstellt. Dazu wurden die Gene identifiziert, die zwischen ipsi- und kontralateraler Seite eine um den Faktor  $>2,5$  unterschiedliche Expression zeigten (s. IV.B.2.2).

Um Gene zu identifizieren, welche in beiden Modellen unterschiedlich exprimiert sind, wurden für jeden Zeitpunkt die 100 am stärksten unterschiedlich exprimierten Gene bestimmt und die Überschneidung beider Modelle ermittelt. (s. IV.B.2.3).

Weiterhin sollte analysiert werden, ob es einen Unterschied zwischen den frühen und späten Veränderungen nach der Okklusion gibt. Dazu sollten die identifizierten Genen der frühe Gruppe (6h-18h) mit den Genen der späten Gruppe (2 -14 Tage) verglichen werden. Da in der Gruppenanalyse (s. IV.B.2.1) ersichtlich wurde, dass der Zeitpunkt *zwei Tage* oftmals nicht zu den sieben und vierzehn Tage-Zeitpunkten gruppiert wurde, beschlossen wir, diese Analyse auf den Vergleich früher Zeitpunkte (6h- 18h) gegen mittlere Zeitpunkte (2 Tage) und späte Zeitpunkte (7-14 Tage) zu verändern.

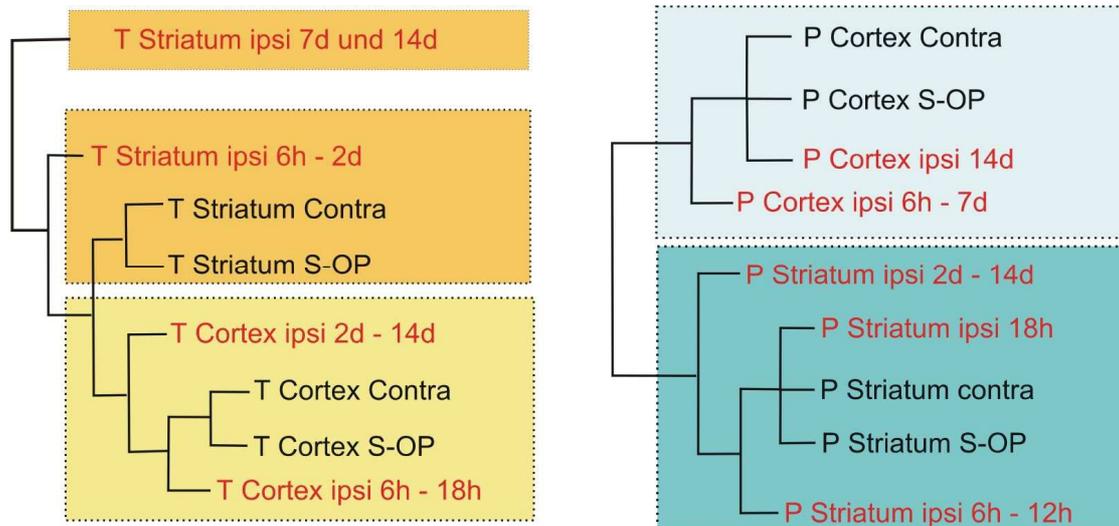
## B. 2. Genexpressionsanalyse mittels Mikroarray technology

### 2.1. Analyse des Versuchsdesigns mittels Gruppenanalyse

Zur Untersuchung der verwendeten Ischämie Methode (MCAO) und Bestätigung des erfolgreichen Versuchsablaufes wurden die Proben in einer Gruppenanalyse verglichen (s Ergebnisse A). In unserem Experiment ist zu erwarten, dass es folgende Gruppen gibt:

1. Auftrennung der Proben in die beiden Modelle, transiente und permanente MCAO.
2. Innerhalb der Modelle sollten die Proben des Cortex und des Striatums jeweils eine Gruppe bilden.
3. In diesen Gruppen wiederum sollte eine Trennung der kontralateralen (nicht geschädigte Seite) und ipsilateralen Seite (geschädigte Seite) erkennbar sein.

4. Die Proben der schein-operierten Tiere sollten zu den kontralateralen Proben geordnet werden.



**Diagramm 1: Ergebnis der Gruppenanalyse der verschiedenen untersuchten Gruppen der Genexpressionsanalyse.** Der Vergleich der Proben miteinander ergab, dass sowohl eine Unterscheidung in die analysierten Modelle, als auch in die beiden untersuchten Gewebe möglich war. P: Permanente MCAO; T: Transiente MCAO; rot: ipsilaterale Proben; schwarz: kontralaterale Proben; S-OP: „schein-operierte“ Tiere

Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Diagramm 1 gezeigt. Man erkennt, dass es tatsächlich zu einer Trennung des transienten und des permanenten Versuchs kommt. Wie erwartet, lassen sich innerhalb der Modelle auch die Proben der Gewebe voneinander unterscheiden.

Weiterhin sind wie erwartet auch die ipsilaterale und kontralaterale Seite eines Gewebes – bis auf wenige Ausnahmen (P Cortex ipsi 14d und P Striatum ipsi 18d) – getrennt. Die Proben der schein-operierten Tiere sind auch, wie erwartet, eng zu den Proben der ungeschädigten Seite eingruppiert.

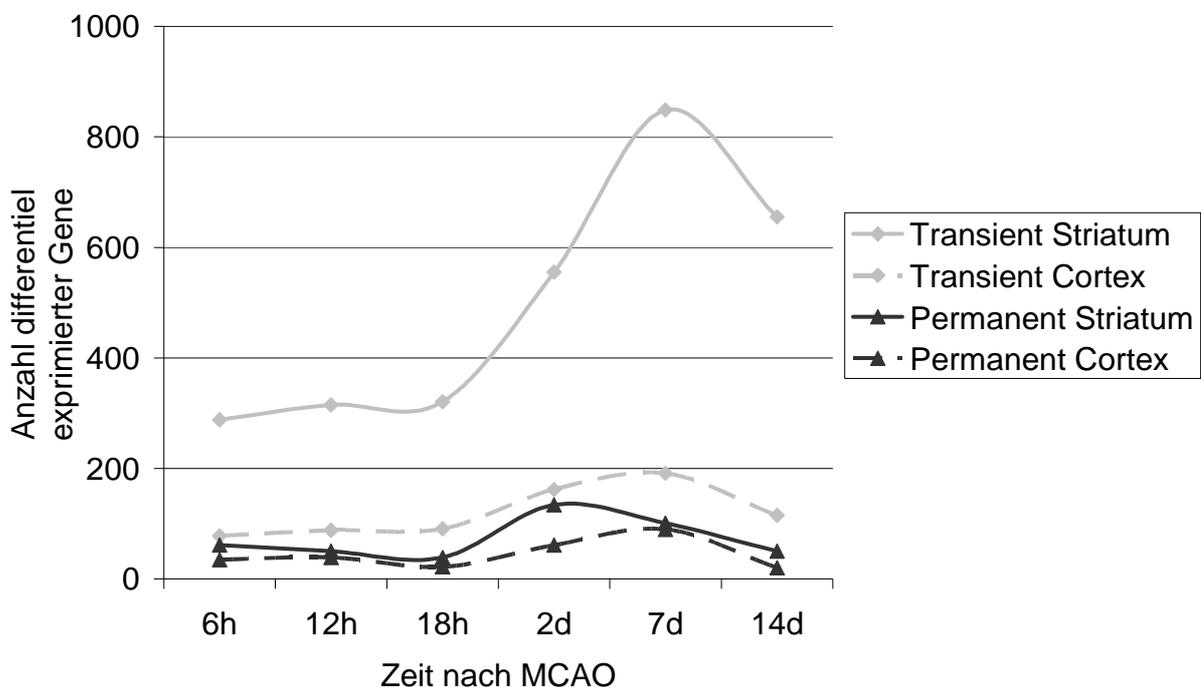
Auffällig ist, dass die Proben von Tag 7 und Tag 14 des Striatum der transienten Ischämie eine separate Gruppe bilden. Dies soll im Weiteren genauer betrachtet werden.

Die Aussagen, die aus dieser Analyse gezogen werden können, bestätigen die Erwartungen und belegen, dass die Versuche technisch richtig durchgeführt wurden. Es lässt sich auch die Aussage treffen, dass es in den Modellen der transienten und permanenten Okklusion zu unterschiedlichen Expressions-

Veränderungen kommt, da die Gene, die sich aus diesen Modellen ableiten lassen, zwei getrennte Gruppen bilden.

## 2.2. Analyse der Geneexpression einzelner Zeitpunkte

Um unterschiedlich regulierte Gene zu identifizieren, wurden jeweils die ipsi- und kontralaterale Probe eines Zeitpunktes miteinander verglichen. Dabei wurde festgelegt, dass ein Gen als differentiell reguliert gilt, wenn sich die Expression zwischen den beiden Seiten mindestens um den Faktor 2,5 unterscheidet. Dies führte für die zwei Modelle und jeweils 6 Zeitpunkte zu den in Diagramm 2 gezeigten Ergebnissen.



**Diagramm 2: Zeitlicher Verlauf der Anzahl an differentiell exprimierten Genen in den verschiedenen Modellen und Geweben.** Aufgetragen sind beidn Modelle aufgetrennt in jeweils Cortex und Straitum.

In beiden Modellen kommt es zu einer Zunahme der Anzahl an differentiell exprimierten Genen. Der Anstieg ist zunächst langsam. Je nach Gewebe und Modell ist der Höchstwert nach zwei bis sieben Tagen erreicht, wonach es wieder zu einem Rückgang kommt. Der Vergleich der Ischämie Modelle zeigt, dass die Anzahl der regulierten Gene im transienten Modell stets höher ist als im permanenten Modell, was sich besonders im Vergleich des Striatum zeigt.

Weiterhin erkennt man, dass es im Striatum generell zu einer stärkeren Antwort als im Cortex kommt, was dem im Vorwort beschriebenen Laisionsmuster entspricht.

### **2.3. Bestimmung der am stärksten regulierten Gene der einzelnen Zeitpunkte**

Um die zwei Modelle besser vergleichen zu können und die in 2.2 beschriebene stark unterschiedlich ausgeprägte Regulation zwischen transienter und permanenter MCAO zu berücksichtigen, wurden die 100 am stärksten regulierten Gene jedes Zeitpunktes einzeln ermittelt. Da in den vorhergehenden Analysen bereits ersichtlich war, dass die Veränderungen der Expression im Striatum höher war als im Cortex, wie aus dem Laisionsmuster zu erwarten war, wurden nur die Daten des Striatums analysiert.

Zur Identifizierung jener Gene, die sowohl nach transienter als auch nach permanenter MCAO exprimiert werden, wurde jeweils die Schnittmenge beider experimenteller Gruppen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Anhang 1 zu sehen.

Im Vergleich der sechs Zeitpunkte fällt auch auf, dass es zu den späteren Zeitpunkten hin eine Zunahme der gemeinsam exprimierten Genen gibt. So sind nach sechs Stunden nur 12 Gene in beiden Modellen und Geweben gleich exprimiert, wohingegen es nach sieben Tagen 38 Gene sind.

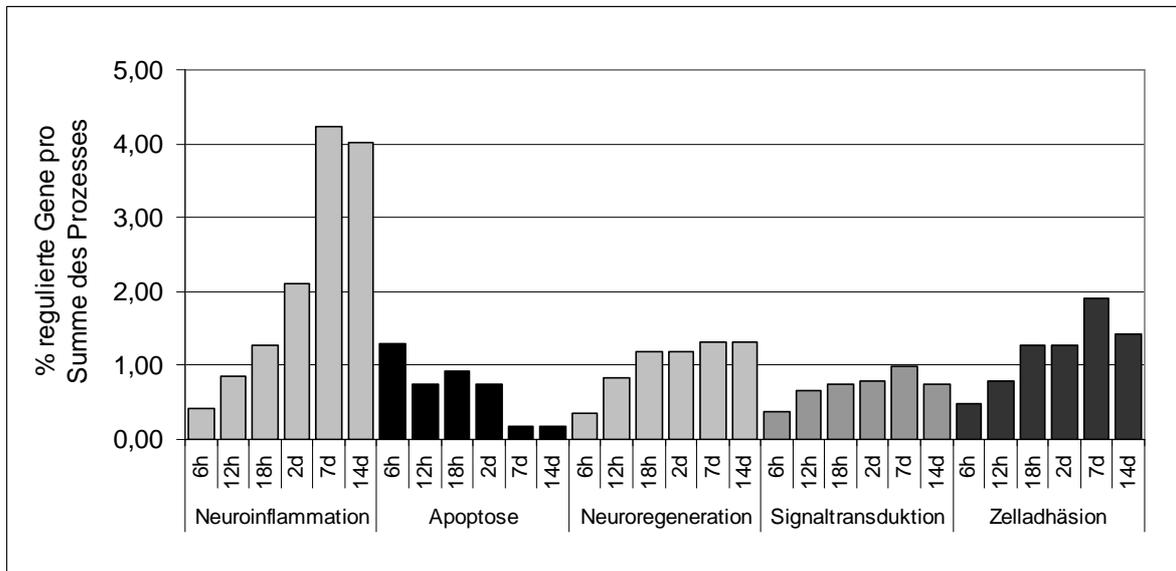
Weiterhin zeigt sich, dass es fast ausschließlich zu einer Erhöhung und nur sehr selten zu einer Erniedrigung der Genexpression kommt. Diese Erhöhung der Expression erreicht teilweise mehr als Zehnfache der normalen Expression.

Es fällt insbesondere auf, dass in beiden Modellen während der frühen Phase eine große Anzahl an Genen differenziell exprimiert werden, welche in den Prozessen der Signaltransduktion (z.B. GABA-A Rezeptor  $\delta$ ), der Transkriptionsregulation (z.B. STAT3, CEBP  $\delta$ ) und der Regulation von Entzündungsprozessen (wie z.B. TGF- $\beta$ , IL1 Rezeptor, Oncostatin M Rezeptor) beteiligt sind. In den späten Phasen finden sich hingegen immer mehr Gene, welche eine Beteiligung von Mikroglia (CD68, C1q) oder auch eine erhöhte Beteiligung Neuroregeneration (z.B. Cathepsine) zeigen.

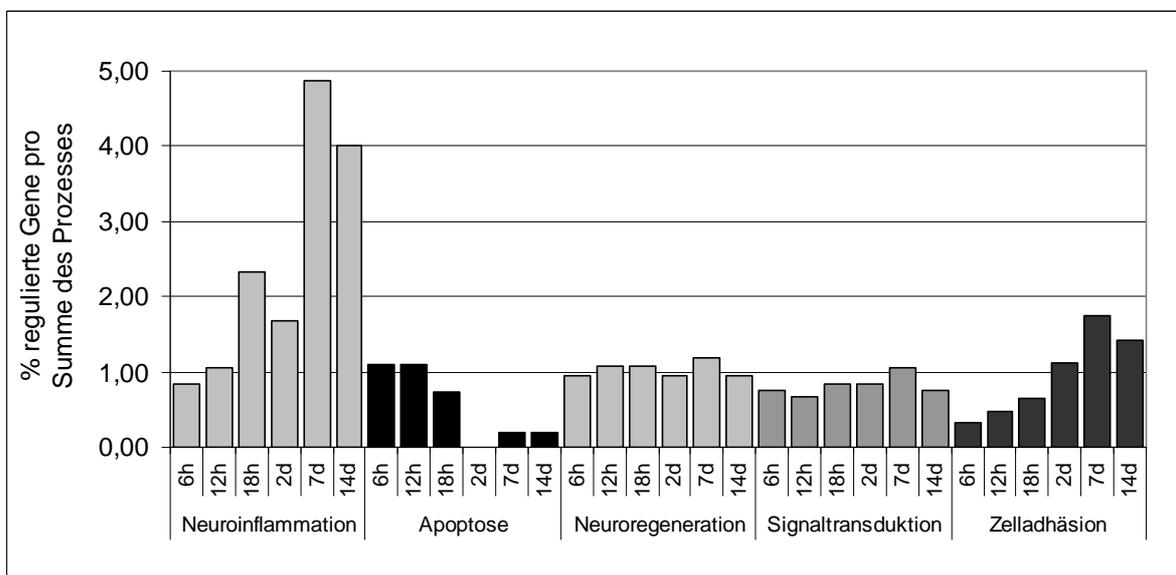
### **2.4. Untersuchung der Veränderung charakteristischer Prozesse nach MCAO**

Um einen besseren Überblick über die Veränderung nach einer Okklusion zu bekommen, wurde die Beteiligung der in der Einleitung genannten Hauptprozesse über den beobachteten Zeitrahmen genauer analysiert. Dazu wurden innerhalb der

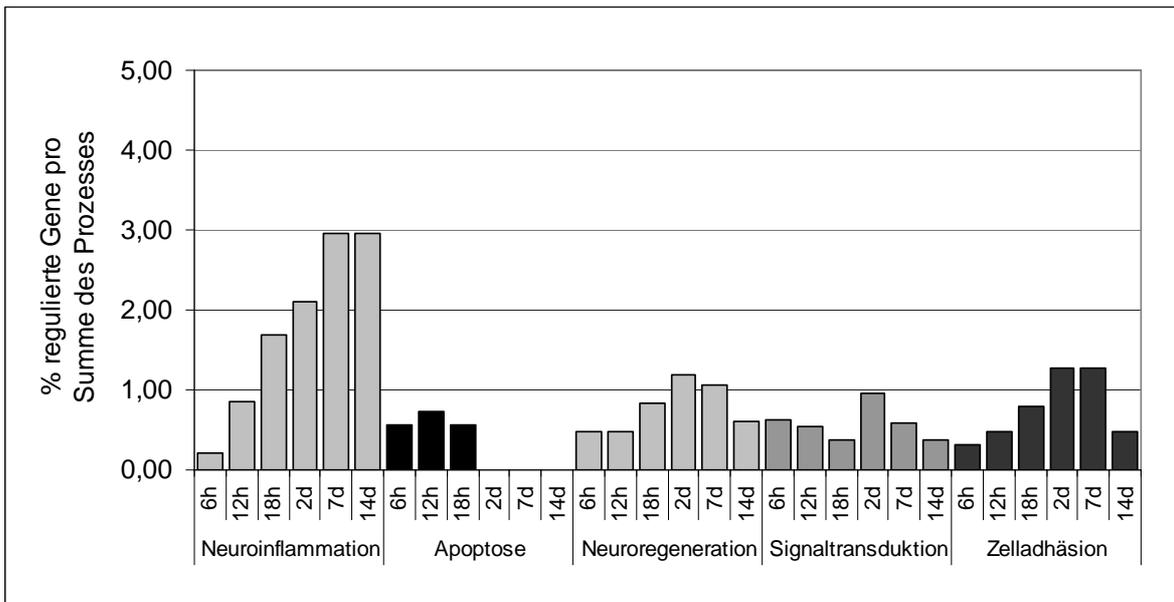
100 am stärksten veränderten Gene die Beteiligung einzelner biologischer Prozesse ermittelt (s. Einleitung).



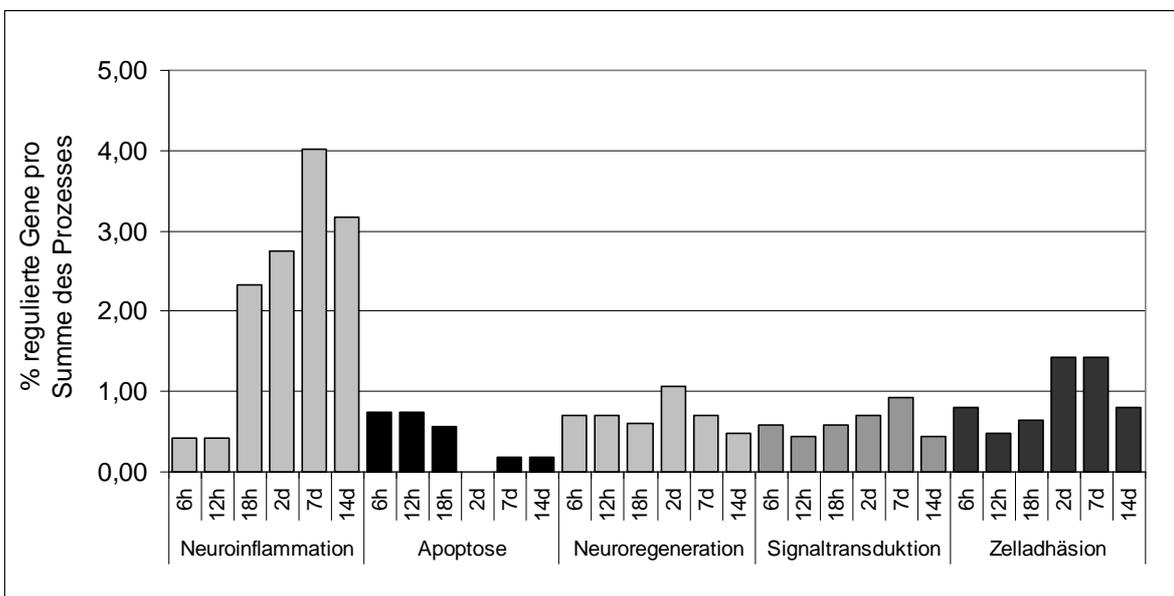
**Diagramm 3: Darstellung der zeitlichen Beteiligung der fünf Hauptprozesse nach transientser MCAO (Striatum).** Dargestellt ist der Anteil an hoch exprimierten Genen in Bezug auf die auf dem Chip vorhanden Gene des Prozesses.



**Diagramm 4: Darstellung der zeitlichen Beteiligung der fünf Hauptprozesse nach transientser MCAO (Cortex).** Dargestellt ist der Anteil an hoch exprimierten Genen in Bezug auf die auf dem Chip vorhanden Gene des Prozesses.



**Diagramm 5: Darstellung der zeitlichen Beteiligung der fünf Hauptprozesse nach permanenter MCAO (Striatum).** Dargestellt ist der Anteil an hoch exprimierten Genen in Bezug auf die auf dem Chip vorhandenen Gene des Prozesses.



**Diagramm 6: Darstellung der zeitlichen Beteiligung der fünf Hauptprozesse nach permanenter MCAO (Cortex).** Dargestellt ist der Anteil an hoch exprimierten Genen in Bezug auf die auf dem Chip vorhandenen Gene des Prozesses.

Die beiden Modelle der transienten und permanenten MCAO ähneln sich stark in der Veränderung der Prozesse.

Es kommt in allen vier Teilversuchen zu einer starken Zunahme der Neuroinflammation, welche ihren Höchstpunkt nach sieben Tagen erreicht und dabei ca. den fünffachen Wert des sechs Stunden-Zeitpunktes erreicht.

Gleichzeitig findet man in den späten Zeitpunkten stets eine Abnahme der Apoptose, die nach 7 Tagen um das Fünffache geringer ist als zu Beginn des Versuchs. Dabei fällt stets auf, dass sich die frühe Phase von sechs bis 18 Stunden stets deutlich von der späten Gruppe von sieben bis 14 Tagen abgrenzt.

Der Prozess der Neuroregeneration zeigt ein Zunahme von den frühen hin zu den späten Phasen. Der Höchstpunkt, welcher meist nach sieben Tagen gemessen wird, ist dabei um ca. das Dreifache höher als der Wert nach sechs Stunden. Dieser Anstieg ist jedoch nur im Striatum zu erkennen. Im Cortex ist über den gesamten analysierten Zeitraum eine gleichmäßige Beteiligung des Prozesses zu sehen, welche in etwa dem höchsten Wert der im Striatum gemessenen Beteiligung entspricht.

Der Prozess der Signaltransduktion zeigt nur sehr geringe Veränderungen. Sowohl im Striatum als auch im Cortex scheint es eine leichte Zunahme des Prozesses zu geben. Ausnahme davon sind die Daten des Striatums der permanenten MCAO, welche eine Abnahme von sechs zu 18 Stunden zeigen, mit einem Höchstpunkt nach zwei Tagen, welcher dann erneut hin zu 14 Tagen abnimmt.

Die Zelladhäsion zeigt neben dem Prozess der Neuroinflammation die stärkste Reaktion auf die Ischämie. Es kommt zu einem Anstieg der Beteiligung des Prozesses, welcher seinen Höchstpunkt nach sieben Tagen erreicht. Dabei ist der Anteil an regulierten Genen fast um das Dreifache höher als zu Beginn des Versuchs.

## B. 3. Überprüfung der Mikroarraydaten

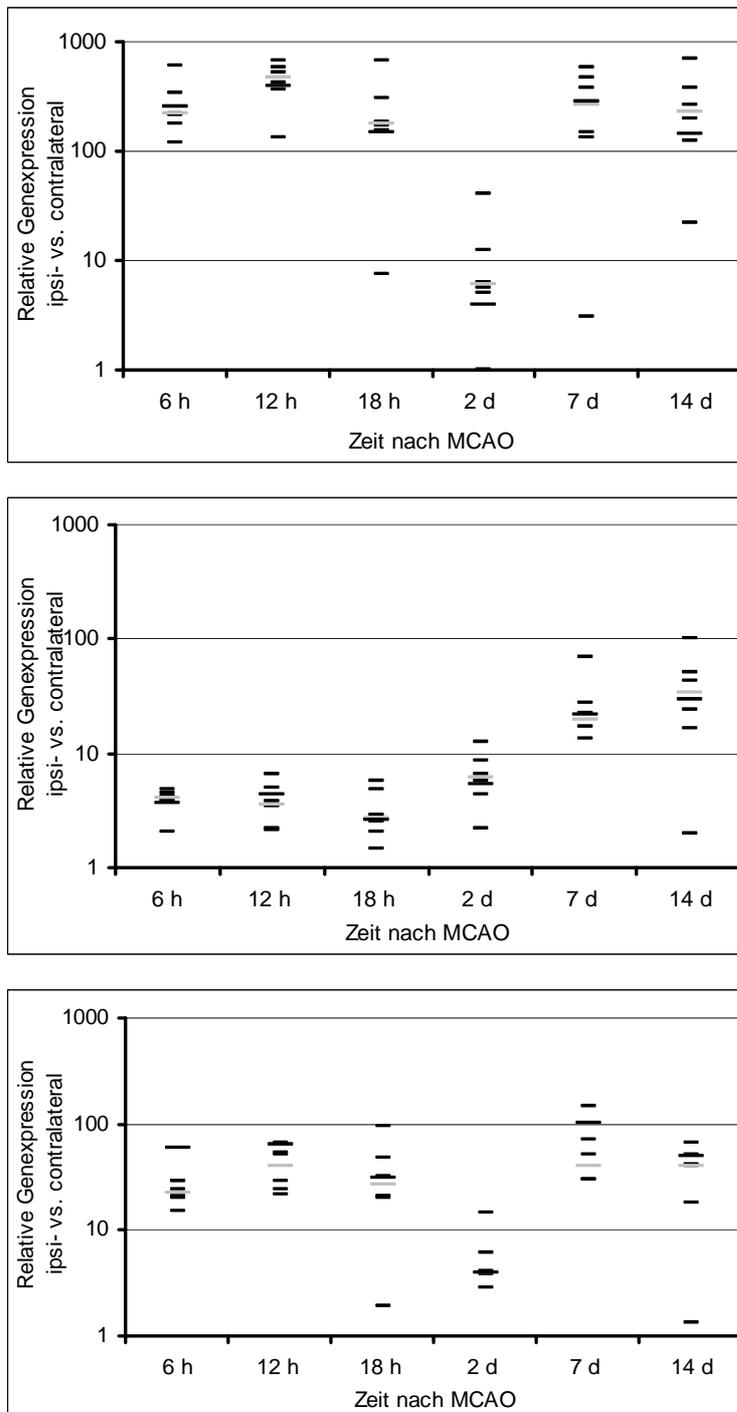
### 3.1. Validierung der Pooldaten mittels qRT-PCR und Vergleich mit den Einzeltierdaten

Bereits vor der Mikroarrayanalyse – für welche nur die gepoolten Proben verwendet wurden – musste sichergestellt werden, dass die gemessenen Werte der gepoolten Proben keine signifikanten Unterschiede zu den Einzeltierdaten zeigten, welche z.B. durch schlechte Qualität einzelner Proben oder durch einen methodischen Fehler verursacht worden sein könnten. Um einen solchen methodischen Fehler auszuschließen, wurde in den Einzeltierproben mittels qRT-PCR die Veränderung bekannter hypoxieinduzierter Gene gemessen. Auf diese Weise sollten Proben identifiziert werden, welche unerwartet keine erhöhte Expression in der ipsilateralen Seite zeigen. Im Fall starker Abweichungen zwischen den gemessenen Daten des Pools und den Mittelwerten der Einzeltierdaten müssten Ausreißer aus dem Pool entfernt werden. Als Hypoxie-Markergene für diesen Zweck wurden CXCR4 (*Schioppa T et al. 2003*), TNF- $\alpha$  (*Zhai QH et al. 1997*) und CCL3 (*Takami S et al. 1997*) gemessen, für die bereits früher eine erhöhte Expression nach Ischämie beschrieben wurde.

In Diagramm 7 ist die Validierung der Pooldaten anhand der Daten zu CCL3, CXCR4 und TNF- $\alpha$  gezeigt. Dabei sind nur die Proben des Striatums der transienten MCAO gezeigt. Es zeigt sich, dass einige Proben bei Messung der Hypoxie-Marker eine wesentlich geringere Genregulation zeigen als die anderen Proben des entsprechenden Zeitpunktes. Dies deutet darauf hin, dass es in diesen Tieren zu keiner oder nur zu einer geringeren Induktion der Hypoxie gekommen ist. Im Vergleich der Werte der gepoolten Proben und des Medians der sechs Proben sieht man jedoch, dass diese Extremwerte eine sehr geringe Wirkung auf den Unterschied der beiden Werte haben. Deshalb erschien es nicht nötig, diese Werte aus den Analysen auszuschließen.

### 3.2. Validierung der Mikroarraydaten durch qRT-PCR

Um die aus dem Mikroarray erhaltenen Daten zu validieren wurden einige Gene ausgewählt und mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) erneut gemessen. Dabei wurden sowohl die Werte für die „gepoolten“ Proben bestimmt, als auch die

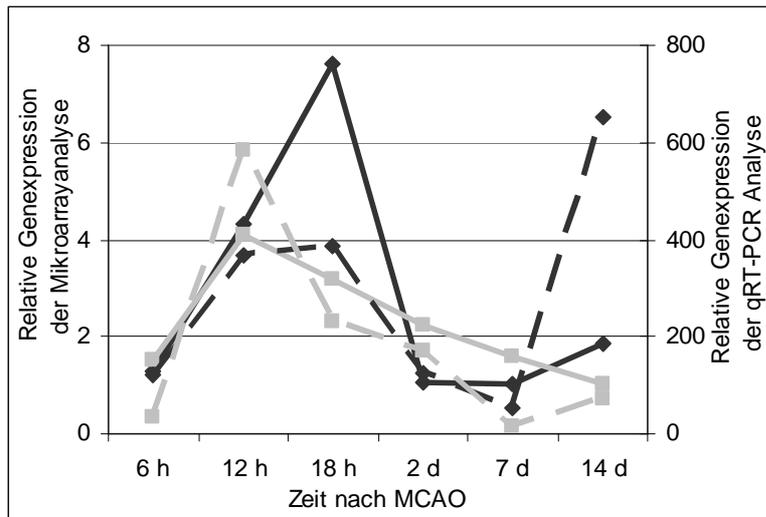


**Diagramm 7: Vergleich der Pool- und Einzeltierdaten der Genexpressionsanalyse für CCL3 (oben), CXCR4 (mitte) und TNF- $\alpha$  (unten).**

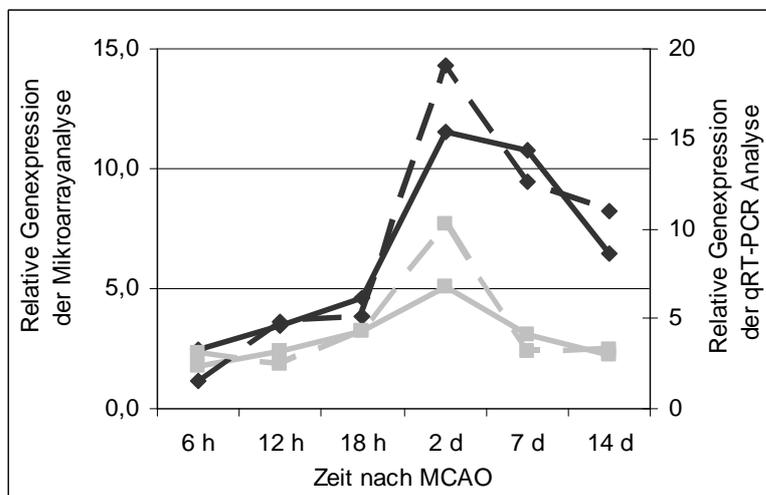
*Die Ergebnisse ergeben eine Übereinstimmung der Daten der Median der sechs Einzelwerte (dicker grauer Balken) und der Pooldaten (dicker schwarzer Balken). Die Streuung der Daten der Einzeltiere (schwarzer Balken) um diese beiden Werte herum bestätigen dieses Ergebnis.*

Werte für die zugrunde liegenden Einzeltiere erhoben. Dies ermöglicht zum Einen eine Validierung der bereits vorliegenden Daten durch eine weitere Methode. Außerdem erhöht dieses Vorgehen die statistischen Signifikanz, da für jeden

Zeitpunkt sechs Einzelwerte vorliegen. Dargestellt werden hier die Vergleiche der Pooldaten zwischen Mikroarray und qRT-PCR für CXCL2 und GFAP an Striatum und Cortex der transienten MCAO. Die Ergebnisse hierzu sind in Diagramm 8 zu sehen. In beiden Fällen erkennt man, dass sich unabhängig von der verwendeten Methode dieselben Tendenzen zeigen lassen. Man findet für die Expression des GFAP im Striatum mit beiden Methoden einen starken Anstieg der Expression nach 18h, der bis zum Tag 14 wieder abnimmt.



**Diagramm 8: Vergleich der Mikroarraydaten mit den qRT-PCR-Daten für die Gen CXCL2 (oben) und GFAP (unten).** Die Ergebnisse der qRT-PCR Analyse bestätigen durch den ähnlichen Verlauf der Genexpressions die Daten der Mikroarrayanalyse.



—◆— Striatum MA      —■— Cortex MA  
 - -◆- - Striatum qRT-PCR      - -■- - Cortex qRT-PCR

Außerdem zeigen die Ergebnisse des CXCL2, dass die mittels Mikroarray bestimmten Daten oftmals geringere Veränderungen der Genexpression zeigten als die Bestimmung mittels qRT-PCR. Dies ist ein grundlegendes Problem der Mikroarray-Technologie, was sich bei der Analyse der Genexpression von Genen

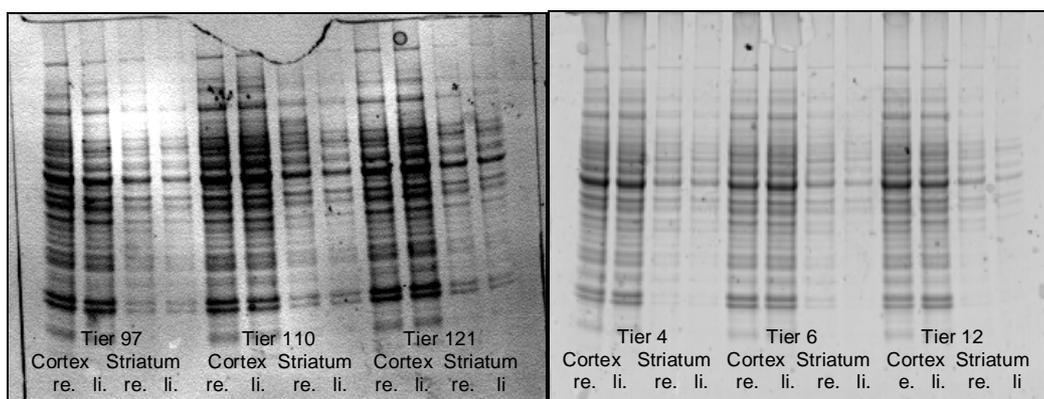
geringer Kopienzahlen, wie z. B. Chemo- und Cytokine besonders auswirkt. Daher wurden im weiteren Verlauf dieser Studie die Veränderungen dieser Botenstoffe nochmals mittels qRT-PCR bestimmt.

## B. 4. Proteinchemische Validierung der Genexpressionsdaten

Zur weiteren Untersuchung der ischämiebedingten Veränderungen und zur Charakterisierung der Zusammenhänge zwischen Gen- und Proteinexpression – welches auch eine Validierung der bisherigen Ergebnisse bedeutet – wurde für einen Teil der identifizierten Gene die Expression auf Proteinebene gemessen. Ein Teil der Proteine wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt, ein anderer Teil wurde mit Hilfe von ELISA nachgewiesen. Die Ergebnisse für die Proteinexpression wurden dann mit den Daten der Genexpressionsanalyse verglichen. Für die meisten Analysen mittels ELISA wurden die gepoolten Proben verwendet, jedoch erfolgte für ausgewählte Proteine auch eine Messung der Einzeltierdaten.

### 4.1. Proteinextraktion und Analyse

Zur Validierung der verwendeten Methode für die Proteinextraktion wurden exemplarisch die Proben von drei Tieren mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel mittels Coomassie gefärbt. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, zeigen die Proben gleichmäßige Bandenmuster, welches die gleichmäßige Extraktion bestätigt. Man erkennt ebenfalls, dass die Proben des Cortex jeweils eine höhere Menge an Protein enthalten als das Striatum. Dies ist durch das größere Gewebevolumen des Cortex zu erklären.



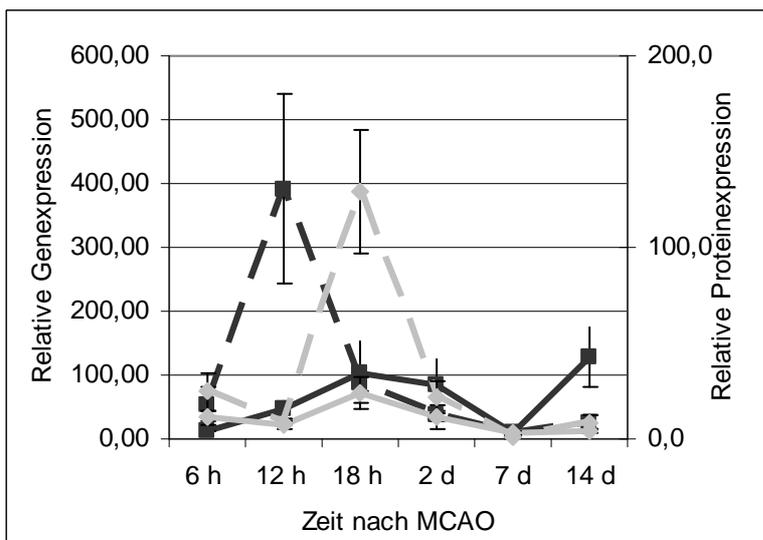
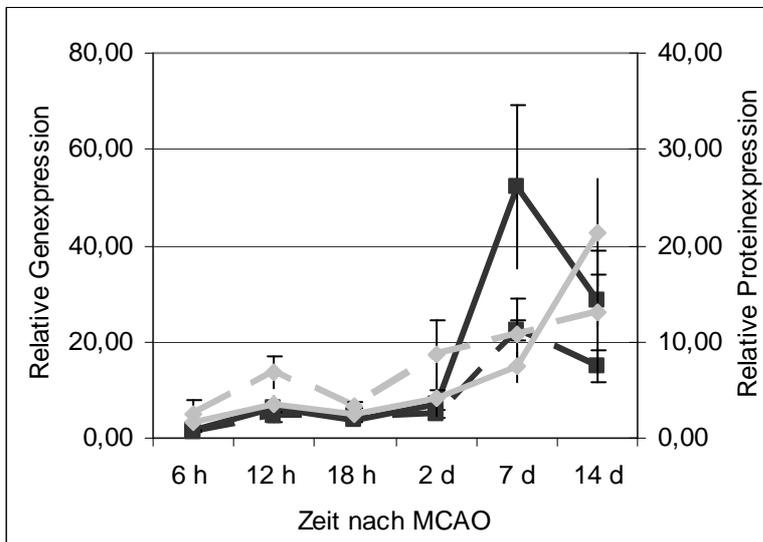
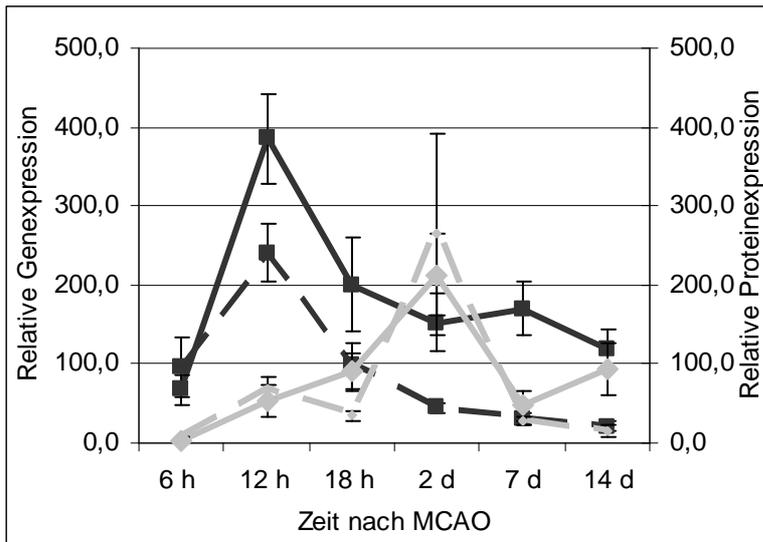
**Abbildung 6: Coomassie gefärbtes SDS-Gel exemplarisch ausgewählter Proben der gelösten Proteinextrakte dreier Mäuse nach permanenter MCAO.** Die Analyse der Proteinproben zeigte gleichmäßige Muster der Proteinbanden, was bestätigt, dass die Extraktion der Proben erfolgreich verlaufen war.

#### **4.2. Daten-Bestätigung mittels ELISA**

Zur weiteren Validierung und zur Erhöhung der statistischen Signifikanz wurden für verschiedene Proteine ELISAs durchgeführt und die so erhaltenen Daten mit den Genexpressionsmustern verglichen. Die meisten Analysen wurden mit den gepoolten Proben durchgeführt. Nur für fünf Proteine wurden Daten für die Einzeltiere erhoben.

Exemplarisch sind die Vergleiche für CCL2, CCL5 und CXCL1 gezeigt, in denen die Proteindaten der Einzelproben mit den Einzeldaten der qRT-PCR Analyse verglichen wurden. Diese sind in Diagramm 9 zu sehen.

Die Proteindaten des Cortex und des Striatums haben jeweils einen ähnlichen Verlauf. Außerdem führt eine erhöhte Expression eines Gens mit Verzögerung zu einer erhöhten Expression des entsprechenden Proteins. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Analysen der Daten der gepoolten Proben, wie in Tabelle 2 zu erkennen ist. Dies bestätigt unsere Annahmen und somit auch die Durchführung des Versuchs.



**Diagramm 9: Mittelwerte der Gene- und Proteinexpressionsdaten der Einzeltiere für CCL2 (oben), CCL5 (mitte) und CXCL1 (unten) im Cortex nach transientscher Ischämie.** Die schwarzen Linien zeigen den Median der Genexpression und die grauen Linien den Median der Proteinexpression der Einzeltierdaten dar. Die Daten des Striatums sind durchgezogen und die Daten des Cortex unterbrochen gezeichnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler der Einzelwerte.

- Striatum Genexpression
- -■- - Cortex Genexpression
- ◆— Striatum Proteinexpression
- -◆- - Cortex Proteinexpression

**Tabelle 2: Vergleich der mittels qRT-PCR bestimmten Genexpressionsdaten und der mittels ELISA bestimmten Proteinmengen in den gesammelten Proben des transienten MCAO-Versuchs.**

Gen	Analyse	Gewebe	6 h	12 h	18 h	2 d	7 d	14 d
CCL2	Protein	Striatum	3,0	26,4	42,5	32,9	5,7	9,4
		Cortex	9,2	69,8	52,8	22,0	2,2	4,6
	RNA	Striatum	258,8	398,5	148,6	4,0	286,8	145,0
		Cortex	271,2	206,4	99,6	4,7	57,9	28,5
CCL3	Protein	Striatum	37,2	51,2	82,5	20,0	907,2	33,0
		Cortex	145,9	154,8	73,6	27,5	355,8	2,2
	RNA	Striatum	258,8	398,5	148,6	4,0	286,8	145,0
		Cortex	271,2	206,4	99,6	4,7	57,9	28,5
CCL4	Protein	Striatum	43,1	26,3	40,7	9,1	39,0	73,0
		Cortex	46,3	58,0	26,4	3,7	24,9	10,3
	RNA	Striatum	298,0	258,5	199,0	4,4	130,3	57,4
		Cortex	150,7	234,9	133,5	2,9	28,8	13,1
CCL5	Protein	Striatum	0,5	3,9	8,9	20,1	15,4	70,0
		Cortex	25,4	23,7	8,5	32,4	148,5	88,1
	RNA	Striatum	4,0	24,6	33,6	25,7	32,3	121,3
		Cortex	3,8	8,6	15,4	7,2	25,8	24,6
CXCL1	Protein	Striatum	5,8	46,2	70,1	18,6	5,5	40,0
		Cortex	12,5	60,0	40,3	14,9	5,5	5,0
	RNA	Striatum	99,9	357,5	264,2	150,0	65,0	106,0
		Cortex	86,6	152,4	120,8	143,3	11,3	25,8
CXCL2	Protein	Striatum	12,5	17,4	67,9	52,3	4,6	26,0
		Cortex	16,3	88,5	38,1	18,3	2,5	1,9
	RNA	Striatum	110,6	462,3	304,5	94,3	93,3	665,2
		Cortex	112,0	523,8	238,4	225,9	12,6	87,3
IL1b	Protein	Striatum	3,6	8,9	8,2	2,4	1,5	2,4
		Cortex	1,2	3,2	1,8	1,2	1,2	1,2
	RNA	Striatum	26,7	38,0	22,5	19,2	13,2	22,1
		Cortex	7,6	21,1	12,6	8,0	3,4	6,4

Bei CCL2 ist deutlich zu sehen, dass es einen Höchstpunkt der Genexpression im Striatum nach 12h gibt, der danach schnell abflacht. Diesem folgt der Höchstpunkt der Proteinexpression nach 18h. Ähnliches sieht man auch bei anderen Genen, wo der Peak der Proteinexpression zeitlich verzögert auf den Peak der Genexpression folgt.

Außerdem erkennt man, dass die Werte im Striatum meistens höher sind als im Cortex. CXCL1 ist das einzige analysierte Gen bei dem ausnahmsweise die gemessenen Werte des Cortex höher liegen als die des Striatums. Hier zeigt sich,

dass Sonderfälle, bei denen höhere Genexpressionen im Cortex als im Striatum gemessen werden, durchaus auch mittels Proteinexpression zu bestätigen sind.

### **4.3. Zusammenfassung der Validierung**

Die Analysen mittels quantitativer real-time-PCR und Proteinmessung konnten exemplarisch die Mikroarraydaten validieren. Die real-time PCR Daten zeigten, dass die Pooldaten und der Mittelwert der Einzelproben korrelieren.

Mittels der Proteindaten der Western Blot- und ELISA-Analysen konnte gezeigt werden, dass die ermittelten Genexpressionsdaten in ihrer Tendenz mit den Proteindaten korrelieren. Außerdem steigt die Proteinexpression in den meisten Fällen verzögert zur RNA-Expression. Daraus lässt sich ableiten, dass die Proteinsynthese wirklich auf die gemessene RNA-Expression zurückzuführen ist.

## **C. Genexpressionsanalyse der Cyto- und Chemokine Beteiligung nach MCAO**

Die Ergebnisse der Mikroarrayanalyse (s. Anhang 1) zeigen nur eine geringe Regulation verschiedener entzündungsregulierender Gene, wie z.B. der Chemokine und Cytokine. Dies ist u. U. durch die methodischen Limitationen der Mikroarray-Analyse bedingt, welche genaue Messungen von gering exprimierten Genen nicht ermöglicht. Dies konnte in dieser Studie bereits am Beispiel des CXCL2 gezeigt werden, bei dem die Genexpression nach Messung mittels Mikroarray wesentlich geringer war als nach Messung mittels qRT-PCR (s. IV.B.3.2).

Um dies zu umgehen, wurden eine Reihe dieser Gene zusätzlich mittels quantitativer real-time PCR analysiert. Diese Methode erlaubt bereits geringe Kopien eines Genes quantitativ detektieren zu können.

### **C. 1. qRT-PCR Analyse der Chemokine und Cytokine**

Die Proben der transienten und permanenten MCAO, wurden mittels qRT-PCR auf Basis der Pooldaten und teilweise auch auf Basis der Einzeltierdaten analysiert. Aufgrund fehlender Beschreibung vieler Gensequenzen konnten nur ein Teil aller Chemokine analysiert werden. Die Mediane der Einzeltierdaten aller analysierten Gene sind in Tabelle 3 gezeigt. Zur besseren Identifizierung von Expressionsprofilen im zeitlichen Verlauf des Experiments wurden die Daten farblich hervorgehoben. Außerdem wurden die Messungen der Liganden und Rezeptoren in zwei getrennten Tabellen dargestellt. Generell zeigen die Muster der Genexpression in beiden Geweben ähnliche Verläufe. Dabei ist jedoch die Regulation im Cortex meist geringer ausgeprägt als im Striatum, welches durch den bereits erwähnten Unterschied im Gewebevolumen verursacht sein kann. Oftmals erkennt man in den Profilen auch eine frühere Regulation im Cortex als im Striatum, was besonders bei den kurzen Abständen zwischen 6h und 48h auffällt. Der Vergleich der beiden Modelle, transiente und permanente MCAO, zeigt, dass obwohl die Expressionsprofile sehr ähnlich sind, die differentielle Expression nach transients MCAO deutlich stärker ausgeprägt ist. Im Folgenden sollen ausgewählte Liganden und Rezeptoren genauer beschrieben werden, um Zusammenhänge und Auffälligkeiten zu verdeutlichen.

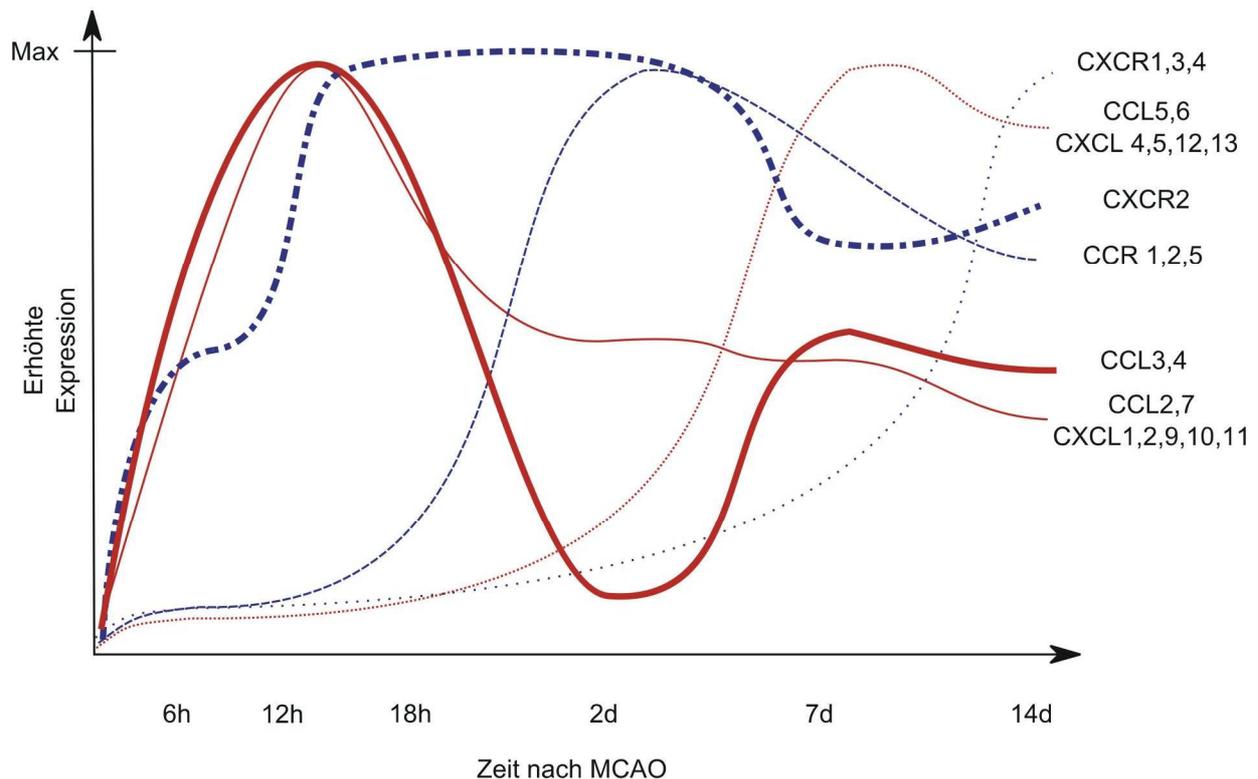
Einen Grossteil der Liganden zeigt einen schnellen Anstieg der Expression, der bereits nach 12h den höchsten Punkt erreicht und dann langsam abnimmt. Dieser Abfall ist aber so langsam, dass diese Liganden oftmals auch nach 14 Tagen noch eine signifikant erhöhte Expression zeigen, wie z.B. die ~100-fache Hochregulation von CCL2 noch 14 Tage nach der Okklusion. Eine andere Gruppe von Liganden zeigt hingegen einen langsamen Anstieg, der erst nach sieben oder vierzehn Tagen seinen Höchstpunkt erreicht. Ein spezielles Expressionsprofil fällt bei den Liganden CCL3 und CCL4 auf, welche während des beobachteten Zeitraums stets eine erhöhte Expression zeigten und nur nach 48h eine nahezu normale Expression aufwiesen. Zur Erklärung dieses Profils wurde noch eine genauere Untersuchung durchgeführt (s. IV.C. 2).

Bei den Rezeptoren fällt auf, dass die Verläufe der Chemokin- und Cytokin-Rezeptoren sich voneinander unterscheiden. Bei den Cytokin-Rezeptoren kommt es nach zwei Tagen meist schon zur stärksten Regulation, wonach diese leicht zurückgeht. Die Expression der Chemokin-Rezeptoren steigt meist nur langsam an, bis nach sieben bzw. vierzehn Tagen der Höchstpunkt erreicht wird, wie z.B. im Falle des CXCR3 welcher 14 Tage nach der Okklusion eine ~100 fache Hochregulation zeigt. Unter den Rezeptoren fällt besonders CXCR2 auf, da er von den untersuchten Rezeptoren der einzige ist, der bereits nach 12h eine erhöhte Expression zeigt. Diagramm 10 fasst die verschiedenen beschriebenen Verläufe zusammen und ermöglicht somit einen besseren Vergleich der Profile.

## Ergebnisse

**Tabelle 3: Ergebnisse der qRT-PCR Analysen der MCAO der verschiedenen Gewebe und Zeitpunkte.** In der Tabelle sind die Werte der relativen Genexpression für die verschiedenen Gewebe und Zeitpunkte angegeben. Zur besseren Identifizierung von Profilen wurden innerhalb eines Modells bzw. eines Gewebes die Werte ihrer Expression hervorgehoben. Der Zeitpunkt der stärksten Expression wurde rot, der zweitstärkste orange und der drittstärkste gelb unterlegt.

Transiente MCAO							Permanente MCAO																	
Genname	Straitum						Cortex						Straitum						Cortex					
	6h	12h	18h	48h	7d	14d	6h	12h	18h	48h	7d	14d	6h	12h	18h	48h	7d	14d	6h	12h	18h	48h	7d	14d
CCL2	48,7	402,0	215,9	146,2	157,2	104,5	43,0	271,1	120,8	39,4	26,5	12,5	21,8	87,7	78,4	57,4	16,7	21,9	51,0	105,2	84,2	39,5	20,1	9,0
CCL3	218,3	467,3	178,3	6,0	264,7	231,2	233,1	293,4	131,0	4,5	76,6	26,1	68,2	184,2	46,2	1,7	66,0	50,6	63,8	173,0	96,1	1,8	31,3	12,1
CCL4	268,7	382,4	164,0	5,0	145,9	82,5	128,9	177,7	136,0	2,9	30,1	15,5	72,3	77,5	29,1	1,4	37,7	14,4	55,9	53,6	53,1	1,2	16,4	6,3
CCL5	6,9	23,0	33,5	27,9	38,7	116,7	2,4	9,6	21,8	8,5	30,6	13,1	1,7	6,1	3,9	7,1	52,2	28,6	1,3	4,4	4,8	5,0	22,3	14,9
CCL6	3,7	11,0	8,5	11,8	40,7	59,8	3,9	7,6	7,3	9,2	9,4	11,1	3,6	4,7	2,4	4,9	21,2	31,1	3,5	5,2	7,7	5,4	10,7	6,6
CCL7	163,1	589,6	277,2	422,5	111,9	234,5	36,3	206,5	42,8	56,1	11,6	21,8	20,0	64,7	42,6	67,8	10,9	13,6	17,2	45,9	32,6	17,1	15,3	5,2
CXCL1	123,7	355,4	366,5	86,1	66,7	200,3	55,3	126,2	190,2	63,4	14,9	26,0	12,2	45,4	104,5	83,6	10,9	128,1	54,6	330,1	86,1	36,7	8,0	26,5
CXCL2	119,8	369,6	384,9	125,7	51,5	652,4	35,8	583,6	232,9	172,0	15,3	70,4	27,4	46,4	46,9	40,9	33,7	20,1	143,9	676,3	317,7	29,6	6,7	53,4
CXCL4	5,4	14,1	19,0	45,6	57,6	33,4	3,4	6,2	8,2	6,0	6,8	2,2	2,2	2,9	1,7	10,1	3,3	3,9	1,8	2,3	2,2	3,2	3,7	1,4
CXCL5	2,6	6,2	3,1	18,0	9,0	68,9	0,8	1,4	2,5	2,4	4,5	6,4	1,4	1,1	1,8	3,2	2,5	27,8	0,6	1,8	1,3	1,1	1,5	1,2
CXCL7	7,1	6,6	9,1	19,1	2,9	3,2	4,1	9,9	12,1	5,9	1,5	1,3	2,0	2,3	1,9	3,3	0,8	1,3	2,4	4,8	7,2	4,4	1,8	1,4
CXCL9	7,4	31,7	6,4	18,7	4,2	20,8	4,7	18,8	1,6	4,8	108,8	17,3	1,1	7,3	1,3	19,3	289,5	44,0	1,0	2,9	1,7	7,4	143,4	60,6
CXCL10	78,9	317,4	81,1	43,4	45,8	283,3	28,6	116,5	19,5	18,0	35,0	35,0	11,4	59,7	66,5	32,3	53,2	60,2	18,4	33,3	23,6	10,6	19,7	20,5
CXCL11	4,8	25,0	10,2	5,3	8,6	32,5	1,8	5,2	3,1	2,0	5,6	4,1	2,1	6,8	2,3	2,3	4,6	6,4	2,3	5,9	2,3	1,5	4,3	3,7
CXCL12	2,1	1,4	1,3	1,8	4,2	6,1	1,0	0,8	0,7	0,9	2,3	1,9	0,5	0,8	0,5	1,0	1,1	1,4	0,6	0,7	0,8	0,8	1,2	1,6
CXCL13	3,2	20,7	18,2	22,5	192,7	110,4	3,0	8,6	30,1	32,4	131,4	75,3	3,0	31,4	37,3	119,5	211,1	69,8	3,0	17,7	78,2	163,4	194,3	95,8
IL1-β	18,5	84,5	20,3	23,8	7,6	39,8	6,1	27,9	18,5	7,9	3,6	7,1												
IL4	1,7	3,3	1,1	0,8	6,9	3,9	1,3	1,5	1,0	1,1	1,9	2,4	1,1	2,1	0,9	1,1	2,3	2,8	0,5	0,9	1,1	1,2	1,6	1,0
IL10	10,6	29,1	14,3	5,6	10,7	3,7	4,4	8,4	2,7	1,3	3,2	1,7	1,1	1,9	1,2	3,0	1,0	1,5	1,7	2,6	2,5	1,8	2,2	1,2
TNF-a	22,5	40,7	26,8	4,0	40,3	40,7	10,6	15,4	13,0	3,4	14,4	5,2	14,8	17,1	11,4	2,8	7,9	4,4	9,5	10,8	13,2	2,2	12,8	2,4
TGF-β	3,7	4,8	4,8	4,8	12,5	13,0	2,2	3,1	2,7	2,7	5,3	3,1	1,4	2,8	1,4	3,5	2,9	4,3	1,1	2,8	2,2	2,2	3,1	2,0
Genname	Straitum						Cortex						Straitum						Cortex					
	6h	12h	18h	48h	7d	14d	6h	12h	18h	48h	7d	14d	6h	12h	18h	48h	7d	14d	6h	12h	18h	48h	7d	14d
CCR1	3,6	11,8	16,2	44,4	6,3	36,4	2,9	13,1	9,9	26,3	5,1	6,0	3,5	14,8	8,0	91,2	5,1	15,8	2,5	9,2	21,1	16,7	7,8	2,8
CCR2	5,6	9,2	3,8	297,2	91,0	95,9	1,2	2,8	4,6	24,4	11,1	6,8	2,5	8,3	6,5	181,4	10,5	41,7	2,0	4,7	7,5	25,9	16,2	8,3
CCR5	5,3	8,7	5,2	19,7	19,8	35,6	3,4	6,9	3,1	6,8	9,2	4,4	1,0	4,4	5,4	12,1	3,0	8,6	1,0	3,4	5,9	5,3	4,7	3,1
CXCR1	0,6	1,8	1,0	12,0	9,0	27,5	0,8	3,6	3,6	5,7	3,4	9,2	1,4	2,8	2,2	5,1	3,9	4,7	1,7	3,0	4,1	2,8	18,1	32,7
CXCR2	13,2	18,2	30,7	99,3	38,9	111,3	3,1	9,6	18,1	17,8	5,4	13,4	4,8	37,6	16,0	35,5	21,7	39,9	5,4	29,1	64,9	15,0	8,3	26,8
CXCR3	9,2	9,0	5,6	11,6	80,7	118,6	3,2	7,8	0,9	1,8	9,7	8,5	1,9	4,1	0,7	3,4	20,3	39,4	1,1	2,9	3,3	1,6	4,4	6,4
CXCR4	4,1	3,6	2,7	6,1	19,5	33,4	1,6	3,5	1,8	2,0	12,2	8,2	1,1	1,3	1,2	2,8	2,2	4,6	1,5	2,5	2,1	2,3	4,5	3,0
CXCR5	3,9	4,2	1,6	4,1	2,9	5,8	2,0	2,6	2,1	1,7	2,0	2,5	1,0	1,6	2,8	2,6	1,0	4,6	1,1	1,3	2,9	1,7	0,8	2,4



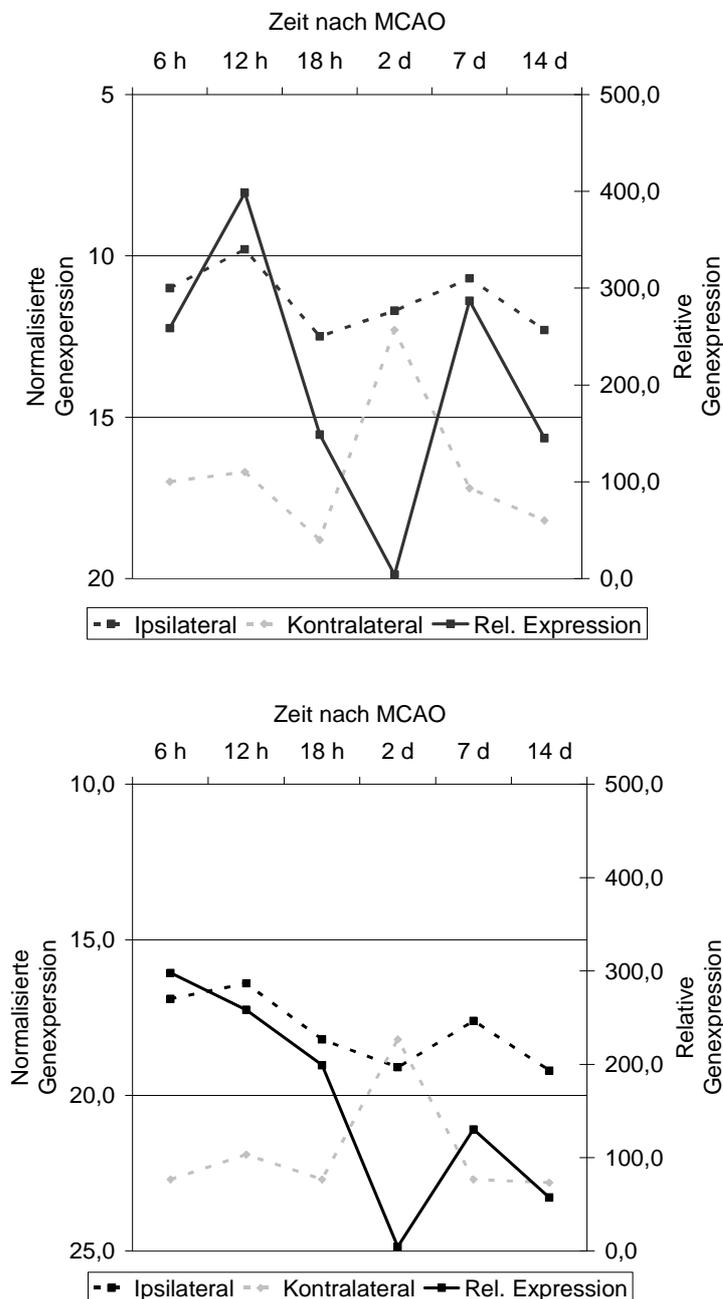
**Diagramm 10: Verlauf der gemessenen Genexpression der Chemokine und Cytokine Liganden (rot) und Rezeptoren (blau).** Die Verläufe sind repräsentativ für beide Versuche und Gewebe dargestellt. Einige Gene sind in Gruppen dargestellt, da sie ähnliche Verläufe zeigten. h: Stunden, d: Tage

In diesem Schema erkennt man, dass die gemessenen Rezeptoren meist nach zwei bzw. 14 Tagen eine erhöhte Expression zeigen. CXCR2 einen besonderen Verlauf, da er bereits nach 12h erhöht ist. Bei den Liganden hingegen kommt es bei einem Teil der analysierten Gene zu einer frühen, bereits nach 12h auftretenden Steigerung, während bei einem anderen Teil erst nach 7 Tagen und damit sehr spät eine deutliche Regulation zu sehen ist.

## C. 2. Kontralaterale Gegenregulation

Da im Vergleich der verschiedenen Expressionsprofile die Verläufe von CCL3 und CCL4 besonders aufgefallen sind, sollten diese im Weiteren genauer analysiert werden. Dazu wurden die gemessenen Genexpressionswerte der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre einzeln betrachtet und nicht wie ansonsten relativ (ipsi-versus kontralateral) und ermittelt, ob es zu einer Veränderung gegenüber dem Referenzgen, der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, kommt. Ebenso wurde bei den Proteindaten nicht die relative, sondern die normalisierte Expression betrachtet. Bei Betrachtung der Expressionen der ipsi- und kontralateralen Seite

zeigte sich eine unerwartete Erhöhung der Expression auf der kontralateralen Seite. In Diagramm 11 sind die normalisierten Genexpression der ipsi- und kontralateralen Seite und die resultierende relative Expression, welche sich aus der Differenz der beiden Seiten berechnet (s. Methoden), gezeigt.

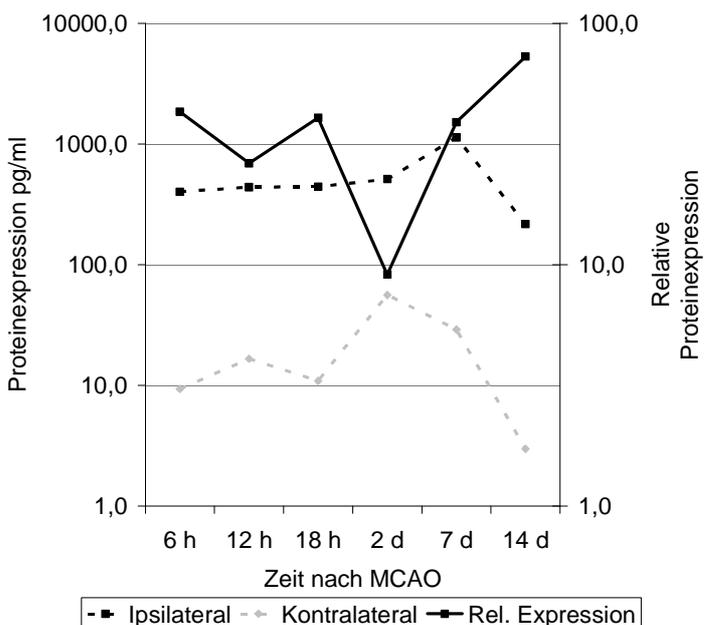
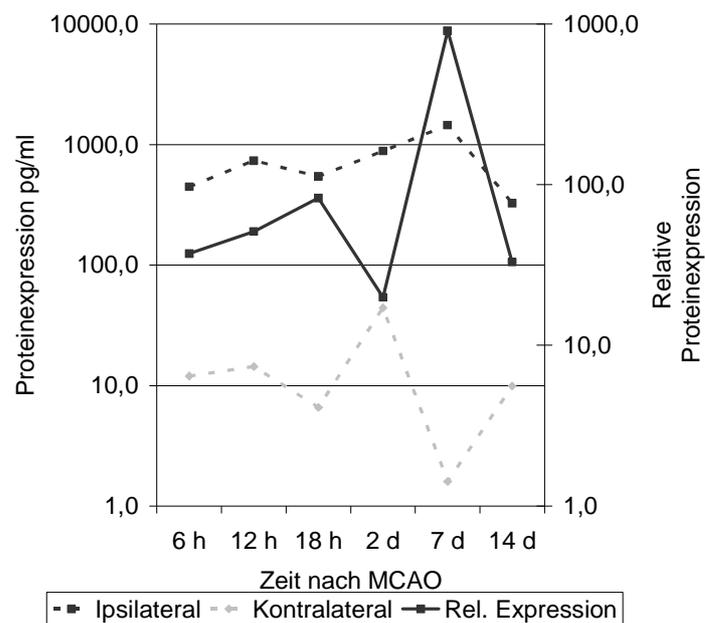


**Diagramm 11:**  
**Genexpressionsdaten der ipsi- (schwarz) bzw. kontralateralen (grau) Proben für das Gene CCL3 (oben) und CCL4 (unten).** Die gestrichelten Datenreihen zeigen die Expressionswerte. Diese Datenreihen zeigen die normalisierte Genexpression ( $\Delta CT$ ) (s. Methoden 1.3 qRT-PCR), bei denen die Werte auf ein Referenzgen normalisiert sind (linke Achse). Die durchgezogene Datenreihe zeigt die daraus resultierende relative Genexpression (rechte Achse).

Bei beiden Cytokinen kommt es zu einer spontanen Erhöhung der Expression in der ipsilateralen Seite, die bis auf eine leichte Erniedrigung nach zwei Tagen, über den gesamten Versuchszeitraum bestehen bleibt. Die kontralaterale Seite zeigt jedoch im frühen Zeitraum bis 18h keine erhöhte Expression, um dann nach 48h eine kurze starke Erhöhung aufzuweisen, die nach sieben Tagen nicht mehr zu

messen war. Da sich die relative Genexpression aus der Differenz der Expression beider Seiten berechnet und sich diese Differenz infolge des Anstiegs auf der kontralateralen Seite vermindert, zeigt die relative Expression bei 48h einen starken Rückgang.

Um zu bestätigen, dass diese unerwartete Beobachtung kein Effekt ist, der nur in der RNA-Expression zu messen ist, wurden auch die Proteinexpressionsdaten der ipsi- und kontra-lateralen Seite einzeln betrachtet. Wie man in Diagramm 12 sieht, zeigt die Proteinexpression einen ähnlichen Verlauf wie die Genexpression.



**Diagramm 12:**  
**Proteinexpression der Cytokine CCL3 (oben) und CCL4 (unten).**

Die gestrichelten Datenreihen zeigen die ipsi- (schwarz) bzw. kontralateralen (grau) normalisierten Proteinexpression-Werte (linke y-Achse). durchgezogene Datenreihe zeigt die daraus resultierende relative Genexpression, welche dem Quotienten der gemessenen Proteinmengen der beiden Hemisphären entspricht (rechte y-Achse).

Um sicherzustellen, dass dieser Effekt nicht auch bei anderen Genen zu einem scheinbaren Rückgang führt, wurden alle Daten nochmals auf die Gegenregulation auf der kontralateralen Seite hin untersucht. Es konnten jedoch keine weiteren Gene identifiziert werden, bei denen es zu einem ähnlichen Effekt kam.

### **C. 3. Zellspezifische Genexpression**

Die Analyse der biologischen Prozesse der Ischämie zeigten eine Zunahme der Zelladhäsion hin zu den späten Zeitpunkten. Diese Gruppe ist wichtig für die Invasion von Leukozyten, da sie durch Expression in Blutgefäßen die Adhäsion und somit auch die Einwanderung der Zellen ermöglichen. Da unsere Daten der analysierten Chemokine ebenfalls darauf hindeuten, dass die Chemotaxis von Leukozyten wesentlich an der Ischämie beteiligt ist, wurde versucht, eine Invasion der Zellen zu bestätigen.

Da eine Einwanderung dieser Zellen zu einer Zunahme, der von ihnen exprimierten Gene führen sollte, wurde die Genexpressionsveränderung einiger Monozyten- und Lymphozyten-spezifischen Zellmarker analysiert. In Kombination mehrerer Zellmarker sollte dann eine Aussage über die Zunahme bestimmter Zellpopulationen möglich sein. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 4 gezeigt.

**Tabelle 4: qRT-PCR Ergebnisse der Leukozytenmarker.** In der Tabelle sind die Werte der relativen Genexpression angegeben, die für die verschiedenen Gewebe und Zeitpunkte berechnet wurden. Zur besseren Identifizierung von Profilen wurden innerhalb eines Modells, bzw. eines Gewebes die Werte ihrer Expression hervorgehoben. Der Zeitpunkt der stärksten Expression wurde rot, der Zweitstärksten orange und der Drittstärksten gelb unterlegt.

		Striatum						Cortex							
Gene		6h	12h	18h	48h	7d	14d			6h	12h	18h	48h	7d	14d
Transient MCAO	CD11b	1,5	2,7	2,9	5,6	22,1	20,2	Monocytes	1,1	1,9	1,9	2,9	7,6	5,6	
	CD11c	6,2	28,1	18,3	24,2	175,6	236,5		4,8	14,9	11,4	5,5	63,6	94,8	
	CD68	1,7	2,7	2,6	6,0	42,2	31,5		1,6	2,3	1,9	3,6	13,5	10,8	
	CD3g	10,7	8,2	4,4	5,9	26,5	97,1	Lymphocytes	1,8	6,4	1,5	2,0	6,6	18,3	
	CD8b	2,9	3,4	1,5	8,9	7,7	2,4		1,4	5,3	1,1	1,0	1,6	1,2	
	CD45	3,9	4,7	2,7	12,9	40,7	26,4		1,3	3,3	2,4	4,4	8,8	7,1	
	CD86	5,4	10,7	5,3	5,3	14,4	17,0		3,1	6,5	3,7	2,1	4,7	3,9	
Permanent MCAO	CD11b	1,1	1,9	1,8	5,9	5,9	7,7	Monocytes	0,8	2,0	2,9	3,6	7,8	3,1	
	CD11c	4,0	10,3	8,7	3,8	38,4	121,3		2,2	5,1	8,9	4,0	68,5	22,2	
	CD68	1,2	1,4	1,4	2,7	4,8	5,7		1,0	2,2	2,0	3,0	10,3	7,9	
	CD3g	2,9	3,3	2,6	5,6	5,2	24,3	Lymphocytes	2,3	2,8	2,0	1,9	5,6	11,5	
	CD8b	1,8	2,1	2,2	1,8	13,3	22,9		1,1	1,1	1,5	1,1	3,6	7,6	
	CD45	0,8	3,5	2,9	13,0	3,9	17,4		0,8	1,4	3,6	5,9	5,9	3,3	
	CD86	0,6	1,2	1,3	1,5	1,8	3,4		0,8	1,9	2,3	2,2	2,0	2,0	

Man erkennt, dass es bei einigen Markern zu zwei Expressionsphasen kommt, welche sowohl im Striatum als auch im Cortex zu messen sind. Die erste Phase, welche nur in der transienten MCAO deutlich zu beobachten ist, ist bereits nach 12h erreicht. Die zweite Phase, welche bei beiden Modellen zu identifizieren ist, ist nach 7 bis 14 Tagen erreicht und zeigt auch meist die höchste beobachtete Expression. Was auffällt ist, dass in den Daten des Striatums der permanenten MCAO die höchste Expression der Gene stets nach 14 Tagen erreicht wird, wohingegen in den anderen Gruppen der Höchstpunkt teilweise früher erreicht wird.

## **D. Genexpressionsanalyse der Alzheimer Erkrankung**

Zur Untersuchung der Prozesse, die der chronischen Neurodegeneration unterliegen, wurde exemplarisch die Alzheimer Erkrankung (AD) gewählt. Da der Beginn dieser Erkrankung nicht klar erkennbar ist, es aber im Verlauf zu einem Voranschreiten der Neurodegeneration und der Demenz kommt, erschien es sinnvoll, die Alzheimer Erkrankung als Beispiel für einen chronischen Verlauf der Neurodegeneration zu wählen.

Zur Analyse der Erkrankung wurden Gewebeproben von AD Patienten und gesunden Probanden gewählt und deren Genexpression miteinander verglichen. Das Ziel war dabei, wie bereits bei der Analyse der Ischämie, Prozesse zu identifizieren welche die Neurodegeneration beeinflussen. Diese sollten dann im Weiteren mit den Daten der Ischämie verglichen werden, um Unterschiede zwischen akuter und chronischer Neurodegeneration zu ermitteln.

### **D. 1. Probengewinnung und Projektdesign**

#### **1.1. Auswahl der Proben**

Zur Untersuchung der differentiellen Genexpression in der Alzheimer Erkrankung wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Colin Masters (Universität Melbourne in Australien; NSV Kooperation) post mortem Gewebestücke gesammelt und zur Analyse bereitgestellt. Dabei erhielten wir je ein Stück des Frontal- und Temporallappens von 16 AD und 13 Kontrollindividuen, aus denen jeweils RNA und Protein extrahiert wurde. Detaillierte Informationen zu den weiter analysierten Fällen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Informationen aller gesammelten Proben sind im Anhang 2 gezeigt.

**Tabelle 5: Detaillierte Informationen zu den gesammelten Proben aus den vorhandenen Pathologieberichten. Bei fehlenden Einträgen lagen die Daten nicht vor.**

	Patienten Nummer	Alter	Post-mortem Zeit [h]	Geschlecht	Neuropathologische Diagnose	Todes-Ursache	Familiäre Vorfälle
<b>Alzheimer</b>	03/512	65	56.5	M			
	03/653	60	65	M	AD	Akute Obstruktion der oberen Luftwege	
	03/891	79	---	M	AD		Ja
	04/042	78	20	W	AD		
	04/497	60	14	M	AD		Ja
	04/639						
<b>Kontrolle</b>	03/481	73	54	W	Lokale hypoxische Veränderungen	Lungenembolie	
	03/833	79	57	M			
	03/965	58	---	W			
	04/034	73	37	W			
	04/041	82	22	M	geringe amyloid Plaques ohne neuritische Veränderungen	Mitralklappeninsuffizienz	
	04/341	79	49	M		Mesotheliom	

## 1.2. Pathologische Klassifizierung anhand biochemischer Daten

Da die weiteren Analysen jeweils auf einem Vergleich zwischen Alzheimer-Erkrankten (AD) und Kontroll-Probanden (Kontrollgruppe) beruhen sollten, war es wichtig sicherzustellen, dass die gewählten Proben jeweils eindeutig in eine der beiden Gruppen eingeordnet werden konnten. Eine Einordnung aufgrund der Pathologieprotokolle war nicht ausreichend, um signifikante Gruppen basierend auf den Ergebnissen der Mikroarrayanalyse zu bilden. Somit waren weitere Parameter notwendig, um die einzelnen Gewebeproben bzw. die dazugehörigen Patienten und Probanden näher zu charakterisieren. Dazu wurden verschiedene im Folgenden beschriebene biochemische Werte bestimmt, die in der Alzheimer

Erkrankung eine wichtige Rolle spielen. Dies waren die Proteinkonzentrationen von A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 und phospho-tau in den Gewebe. Die Liste dieser Werte ist im Anhang 3 zu sehen.

Durch Neuberechnung der Mikroarraydaten unter Verwendung dieser Werte stellte sich heraus, dass bei den hier verwendeten Gewebeproben die Einordnung mittels A $\beta$ 40 zu den signifikantesten Ergebnissen betreffs Differenzierung von Alzheimer-Erkrankten und Kontroll-Probanden führte.

Die Einordnung der Proben wurde dabei wie folgt festgelegt: A $\beta$ 40 < 0,3  $\mu\text{g/ml}/\mu\text{g}$  wurde als „**low A $\beta$  Kontrolle**“ und A $\beta$ 40 > 3,5  $\mu\text{g/ml}/\mu\text{g}$  als „**high A $\beta$  AD**“ definiert. Mit diesen biochemischen Richtwerten wurden dann für die Auswertung der Affymetrix-Daten die Gruppen „high A $\beta$  Alzheimer“ (AD) und „low A $\beta$  Kontrollen“ (CTR) neu definiert. Da die RNA-Qualität einen großen Einfluss auf den Erfolg der Genexpressionsanalyse hat, wurden aus diesen beiden Gruppen jene Proben ausgewählt, die aufgrund der RNA-Analysen eine gute Qualität und Quantität aufwiesen. Durch diese Auswahl blieben jeweils 6 Proben für die AD- und CTR-Gruppe zur weiteren Analyse (s. Tabelle 6) übrig.

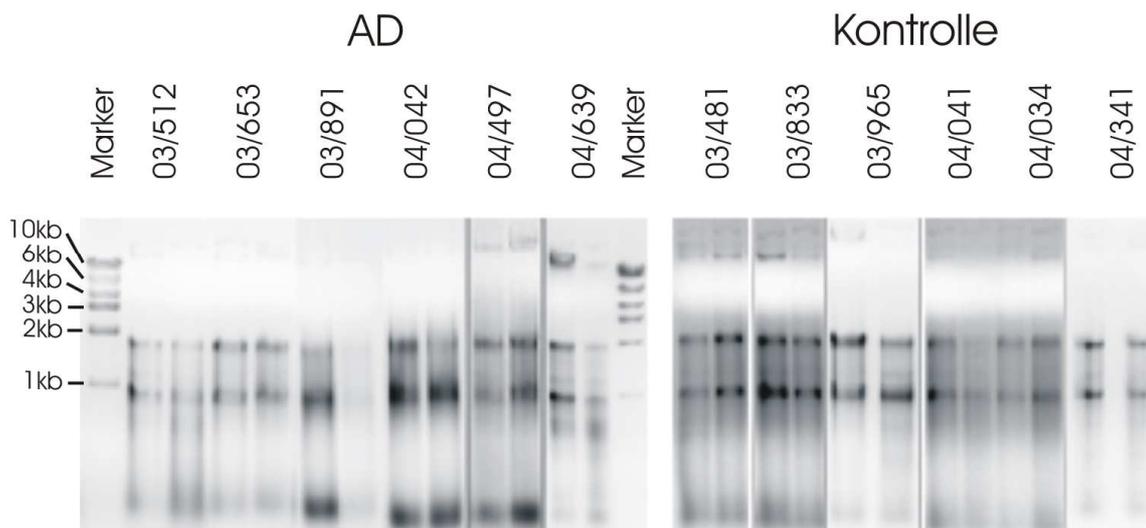
**Tabelle 6: Gebildete Gruppen zur weiteren Analyse.** *Gruppierung erfolgte aufgrund der Proteinkonzentration der A $\beta$ 1-40 Fragmente in den gesamt Proteinextrakten.*

		ELISA Unlösliches Ab 1-40 $\mu\text{g/ml}$ pro $\mu\text{g}$ Gesamt-Protein	
		Frontal	Temporal
Alzheimer erkrankt	03/512	11,11	9,57
	03/653	10,48	4,48
	03/891	15,79	11,41
	04/042	3,52	8,32
	04/497	3,83	9,65
	04/639	4,38	2,49
Kontrollen	03/481	0,18	0,05
	03/833	0,27	0,10
	03/965	0,13	0,02
	04/034	0,06	0,09
	04/041	0,11	0,10
	04/341	0,10	0,02

## D. 2. Qualitätskontrolle der extrahierten RNA

### 2.1. RNA Kontrolle mittels Gelelektrophorese

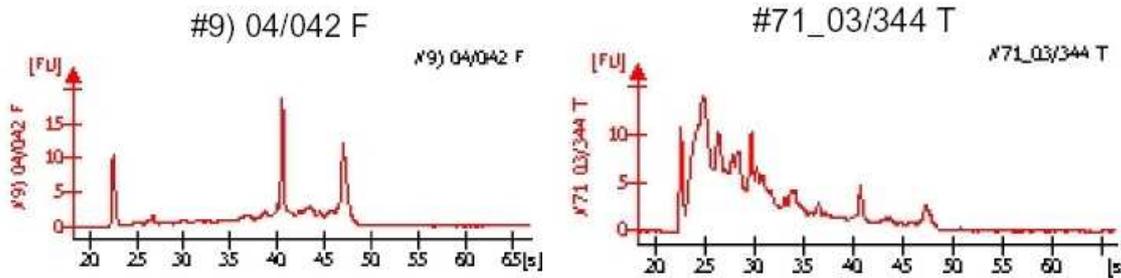
Um die Qualität der aus den humanen post mortem Proben extrahierten RNA zu überprüfen, wurden diese mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Ergebnisse dieser Kontrolle sind in Abbildung 7 zu sehen. Da man in allen Proben sowohl die 18S als auch die 28S Bande erkennt, wurde diese Proben für die Mikroarrayanalyse verwendet.



**Abbildung 7: Gelelektrophoretische Analyse der extrahierten RNA aus den verschiedenen humanen Gewebeproben.** Gezeigt sind jeweils die Proben des Frontal- (linke Spur) und des Temporallappens (rechte Spur) einer Probe.

### 2.2. RNA Kontrolle mittels Bioanalyser Technology

Zur genaueren Bestimmung einer vorhandenen Degradation der extrahierten RNA wurden alle Proben mittels der „Bioanalyser Technology“ analysiert. Dabei erfolgt eine Trennung nach der Größe der vorhandenen RNA Moleküle und die Quantifizierung eines interkalierenden Farbstoffes mittels Fluoreszenzmessung. Diese Analyse bestätigte in weiten Teilen die gelelektrophoretische Analyse (s. IV.D.2.1). Exemplarisch sind zwei Ergebnisse des Bioanalyzers in Abbildung 8 dargestellt. Man erkennt, dass die RNA der Probe 04/042 F gut erhalten ist, da beide 18S und 28S rRNA Signale vorhanden sind und es wenig Hintergrundsignale gibt. Probe 03/344T zeigt hingegen eine stark degradierte RNA mit einem breiten Berg von unterschiedlich großen RNA-Fragmenten.



**Abbildung 8: RNA-Profile zweier RNAs aus einer Messung des Bioanalyzers.**

Links eine gut erhaltene RNA mit klaren rRNA Signalen. Das Signal bei ~22s stammt vom Marker, und die Signale bei ~40s und ~47s zeigen die 18S und 28S rRNA. Rechts eine deutlich degradierte Probe mit einem breiten Berg und nur kleinen Signalen der rRNAs.

### D. 3. Genexpressionsanalyse mittels Microarray Technology

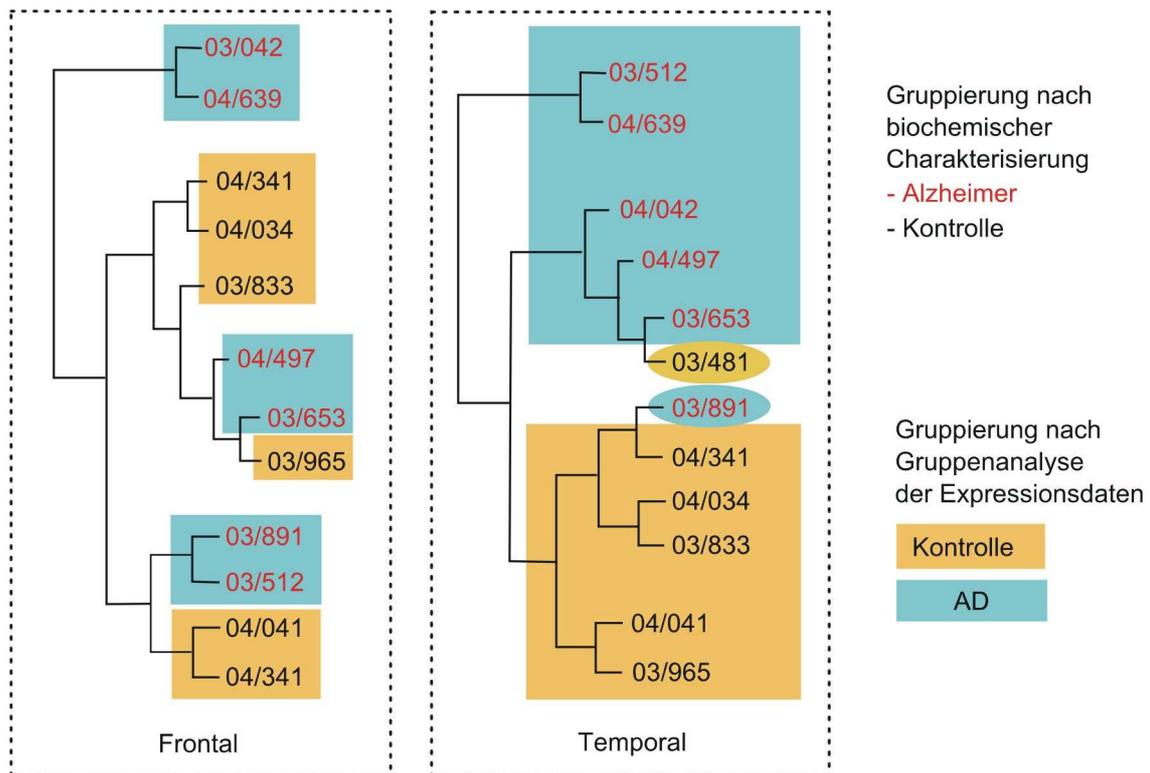
#### 3.1. Gruppenanalyse zur Validierung der untersuchten Gruppen

Zur Identifizierung von Extremwerten innerhalb der Gruppen, wurden die Proben der Kontroll- und die AD-Gruppe einer Gruppenanalyse unterzogen. Dabei werden jene Proben, welche in ihren Expressionswerten die größte Korrelation zueinander zeigen, einander zugeordnet. Dies ergibt zwei Gruppen, welche die Proben der erkrankten bzw. der nicht erkrankten Probanden enthalten. Falls die Proben jedoch keine signifikanten Unterschiede haben oder ein anderer Effekt die Unterschiede der Erkrankung überlagert, würde es zur Bildung von anderen Gruppen kommen. Einzelne falsch zugeordnete Proben sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Extremwerte, welche in den weiteren Analysen entweder genauer betrachtet oder vollständig herausgenommen werden müssen.

Bei der Analyse des frontalen Gewebes zeigte sich nicht die erwartete Auftrennung in zwei Gruppen, sondern die Bildung von Gruppen mit Proben der AD und Kontrollgruppe. Dies kann mehrere Gründe haben.

1. Die Unterschiede der Geneexpression zwischen der beiden Einheiten sind nicht groß genug.
2. Die Klassifizierung in AD und Kontrolle wurde nicht eindeutig durchgeführt.
3. Die Schwankungen der RNA-Qualität überlagern die Unterschiede der Gruppen.

Die Analyse der temporalen Gewebe hingegen ergab ein differenziertes Ergebnis, welches die AD- und Kontroll-Proben – bis auf zwei Ausreißer – voneinander trennte. So ergab sich ein Hauptast mit den Kontroll Proben und zwei Äste mit den AD-Proben. Nur die Proben 04/481 und 03/891 wurde entgegen unseren Erwartungen gruppiert, da sie jeweils in die falsche Gruppe sortiert wurden. Deshalb wurden sie in den weiteren Analysen nicht mit aufgenommen.



**Diagramm 13: Gruppenanalyse der gewählten Proben getrennt nach Proben des Frontal- (linkes Diagramm) und Temporallappens (rechtes Diagramm).** Die Gruppenanalyse ordnet jeweils die Proben zueinander, welche sich untereinander am ähnlichsten sind. Die biochemische Gruppierung der Proben (s. IV.D.1.2) ist mittels der Schriftfarbe – AD: rot, Kontrolle: schwarz – und die aus der Analyse ermittelte Gruppierung mittels der Hintergrundfarbe – AD: hellblau, Kontrolle: orange – verdeutlicht.

Diese Ergebnisse führten zu der Entscheidung, dass die Proben des frontalen Lappens nicht weiter analysiert wurden, da die Gruppierung in eine erkrankte (AD) und eine nicht erkrankte (Kontroll) Gruppe nicht erfolgte und somit die Bestimmung differentieller Genexpression nicht möglich war. Die folgenden Analysen wurden dementsprechend nur mit den Proben des Temporallappens durchgeführt.

### **3.2. Grundlegende Analyse der Genexpressionsdaten**

Um in den Proben des Temporallappens differentiell exprimierte Gene zwischen Kontrollen und AD zu identifizieren, wurden diese mittels eines t-Tests analysiert. Dabei wurde als Grenzwert für die differentielle Expression ein Wert von 2 und für die Signifikanz ein Wert unter 0.005 verwendet, um Gene zu identifizieren, welche bereits eine relativ niedrige Expressionsänderung zeigten. Dies führte zu einer großen Ergebnisgruppe, welche 283 Gene umfasste. Die Liste ist im Anhang 4 angehängt.

Da die Liste mit mehr als 280 Genen zur detaillierten Analyse einzelner Gene noch zu groß war, wurden die Daten weiter eingengt. Dazu wurde aus den Daten durch Erhöhung der minimalen Signifikanz von  $P < 0,005$  auf  $P < 0,001$  eine weitere Ergebnisgruppe ermittelt. Dies reduzierte die Gruppen auf 104 Gene, denen eine bekannte Funktion zugeschrieben werden kann. Diese Gene sind in Tabelle 7 zusammen mit der gemessenen relativen Genexpression  $F$  und der mittels des t-Tests berechneten Signifikanz  $P$  aufgeführt. Aus diesen wurden einige Gene ausgewählt, welche im Bezug zur Alzheimer-Erkrankung von besonderem Interesse erschienen. Diese sind in Tabelle 7 grau unterlegt. Es sind Gene, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind (z.B.:  $TGF\alpha$ , CNPase, HSP70), Gene, die bereits eine Korrelation zu AD gezeigt haben (z.B.: CD47, cholinerge Rezeptoren) sowie Gene, die an wichtigen Signaltransduktionswegen (FGF1) beteiligt sind.

**Tabelle 7: Signifikant unterschiedlich exprimierte Gene des Temporallappens in AD vs. Kontrolle.** Als signifikant reguliert wurden Gene mit den Werten einer relativen Genexpression  $F > 2$  und einer Signifikanz  $P < 0,001$ , definiert. Grau unterlegt: Von Interesse erscheinende Gene in Bezug auf die Alzheimer Erkrankung

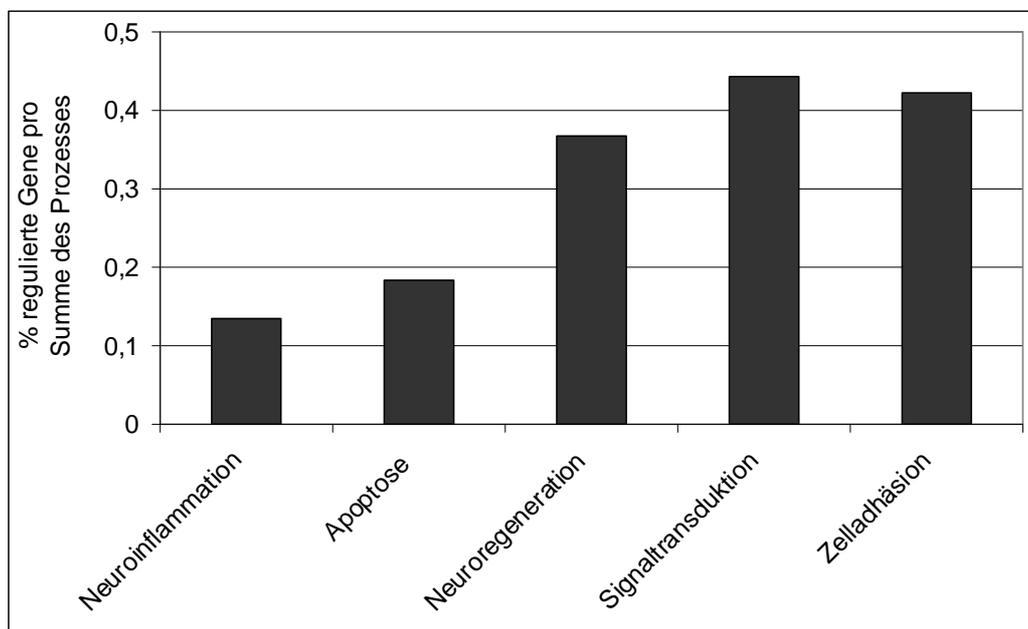
Genname	Relative Genexp. F	Signifikanz P
Ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	0,05	0,0000
Similar to ataxin 2-binding protein 1 isoform 4; hexaribonucleotide binding protein 1	0,18	0,0006
Leucyl/cystinyl aminopeptidase	0,19	0,0000
Cholinergic receptor, muscarinic 3	0,21	0,0009
Calneuron 1	0,24	0,0009
Potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1	0,24	0,0009
Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 3	0,24	0,0003
Transmembrane emp24 protein transport domain containing 4	0,29	0,0002
Piccolo (presynaptic cytomatrix protein)	0,30	0,0006
RNA binding motif protein 9	0,32	0,0001
Neurexin 1	0,34	0,0001
Vacuolar protein sorting 13A (yeast)	0,35	0,0007
PDZ domain containing 10	0,37	0,0004
LIM domain only 4	0,38	0,0000
Mannose receptor, C type 1	0,40	0,0001
Spermatogenesis associated, serine-rich 2	0,40	0,0004
CD47 antigen	0,42	0,0008
Fasciculation and elongation protein zeta 2 (zygin II)	0,44	0,0009
Likely ortholog of mouse metal response element binding transcription factor 2	0,46	0,0004
PR/SET domain containing protein 8	0,47	0,0004
Transmembrane 4 superfamily member 9	0,47	0,0005
MYC binding protein 2	0,48	0,0007
Microphthalmia-associated transcription factor	2,03	0,0003
LCCL domain containing cysteine-rich secretory protein 1	2,05	0,0005
Lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase (Wolman disease)	2,05	0,0007
Transmembrane protein 10	2,06	0,0003
Formin binding protein 1	2,07	0,0005
Blood vessel epicardial substance	2,09	0,0001
Brain specific protein	2,09	0,0002
Contactin associated protein-like 4	2,10	0,0003
Formin-like 2	2,10	0,0002
SP110 nuclear body protein	2,10	0,0007
Ring finger protein 130	2,11	0,0002
Transforming growth factor, alpha	2,11	0,0007
Integrin, beta 1 (antigen CD29)	2,13	0,0002
Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	2,14	0,0002
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), 1	2,16	0,0005
2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	2,18	0,0006
Lysosomal-associated membrane protein 2	2,20	0,0002
Septin 4	2,22	0,0008
Heat shock 70kda protein 2	2,25	0,0005

Genname	Relative Genexp. F	Signifikanz P
Gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	2,26	0,0007
Fibroblast growth factor 1 (acidic)	2,27	0,0003
Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle	2,27	0,0008
Neuron navigator 3	2,27	0,0008
Phosphodiesterase 7A	2,27	0,0001
Ankyrin repeat domain 13	2,28	0,0007
Elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 1	2,28	0,0003
Implantation-associated protein	2,28	0,0000
Transmembrane and coiled-coil domains 3	2,28	0,0006
Aspartoacylase (aminoacylase 2, Canavan disease)	2,29	0,0009
Radixin	2,31	0,0004
Serum/glucocorticoid regulated kinase-like	2,31	0,0003
HRAS-like suppressor 3	2,32	0,0002
Lipin 1	2,34	0,0006
Myosin IE	2,34	0,0004
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)	2,40	0,0003
Septin 8	2,41	0,0001
Chloride intracellular channel 4	2,42	0,0004
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	2,46	0,0006
Niemann-Pick disease, type C1	2,46	0,0003
Lysosomal-associated membrane protein 2	2,49	0,0008
Transmembrane protein 38B	2,50	0,0003
Glycolipid transfer protein	2,51	0,0003
Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	2,52	0,0001
Rhotekin	2,55	0,0006
V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	2,56	0,0001
Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	2,58	0,0004
Vitelliform macular dystrophy (Best disease, bestrophin)	2,58	0,0004
Chemokine-like factor super family 5	2,60	0,0007
Dedicator of cytokinesis 10	2,63	0,0005
Discoidin domain receptor family, member 1	2,64	0,0005
LIM domain binding 3	2,64	0,0007
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	2,64	0,0002
Prostate cancer associated protein 6	2,65	0,0007
Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8	2,69	0,0003
Phosphodiesterase 8A	2,69	0,0006
Ras association (ralgds/AF-6) domain family 2	2,69	0,0002
Solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	2,70	0,0010
Zinc finger, BED domain containing 3	2,71	0,0000
Anillin, actin binding protein (scraps homolog, Drosophila)	2,73	0,0003
Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	2,76	0,0008
Adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit	2,77	0,0000
Spermatogenesis associated 13	2,90	0,0002
Septin 10	2,91	0,0000
Layilin	2,94	0,0002
Von Willebrand factor A domain-related protein	2,94	0,0003
RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	2,98	0,0001
Proline rich membrane anchor 1	3,06	0,0006
Family with sequence similarity 38, member B	3,09	0,0000
Prostate-specific membrane antigen-like	3,10	0,0008

Genname	Relative Genexp. F	Signifikanz P
Cadherin 19, type 2	3,23	0,0009
Folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1	3,25	0,0003
Pleckstrin homology domain containing, family H member 1	3,39	0,0004
TPR domain, ankyrin-repeat and coiled-coil-containing	3,46	0,0008
Solute carrier family 31 (copper transporters), member 2	3,53	0,0005
Tight junction protein 2 (zona occludens 2)	3,58	0,0007
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2	3,59	0,0001
UDP glycosyltransferase 8	3,65	0,0008
Leucine rich repeat containing 1	4,01	0,0001
Suppression of tumorigenicity 18 (zinc finger protein)	4,08	0,0004
Integrin, alpha 2 (CD49B)	4,24	0,0005
Collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)	4,38	0,0003
FCH and double SH3 domains 2	7,66	0,0001

Um eine genauere Aussage über die in der AD signifikant regulierten Prozesse zu machen, wurde diese Liste wie in der Einleitung beschrieben bezüglich der regulierten Prozesse analysiert. Das Ergebnis ist in Diagramm 14 gezeigt.

Die Stärkste Beteiligung zeigt die Signaltransduktion, in ähnlichem ausmaß wie die Zelladhäsion. Gefolgt werden diese von der Neuroregeneration. Die geringste Beteiligung zeigen die Prozesse der Neuroinflammation und der Apoptose.



**Diagramm 14: Beteiligung der analysierten biologischen Prozesse in der Alzheimer Erkrankung.** Der Vergleich der beteiligten Prozesse zeigt eine starke Beteiligung Neuroregenerativer Prozesse und der Signaltransduktion.

### 3.3. Analyse der an der APP-Prozessierung beteiligten Gene

Zur genaueren Untersuchung der verschiedenen Proteine bzw. Gene, welchen eine Beteiligung an der Alzheimer Erkrankung zugeschrieben wird, wurden im weiteren folgende drei Prozesse ausgewählt und die beteiligten Proteine innerhalb unserer Daten analysiert.

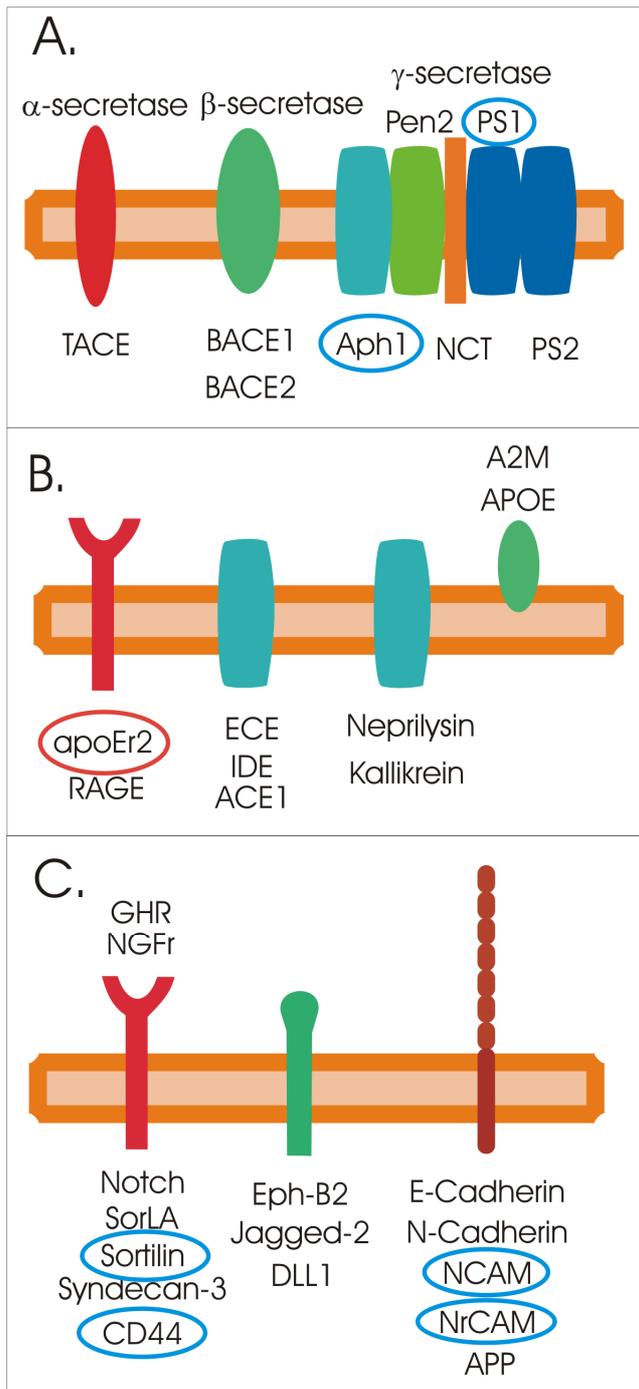
- A. Die APP-Prozessierung und Bildung der A $\beta$ -Plaques
- B. Prozesse der A $\beta$ -Peptid-Beseitigung
- C. Substrate der APP prozessierenden  $\gamma$ -Sekretase

Die in diesen Prozessen beteiligten Proteine wurden mit der Genliste im Anhang 4 aus 3.2 verglichen. In den Abbildungen A-C sind jeweils die Proteine der einzelnen Prozesse gezeigt. Dabei sind jene, welche bei unseren Untersuchungen identifiziert wurden, umrandet. Gene, welche eine erhöhte Expression zeigten, wurden blau und Gene, welche eine erniedrigte Expression zeigten, rot markiert.

Aus allen drei Gruppen konnten jeweils einige Proteine identifiziert werden, deren Gene eine veränderte Expression zeigten. Bei der APP Prozessierung konnten signifikante Veränderungen der  $\gamma$ -Sekretase Untereinheit PS1 ( $F = 1,9$ ,  $P = 0,001$ ) und APH-1a ( $F=1,8$   $P=0,001$ ) gemessen.

Innerhalb der Prozesse der A $\beta$ -Peptid-Degradation und -Beseitigung wurde keine Erhöhung der Expression der verschiedenen Gene gemessen. Der ApoE-Rezeptor, welcher an der Beseitigung der Plaques beteiligt ist, zeigte jedoch eine verringerte Genexpression ( $F=0,6$ ,  $P = 0,0013$ ).

Unter den Substraten der  $\gamma$ -Sekretase zeigten einige eine erhöhte Expression, aber keines der betrachteten Gene wurde herabreguliert. Erhöhte Expression zeigten CD44 ( $F=6,06$ ;  $P=0,0015$ ), NCAM ( $F=2,13$   $P=0,0013$ ), sowie Sortilin 1 ( $F=1,9$   $P=0,0003$ ).



**Abbildung 9: Darstellung an der Alzheimer Erkrankung**

**beteiligten Proteine mit deren veränderter Genexpression.**

In

Abbildungen A und B sind

verschiedene Proteine gezeigt,

welche an der Bildung bzw. der

Beseitigung der Aβ-Plaques

beteiligt sind. Abbildung C zeigt

verschiedene Substrate der

γ-Sekretase. In den Abbildungen

sind jene Proteine hervorgehoben,

welche in unseren Versuchen eine

veränderte Expression zeigten.

Dazu sind verstärkt exprimierte

Gene blau und vermindert

exprimierte Gene rot umrandet.

#### D. 4. Validierung der Mikroarray-Daten mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR)

Um die Daten der Mikroarray-Analyse zu unterstützen und zu überprüfen, wurde die gemessene Regulation einer Auswahl von Genen mittels Messung durch qRT-PCR validiert. Zu diesem Zweck wurden aus den in Abschnitt 3.2 identifizierten Genen Beispiele verschiedener Funktionen ausgewählt, um eine breite Abdeckung verschiedener Prozesse zu erreichen. Dabei wurden sowohl Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle, aber auch Struktur- und Signalproteine

gewählt. Tabelle 8 zeigt, dass sich alle Mikroarraydaten außer die des neuronalen Rezeptors GPR37 mittel qRT-PCR bestätigt lassen.

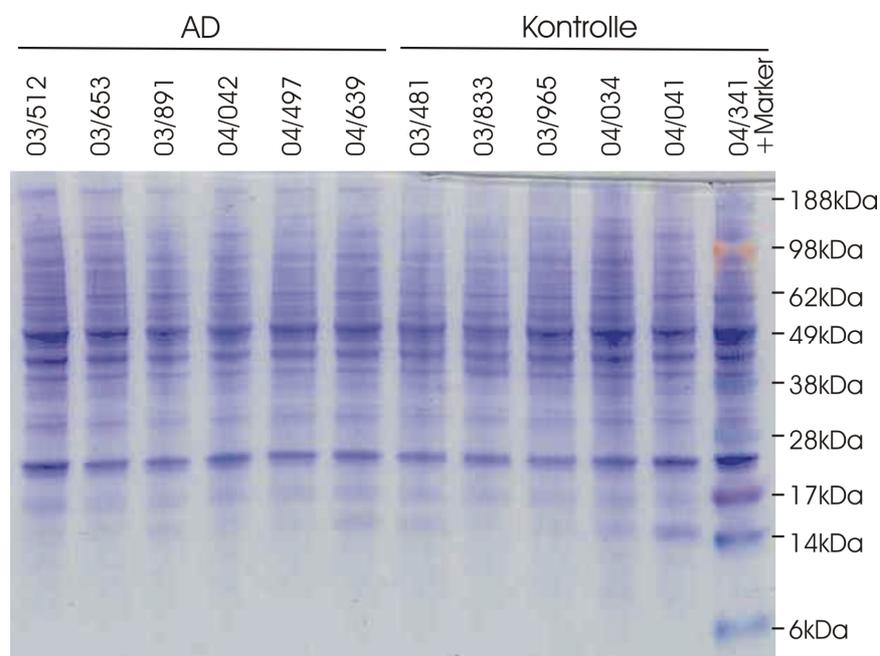
**Tabelle 8: Vergleich der Expressionen zwischen Microarray und qRT-PCR.**

	Mikroarray		qRT-PCR	
	rel. Genexp F	Signifikanz P	rel. Genexp F	Signifikanz P
AMPA2	0,4	0,004	0,4	0,164
KIF5b	1,6	0,004	4,6	0,141
MOBP	2,7	0,001	6,4	0,054
CD44	6,2	0,002	11,7	0,005
NCAM	2,1	0,002	2,8	0,229
Transferrin	2,1	0,004	6,1	0,790
GPR37	4,1	0,002	1,1	0,668

## D. 5. Proteinchemische Validierung der Genexpressionsdaten

### 5.1. Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der isolierten Proteine

Um die Extraktion und das Lösen der Proteinproben zu verfolgen, wurden gleiche Mengen Protein mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Coomassie gefärbt. Wie das Gel in Abbildung 10 zeigt, war die Proben homogen und es gab keine sichtbaren Degradationen.



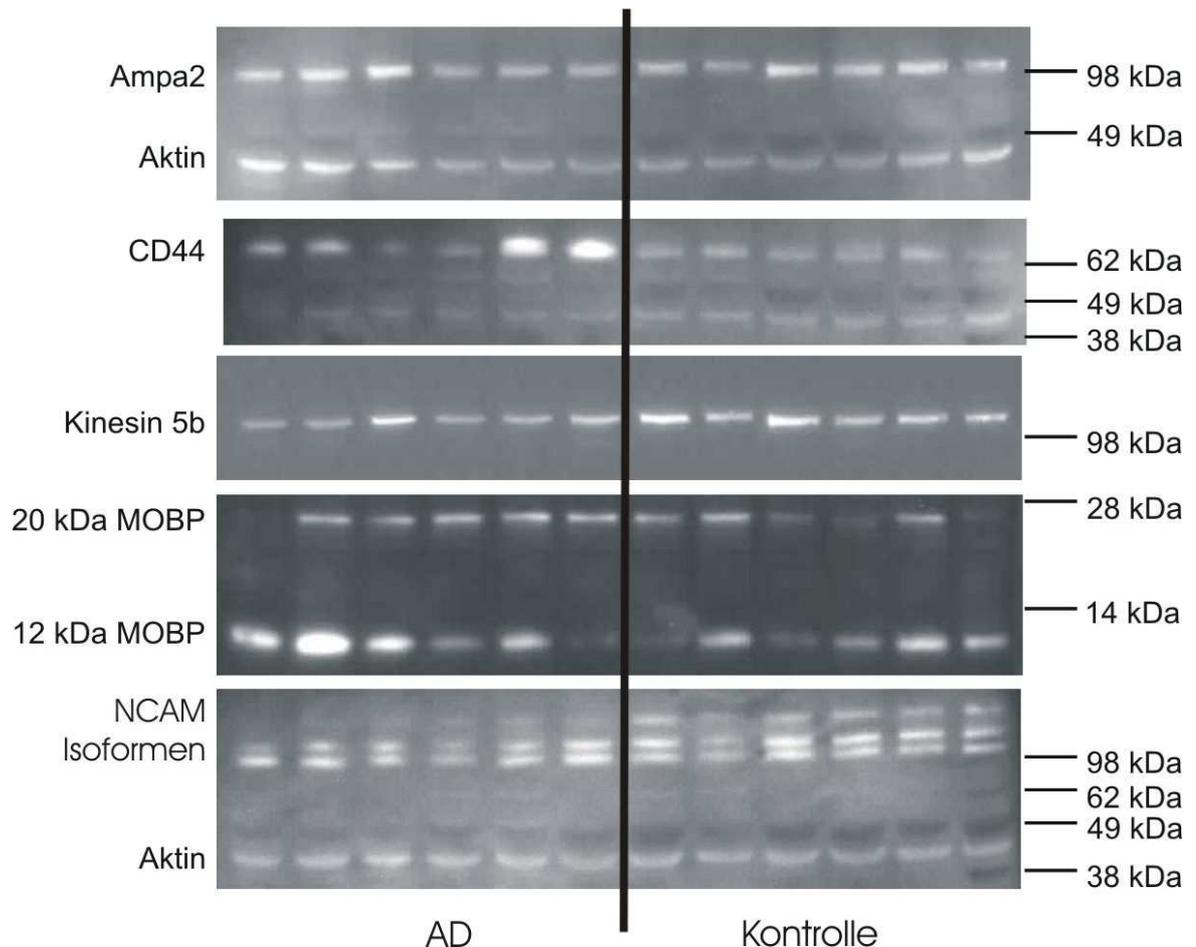
**Abbildung 10: Analyse der extrahierten humanen Proteinproben des Temporallappens.** Coomassie Blue gefärbtes 4-12% Bis-Tris Gel. Das Ergebnis bestätigte durch die gleichmässigen Proteinbanden die erfolgreiche Extraktion.

## 5.2. Validierung via Western Blot

Zur Validierung der gemessenen Genexpression auf Proteinebene wurde für ausgewählte Gene die Proteinexpression mittels Western Blot bestimmt. Diese Daten wurden dann mit den Daten der qRT-PCR und der Mikroarray Analyse verglichen. Da diese Analysen teilweise nur geringe Änderungen der Proteinexpression zeigten, war es besonders wichtig, für jede Probe gleiche Mengen an Protein aufzutragen. Dies wurde durch Einsetzen gleicher Gesamtproteinmengen erfüllt, aber anschließend durch Messung der Aktin-Expression auf jedem Blot nochmals sichergestellt.

In *Abbildung 11* sind die Ergebnisse der verschiedenen Western Blots gezeigt. Für jeden Blot wurde zusätzlich noch ein Blot mit anti-Aktin Antikörper durchgeführt. In den Fällen, in denen ein gleichzeitiger Blot mit zwei Antikörpern möglich war, wurde dieses durchgeführt und in der *Abbildung* gezeigt (AMPA2 und NCAM). Falls dies nicht möglich war, wurde der Blot sequentiell mit den beiden Antikörpern analysiert. Die gemessenen Intensitäten wurden dann auf die gemessenen Aktin Intensitäten normalisiert.

Neben der erfolgreichen Bestimmung der verschiedenen Proteinexpressionen fielen zusätzlich noch zwei weitere Beobachtungen auf. Bei der Analyse des Blots mit anti-MOBP Antikörper zwei spezifische Banden gemessen. Diese ließen sich den Isoformen der Länge 12kDa und 20 kDa zuordnen (*Yool D et al. 2002*), die jedoch beide die erhöhte Genexpression bestätigen. Weiterhin zeigte der Blot mit anti-NCAM Antikörper drei spezifische Einzelbanden. Diese Banden konnten den Isoformen der Länge 110kDa, 120kDa und 140 kDa zugeordnet werden.

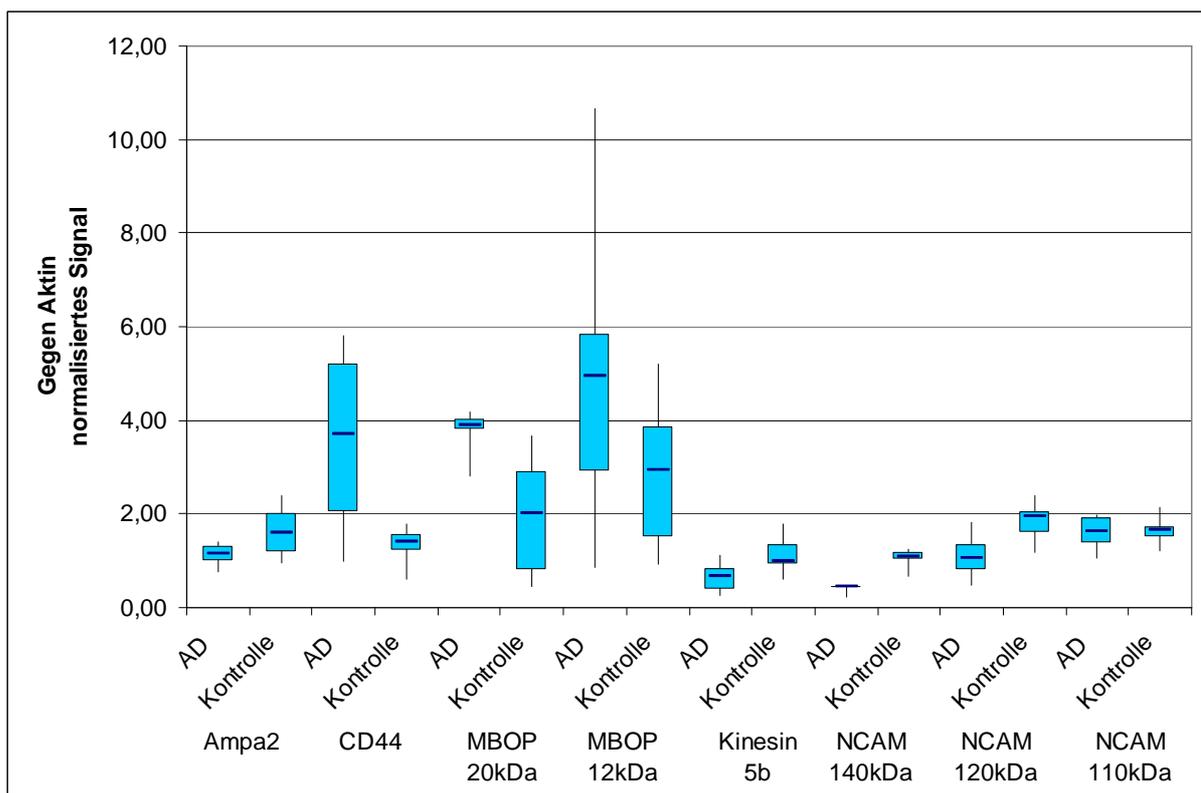


**Abbildung 11** Western Blot-Analyse der verschiedenen analysierten Proteine humanen AD- und Kontroll-Proben. Die Blots wurden mit den Antikörpern anti-AMPA2 (108kDa), anti-CD44 (80kDa), anti-Kinesin 5B (110kDa), anti-MOBP (20kDa und 12kDa), sowie anti-NCAM (140kDa, 120kDa, 110kDa) analysiert. Auf den Blots gegen AMPA2 und NCAM sind zusätzlich noch die Banden des anti-Aktin (42kDa) Antikörpers gezeigt, welche zur Normalisierung verwendet wurden.

Zur Validierung wurden jeweils die Werte der Gen- und Proteinexpression verglichen. Zu den berechneten relativen Expressionen der verschiedenen Methoden wurde zusätzlich die Signifikanzen mittels eines t-Tests berechnet und diese miteinander verglichen. Ein Ergebnis wurde bei einer Signifikanz von  $P < 0,05$  als signifikant (gelb hervorgehoben) und bei  $P < 0,01$  als hoch signifikant (rot hervorgehoben) bezeichnet.

**Tabelle 9: Vergleich der mit verschiedenen Methoden bestimmten Expressions-Verhältnisse.** Für jede Methode ist sowohl die berechnete relative Expression (rel. Exp) sowie die Signifikanz (P) gezeigt.

		Microarray		qRT-PCR		Western Blot		ELISA	
		rel. Exp	P	rel. Exp	P	rel. Exp	P	rel. Exp	P
Kinesin 5b		1,6	0,003	4,6	0,141	0,69	0,057		
Ampa 2		0,4	0,015	0,4	0,164	0,73	0,081		
CD 44		6,1	0,001	11,7	0,005	2,64	0,023	1,18	0,123
MOBP	20 kDa	2,6	0,002	6,4	0,054	1,95	0,021		
	12 kDa					1,68	0,204		
NCAM	140kDa	2,1	0,001	2,83	0,229	0,39	0,000		
	120kDa					0,53	0,018		
	110kDa					0,99	0,842		
Transferrin		2,04	0,004	6,1	0,790			1,23	0,169



**Diagramm 15: Ergebnisse der Western Blot Analysen.** Gezeigt sind die Mediane der normalisierten Gruppen AD und Kontrolle der analysierten Proteine, mit den errechneten Quartilen, Minima und Maxima..Die Normalisierung wurde dabei stets auf die Intensität des Aktins durchgeführt.

Aus den analysierten Daten geht hervor, dass sich die Tendenz der positiven oder negativen Regulation der verschiedenen Gene, die mittels Microarray bzw. mittels

qRT-PCR bestimmt wurde, meist auf Proteinbasis bestätigen lässt. Dieses bestätigt sich sowohl für die einzelnen Proben als auch für den Mittelwert der Gruppen. Allerdings weisen die Ergebnisse, wie bereits in den qRT-PCR Analysen gefunden wurde, teilweise nur eine geringe Signifikanz auf. Das Einzige Protein bei dem Protein- und Genexpressionsanalyse unterschiedliche Tendenzen zeigen, ist NCAM1.

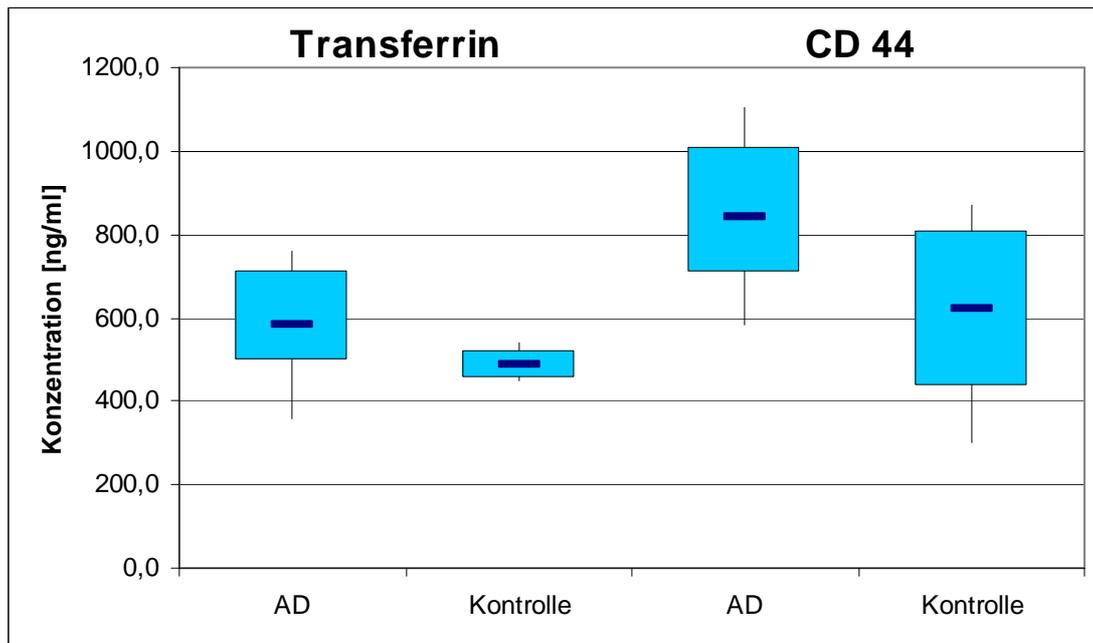
### **5.3. Validierung mittels immunhistochemischer Methoden**

Um die Genexpressionsdaten weiter zu bestätigen, wurde versucht, immunhistochemische Färbungen von Schnitten der Gewebe durchzuführen, um diese dann innerhalb der Gruppen AD und Kontrolle zu vergleichen. Diese Färbungen wurden für die Proteine GPR37, MOBP und NCAM durchgeführt. Leider gelang es aufgrund der schlechten Gewebequalität nicht, die Färbungen ausreichend zu optimieren um signifikante Messungen durchführen zu können.

### **5.4. Validierung mittels ELISA-Messungen**

Die Validierung mittels ELISA-Assay wurde für die Proteine MBP, Transferrin und CD44 durchgeführt. Von diesen ausgewählten Analysen ergaben nur die Messungen des CD44 und des Transferrins auswertbare Daten. Die Analysen ergaben ähnlich wie die Western Blot Analysen eine Bestätigung der Tendenz der veränderten Expression welche in der qRT-PCR Analyse bestimmt wurde. Jedoch war bei diesen Analysen die Signifikanz der Analysen noch geringer als jene der vorhergehenden Analysen.

Die Ergebnisse der beiden Analysen sind in Tabelle 9 (s.o.) und Diagramm 16. gezeigt. Man erkennt für beide Proteine eine erhöhte Expression in der AD, welche die erhöhten Genexpression bestätigt, aber keine Signifikanz erreicht.



**Diagramm 16: Ergebnisse des ELISA Analyse der Proteine Transferrin und CD44.** Aufgetragen sind die Mediane der gemessenen Konzentrationen der beiden Gruppen AD und Kontrolle mit den errechneten Quartilen, Minima und Maxima.

### 5.5. Zusammenfassung der Validierung

Die Western Blot-Analysen bestätigten die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen. Man erkennt jeweils Tendenzen einer veränderten Proteinexpression, welche in den meisten Fällen den in der qRT-PCR erhaltenen Tendenzen entspricht. Diese Tendenzen konnten innerhalb der Gruppen jedoch nur mit teils sehr geringer Signifikanz gezeigt werden.

## **E. Genexpressionsanalyse von angereicherten Endothelzellen von Alzheimerpatienten**

Verschiedene Untersuchungen berichten davon, dass in der Alzheimer-Erkrankung die Blutgefäße des Gehirns eine wichtige Rolle bei der Pathologie spielen. Es gibt viele Hinweise aus der Literatur, dass der Abtransport der Amyloid Plaques zu einem wesentlichen Teil über die Blutgefäße erfolgt. So scheint ein Transport über Rezeptoren und Transporter zu erfolgen, welcher die Verlagerung des Amyloids vom Gehirn ins Blut unterstützt (Deane R et al. 2004, Zlokovic BV et al. 1996). Dies bestätigte sich bereits bei der Analyse der beschriebenen Transporter und Rezeptoren des Amyloids in dieser Studie (s.IV.D.3.3)

Bisher wurde nur Material des gesamten Hirnparenchyms untersucht wodurch Gene, welche nur in den Endothelzellen verändert exprimiert sind, nicht identifiziert werden könnten. Deshalb wurden aus den bisher analysierten Proben die Endothelzellen angereichert und gesondert analysiert. Zu diesem Zweck wurde eine Methode etabliert, um Gefäße aus gefrorenen Proben anzureichern und aus diesen die RNA zu extrahieren. Beim Einfrieren der Gewebe kommt es bereits zu Schädigungen der Zellen durch Gefrierartefakte, weshalb eine Isolation mittels Filtration oder Zentrifugation der Gefäße, welche den rigiden Zusammenhalt der Gefäße ausnutzt, nicht möglich war. Deshalb musste eine andere Methode verwendet werden, bei der der Schaden im Gewebe keine Auswirkung haben würde. Zu diesem Zweck bot sich die Methode der „Laser-capture microdissection“ an, bei der mittels Positionieren eines Laserstrahls bestimmte Areale eines Gewebeschnittes ausgesucht werden, welche dann durch den Strahl vom übrigen Gewebe sezirt werden.

Um die Zellen im Mikroskop besser identifizieren zu können, wurde eine Färbung verwendet, welche zum Einen Gefäße spezifisch anfärbt und zum Anderen schnell durchführbar ist, um eine weitere Degradation der RNA zu vermeiden. Dazu wurde die Färbung der Gefäße mittels RCA-1 verwendet (Moisilovic-Petrovic J et al. 2004). Nach erfolgreicher Dissektion der Gefäße wurde die optimale Methode zur RNA-Extraktion durch den Vergleich mehrerer Verfahren ermittelt. Ein Vergleich der RNA-Extraktion aus Gesamtgewebe und isolierten Gefäßen erfolgte im Anschluss mittels der Quantifizierung der Genexpression gefäßspezifischer Gene.

## E. 1. Etablierung der Laser Capture Microdissection (LCM) Methode

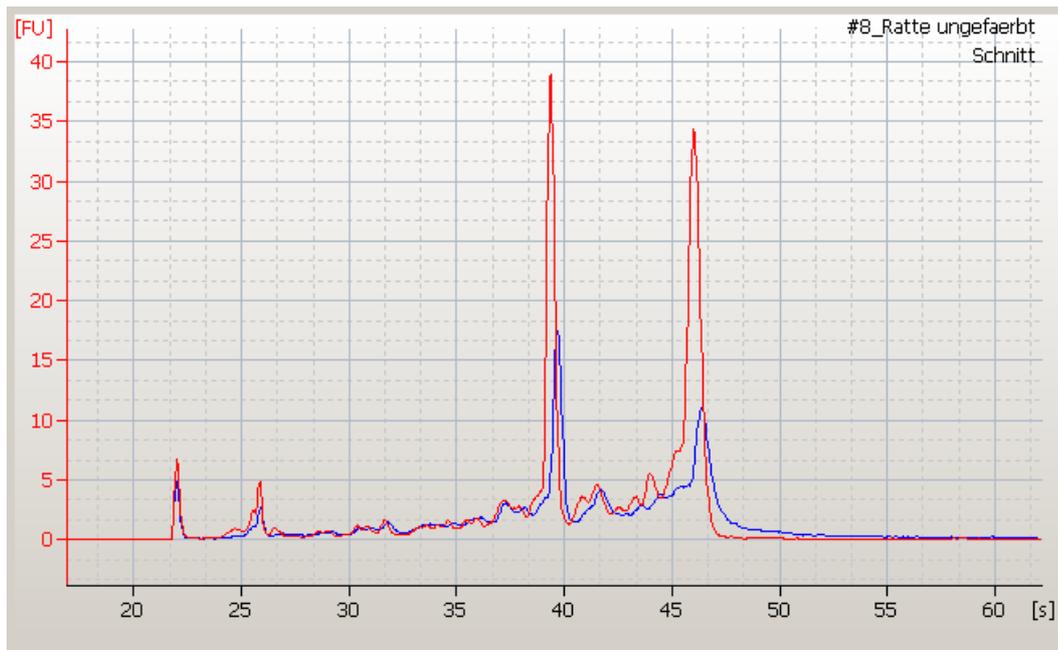
### 1.1. Blutgefäßextraktion

Zur Identifizierung der Gefäße sollte ein Lectin verwendet werden, welches spezifisch an Glykoproteine von Blutgefäßen bindet. Ein direkter Vergleich der beiden Lektine *Ricinus communis-agglutinin -1* (RCA-1) und *Ulex Europeaus Agglutinin 1* (UEA-1) auf murinen und humanen Schnitten ergab RCA-1 als optimales Färbungsreagenz. Durch Verwendung eines FITC markierten RCA-1 war die Erkennung der Zellen möglich.

Mit diesem Lektin wurde dann bestimmt, mit welcher Fixierungsmethode eine gute RNA-Extraktion möglich war. Dazu wurden die folgenden drei Fixierungsmöglichkeiten verglichen:

- 1 min Acetone bei 4°C
- 1 min PFA (4%) bei RT
- 1 min Ethanol (75%) bei RT

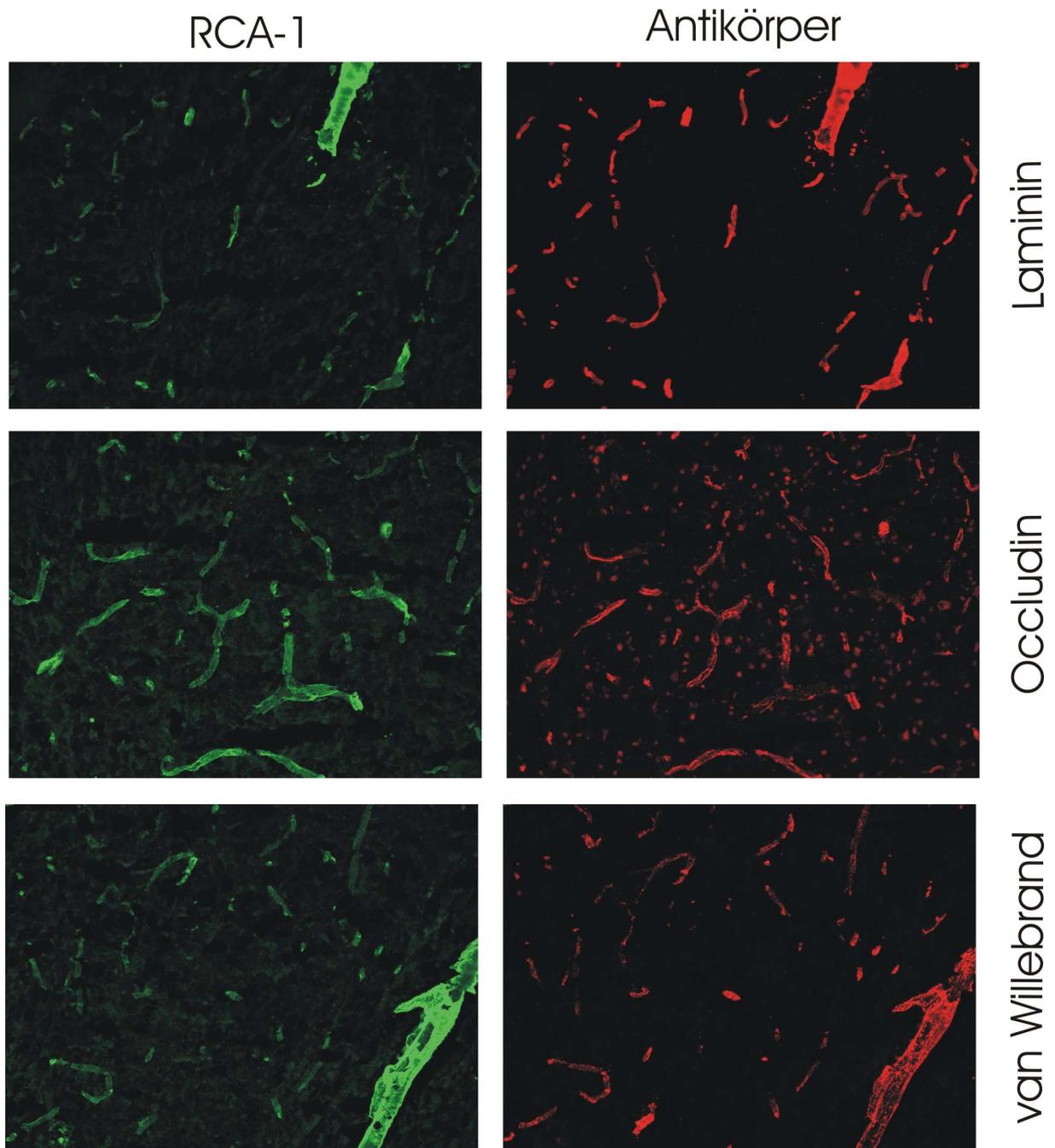
Es zeigte sich, dass nach der Fixierung mit PFA keine RNA-Extraktion mehr möglich war und dass nach der Ethanolfixierung eine größere Menge RNA als nach der Acetonfixierung gewonnen werden konnte. Daher wurde diese Methode weiterverwendet. Als nächstes wurde bestimmt, ob es durch die Färbemethode zu einer Degradation der RNA kommt. Dazu wurde die RNA aus einem gefärbten und einem ungefärbten Schnitt extrahiert und die Qualität mittels einer Bioanalyser-Analyse verglichen. Diagramm 17 zeigt, dass nach der Färbung wohl die RNA-Menge reduziert ist, die Qualität aber erhalten bleibt.



**Diagramm 17: Analyse der RNA Qualität vor (rot) und nach (blau) der RCA-1 Färbung.** Die Messung zeigt einen Rückgang der Menge an extrahierter RNA, zeigt aber keine zusätzliche Degradation.

## 1.2. Validierung der Bindungsspezifität von RCA-1

Um sicherzustellen, dass die verwendete Methode der Färbung von Endothelzellen mit RCA-1 spezifisch für Blutgefäße ist, wurden eine Doppelfärbung mit RCA-1 und Antikörpern gegen gefäßspezifische Marker wie von Willebrand-Faktor, Laminin (Endothelzellen) und Occludin (tight junctions) durchgeführt. Aus den Doppelfärbungen (Abbildung 12) erkennt man, dass bei allen drei Antikörpern eine hohe Übereinstimmung der Färbung mit RCA-1 zu erkennen ist. Dies belegt, dass mit der RCA-1 Färbung Gefäße identifiziert werden können.



**Abbildung 12: Bestätigung der gefäßspezifischen Färbung von RCA-1 mittels des Vergleichs mit Antikörperfärbungen gegen endothelzell spezifischen Proteinen.** Links: Färbung des Schnittes mit RCA-1. Rechts: Färbung des selben Schnittes mit verschiedenen Antikörpern.

### 1.3. Vergleich verschiedener RNA Extraktions-Kits

Da im weiteren Verlauf des Versuchs sehr geringe Mengen an Gewebematerial verwendet wurden und dabei trotzdem die Qualität und eine ausreichende Menge an RNA gewährleistet werden sollten, musste die beste Methode zur Extraktion der

RNA identifiziert werden. Dazu wurde RNA aus gefärbten Schnitten mit drei verschiedenen Kits extrahiert und die erhaltene Menge und Qualität mittels einer Bioanalyzermessung bestimmt. Um humanes Gewebe zu sparen wurden dazu Schnitte von gefrorenen Rattenhirnen verwendet. Um zu ermitteln, welche Extraktion die höchste Ausbeute erbringt, wurden drei Kits verglichen. Dazu wurde aus einem kompletten ungefärbten Schnitt die RNA extrahiert und die RNA Menge gemessen. Dies zeigte, dass mittels des Arcturus-Kits die größte Menge an RNA isoliert wurde. Um zu zeigen, dass sich die RNA-Qualität durch die Färbung nicht verändert, wurde anschließend RNA aus einem ungefärbten und einem gefärbtem Schnitt extrahiert und verglichen. Dies zeigte, dass es durch die Färbung zu einer Verringerung der extrahierten Menge, jedoch zu keiner erheblichen Degradation kommt.

### **1.4. Analyse der Anreicherung gefäßspezifischer Gene**

Um zu ermitteln um welchen Faktor die Anreicherung der Blutgefäße möglich war, wurden mit verschiedenen gefäßspezifischen Genen qRT-PCR Analysen durchgeführt. Diese Gene waren LAT1, Glut1, RGS5 und PECAM. Die Anreicherung dieser Gene wurde im Vergleich zu einer Probe aus Gesamtgewebe bestimmt. Dies ergab eine mögliche Anreicherung um den Faktor 2,5 – 5,5, welche für unsere Untersuchungen ausreichend erschien.

## **E. 2. Genexpressions Analyse**

### **2.1. RNA Extraktion**

Da in den Vorversuchen festgestellt wurde, dass aus einer Präparation selten mehr als fünf ng RNA erhalten wurden, und dies zu wenig ist für eine Standard Zwei-Zyklus Amplifikation für die Mikroarray Analyse, wurden von jedem Gewebeblock jeweils drei Schnitte extrahiert und die gewonnene RNA gepoolt. Weiterhin sollten durch die Analyse mittels des Bioanalyzers Proben mit schlechter Qualität bereits im Vorfeld aussortiert werden.

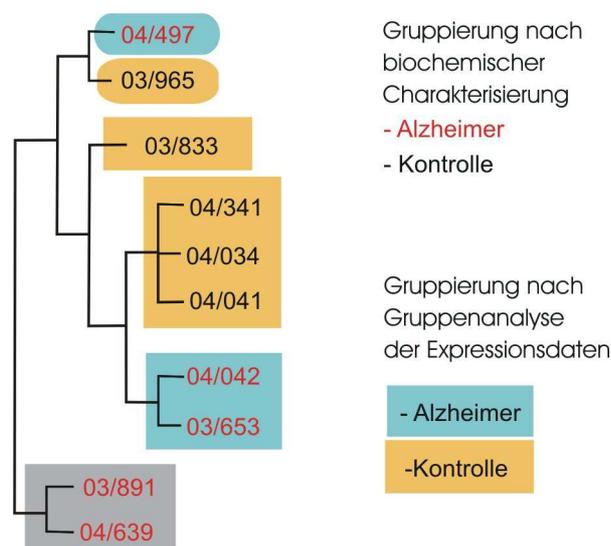
Die Qualitätskontrolle der Proben des Frontallappens ergab, dass für die Analyse mittels Mikroarray zehn Proben verwertbar waren.

Die Proben des Temporallappens ergaben in dieser Analyse bereits keine verwertbare Qualität. Aus diesem Grund befasst sich die Auswertung der Ergebnisse ausschließlich mit den Proben des frontalen Lappens. Dies ist aufgrund

des Ausschlusses der frontalen Proben in der vorhergehenden Hirnparenchym-Analyse ungünstig, aber leider nicht zu ändern.

## 2.2. Mikroarray-Analyse

Um in den Proben des Frontallappens mögliche Extremwerte festzustellen, wurden die Proben in einer Gruppenanalyse verglichen. Das Ergebnis ist in Diagramm 18 zu sehen. Dieses zeigt, dass sich zwei Proben (03-891 F AD und 04-639 F AD) getrennt von den anderen Proben gruppieren. Deshalb wurde beschlossen, diese in die weiteren Analysen nicht mit einzubeziehen. Somit blieben fünf Proben für die Kontrollgruppe und drei Proben für die AD Gruppe für eine weitere Analyse.



**Diagramm 18: Gruppenanalyse der Proben der isolierten Blutgefäße des Frontallappens.** Das Diagramm zeigt, dass acht der zehn Proben sehr nahe zueinander gruppiert werden und dass zwei von ihnen nicht mit den anderen korrelieren.

Die Analyse der Genexpressionsdaten der isolierten Gefäße wurde dann mit diesen beiden Gruppen durch einen t-Test durchgeführt. Dazu wurde die Expression der Gene zwischen den Gruppen verglichen und aus den Einzelwerten wurde der Median berechnet. Aus diesen Werten wurde die relative Genexpression der einzelnen Gene berechnet und jene als signifikant reguliert ausgewählt, welche einen Expressionsunterschied von  $>1.5$  und einer Signifikanz von  $P < 0,01$  ergaben. Dies ergab eine Liste mit 153 Genen bekannter Funktion. Die Liste dieser Gene ist im Anhang 5 gezeigt.

Diese Liste zeigt, dass es meist zu einer Verringerung der Expression in der AD Gruppe kam. Außerdem erkennt man, dass ein großer Teil der differentiell

exprimierten Gene an Entzündungsprozessen beteiligt sind. Man sieht, dass diese Gene ca. 10% der Liste ausmachen, was zeigt, dass sich auch hier Anzeichen einer Neuroinflammation widerspiegeln.

Da die Anreicherung der Blutgefäße durchgeführt wurde, um eine genauere Untersuchung der in diesen Zellen verändert regulierten Transporter und Rezeptoren durchzuführen, wurden alle Gene der Prozesse *Transporter Aktivität (GO:0005215)* und *Rezeptor Aktivität (GO:0004872)* aus den Ergebnissen nochmals genauer betrachtet. Diese beiden Gengruppen sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 gezeigt. Zusammen ergeben sich 17 Gene aus den 102 Genen, welche zu der Gruppe der Rezeptoren und Transporter zählen. Dies bestätigt die Annahme, dass diese Gruppen an Genen in der AD eine wichtige Rolle spielen und dass es zu wesentlichen Veränderungen an der Struktur der Blutgefäße kommt.

**Tabelle 10: Differenziell exprimierte Gene der Blutgefäße welche zu den Rezeptoren zählen.**

Genname	relative Expression	Signifikanz P
Discoidin domain receptor family, member 1	0,58	0,0010
Major histocompatibility complex, class I, A	0,58	0,0037
Interleukin 13 receptor, alpha 1	0,50	0,0021
Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta)	0,45	0,0071
Low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	0,64	0,0026
Putative nuclear protein ORF1-FL49	0,60	0,0034

**Tabelle 11: Differenziell exprimierte Gene der Blutgefäße welche zu den Transportern zählen.**

Genname	relative Expression	Signifikanz P
Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 6	1,53	0,0059
Ubiquinol cytochrome c reductase, 6.4kDa subunit	0,66	0,0024
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 8, 19kDa	0,66	0,0040
Sorcin	0,60	0,0098
Cytochrome b-5	0,59	0,0022
ATPase, Class II, type 9B	0,56	0,0100
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s (factor B)	0,55	0,0080
Solute carrier family 25, member 27	0,49	0,0073
Aldo-keto reductase family 1, member C3	0,46	0,0007
Adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit	0,40	0,0061
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	0,33	0,0045

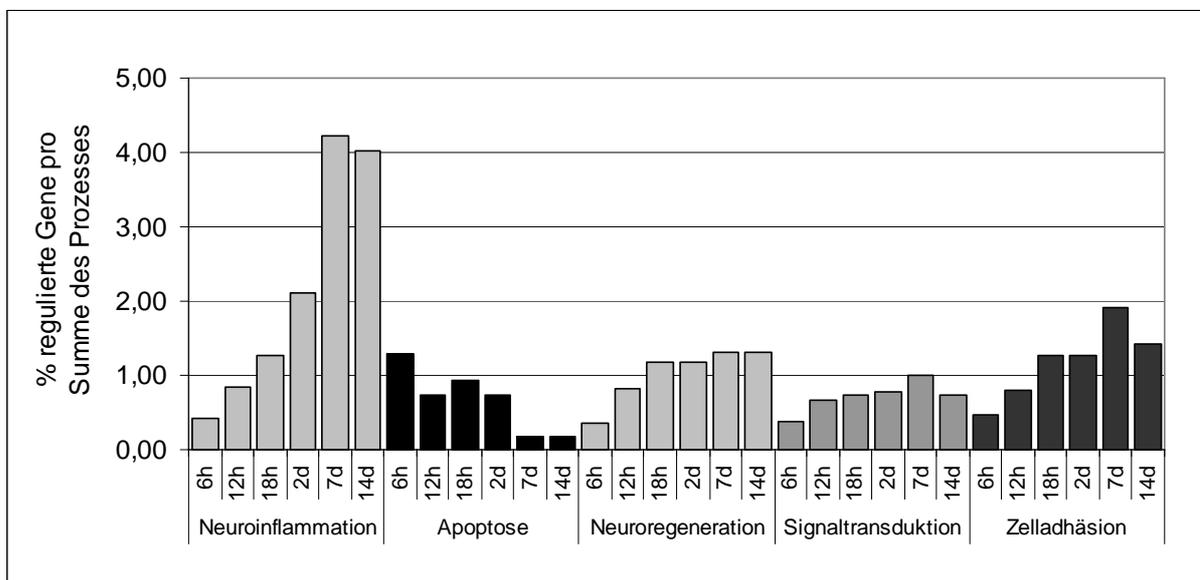
## F. Vergleich der beiden Erkrankungen AD und MCAO

### F. 1. Vergleich der differenziell exprimierten Prozesse in der MCAO und der AD

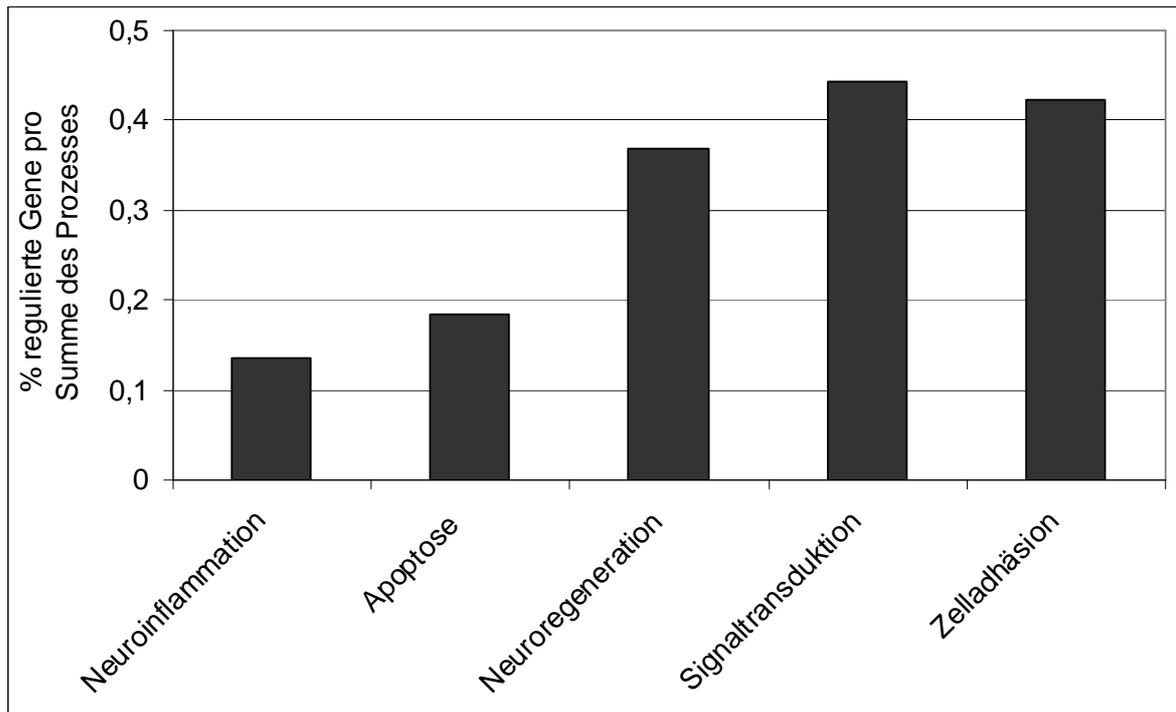
Um mögliche Unterschiede und/oder Gemeinsamkeiten zwischen den Prozessen der Neurodegeneration zu identifizieren, welche nach einer Ischämie und während der Alzheimer Erkrankung auftreten, wurden die in der Einleitung beschriebenen Prozesse verglichen.

Da die Analyse der Prozesse nach der MCAO bereits gezeigt hatte, dass die Modelle der transienten und permanenten MCAO, sowie der Gewebe Striatum und Cortex, sich sehr stark ähnelten, wurden für den Vergleich mit der Alzheimer Erkrankung nur die Ergebnisse des Striatums nach der transienten MCAO verwendet.

Zum Vergleich der beiden Modell wurden jeweils die Ergebnislisten der 100 stärksten exprimierten Gene verwendet (s. MCAO 2.3. und AD 3.2.). Diese beiden Daten sind nochmals in Diagramm 19 und Diagramm 20 gezeigt.



**Diagramm 19: Darstellung der zeitlichen Beteiligung der drei Hauptprozesse nach transienter MCAO (Striatum). Dargestellt ist der Anteil an hoch exprimierten Genen in Bezug auf die auf dem Chip vorhandenen Gene des Prozesses.**



**Diagramm 20: Darstellung der Beteiligung der verschiedenen Prozesse in der Alzheimer Erkrankung.** Dargestellt ist der Anteil an hoch exprimierten Genen in Bezug auf die auf dem Chip vorhanden Gene des Prozesses.

Beim Vergleich beider Diagramme fällt auf, dass die Neuroinflammation in der AD eine wesentlich geringere Rolle spielt als nach der MCAO. Auch der Prozess der Apoptose ist eher schwach vertreten, welches den späten Phasen nach der Ischämie ähnelt.

Die Neuroregeneration, welche in der MCAO über die zeitliche Betrachtung einen Anstieg zeigt, ergibt in der AD eine relativ starke Beteiligung, welche etwa den Mittelwert, welcher nach der MCAO gemessen wurde, entspricht (~0,5 %).

Die Signaltransduktion zeigt in der AD die stärkste Beteiligung von den fünf betrachteten Prozessen. In der MCAO ist die Beteiligung eher gering und zeigt nur eine geringe Zunahme. Von den Werten her bewegen sich beide Modelle im gleichen Bereich (etwa 0,5%).

Die Zelladhäsion zeigt in beiden Modellen eine starke Beteiligung. In der MCAO findet man einen Anstieg über den Zeitraum der 14 Tage, welcher nach sieben Tagen seinen Höchstpunkt erreicht. In der AD gehört der Prozess zu den am

stärksten Beteiligten und hat einen ähnlichen Wert wie zu Beginn der Messungen nach der MCAO.

## **F. 2. Vergleich der frühen und späten Phase nach der MCAO mit der AD**

Da eines der Ziele dieser Studie war, ähnlich regulierte Prozesse und möglicherweise auch Gene, in neurodegenerativen Erkrankungen zu identifizieren, wurden die Ergebnislisten der MCAO und AD auch auf der Ebene der einzelnen Gene verglichen.

Dazu wurden die frühen Zeitpunkte, von sechs bis 18 Stunden, und die späten Zeitpunkte, von zwei bis 14 Tage, aus dem MCAO Modell zu einer Gruppe zusammengefasst. Aus diesen Gruppen wurden dann die 300 am stärksten exprimierten Gene bestimmt und der Überlapp mit den Ergebnissen der AD bestimmt. Die Ergebnisse aus diesem Vergleich sind in Tabelle 12 und

Tabelle 13 zu sehen.

**Tabelle 12: Übereinstimmungen der differenziell exprimierten Gene in der transienten MCAO und der AD. Übereinstimmungen mit der frühen Phase der MCAO sind weiß, und jene mit der späten Phase grau unterlegt.**

Genname	Expression nach AD	Expression nach MCAO
CD9 antigen	2,2	3
Chloride intracellular channel 4 (mitochondrial)	2,4	3,4
Elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2)-like 1	2,2	2,3
Forkhead box O1	4,2	0,5
Lysosomal membrane glycoprotein 2	4,7	2,2
Ring finger protein 130	2,1	1,6
Adiponectin receptor 2	2,1	1,4
Contactin associated protein 4	2,1	1,5
N-acetylgalactosaminyltransferase 4	2,1	2,9
Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein	3,2	1,7
Lysosomal membrane glycoprotein 2	4,6	6,2
Chloride intracellular channel 4 (mitochondrial)	2,4	1,9

**Tabelle 13: Übereinstimmungen der differenziell exprimierten Gene in der permanenten MCAO und der AD. Übereinstimmungen mit der frühen Phase der MCAO sind weiß, und jene mit der späten Phase grau unterlegt.**

Genname	Expression nach AD	Expression nach MCAO
CD9 antigen	2,2	1,6
Chloride intracellular channel 4 (mitochondrial)	2,4	3,5
Discoidin domain receptor family, member 1	2,3	1,7
Elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2)-like 1	2,2	1,2
Glycolipid transfer protein	2,5	1,4
Bromodomain containing 4	0,3	1,1
Claudin 11	3,7	1,3
Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1	2,2	1,3
Growth factor receptor bound protein 2-associated protein 1	2,5	1,4
HLA class II	4,2	1,2
Microtubule-associated Protein 1B	0,4	1,5
Procollagen, type IV, alpha 3 binding protein	0,4	1,1
Quaking	2,2	1,2
Rho gtpase activating protein 17	2,2	1,1
Serum/glucocorticoid regulated kinase 3	2,3	1,1
Transmembrane 4 superfamily member 9	0,5	1,5
Ubiquitin / ribosomal protein CEP52	4,2	1,2

Wie aus den Tabellen zu erkennen, sind die Übereinstimmungen der beiden Erkrankungen relativ gering (25 Gene von 300). Beide Listen enthalten Gene welche in der Neuroinflammation oder der Neuroregeneration beschrieben sind, dort jedoch bisher nicht als essentiell identifiziert wurden.

So sind z. B. die Gene CD9, CNPase oder auch das HLA class II deutlich mit Entzündungsprozessen korreliert. Claudin 11 hingegen, welches auf Oligodendrozyten exprimiert wird, dient der Neuroregeneration. Die Rezeptoren und Kanäle dienen hingegen eher der Signaltransduktion.