

**Identifizierung und molekulare Charakterisierung neuer
neuronaler Regenerations-assoziiierter Gene (RAGs) im
Kontext des axonalen Wachstums *in vitro***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Katharina Schaepe

aus Beuthen

Düsseldorf, Februar 2015

Aus dem Labor für Molekulare Neurobiologie der Neurologischen Klinik,
Universitätsklinikum, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Univ.-Prof. Dr. Hans Werner Müller

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2015

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung/Summary.....	1
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Summary	2
2 Einleitung.....	4
2.1 Das Periphere Nervensystem.....	4
2.1.1 Anatomie der peripheren Nerven	4
2.1.2 Das dorsale Hinterwurzelganglion.....	6
2.1.3 Traumatische Nervenläsionen	8
2.1.4 Therapieansätze traumatischer Nervenverletzungen	9
2.2 De- und Regeneration peripherer Nerven	9
2.2.1 Distaler Stumpf – Wallersche Degeneration	10
2.2.2 Proximaler Stumpf	12
2.2.3 Regenerationsverlauf.....	12
2.3 Regenerations-assoziierte Gene	14
2.4 Regenerations-assoziierte Genkandidaten	16
2.4.1 Vorexperimente aus der Arbeitsgruppe.....	16
2.4.2 Claudin 4	18
2.4.3 Cmtm3.....	20
2.4.4 Dusp6	20
2.4.5 Klf6	21
2.4.6 Kif22	23
2.5 F11-Zelllinie	24
2.6 Zielsetzung.....	26
3 Material und Methoden.....	27
3.1 Versuchstiere.....	27
3.2 Antikörper	27
3.3 Reagenzien und Puffer	28
3.4 PNS Läsionen	31
3.5 Gewebepreparation	32
3.6 Immunhistochemisches Fluoreszenz-Färbeprotokoll	33
3.7 Molekularbiologische Methoden	34
3.7.1 RNA- Isolation aus kultivierten Zellen und Gewebe.....	34
3.7.2 Reverse Transkription (RT-PCR)	35
3.7.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR).....	36
3.7.4 Primerherstellung	38

3.8	Zellkultur.....	39
3.8.1	Kultivierung von F11-Zellen	39
3.8.2	Kryokonservierung und Revitalisierung von F11-Zellen	40
3.8.3	Präparation von primären DRG-Kulturen	40
3.8.4	Immunzytochemie	41
3.9	Gentechnische Verfahren	41
3.9.1	Verwendete Vektoren.....	41
3.9.2	Isolierung und Ligation der Kandidatengen-Fragmente.....	42
3.9.3	Transformation	43
3.9.4	Isolierung von Plasmid-DNA	43
3.9.5	siRNA Resuspension.....	43
3.9.6	Transfektion	43
3.10	Hochdurchsatz-Screenings der rekombinant modulierten RAG-Kandidaten ...	45
3.10.1	Probengenerierung	45
3.10.2	Cellomics-basierte Analyse	45
3.10.3	Statistische Analyse	46
4	Ergebnisse.....	48
4.1	Validierung läsionsinduzierter Genexpressionsmuster und molekulare Charakterisierung putativer RAGs.....	48
4.1.1	Claudin4	49
4.1.2	Cmtm3.....	52
4.1.3	DUSP6.....	54
4.1.4	Klf6	57
4.1.5	Kif22	61
4.2	In vitro-Funktionsuntersuchungen rekombinant modulierter RAG-Kandidaten in F11-Zellen	64
4.2.1	Einfluss der rekombinanten RAG-Überexpression auf das Neuritenwachstum	65
4.2.2	Einfluss der rekombinanten RAG-Suppression auf das Neuritenwachstum	67
4.2.3	Einfluss rekombinanter Ko-Expressionen der RAG-Kandidatengene auf das Neuritenwachstum.....	70
5	Diskussion.....	74
5.1	Das RAG-Genexpressionsmuster.....	74
5.2	Experimentelle Validierungen der Ausgangsdaten.....	75
5.3	Zelluläre Lokalisation potenzieller RAG-Kandidaten in vivo und in vitro.....	76
5.3.1	Claudin4	76
5.3.2	Cmtm3.....	77
5.3.3	Dusp6	78
5.3.4	Klf6	79
5.3.5	Kif22	79

5.4	Einflüsse rekombinanter Modulationen potenzieller RAG-Kandidaten	80
5.4.1	Claudin4	80
5.4.2	Cmtm3.....	83
5.4.3	Dusp6	84
5.4.4	Klf6	86
5.4.5	Kif22	89
5.5	Kombinatorische Überexpressionen.....	90
Literaturverzeichnis.....		92
Abkürzungsverzeichnis		105
Eidesstattliche Erklärung.....		108
Danksagung		109

1 Zusammenfassung/Summary

1.1 Zusammenfassung

Periphere Nerven sind im Gegensatz zu zentralen Nerven nach einer traumatischen Kontinuitätsunterbrechung zur spontanen axonalen Regeneration fähig und manifestieren während des Regenerationsprozesses ein auffälliges und stereotypes Muster zellulärer Veränderungen. Die Mechanismen einer erfolgreichen neuronalen Regeneration sind komplex, bislang nur teilweise identifiziert und beinhalten läsionsinduzierte Expressionen sogenannter Regenerations-assoziiertes Gene (RAGs), deren funktionelle Beweisführung noch teilweise aussteht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es (i) neue RAGs zu identifizieren, (ii) die läsionsinduzierten Genexpressionsmuster dieser *in vivo* zu validieren, (iii) die Proteinlokalisierung *in vivo* sowie *in vitro* zu charakterisieren, (iv) die Genexpressionen in einem geeigneten *in vitro*-Modellsystem rekombinant zu modulieren sowie (v) die rekombinanten Modulationsauswirkungen auf die Neuritogenese des *in vitro*-Modellsystems qualitativ und quantitativ zu ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zeitlichen läsionsinduzierten mRNA-Expressionsmuster der RAG-Kandidatengene *Cldn4*, *Cmtm3*, *Dusp6*, *Klf6* und *Kif22* in verletzten DRG-Neuronen nach traumatischer Ischiasnervläsion erfolgreich validiert und die Proteinverteilung dieser Kandidaten (mit Ausnahme von *Cmtm3*) in DRG-Neuronen und Motorneuronen des lumbalen Rückenmarks *in vivo* charakterisiert. Die F11-Zelllinie wurde als geeignetes *in vitro*-Modellsystem etabliert und die Genexpressionen der fünf RAG-Kandidaten wiesen in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingung der F11-Zellen (proliferativ vs. differenziert) eine signifikante Induktion der Genregulation parallel zur neuronalen Differenzierung auf.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen, dass nach rekombinanter Modulation alle fünf Kandidatengene signifikante Einflüsse auf die Neuritogenese von F11-Zellen aufweisen und somit neue, für die Regeneration putativ essentielle RAGs darstellen.

So konnte nach rekombinanter Überexpression von *Cldn4*, *Dusp6* und *Klf6* eine signifikante Induktion der Neuritogenese (Neuritenanzahl und -länge) in proliferierenden F11-Zellen manifestiert werden. Rekombinante Suppressionsanalysen von *Cmtm3* und *Kif22* zeigen eine signifikante Reduktion der F11-Zell-Differenzierung (Neuritenanzahl und -länge).

Des Weiteren ist es in dieser Arbeit gelungen, additive Effekte der Kandidatengene *Cldn4*, *Dusp6* und *Klf6* mittels rekombinanter Überexpressionsanalysen zu detektieren sowie erste Hinweise auf mögliche beteiligte Signalwege zu ermitteln.

1.2 Summary

In contrast to central nerves, peripheral nerves spontaneously regenerate in a staginess and stereotype pattern of cellular alterations during the process of axonal regeneration after traumatic injury. The complex mechanisms of successful neuronal regeneration are only partially identified and contain lesion-dependent expressions of so called regeneration-associated genes (RAGs).

The focus of this study was to (i) identify new RAGs, (ii) validate their lesion-induced gene expression patterns *in vivo*, (iii) characterize the protein distributions *in vivo* as well as *in vitro*, (iv) modulate recombinant candidate-gene expressions in a suitable model system *in vitro* and finally (v) determine the qualitative and quantitative impacts of the recombinant modulations on neuritogenesis in the model system *in vitro*.

In the present study the time- and lesion-dependent mRNA expression patterns of the RAG-candidates *Cldn4*, *Cmtm3*, *Dusp6*, *Klf6* and *Kif22* were validated in sciatic nerve injured DRG neurons and their protein localizations (expected *Cmtm3*) were characterized in DRG neurons as well as motor neurons of the lumbar spinal cord *in vivo*.

The gene expression patterns of the 5 RAG-candidates exhibited significant gene inductions synchronized to neuronal differentiation of the well-established F11 cell line as a function of the culture conditions (proliferative vs. differentiated).

The present data reveal significant influences of all 5 recombinantly modified candidate gene on the F11 cell neuritogenesis and outgrowth, respectively and consequently represent new putative RAGs. Transient overexpression of *Cldn4*, *Dusp6* and *Klf6* was

sufficient to induce the neuritogenesis (neurite count and length) under proliferating F11 cells. Analyses of the recombinant suppression of both *Cmtm3* and *Kif22* result in a significant reduction in differentiation of F11 cells (neurite count and length).

In addition, combinatorial co-transfections to overexpress the gene candidates *Cldn4*, *Dusp6* und *Klf6* reveal in additive effects and provide first indications of putatively involved signaling pathways.

2 Einleitung

2.1 Das Periphere Nervensystem

Das Periphere Nervensystem (PNS) stellt das Bindeglied zwischen dem Zentralen Nervensystem (ZNS) und den motorischen, sensorischen, somatischen und viszerale Endorganen dar und umfasst außerhalb des Gehirns und Rückenmarks alle Strukturen des Nervensystems. Histologisch besteht das PNS aus drei Grundstrukturen: den Neuronen, den die Myelinscheiden ausbildenden Schwannzellen sowie dem umgebenden Bindegewebe. Die Funktionalität der vegetativen, sensiblen und motorischen Nerven des PNS unterscheidet sich lediglich (i) in der Innervation des Endorgans, (ii) der Richtung der Aktionspotentialfortleitung sowie (iii) den damit in Zusammenhang stehenden morphologischen Unterschieden. Während das ZNS durch Schädelknochen und Wirbelkörper gegen mechanische Einwirkungen der Umwelt geschützt ist, besitzen die Komponenten des PNS keinen entsprechenden mechanischen Schutz.

2.1.1 Anatomie der peripheren Nerven

Periphere Nerven bestehen aus einem Bündel von Nervenzellfortsätzen und fungieren in der Übermittlung von Informationen zwischen der Körperperipherie und dem ZNS. Die wesentlichen Strukturen einer Nervenzelle werden in Perikaryon, Dendriten und Axon unterteilt. Das Perikaryon (Zellkörper) enthält einen zentral gelegen Nukleus mit Nukleolus sowie das Zytoplasma, welches Nissl-Substanz (Aggregationen von rauem endoplasmatischem Retikulum), Mitochondrien, Neurofilamente, Lysosomen und Golgi-Apparate fasst. Die baumartig verzweigten Fortsätze, die sogenannten Dendriten, empfangen und leiten Signale und Reize afferent zum Perikaryon. Im Gegensatz zu den Dendriten stellt das Axon, welches jede Zelle nur einmal aufweist, eine efferente Reizleitung zu den Zielzellen und Endorganen dar. Anhand ihrer Funktion lassen sich die Nervenzellen grob in drei Arten unterteilen: sensorische Neuronen, motorische Neuronen und Interneuronen.

Schwannzellen gehören zu den Gliazellen und fungieren als Stütz- und Hüllzellen peripherer Axone. Grundsätzlich wird zwischen myelinisierten und nicht-myelinisierten Nervenfasern unterschieden. Die von Schwannzellen mehrfach umhüllten, myelinisierten Nervenfasern werden je nach Faserdicke in unterschiedliche Faserklassen unterteilt. Da jede Schwannzelle jeweils nur einen Nervenabschnitt von 0,25 -1,5 mm myelinisiert (Mumenthaler, 2007) und durch diese Myelinhülle das Axon elektrisch isoliert, entstehen zwischen diesen Internodien unmyelinisierte Abschnitte, die Ranvierschen Schnürringe. Aufgrund des histologischen Aufbaus wird die elektrische Signalleitung innerhalb myelinisierter Axone periodisch von einem Schnürring zum nächsten fortgeleitet, was als saltatorische Erregungsleitung bezeichnet wird.

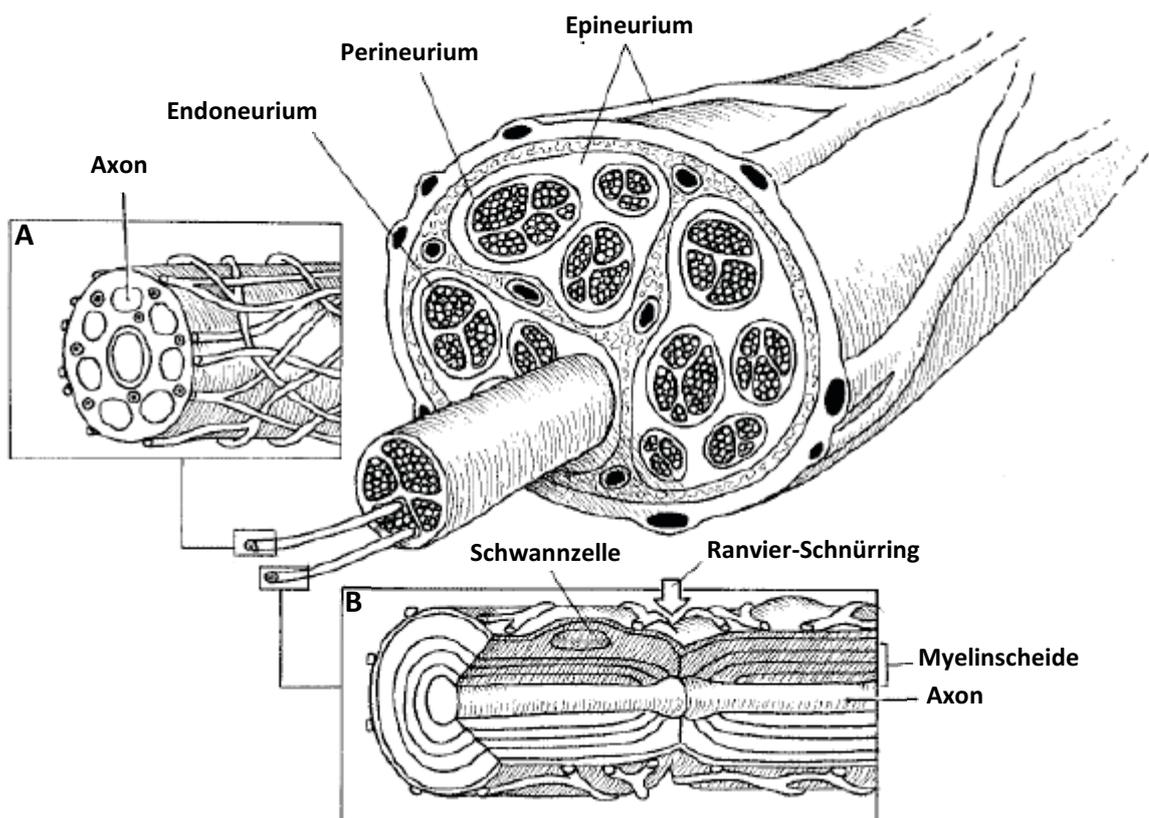


Abbildung 2.1: Schematischer Querschnitt durch einen peripheren Nerv. Darstellung eines Nervenquerschnittes mit Epineurium, Perineurium, Endoneurium, Schwannzelle, Ranvierschem Schnürring und Myelinscheide mit Axonmagnifizierung im (A) Quer- und (B) Längsschnitt. [Auszug modifiziert aus: Lundborg, 1988]

Prinzipiell besteht der periphere Nerv aus insgesamt vier aufeinander liegenden Schichten: dem Epineurium mit einer epifaszikulären Hülle, dem bindegewebeartigen und Flexibilität verleihendem Perineurium, dem kollagenhaltigen Endoneurium und schließlich den Axonen (Abbildung 2.1).

2.1.2 Das dorsale Hinterwurzelganglion

Dorsale Hinterwurzelganglien oder *dorsal root ganglia* (DRG), sind Nervenknotten (Ganglien), die eine Ansammlung von ursprünglich afferenten Perikaryen beinhalten und den sensorischen Neuronen des PNS zugeordnet werden. DRG sind innerhalb des knöchernen Wirbelkanals an beiden Seiten je Rückenmarksegment lokalisiert und sind Bestandteil der dorsalen Wurzel des Spinalnervs.

Die in den DRG zusammengefassten Neurone weisen einen pseudounipolaren Zellaufbau auf. Pseudounipolare Neurone besitzen ein Axon, welches sich nach Verlassen des Perikaryons in einen peripheren sowie einen zentralen Fortsatz aufteilt. Ihre sensorischen Informationen werden afferent über die Redlich-Obersteiner-Zone, der Grenze zwischen dem peripheren und zentralen Nervensystem (Abbildung 2.2), an das dorsale Hinterhorn des Rückenmarks bis hin zum Gehirn übermittelt. Interessanterweise unterscheiden sich die beiden Fortsätze deutlich in ihrem intrinsischen Regenerationsvermögen. Während der periphere Fortsatz nach einer Verletzung spontan regenerieren und somit zu einer vollständigen funktionalen Erholung führen kann, weist der zentrale Fortsatz nur eine sehr limitierte Regenerationskapazität auf (Teng & Tang, 2006).

Innerhalb des DRG werden die zentral liegenden Neurone von mehreren Satellitenzellen umhüllt. Jedes aus einem Neuron auswachsende Axon durchläuft das DRG, ohne dass innerhalb dieser Struktur eine Teilung oder Verzweigung auftritt (Matsuda & Uehara, 1981). Zwischen den DRG der verschiedenen Rückenmarkssegmente gibt es hinsichtlich der Architektur keinen wesentlichen Unterschied (Matsuda & Uehara, 1981). Dennoch werden DRG in unterschiedliche Gruppen klassifiziert, die auf (i) der Zellkörpergröße, (ii) dem Fasertyp, (iii) den elektrophysiologischen Prozessen und (iv) dem sensorischen Rezeptortyp basieren (Rask, 1999; Mense, 1990).

Eine Rezeptor-basierte Charakterisierung resultiert in unterschiedlichen Typen von großen und kleinen DRG-Neuronen, welche in die Schmerz-vermittelnden nozizeptiven und Temperatur-wahnehmenden perzeptiven Neurone (kleine DRG-Subpopulation), in Druck-vermittelnden mechanozeptiven Neurone (große DRG-Subpopulation) sowie in die Tiefen-sensiblen propriozeptiven DRG-Neurone differenziert werden (Abbildung 2.2; Caspary & Anderson, 2003).

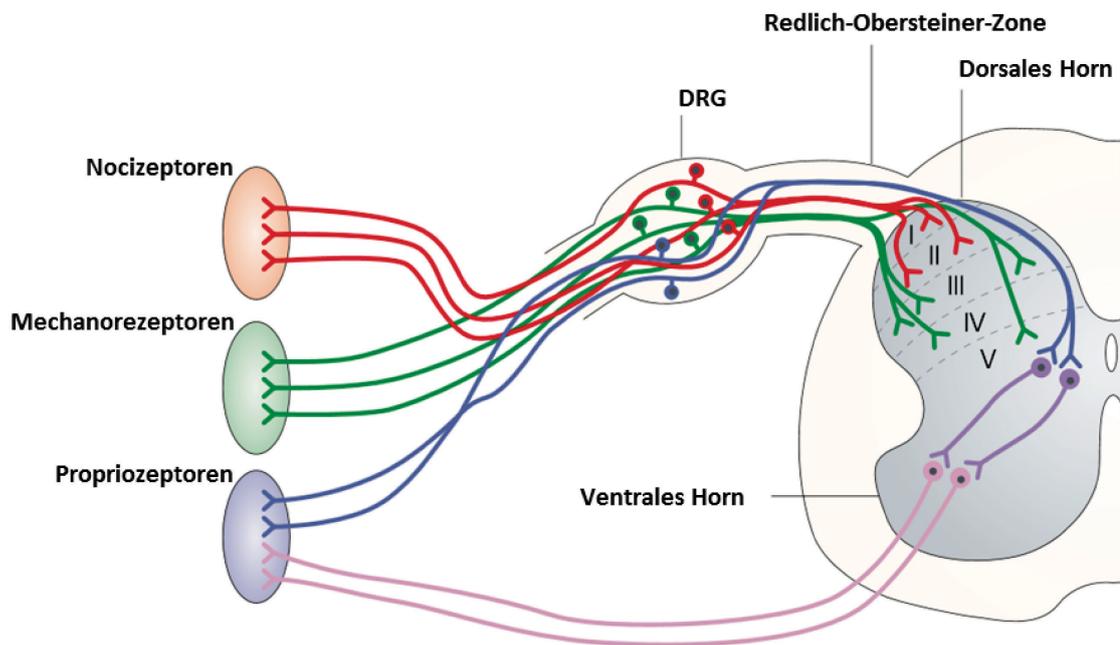


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Dorsalen Hinterwurzelganglions (DRG). Sensorische Informationen werden aus dem DRG afferent über die Redlich-Obersteiner-Zone an das dorsale Hinterhorn und in die Peripherie projiziert. Schmerz und Temperatur wird über nozizeptive Neurone (**rot**) in die ersten zwei (I, II) Zonen der grauen Substanz des Rückenmarks gesandt. Druckempfindung wird über Mechanorezeptoren (**grün**), welche bis zu den Zonen III, IV und V der grauen Substanz gelangen, in die Peripherie vermittelt. Propriozeption wird über sensorische Neurone, die durch das dorsale Horn bis zu den ventral lokalisierten Motoneuronen (**blau**) vermittelt. Motoneurone sind direkt über Muskeln in der Peripherie verknüpft um den Bewegungsapparat zu steuern (**pink**). Römische Zahlen zeigen die unterschiedlichen Zonen des dorsalen Hinterhorns an. [Auszug modifiziert aus: Caspary & Anderson, 2003]

DRG-Zellkörpergrößen unterscheiden sich anhand des Neurofilamentgehalts und dessen Zusammensetzung. Obwohl DRG-Neurone mit kleinen Zellkörpern ebenso über nicht-phosphoryliertes Neurofilament (NF) verfügen, wie die mit großen Zellkörpern, weisen nur die größeren Neurone die 200 kDa große Untereinheit (NF200) dieses Strukturproteins auf (Perry *et al.*, 1991). In immunhistochemischen Untersuchungen werden daher NF200-spezifische Antikörper als ein selektiver Marker zur Unterscheidung

der Neuronenpopulationen verwendet (Perry *et al.*, 1991; Segond Banchet *et al.*, 2002). Die Kenntnis weiterer Markerproteine erlaubt darüber hinaus eine weitergehende Charakterisierung z. B. der nozizeptiven Neurone mittels des Calcitonin-Peptids (CGRP; Fullmer *et al.*, 2004; Chopra *et al.*, 2000) sowie einer weiteren kleinen DRG-Neuronensubpopulation mithilfe des Isolektins B4 (IB4) von der Strauchpflanze *Griffonia (Bandairaea) simplicifolia*.

Aufgrund ihrer zytoarchitektonischen Besonderheiten und guten Zugänglichkeit stellen DRG-Neurone ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung neuronaler Mechanismen der spontanen axonalen Regeneration dar und dienen auch in dieser Arbeit als Versuchsmaterial.

2.1.3 Traumatische Nervenläsionen

Traumatische Nervenläsionen führen bei vielen Patienten zu einer Einschränkung der Sensibilität bis hin zu Lähmungserscheinungen. Obwohl Nervenverletzungen statistisch den relativ seltenen Krankheitsbildern zugeordnet werden, sind allein in Europa jährlich über 300.000 Personen von traumatischen peripheren Nervenverletzungen betroffen (Mohanna *et al.*, 2003). Über 60 % der PNS-Läsionen sind auf die oberen Extremitäten beschränkt und betreffen vorwiegend den *Nervus radialis*, den Speichennerv im Arm (Noble *et al.*, 1998).

Nervenläsionen können durch Zug-, Kompressions- und Schnitttraumen entstehen und wurden bereits 1943 von Seddon in drei Kategorien klassifiziert: Neurapraxie, Axonotmesis und Neurotmesis (Seddon, 1943). Während die Neurapraxie die mildeste Form einer Nervenverletzung beschreibt, die keinen axonalen Kontinuitätsverlust aufweist, liegt bei einer Axonotmesis eine komplette Kontinuitätsunterbrechung des Axons vor, wobei jedoch alle bindegewebeartigen Strukturen des Nervs noch intakt sind. Bei der Neurotmesis ist der Nerv vollständig durchtrennt, so dass alle essentiellen Anteile des Nervs (Axon, Endo-, Peri- und Epineurium) zerstört sind. Im Jahre 1951 wurde die Klassifizierung der Nervenverletzungen von Sunderland präziser in fünf Schweregrade unterteilt. Hierbei wurde die Axonotmesis in drei weitere Schweregrade differenziert, welche von klinischer Relevanz sind (Sunderland, 1951).

Die Neurotmesis, die schwerwiegendste Art der Nervenverletzung, wurde in der vorliegenden Arbeit experimentell durch das Läsionsparadigma der gezielten Durchtrennung/Transsektion (Axotomie) des Ischiasnervs der Ratte nachgestellt, während das verminderte Trauma der Axonotmesis durch eine massive und standardisierte Ischiasnervquetschung ausgelöst wurde.

2.1.4 Therapieansätze traumatischer Nervenverletzungen

Die klinisch relevante Schweregrad-Klassifizierung nach Seddon und Sunderland hilft nicht nur bei der Beschreibung des Läsionsmaßes, sondern auch bei der Prognosebeurteilung sowie der Entwicklung einer geeigneten Therapie. Während mildere Neuropraxia-klassifizierte Läsionen mit konservativen Therapien, basierend auf aktiver Physiotherapie sowie Elektrotherapie, behandelt werden können, gehört die chirurgische Therapie zum Schwerpunkt der Nervenläsion-Behandlungen. Die rekonstruktive Nerven Chirurgie gliedert sich in die direkte Koaptation (Zusammenfügen traumatisch getrennter Nervenfragmente) und die Nerven transplantation. Bei der direkten Koaptation wird zwischen der epineuralen und der interfazikulären Nahtführung unterschieden. Je nach Materialherkunft wird bei der Nerven transplantation zwischen autogen (körpereigen), allogenen (artspezifisch) und xenogen (artenfremd) unterschieden.

Trotz 150 Jahren Erfahrung auf dem Gebiet der modernen chirurgischen Behandlung peripherer Nervenläsionen, bleibt die Nervenrekonstruktion eine große Herausforderung für den Operateur und kann zu hochgradiger Behinderung sowie einer lebenslangen Morbidität des behandelten Patienten führen (Noble *et al.*, 1998).

2.2 De- und Regeneration peripherer Nerven

Während nach einer traumatischen Kontinuitätsunterbrechung des ZNS zumeist keine spontane axonale Regeneration stattfindet, ist das PNS zur spontanen funktionellen Regeneration fähig, wobei das Ausmaß der Regeneration mit zunehmendem Alter und der Entfernung der Läsionsstelle vom Zielgebiet abnimmt. Dabei kommt es im PNS

ausschließlich zu einer Erholung der sogenannten Spinalnerven, die sich aus afferenten und efferenten Nervenwurzeln zusammensetzen. Jedoch resultiert auch im PNS nach einer schwerwiegenden Verletzung partiell ein Apoptose-ähnlicher Zelltod und damit der Zerfall der verletzten Nervenzelle (Lundborg, 2000).

In Folge einer Axotomie entstehen aus der verletzten Nervenzelle zwei unterschiedliche Fragmente, (a) distal: das kernlose Axonsegment und (b) proximal: das Perikaryon mit Zellkern und Axonstumpf. Während die traumatische Verletzung des Perikaryons zum Absterben des beschädigten Neurons führt, resultiert die Verletzung eines Nervenzellfortsatzes, einer Nervenfasern oder eines ganzen Axons in der spontanen Initialisierung des gerichteten axonalen Regenerationsprozesses mit Restitution der funktionellen Integrität des geschädigten Areals. Dabei ist für eine erfolgreiche funktionelle Erholung die Schaffung einer permissiven, trophischen Umgebung im distalen Stumpf für das Einwachsen regenerierender Axone eine essentielle Voraussetzung.

2.2.1 Distaler Stumpf – Wallersche Degeneration

Die anterograde Degeneration, auch Wallersche Degeneration genannt, beschreibt den Ereignisverlauf eines peripheren axotomierten Nervs (Waller, 1850; Fu & Gordon, 1997; Stoll *et al.*, 2002) distal der Nervenverletzung (Abbildung 2.3), bei dem Schwannzellen aber auch Makrophagen entscheidende Rollen spielen. Der Zerfall des abgetrennten Axons geht mit einer plastischen Funktionsumstellung der assoziierten Schwannzellen, von einem ausdifferenzierten myelinisierenden Phänotyp zu einem dedifferenzierten Phänotyp einher, welcher durch Proliferation und Hypertrophie symbolisiert wird (Hall, 1986). Die Fragmentierung der Axone verursacht den Zerfall und die Auflösung der Markscheide in grobe ellipsenförmige Einzelfragmente, den Myelinovoiden, wobei Chemokine, Zytokine sowie weitere neurotrophe Faktoren mit chemotaktischer Wirkung für Makrophagen sekretiert werden (Bosse, 2012). Der weitere Zell-Debrisabbau erfolgt durch eingewanderte Makrophagen histozytärer Herkunft (Brück, 1997; Stoll *et al.*, 1989; Fawcett & Keynes, 1990), die das Myelin zu Neuralfetten abbauen.

Zeitgleich zum Axon- und Markscheidenabbau proliferieren die Schwannzellen in einer längsorientierten Zellformation entlang der erhaltenden perineuralen Hülle. Hierbei

werden Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle und Moleküle der extrazellulären Matrix produziert und sekretiert, die für ein ideales neurotrophes und somit Regenerations-förderndes Milieu im distalen Nervenfragment sorgen. Diese Zellformation wird als „Hanke-Büngner Bänder“ bezeichnet und dient als Leitschiene für regenerierende Nervenfasern (Bunge, 1980; Son & Thompson, 1995). Auch bei ausbleibender Regeneration bleiben die Hanke-Büngner Bänder in atrophischer Form bestehen (Abbildung 2.3e).

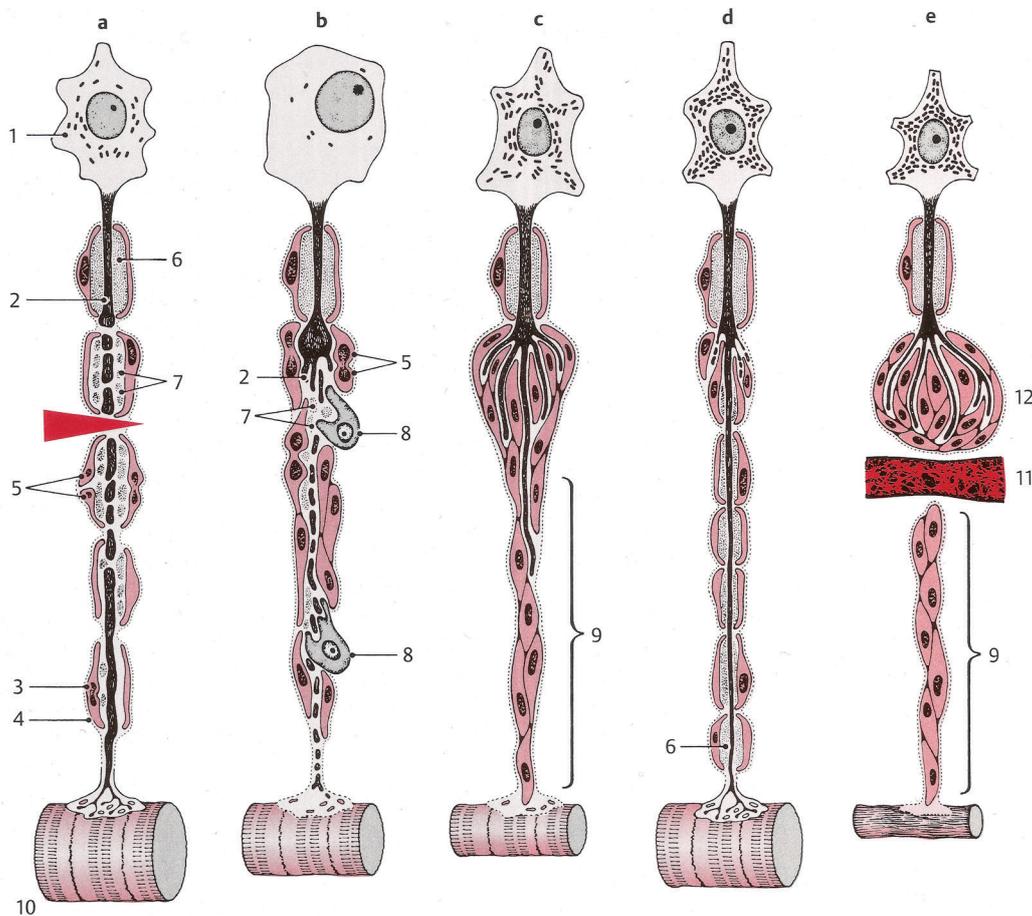


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung von unterschiedlichen Phasen der peripheren Nervenregeneration. a – Wallersche Degeneration, Zerfall der Markscheiden, distal liegende Schwannzellen werden mitotisch; b – Margination von Nissl-Schollen, Verlagerung des Zellkerns, Invasion von Makrophagen führt zum Entfernen von nekrotischem Gewebe und Myelintrümmern; c – Ausbildung von „Hanke-Büngner Bändern“; d – Vollendete Regeneration nach Bildung von Myelin; e – Neuombildung, aussprossende Axone haben ihr Zielgebiet nicht erreicht; 1: Perikaryon; 2: Axon, Axonsprossen; 3: Schwannzelle; 4: Basalmembran der Schwannzellen; 5: Schwann-Zell-Mitose; 6: Markscheide; 7: Markscheideabbauprodukte; 8: Makrophagen; 9: Büngner-Bänder aus proliferierten Schwannzellen; 10: Muskelfaser; 11: Bindegewebe; 12: Amputationsneurom [Auszug aus: Mumenthaler, 2007]

2.2.2 Proximaler Stumpf

Nach einer axonalen Kontinuitätsunterbrechung kommt es auch im proximalen Nervenfaserstumpf zunächst zu retrograden degenerativen Veränderungen (Abbildung 2.3a). Diese können vom Ausmaß sehr unterschiedlich sein und sich vom ersten Ranvierschen Schnürring proximal der Verletzung über die gesamte Strecke bis hin zum Zellkörper erstrecken und sind meist abhängig vom Läsionsgrad und der Läsionsentfernung zum Perikaryon (Burnett & Zager, 2004).

Unmittelbar nach einer Axotomie schwillt der proximale Stumpf zum sogenannten Wachstumskolben an und eine Akkumulation von Mitochondrien, Neurofilament und zytoplasmatischen Strukturen des anterograden Transports findet statt (Mumenthaler, 2007). Der Zellkörper des verletzten Neurons schwillt an und zeigt Anzeichen sogenannter Chromatolyse, wobei sich dessen Nissl-Anfärbbarkeit abschwächt und sich der Nukleus vom Zentrum in die Peripherie verlagert und es zu einer Vergrößerung des Nukleolus kommt (Fawcett & Keynes, 1990; Mumenthaler, 2007). Die einsetzenden zellulären Reaktionen sind mit einer veränderten Genexpression und erhöhter Protein- und Lipid-Syntheserate verknüpft. Das Resultat ist die funktionelle Umstellung von einem reifen transmittierenden auf einen regenerativen Zustand mit erhöhter Protein- bzw. Lipid-Syntheserate (Burnett & Zager, 2004).

Im Allgemeinen unterliegt der Prozess des axonalen Wiedereinwachsens der Dynamik sowie der Struktur von Aktinfilamenten und Mikrotubuli, wobei eine hohe Dichte von filamentösem Aktin im Wachstumskolben zu einer kontinuierlichen Produktion von Zellfortsätzen führt (Abbildung 2.3b; Fawcett & Keynes, 1990).

2.2.3 Regenerationsverlauf

Die degenerativen Veränderungen der Wallerschen Degeneration stellen durch das resultierende trophisch fördernde Milieu die Grundlage einer erfolgreichen Regeneration dar und ermöglichen ein Wiedereinwachsen der lädierten Axone in den distalen Stumpf.

Von Küry und Mitarbeitern wurden wesentliche Voraussetzungen für eine erfolgreiche funktionelle Regeneration des PNS folgendermaßen zusammengefasst: (i) der Schutz vor

apoptotischen Prozessen der regenerierenden Neurone, (ii) die Reaktivierung von Entwicklungsprozessen zur Zielgewebeerkennung und der damit verbundenen gerichteten axonalen Elongation, (iii) die Sicherstellung der Barrierefreiheit für axonales Auswachsen und schließlich (iv) die Remyelinisierung, welche durch gliale Differenzierung der Schwannzellen nach axonaler Konnexion induziert wird (Küry *et al.*, 2001).

Nach einer Axonunterbrechung ist bereits nach wenigen Stunden am proximalen Wachstumskegel, welcher aus dem letzten Ranvierschen Knoten auswächst, die erste Aussprossung von myelinisierten Axonen zu beobachten. Die Geschwindigkeit der axonalen Regeneration wird maßgeblich durch die Chromatolyse, die Aktivität des Wachstumskolbens sowie den Gewebewiderstand zwischen proximalem und distalem Nervenstumpf bestimmt (Burnett & Zager, 2004). Durchschnittlich liegt diese bei ca. 0,5 bis 1 mm pro Tag, so dass je nach Defektlänge (Entfernung zwischen Läsionsort und Zielgewebe) und dem Vorhandensein von Leitstrukturen an der Läsionsstelle eine Reinnervation des Zielgewebes auch mehrere Wochen oder gar Monate in Anspruch nehmen kann.

Die Wiederherstellung des Axon-Schwannzellen-Kontaktes initialisiert die Remyelinisierung des zunächst nackten distalen Axons (Abbildung 2.2d) sowie die Synthese von Myelinproteinen, Fetten und spezifischen Enzymen. Diese zellulären Reaktionen spiegeln sich in dynamischen, aber hoch reproduzierbaren Veränderungen auf der molekularen Ebene der Genexpression wider (Fu & Gordon, 1997). Eine erfolgreiche Regeneration ist transkriptionsabhängig (Smith & Skene, 1997) und beinhaltet den retrograden Transport läsionsinduzierter Signale aus der Läsionsregion zum Nukleus des verletzten Neurons (Chong *et al.*, 1999; Neumann & Woolf, 1999; Hanz *et al.*, 2003). Die Charakterisierung der Genexpressionsprofile dieser reproduzierbaren molekularen Reaktionen sind folgerichtig Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen zur Identifizierung relevanter molekularer Genmodule läsionsinduzierter Reaktionen (Bosse *et al.*, 2001; Cameron *et al.*, 2003; Szpara *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013), der Charakterisierung relevanter Transkriptionsfaktoren (Küry *et al.*, 2001; Stam *et al.*, 2007; van Kesteren *et al.*, 2011) sowie im Hinblick auf die läsionsinduzierte Reaktivierung von Entwicklungsprozessen (Bosse *et al.*, 2006; Méchaly *et al.*, 2006) beschrieben worden.

Nach Ausbildung neuer Synapsen ist das Zielorgan reinnerviert (Fawcett & Keynes, 1990; Fu & Gordon, 1997; Stoll & Müller, 1999), wobei die Spezifität der Regeneration eine der

größten Herausforderungen einer erfolgreichen peripheren Nervenreparatur darstellt und von mehreren Faktoren abhängig ist. Zum einen müssen ausreichend Axone die Peripherie vor Atrophie der Endorgane erreichen, und zum anderen müssen Axone ihre spezifischen Zielorgane reinnervieren (Brushart, 1991). Grundsätzlich wird zwischen topographischer Spezifität und Endorganspezifität unterschieden. Während die topographische Spezifität in einer Reinnervation des z. B. richtigen Muskels im motorischen System resultiert, beschreibt die Endorganspezifität die Reinnervation des korrekten Typus des sensiblen Endorgans z. B. des korrekten Fasertyps im motorischen System (Brushart, 1991).

Da die Regeneration peripherer Nerven nur langsam fortschreitet, stellt sie eine klinische Gefahr für den Menschen dar. Bei sehr proximal gelegenen Verletzungen dauert es mehrere Monate bis Jahre, bis die regenerierenden Axone wieder zu ihrem ursprünglichen Innervationsgebiet ausgewachsen sind. Eine anhaltende Denervation des Zielgebiets führt daher leider häufig zu Atrophie und Degeneration der betroffenen Zielorgane.

2.3 Regenerations-assoziierte Gene

Periphere Nerven manifestieren ein auffälliges und stereotypes Muster zellulärer Veränderungen als Antwort auf eine traumatische Verletzung. Zelluläre Reparaturmechanismen beruhen (i) initial auf dem retrograden Transport läsionsinduzierter Signale aus dem Verletzungsgebiet zum Nukleus des verletzten Neurons (Chong *et al.*, 1999; Neumann & Woolf, 1999), (ii) der sequentiellen Aktivierung und Inaktivierung relevanter Gene (Fu & Gordon, 1997; Smith & Skene, 1997; Bosse *et al.*, 2006) sowie (iii) der intrinsischen Wachstumskapazität der peripheren Nervenzelle.

Regenerierende Neurone, insbesondere DRG-Neurone, agieren unmittelbar nach einer Läsion mit einer läsionsinduzierten Expression von sogenannten Regenerations-assoziierten Genen (RAGs) während der Regenerationsphase, deren Expressionsniveau sich nach erfolgter Regeneration häufig dem basalen Level unverletzter Nerven wieder angleicht. Auch das entgegengesetzte Expressionsmuster von supprimierten RAGs ist bereits identifiziert worden (Moore *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011).

Zur komplexen Gruppe der RAG-Proteine gehören u. a. Strukturproteine, axonale Wachstums- und Elongations-Signalproteine sowie Transkriptionsfaktoren. Aus der Kategorie der läSIONSINDUZIERTE Strukturproteine, welche in den dynamischen Prozessen der Zytoskelett-Architektur von Wachstumskegeln involviert sind, wurden bislang folgende RAGs identifiziert: Gap43 (*growth associated protein 43*; Bomze *et al.*, 2001), Cap23/BASP1 (*brain abundant, membrane attached signal protein 1*; Frey *et al.*, 2000), Sprr1 (*Small proline-rich repeat protein 1A*; Bonilla *et al.*, 2002), Stmn2 (Stathmin 2; Richardson *et al.*, 2009). Weitere Skelettproteine wie Alpha-Tubuline und Aktin (Fenrich & Gordon, 2004) sind sowohl mit Wachstumskegel- als auch verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen, wie L1CAM, NCAM1 und contactin-2, assoziiert und steuern Strukturänderungen von regenerierenden Axonen (Aubert *et al.*, 1998; Mason *et al.*, 2003).

Der Expression läSIONSINDUZIERTE RAGs liegt vermutlich die koordinierte Aktivität spezifischer Regenerations-assoziierte Transkriptionsfaktoren zugrunde, zu denen auch die Neuritenwachstum fördernden Transkriptionsfaktoren Ankrd1 (*ankyrin repeat domain1*; Stam *et al.*, 2007), Atf3 (*activating transcription factor 3*; Seijffers *et al.*; 2006 Seijffers *et al.*, 2007), c-JUN (*jun oncogene*; Broude *et al.*, 1997; Raivich *et al.*, 2004), CREB (*cAMP response element-binding protein*; Gao *et al.*, 2004), Smad1 (*SMAD Family number1*; Zou *et al.*, 2009), Sox11 (*SRY-box containing gene 11*; Jankowski *et al.*, 2009), Nfil3 (*nuclear factor interleukin 3 regulated*; MacGillavry *et al.*, 2009) sowie mehrere Mitglieder der Klf (*krüppel-like factors*)-Familie (Moore *et al.*, 2009) gehören.

Potenziell sind auch RAGs identifiziert, die sowohl in der axonalen Regeneration als auch Degeneration involviert sind. Hierzu gehört beispielweise das Galactin 1 (*galactose binding lectin LGALS1*; McGraw *et al.*, 2004; Di Giovanni, 2009), welches in Apoptose, Zellproliferation sowie -differenzierung involviert ist.

Zellintrinsische Mechanismen und eine differentielle RAG-Regulation beeinflussen das intrinsische Regenerationspotential von Neuronen nach einer peripheren oder zentralen Nervenverletzung jedoch unterschiedlich (Neumann *et al.*, 2002).

Obwohl die Identifizierung und Charakterisierung neuer potentieller RAGs in den letzten Jahren stetig zugenommen hat (Skene, 1989) und ihre veränderte Expression während der spontanen axonalen Regeneration des PNS bestätigt ist, steht für zahlreiche dieser

Gene noch die experimentelle Beweisführung einer relevanten funktionellen Bedeutung während der Nervenregeneration aus.

2.4 Regenerations-assoziierte Genkandidaten

Die Analyse der Arbeitsgruppe für Molekulare Neurobiologie von zurzeit noch unveröffentlichten mRNA-Expressionsprofilen von verletzten sowie regenerierenden DRG-Neuronen der Ratte ergab stichhaltige Hinweise auf weitere, bislang noch unbekannte Regenerations-assoziierte Gene und diente als Ausgangslage für diese experimentelle Dissertation.

2.4.1 Vorexperimente aus der Arbeitsgruppe

Mit Hilfe von modernen DNA-Mikrochip Analysen (RAE-230 2.0 [8h und 24h] sowie RAE-230A [2d, 7d, 28d] Mikroarrays, Affymetrix) wurden ca. 6000 Genproben nach traumatischen Verletzungen des Ischiasnervs im betroffenen neuronalen Zellkörper detektiert, die zumindest an einem der untersuchten Zeitpunkte signifikant ($FC \geq 1,5$; $p \leq 0,01$) reguliert waren. Es wurden drei verschiedene Läsionsparadigmen zu den genannten Zeitpunkten nach einer Nervenverletzung untersucht: (i) die Quetschläsion (*crush*) als Modell der Axotomie, um die spontanen De- und Regenerationsvorgänge peripherer Nerven mit den Vorgängen nach einer (ii) vollständigen Transektion (*Axotomie/transection*) zu vergleichen. Bei diesem Neurotmesis-Läsionsmodell wurde experimentell eine ansonsten mögliche axonale Regeneration durch eine beidseitige Ligatur der durchtrennten Nervenstümpfe an der Läsionsstelle unterbunden. Ein Vergleich der molekularen Genantwort des dritten untersuchten Läsionsmodells, (iii) der chirurgischen Koaptation (*reanastomosis*) von zuvor (28 Tage) durch eine Transektion getrennten Nervenstümpfen, mit den molekularen Ereignissen nach einer Quetschläsion, sollte schließlich Aufschluss darüber geben, ob und welche Divergenzen in den molekularen Reaktionen während einer spontanen (*crush*) und einer verzögerten (*reanastomosis*) axonalen Regeneration identifizierbar sind.

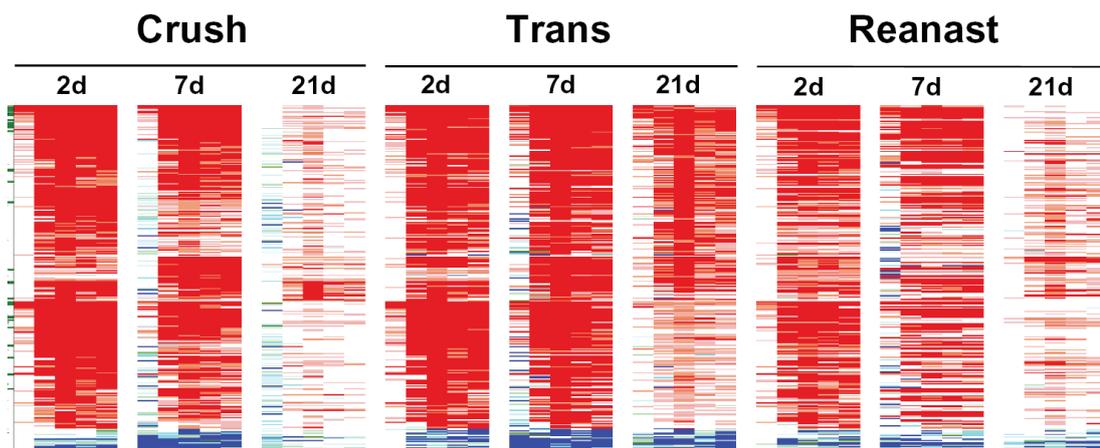


Abbildung 2.4: Heatmap von Gen-Expressionsunterschieden in sensorischen DRG-Neuronen nach Ischiasnerv-Läsion der Ratte. Crush = Quetschläsion, **Trans** = Transsektion, **Reanast** = Reanastomose; **rot** = signifikante Hochregulation, **blau** = signifikante Runterregulation, **grün** = etablierte RAGs; **2d, 7d, 21d** = 2, 7 und 21 Tage nach Läsion. Tabellarische Auflistung von ~300 Genproben putativer RAGs. Jede Linie repräsentiert die zeitliche Regulation einer jeden Genprobe in Abhängigkeit des jeweiligen Läsionsmodells. Die Berechnung erfolgte mithilfe von fünf verschiedenen statistischen Algorithmen (PLIER, RMA, GCRMA, MAS 5, LI WONG; ArrayAssist 4.2.0 Software). Jedes Gen erhält dadurch fünf Regulationswerte je Zeitpunkt (Subspalten). Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Frank Bosse (AG für Molekulare Neurobiologie, Neurologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Ein Vergleich der zeitlichen Regulationsprofile ergab für fast alle in der Literatur beschriebenen RAGs ein ähnliches, läsionsinduziertes Regulationsmuster mit einer signifikanten Induktion spätestens zwei Tage nach einer Verletzung, welche auch über sieben Tage in allen drei untersuchten Paradigmen zu beobachten war (Abbildung 2.4; grüne Markierung). Während in den zur Regeneration befähigten zwei Paradigmen (Quetschläsion und Koaptation) in der Regel nach 21 Tagen eine spezifische Herunterregulation auf das basale Kontrollniveau zu beobachten war, war nach einer Transsektion oft eine über den 21 Tage Zeitpunkt andauernde Induktion erkennbar (Abbildung 2.4).

Die zeitliche Clusteranalysen der Mikroarray-Daten ergaben, dass 286 Genproben des Affymetrix-Chips in dieser Analyse ein den etablierten Regenerations-assoziierten Genen vergleichbares Genexpressionsprofil aufweisen und die Heatmap somit potentiell weitere, neue induzierte RAGs beinhalten sollte. Darüber hinaus wurden 18 Genproben identifiziert, die ein zu den induzierten RAGs komplementäres Regulationsmuster

aufweisen und möglicherweise eine neue Gruppe supprimierter RAGs darstellen (Abbildung 2.4).

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation charakterisierten Kandidatengene *Cldn4*, *Cmtm3*, *Dusp6*, *Klf6* und *Kif22* spiegeln das läsionsinduzierte Expressionsprofil etablierter RAGs wider.

2.4.2 Claudin 4

Epineurium, Perineurium und Endoneurium sind die drei konnektiven Gewebekomponenten des peripheren Nervs (Abbildung 2.1). Die Struktur dieser Komponenten ist eng mit der Funktion der Abschirmungsbarriere für die Impuls-leitenden Elemente assoziiert. Epithelzellen werden mit *tight junctions* (dichte Verbindungen), *adherens junctions* (adhäsive Verbindungen) sowie *gap junctions* (lückenhafte Verbindungen) zusammengehalten. Diese *junctions* fungieren zum einem als mechanische Zellverbindung und zum anderen leiten sie Signale ins Zellinnere, um den Kontaktumfang mit Nachbarzellen sowie der extrazellulären Matrix zu referieren (Shang *et al.*, 2012).

Tight junctions exprimieren verschiedene Transmembranprotein-Typen wie das Occludin sowie verwandte Adhäsionsmoleküle, wie das Tricellulin oder verschiedene Claudine (Elkouby-Naor & Ben-Yosef, 2010), welche dem selektiven parazellulären Transport dienen und dadurch eine selektive parazelluläre Membranpermeabilität ermöglichen (Claude, 1978).

Claudine sind multifunktionale Proteine, die den parazellulären Transport von Ionen, gelösten Substanzen sowie Wasser regulieren und als Schranke zwischen apikaler und basolateraler Domäne von Plasmamembranen fungieren (Alshbool & Mohan, 2014). Bisher wurden 27 unterschiedliche *Tight junction* Membranproteine der Claudin-Familie in Maus und Mensch, mit einem molekularen Gewicht zwischen 20 und 34 kDa identifiziert (Alshbool & Mohan, 2014). Das vier Transmembrandomänenprotein Cldn4 (Claudin4) gehört ebenfalls zur multigenen Familie der *tight junction* Membranproteine und weist eine typische Cldn-Struktur auf. Diese besteht aus (i) vier Transmembrandomänen, (ii) zwei extrazellulären Loops (Schleifen), (iii) einem kurzen intrazellulären Loop sowie einem zytosolischen (iv) Amino- und (v) Carboxy-Terminus

(Abbildung 2.5; Alshbool & Mohan, 2014). Während die Aminosäuresequenz der ersten und vierten Transmembrandomäne in vielen Claudinen hoch konserviert ist, gilt dies für die zweite und dritte Domäne nicht (Morita *et al.*, 1999). Die erste extrazelluläre Schleife (ECL1 in Abbildung 2.5) besteht aus den geladenen Aminosäuren Glycin (G), Leucin (L) sowie Tryptophan (W) und ist grundlegend für die Transport-Selektivität verantwortlich. Des Weiteren sind zwei Cysteine (C) hoch konserviert, welche zur Proteinstabilität durch mögliche ausbildende Disulfidbrücken beitragen könnten (Angelow *et al.*, 2008). Der zweite extrazelluläre Loop (ECL2) weist ein *helix-turn-helix*-Motiv auf und dient zur Dimerisierung von Claudinen durch hydrophobe Interaktionen (Fujita *et al.*, 2000). Der Carboxy-Terminus ist zwischen den Claudinen sehr variabel, und ruft somit die parazellulären Selektivitätsunterschieden der verschiedenen Claudine hervor (Angelow *et al.*, 2008).

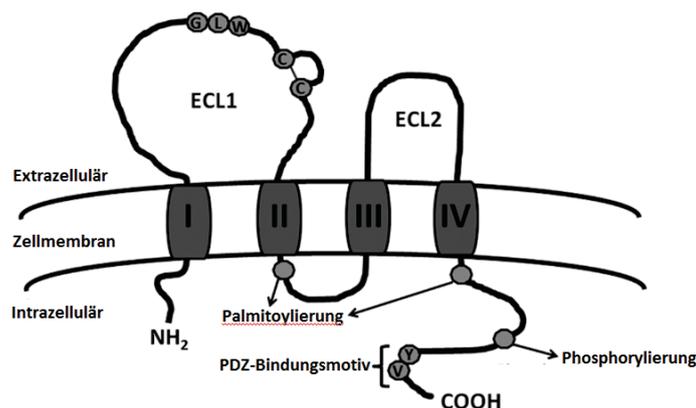


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Claudin-Struktur. Claudine verfügen über vier Transmembrandomänen (I, II, III, IV), zwei extrazellulären Schleifen (*loops*) (ECL1 und ECL2), eine kleine intrazellulären Schleife und zytosolische Amino- und Carboxy-Termini. [Auszug modifiziert aus: Alshbool & Mohan, 2014]

Basierend auf Sequenzanalysen und funktionellen Eigenschaften von Claudinvarianten der Maus, sind zwei Hauptgruppen der Claudine klassifiziert worden: 1. die „klassischen“, sequenzähnlichen Claudine, zu denen die Isoformen 1-10, 14, 15, 17 und 19 gehören, sowie 2. die „nicht-klassischen“ Claudine mit den Isoformen 12, 13, 16, 20, 22 und 23. Die Mitglieder der zweiten Kategorie sind am wenigsten miteinander verwandt.

Das in dieser Arbeit untersuchte Claudin4 wurde bislang in Endothelgewebe (Günzel & Yu, 2013) und in Neuronen des enterischen Nervensystems des Magen-Darm-Traktes (Karaki *et al.*, 2007) erforscht und als eine Kationen-Barriere klassifiziert (van Itallie, *et al.*, 2003). Anhaltspunkte für eine Funktion im Nervensystem wurde bisher nicht publiziert. Im Gegenteil: die Präsenz von Claudin4 ist in adulten Nerven sogar in einer früheren Publikation ausgeschlossen worden (Alanne *et al.*, 2009).

2.4.3 Cmtm3

Das Kandidatenprotein Cmtm3 (*CKLF-like MARVEL transmembrane containing 3*) gehört zu einer neuen Proteinfamilie, welche Eigenschaften von Chemokinen und der 4-Transmembran-Superfamilie (TM4SF) miteinander verbindet (Han *et al.*, 2003). Beim Menschen wurden bislang neun Familienmitglieder identifiziert: Cmtm1-8 sowie CKLF (*chemokine-like factor*). Cmtm-Proteine besitzen eine MARVEL-Domäne, welche in vielen essentiellen zellulären Prozessen, wie z. B. der Tumorsuppression, im vesikulären Austausch oder der Formation von *tight junctions* involviert sind (Lind *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012). Die Cmtm-typische 4-Transmembran-Helix-Struktur, mit zytosolischem Amino- und Carboxy-Terminus, wurde zuvor vor allem in Proteinen des kompakten Myelins (PMP22, MAL, PLLP) sowie im *tight junction* Protein Occludin der apikalen Zone polarisierter Epithelien identifiziert (Alonso & Weissman, 1987; Pérez *et al.*, 1997; Puertollano *et al.*, 1999; Martín-Belmonte *et al.*, 2001; Bosse *et al.*, 2003).

Cmtm3 ist ein neues, jedoch evolutionär konserviertes Gen, welchem wichtige Funktionen im Immun- und im männlichen Reproduktionssystem zugesprochen werden (Rui *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2006). Das 20 kDa große Protein ist im Zytoplasma lokalisiert und fungiert im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie in Zellkernen als ein stabilisierendes Proteingerüst (Imamura *et al.*, 2004).

Erst kürzlich wurde das *Cmtm3*-Kandidatengen als ein Tumorsuppressorgen beschrieben, da es in vielen Magen-, Brust-, Nasenrachenraum-, Speiseröhren-, Dickdarm- und Nierenkarzinomen herunterreguliert ist (Wang *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2014). Jedoch ist bislang leider nur sehr wenig über die genaue funktionelle Rolle des *Cmtm3* bekannt und eine Expression und/oder Funktion im Nervensystem war bis zum Beginn dieser Arbeit in der Literatur noch nicht beschrieben.

2.4.4 Dusp6

Das Dusp6-Protein (*dual specificity phosphatase 6*) ist ein Inaktivator für MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinasen. Bis zu 11 *Dusp*-Gene sind bereits in Säugergenomen identifiziert, die MAP-Kinase-Phosphatasen (MKP) kodieren (Theodosiou & Ashworth,

2002). Alle Dusp-Proteine weisen eine verwandte Aminosäuresequenz in der katalytischen Proteindomäne auf und besitzen am hoch konservierten Amino-Terminus eine MAP-Kinasen Bindestelle, welche die subzelluläre Lokalisation der Proteine beeinflusst (Theodosiou & Ashworth, 2002).

Die Dusp-Familie wird aufgrund der unterschiedlichen subzellulären Lokalisierung in drei Gruppen unterteilt. Während die erste Gruppe (Dusp1, -2, -4, -5) ausschließlich nukleär exprimiert wird (Rohan *et al.*, 1993; Guan & Butch, 1995; Kwak & Dixon, 1995), werden die Proteine der zweiten Gruppe (Dusp6, -7, -16) vorwiegend im Zytoplasma exprimiert (Dowd *et al.*, 1998; Tanoue *et al.*, 2001; Masuda *et al.*, 2001; Groom *et al.*, 1996; Muda *et al.*, 1996). Die dritte Gruppe enthält Dusp-Proteine (Dusp8-10), die sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert sind (Theodosiou *et al.*, 1996; Muda *et al.*, 1997; Theodosiou *et al.*, 1999; Tanoue *et al.*, 1999).

MAP-Kinasen sind evolutionär konservierte Gene, die wichtige Funktionen in der Organisation sowie Manipulation von zellulären Prozessen, wie der Proliferation, Differenzierung und Apoptose aufweisen (Schaeffer & Weber, 1999; Chang & Karin, 2001). Insgesamt sind vier MAP-Kinase-Gruppen in Säugerzellen bekannt: (i) Erk1 und Erk2 (*extracellular signal-regulated kinases*), (ii) JNK1-JNK3 (*c-Jun amino-terminal kinases*), (iii) p38 α -p38 δ (*p38 kinases*) sowie (iv) BMK1 (*Erk5/Big MAP kinase1*) (Theodosiou & Ashworth, 2002).

Dusp6 ist während der frühen Mausentwicklung mitverantwortlich für die Erk-Aktivitäts-Regulation im FGF (Fibroblastenwachstumsfaktor)-Signalweg (Eblaghie *et al.*, 2003). Da die FGF-Signalkaskaden wichtige physiologische Funktionen bei der peripheren Nervenregeneration ausüben (Grothe *et al.*, 2006), erscheinen im Falle positiver, RAG-assoziiierter Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit, weiterführende Untersuchung von Dusp6 in diesem Kontext lohnenswert für ein verbessertes Verständnis der komplexen regulatorischen molekularen Reaktionen der Regeneration des PNS.

2.4.5 Klf6

Der *krüppel-like faktor-6* (*Klf6*, *Copeb*) ist Mitglied der Klf-Transkriptionsfaktor-Familie, welche sich durch eine hoch konservierte Cys₂-His₂-Zinkfinger (Cystein₂/Histidin₂) DNA-

Bindungsdomäne im C-Terminus der Aminosäuresequenz auszeichnet (Kaczynski *et al.*, 2003) und mit der namensgebenden archetypischen Bindungsdomäne des Krüppelfaktors aus *Drosophila melanogaster* verwandt ist. Insgesamt sind 17 Klf-Familienmitglieder in Säugetieren bekannt, die alle regulierend auf die Genexpression eingreifen können. Auch zu den Transkriptionsfaktoren der Sp1-Genfamilie, welche in Abhängigkeit physiologischer oder pathologischer Stimuli die Transkription aktivierend oder reprimierend beeinflussen, bestehen erkennbare Verwandtschaftsbeziehungen (Kiryu-Seo & Kiyama, 2011). Da zwischen den Klf-Familienmitgliedern vor allem die DNA-Bindedomäne konserviert ist, andere Proteinbereiche jedoch stark variieren können, sind für diese sehr verschiedene und sogar gegensätzliche Funktionen beschrieben (Bieker, 2001; Suske *et al.*, 2005). Daher sind die Klf-Transkriptionsfaktoren in vielen biologischen Prozessen, wie (i) Proliferation, (ii) Differenzierung, (iii) Apoptose und (iv) Entwicklung involviert (McConnell & Yang, 2010).

Die beiden Mitglieder *Klf6* und *Klf7* sind aufgrund einer sauren Aktivierungsdomäne sowie einer hydrophoben Serin-reichen Domäne strukturell am engsten miteinander verwandt (Kaczynski *et al.*, 2003). Die Serin-reiche Domäne ist eine hoch konservierte Signalsequenz für Kernlokalisierungen, eine intrazelluläre Verteilung, die für das *Klf6*-Protein z. B. in ZNS-Neuronen und Endothelzellen des zerebralen Kortex sowie in Septum, Hippocampus, Basalganglien, Hypothalamus und Thalamus bereits nachgewiesen wurde (Jeong *et al.*, 2009). Darüber hinaus ist *Klf6* im sich entwickelnden Nervensystem (Laub *et al.*, 2001) und ausdifferenzierten Neuronen des ZNS (Moore *et al.*, 2011) sowie in den nicht-neuralen Geweben wie Herz, Dickdarm, Lunge, Niere und Gliedmaßenknospen exprimiert (Benzeno *et al.*, 2004).

Klf6 fungiert je nach zellulärer Reaktion als Transkriptionsrepressor oder auch -aktivator (Bieker, 2001) und agiert über die Induktion des Zellzyklus-regulierenden Signalmoleküls p21 zudem als Tumorsuppressor (Benzeno *et al.*, 2004).

Für einige Klf-Gene konnte eine regulatorische Funktion bei der Neuritenbildung motorischer Neurone des ZNS *in vitro* gezeigt werden (Moore *et al.*, 2009). Dabei wurde für *Klf6*, eine wachstumsfördernde Wirkung auf Neuriten von Retinalganglienzellen (RGCs) und Kortex-Neuronen *in vitro* nachgewiesen. Andere Klf-Gene, wie z. B. *Klf4*, führten bei rekombinanter Überexpression hingegen zu einer Reprimierung des Neuritenwachstums (Moore *et al.*, 2009).

Andere Studien im Kontext von Gewebeverletzungen beschreiben eine spezifische Aktivierung der *Klf6*-Genexpression in Satellitenzellen der Leber, was nachfolgend zur Fibrogenese und Bildung der Extrazellulärmatrix führt (Ratziu *et al.*, 1998). Übereinstimmend konnte eine Verbindung zwischen der Klf-Aktivität und einer Zytokin-Empfindlichkeit aufgrund einer *Klf6*-abhängigen Aktivierung des Kollagen- $\alpha 1(I)$ -Promotors sowie des TGF- β -Promotors gezeigt werden (Kim *et al.*, 1998). Somit wurde bereits früh eine Verbindung zwischen den *Klf6*-Funktionen und Verletzungen vermutet. Jedoch lassen bislang nur die Arbeiten von Moore im zentralen Nervensystem (Moore *et al.*, 2009), sowie die in dieser Arbeit geschilderten läsionsinduzierten RAG-Expressionsprofile peripherer Neurone auf eine relevante Funktion des *Klf6*-Transkriptionsfaktors im verletzten Nervensystem vermuten.

2.4.6 Kif22

Proteine der Kinesin Superfamilie (Kif) sind molekulare, eukaryotische Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine, welche durch Hydrolyse ATP (Adenosintriphosphat) in mechanische Energie konvertieren und aktiv (i) Organellen, (ii) mRNAs, (iii) Proteinkomplexe sowie (iv) Chromosomen entlang von Mikrotubuli transportieren (Tanaka *et al.*, 1998; Ligon & Steward, 2000; Stowers *et al.*, 2002; Diefenbach *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2005; Miki *et al.*, 2005; Pilling *et al.*, 2006). Dabei kontrollieren Kif-Proteine vorwiegend den intrazellulären anterograden Transport von vielen funktionellen Molekülen, Vesikeln, oder auch Organellen (Hirokawa *et al.*, 2009). Mehr als 45 Kif-Mitglieder sind derzeit in Säugerzellen identifiziert, welche in 14 Untergruppen unterteilt wurden (Lawrence *et al.*, 2004). Mehrere Kif-Proteine sind während der Karzinogenese an mitotischen Prozessen sowie Expressionsänderungen involviert und stellen potenzielle Biomarker sowie molekulare Targets für die Krebstherapie dar (Yu & Feng, 2010; Yu *et al.*, 2014).

Das in dieser Arbeit untersuchte Kif22, welches auch als Kid (*kinesin-linker DNA-binding protein*) bezeichnet wird, ist ein Plusende-orientiertes Mikrotubuli-basiertes Motorprotein, das sowohl an Mikrotubuli als auch Chromosomen bindet und am gesamten Mitoseprozess beteiligt ist (Tokai *et al.*, 1996; Levesque & Compton, 2001;

Tokai-Nishizumi *et al.*, 2005). Während der Prometaphase ist Kif22 in der Organisation des Spindelapparates sowie an der Chromosomen-Anordnung beteiligt (Tokai *et al.*, 1996). Im weiteren Mitoseprozess ist Kif22 an der Metaphaseplatte akkumuliert und befördert die Chromosomenarme zum Spindeläquator (Funabiki & Murray, 2000). Während der Anaphase bewegt Kif22 die Spindelpole entlang der Chromosomen und bewirkt eine Kompaktierung dieser (Ohsugi *et al.*, 2008).

Während der axonalen Regeneration des peripheren Nervensystems sind die assoziierten Genexpressionsänderungen von Neurofilament und Tubulin bereits gut erforscht (Hoffman *et al.*, 1987; Hoffman & Cleveland, 1988; Wong & Oblinger, 1990; McKerracher *et al.*, 1993). Partiiell wurde bewiesen, dass die Genexpressionsmuster von Neurofilament und Tubulin aus der Entwicklung in der Regeneration rekapituliert werden. Essentielle axonale Signale werden nach einer peripheren Nervenverletzung über den retrograden Transport zum Zellkörper weitergeleitet und die intrinsische Wachstumskapazität der Neurone wird aktiviert (Hanz & Fainzilber, 2006; Abe & Cavalli, 2008). Der Kinesin-vermittelte anterograde Transport stellt die zur axonalen Remodellierungsprozess essentiellen Faktoren wie Strukturelemente, Tubulinoligomere, Mitochondrien sowie Membranbestandteile zur Verfügung, aber limitiert die Geschwindigkeit des Regenerationsvorgangs durch seine maximale Transportgeschwindigkeit (Hirokawa & Takemura, 2004a, 2004b).

2.5 F11-Zelllinie

Zur Entwicklung eines immortalisierten Zellkulturmodellsystems für sensorische Neurone dorsaler Hinterwurzelganglien (DRG), wurde bereits 1985 die Fusionszelllinie F11 generiert (Platika *et al.*, 1985). Diese beruht auf einer Fusion von dissoziierten embryonalen (E13) DRG-Neuronen der Ratte mit der murinen Neuroblastom-Zelllinie N18TG2, welche instabil für die HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase) ist (Platika *et al.*, 1985). Die zugrundeliegenden Selektionskriterien für eine erfolgreiche Etablierung der Fusionszelllinie waren (i) eine stabile Ausprägung typischer neuronaler DRG-Eigenschaften, (ii) die Präsenz sowohl von Ratten-, als auch von Maus-Chromosomen, (iii) die Fähigkeit zur Synthese von Isoenzymen aus Ratte und Maus, (iv)

die weitestgehende Eliminierung kontaminierender parentaler N18TG2-Zellen mittels HAT-Behandlung (Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin) sowie (v) eine HPRT-Genexpression (Platika *et al.*, 1985).

Darüber hinaus exprimieren F11-Zellen neuronale Ganglioside, generieren Aktionspotentiale und manifestieren unter Differenzierungsbedingungen enorme neuritische Aktivität. Bei all diesen Eigenschaften handelt es sich um charakteristische Merkmale, die auf den hohen genomischen Anteil des fusionierten DRG-Neurons zurückzuführen sind (Platika *et al.*, 1985).

Unter proliferativen Kulturbedingungen weisen F11-Zellen wenige kurze, neuritenähnliche Fortsätze auf. Eine neuronale Differenzierung von F11-Zellen kann durch (i) die Reduktion der Serumkonzentration im Medium, welche in einer Reduktion der mitogenen Substanzen resultiert (Francel *et al.*, 1987), (ii) die Gabe des Pflanzen-Diterpens Forskolin (Francel *et al.*, 1987), das durch Stimulation der Adenylatzyklase den intrazellulären cAMP-Spiegel (zyklischem Adenosinmonophosphat) erhöht, oder (iii) durch Hinzugabe von dbcAMP (zyklischem Dibutyryl-Adenosinmonophosphat), einem cAMP-Analagon mit erhöhter Membranpermeabilität (Ghil *et al.*, 2000), induziert werden.

Während die Existenz von spezifischen Eigenschaften sensorischer DRG-Neurone durch den Nachweis von delta-opioiden Rezeptoren, Rezeptoren für Prostaglandine und Bradykinin sowie Dihydropyridin-sensitiver Kalziumkanäle (Francel *et al.*, 1987) verifiziert ist, sind keine Nachweise von Fibroblasten, Schwann- oder Satellitenzellen, welche natürlicherweise in DRG präsent sind, immunzytochemisch validiert worden (Boland & Dingleline, 1990). Die Tatsache, dass die natürliche Heterogenität der primären DRG-Neurone nicht akkurat durch eine einzelne Zelllinie wiedergespiegelt werden kann, lässt dennoch nicht an der Qualifikation der F11-Zelllinie als geeignetes immortalisiertes DRG-Modell zweifeln. Insbesondere durch die Synthese der Neurotransmitter Substanz P, welche charakteristisch für die Nozizeptoren ist (Abbildung 2.2; Francel *et al.*, 1987), sowie verschiedene publizierte Forschungsarbeiten zur Identifizierung neuer putativer RAGs, wie beispielsweise das kürzlich als RAG klassifizierte *Nfil3* (*nuclear factor, interleukin 3 regulated*; MacGillavry *et al.*, 2009), bestätigen ausdrücklich die hohe Relevanz des F11-Zellmodells für die hier geschilderten *in vitro*-Analysen. Somit können die F11-Zellen als Modellsystem für die Untersuchung neuronaler Differenzierung und

Entwicklung dienen und stellen eine stabile und konstitutiv neuronale Zelllinie dar, welche eine aufwendige Kultivierung primärer DRG weitgehend ersetzen und dadurch die Zahl benötigter Spender/Versuchstiere deutlich reduzieren kann.

2.6 Zielsetzung

Die Identifizierung von neuen Regenerations-assoziierten Genen stellt einen wichtigen Ansatzpunkt zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen im histopathologischen Regenerationsprozess dar. Gelingt es, neue essentielle RAGs zu finden, welche z. B. das regenerative Axonwachstum induzieren oder das Längenwachstum fördern oder stabilisieren, so wäre eine Möglichkeit gegeben, um in nachfolgenden *in vivo*-Systemen nach therapeutischen Ansatzpunkten zur Therapieentwicklung nach peripheren aber auch zentralen Nervenläsionen zu forschen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen dienen der Identifizierung und Charakterisierung neuer für die Nervenregeneration relevanter Gene und beinhalteten folgende Forschungsschwerpunkte:

1. Experimentelle Validierung der läsionsinduzierten Genexpressionsmuster ausgewählter Kandidatengene aus der Mikroarray-Analyse.
2. Immunhistochemische Charakterisierungen putativer RAG-Kandidaten *in vivo*.
3. Etablierung eines geeigneten neuronalen *in vitro*-Modellsystems (F11-Zellen) für RAG-Analysen.
4. Immunzytochemische Charakterisierungen putativer RAGs *in vitro*.
5. Generierung genspezifischer Expressionskonstrukte.
6. Rekombinante Modulation der Expression der Genkandidaten *in vitro*.
7. Qualitative und quantitative Hochdurchsatz-Analysen zur Charakterisierung des Neuritenwachstums rekombinanter F11-Zellkulturen in Abhängigkeit der Differenzierungsbedingung und Kandidatengenexpression.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für experimentelle *in vivo* Arbeiten wurden adulte männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 200-220 g aus der hausinternen Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf verwendet. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in Gruppenkäfigen unter konstanten Konditionen bei einer Temperatur von 21°C, einer Luftfeuchtigkeit von 50 % \pm 5 % sowie einem Tages- und Nachtzyklus von je 12 Stunden. Das Futter bestand aus pelletiertem Trockenfutter und pathogenfreiem Trinkwasser.

Alle Tierversuche sind entsprechend der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt worden (LANUV NRW Az: 8.87-50.10.37.09.301).

3.2 Antikörper

Tabelle 3.1: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Antigen	Hersteller
Cldn4 Kaninchen IgG	Claudin 4	Acris
Cmtm3 (E14) Ziege IgG	CKLF-Like MARVEL Transmembrane Domain Containing	Santa Cruz
Dusp6 (EPR129Y) Kaninchen IgG	Dual spezific phosphatase	abcam
GFP Kaninchen IgG	Grün fluoreszierendes Protein	abcam
Kif22 Kaninchen IgG	Kinesin family member 22	Abnova
Klf6 (R-173) Kaninchen IgG	Krüppel like factor 6	Santa Cruz
NF200 Maus IgG	Neurofilament 200 kDa	Sigma Aldrich
Pan axonaler Marker Maus IgG	Neurofilament 180-200 kDa	Covance
S100 Maus IgG	Schwannzell-Marker	abcam
β -III-Tubulin Maus IgG	β -III-Tubulin	Sigma Aldrich

Tabelle 3.2: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller
anti-Maus Esel IgG, Alexa Fluor® 488-gekoppelt	Invitrogen
anti-Maus Esel IgG, Alexa Fluor® 594-gekoppelt	Invitrogen
anti-Kaninchen Esel IgG, Alexa Fluor® 488-gekoppelt	Invitrogen
anti-Kaninchen Esel IgG, Alexa Fluor® 488-gekoppelt	Invitrogen

3.3 Reagenzien und Puffer

Tabelle 3.3: Reagenzien für immunhistochemische Untersuchungen

Reagenzien	Zusammensetzung/Hersteller
0,1 M Natriumcitrat-Dihydrat	29,41 g Na-C ₆ H ₅ O ₇ x 2H ₂ O (Merck) in 1000 ml Aqua dest.
0,1 M Zitronensäure-Monohydrat	21,01 g C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O (Merck) in 1000 ml Aqua dest.
0,2 M PB (Phosphat Puffer), pH=7,4	2,8 g Na ₂ HPO ₄ (Merck) 6 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (Merck) in 1000 ml Aqua dest.
10 nM Natrium-Citrat-Puffer; pH=6	9 ml 0,1 M Zitronensäure-Monohydrat 41 ml 0,1 M Natriumcitrat-Dihydrat in 450 ml Aqua dest
10x PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung), pH=7,4	80 g NaCl (Merck) 2 g KCl (Merck) 17,8 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (Merck) 2,4 g KH ₂ PO ₄ (Merck) in 1000 ml Aqua dest.
4 % PFA (Paraformaldehyd)	40 g PFA (Merck) 10 g Saccharose (Merck) 100 ml 10x PBS in 1000 ml Aqua dest.
Blocking-Lösung	10 % DS, 0,1 % Triton-X100 (Merck) in PBS
DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol)	1:10000 in PBS (Roche Diagnostics)
DS (Eselserum)	Sigma-Aldrich
Fluoromount G	Southern Biotech
Natriumborhydrid	Merck

Tabelle 3.4: Reagenzien für Genexpressionsanalysen

Reagenzien	Hersteller
1 kb DNA Leiter	Invitrogen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
5 x first strand buffer	Invitrogen
Agarose	Merck
anchored oligo(dT)12-18	Invitrogen
dNTP Mix	Invitrogen
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen
Ethidiumbromid	Merck
random Primer	Invitrogen
RNase Superscript II™	Invitrogen
Rnasin	Promega
SYBR Green	Applied Biosystems
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 3.5: Material zur rekombinanten Überexpression und siRNA-basierter Suppression

Reagenzien	Zusammensetzung/Hersteller
LB-Medium nach Lennox:	1,0 % (w/v) Bacto Trypton (Difco) 0,5 % (w/v) Hefe Extrakt (Difco) 0,5 % (w/v) NaCl (Merck)
LB-Agar	1,5 % (w/v) Bacto Agar in LB (Gibco)
Ampicillin	50 µg/ml in LB-Medium 70 µg/ml in LB Agar (Roche)
Kanamycin	50 µg/ml in LB-Medium 70 µg/ml in LB Agar (Roche)
Sac I	^{5'} ...G A G C T ^{3'} ... ^{3'} ...C ^{5'} A T C G A G... ^{5'} (Thermo Scientific)
Sal I	^{5'} ...G ^{3'} A T C G A C... ^{3'} ^{3'} ...C A G C T ^{5'} A G... ^{5'} (Thermo Scientific)
T4-DNA-Ligase	Invitrogen

Tabelle 3.6: Verwendeter Bakterienstamm

Bakterienstamm	Eigenschaften/Hersteller
ONE SHOT TOP 10	F ⁻ , mrcA Δ(mrr-hdsRMS-mcrBC), 80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (StrR), endA1, nupG (Invitrogen)

Tabelle 3.7: DNA-Fragmente für Überexpressionsversuche

Genname	Länge der CDS	synthetisiertes Fragment	flankierende Restriktionsschnittstellen
Cmtm3	554 bp	572 bp	Sac I und Sal I
Dusp6	1146 bp	1163 bp	Sac I und Sal I
Cldn4	633 bp	650 bp	Sac I und Sal I
Klf6	852 bp	857 bp	Sac I und Sal I
Kif22	1974 bp	1991 bp	Sac I und Sal I

Tabelle 3.8: Verwendete Vektorkonstrukte

Vektor	Hersteller
pIRES2-EGFP	Clontech
pUC57	GeneScript
CMTM3-pIRES2-EGFP	Eigenkonstrukt
DUSP6-pIRES2-EGFP	Eigenkonstrukt
CLDN4-pIRES2-EGFP	Eigenkonstrukt
KLF6-pIRES2-EGFP	Eigenkonstrukt
KIF22-pIRES2-EGFP	Eigenkonstrukt

Tabelle 3.9: Verwendete siRNA Pools

siRNA Pool	Targetsequenzen
siGENOME SMARTpool siRNA-Klf6	CGAAGUAAAUAGGAAUCU GAGGAAUUAUUGGCAACAGA GGUGAAGUCUUAGUCAAUU GUACAUCGGUGCCAUUUUA
siGENOME SMARTpool siRNA-Cmtm3	UUACAAGGCAGCAGGAGUU GCCAUUGACUUCUACCUGA UUAAUGAAGUGGCCAAAUU UCACUGCUGUCGCCAAAUA
siGENOME SMARTpool siRNA-Cldn4	GGAUGAACUGCGUGGUGCA ACGAGACCGUCAAGGCCAA CCACCUCGCCGCAACGAAA CAAGCAUGCUGAUUAUGGU
siGENOME SMARTpool siRNA-Kif22	GUGAUUAACCGCCUUUCA GCAGAAUGCCAGUGUACUU UAGAACAGCGUGAACGUUU AGAGAACACUCCCAAAU

Tabelle 3.9: Verwendete siRNA Pools (Fortsetzung)

siRNA Pool	Targetsequenzen
siGENOME SMARTpool siRNA-Dusp6	GAAAUGGCGAUCAGCAAGA CCUCGGACAUUGAGUCUGA UCAAGAAACUCAAGACGA GAACGAUGCUUAUGACAUU
siGENOME SMARTpool siRNA-Atf3	GAAGACGAGAGGAACCUUU UUGCUAACCUGACACCUUU CAGAGUGCCUGCAGAAGGA CAGAGAAACUGGAGAGUGU
siGENOME SMARTpool siRNA-nonsense	UAGCGACUAAACACAUCAA UAAGGCUAUGAAGAGAUAC AUGUAUUGGCCUGUAUUAG AUGAACGUGAAUUGCUCAA

Tabelle 3.10: Transfektionsreagenzien

Transfektionsreagenzien	Hersteller
Lipofectamine TM LTX and Plus Reagent	Invitrogen
DharmaFECT 3	Thermo Scientific Dharmacon [®]
5x siRNA Buffer	Thermo Scientific Dharmacon [®]
DMEM Glutamax [®]	Gibco

3.4 PNS Läsionen

Alle chirurgischen Eingriffe wurden an ordnungsgemäß ausgestatteten Operationsplätzen in der Tierversuchsanlage durchgeführt. Die Versuchstiere wurden durch initiale Inhalation von Isofluran (Baxter) betäubt und mittels Inhalationsnarkose unter Verwendung von Isofluran (3-4 % zur Einleitung, 1-2 % zur Erhaltung) in einem 2:1 Gemisch aus Lachgas und Sauerstoff in Narkose gelegt. Die Oberschenkel der Hinterbeine wurden dorsal rasiert und mit Kodan-Spray (Schülke & Meyr GmbH) desinfiziert. Der *Nervus ischiadicus* wurde durch stumpfes Spreizen des überdeckenden Muskels mithilfe einer eingeführten Schere auf Höhe der Mitte des Oberschenkels freigelegt.

Die Quetschläsion (*crush*) beruht auf dem Quetschen des Nervs mittels einer feinen Uhrmacherpinzette (Dumont, Pinzettenstärke: No 7) für je zweimal 10 Sekunden.

Für die Transsektion (*trans*) wurde der Ischiasnerv mit nicht absorbierbarer chirurgischer Nähseide (Ethicon, Fadenstärke 4) zweimal direkt nebeneinander abgebunden und anschließend zwischen den Ligaturen mit einer feinen, scharfen Schere durchtrennt.

Nach Abschluss der Nervenläsionen wurde der Muskel durch ein leichtes und vorsichtiges Zusammendrücken des Hinterbeins von außen wieder zusammengefügt und die Wunde mit Klammern verschlossen. Zusätzlich zu den lädierten Tieren wurden *sham*-operierte Kontrolltiere untersucht, bei welchen ausschließlich der Oberschenkel geöffnet wurde, der Nerv jedoch unverletzt und unangetastet blieb.

3.5 Gewebepräparation

Zur Gewinnung von Gewebeproben wurden die lädierten Tiere sowie die Kontrolltiere nach einem Zeitraum von acht und 24 Stunden, sowie zwei, sieben und 21 Tage post Operation durch Verwendung einer letalen Überdosis Isofluran und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Für nachfolgende Untersuchungen wurden die dorsalen Hinterwurzelganglien (DRG) L4, L5 und L6, der entsprechende Teilabschnitt des lumbalen Rückenmarks selbst sowie der distale Ischiasnerv isoliert.

Für Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR wurde das präparierte Gewebe umgehend auf Trockeneis überführt, gefroren und bei -80°C gelagert.

Für immunhistochemische Untersuchungen wurde das gewonnene Gewebe in 3,7 %iger Formaldehyd-Lösung (Merck) über Nacht (die DRGs nur für 6 Stunden) fixiert und anschließend für 24 Stunden in PBS inkubiert. Danach wurde das Rückenmark (Fragment L4-L6) aus den Wirbelkörpern freipräpariert. Nach der PBS-Behandlung wurden die Proben bei Raumtemperatur (RT) in einer Ethanol-Konzentrationsreihe (Tabelle 3.11) dehydriert und gehärtet und über Nacht (die DRG für nur 6 Stunden) bei 4°C mit dem Intermedium Methylbenzoat (Merck) inkubiert, um später die Immersion des Paraffins ins Gewebe zu ermöglichen. Zur Paraffininfiltration wurde das Gewebe in kleine Glasgefäße (Ø ca. 2 cm) überführt, mit einem auf 59°C erwärmten Mix aus 95 % Paraffin (Merck) und 5 % Wachs (Caelo) vollständig überschichtet und im Wärmeschrank bei 59°C für eine Stunde aufbewahrt. Es folgten drei Paraffin/Wachs-Wechsel nach jeweils einstündiger

Inkubationszeit und eine abschließende Inkubation der Proben im Paraffin/Wachs Gemisch über Nacht bei 59°C.

Am folgenden Tag wurde das Gewebe eingeblockt. Dazu wurde es in quadratische Kautschukformen überführt und zur Generierung für das Mikrotom (Reicher-Jung 1140/Autocut) geeigneter Gewebeblöcke final mit dem Paraffin/Wachs-Gemisch überschichtet. 10 µm dicke Querschnitte aus Rückenmark- und Ischiasnervgewebe sowie Koronalschnitte aus DRG wurden angefertigt, in ein auf 47°C äquilibriertes Wasserbad (Medax 43900) zur Streckung überführt und auf beschichteten Objektträgern (Marienfeld, HistoBond) für zehn Stunden bei 57°C im Wärmeschrank getrocknet.

Tabelle 3.11: Dehydrierungsprotokoll für Gewebeproben

Schritt	Konzentration Ethanol (%)	Inkubationsdauer (min)
1	50	30
2	70	60
3	90	60
4	100	60
5	100	60

3.6 Immunhistochemisches Fluoreszenz-Färbeprotokoll

Für immunhistochemische Färbungen wurden Gewebeschnitte mit 10 % Eselserum/PBS geblockt (DS, Sigma) und mit 0,1 % Triton X-100 (Merck) für eine Stunde permeabilisiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern (Tabelle 1) erfolgte über Nacht bei 4°C in Blocking-Lösung. Nach drei PBS-Waschschritten wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper für zwei Stunden bei RT in 0,1 % Triton X-100/PBS inkubiert. Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Roche Diagnostics) gelabelt. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Proben mit Fluoromount G (Southern Biotech) eingedeckt.

Zum Detektieren und späteren Ausschließen von unspezifischen Bindungen der Sekundärantikörper wurden Negativkontrollen, ohne Verwendung primärer Antikörper, durchgeführt. Die Spezifität der Primärantikörper wurde in vorherigen Studien an

Gewebe aus intakten DRG, Rückenmark oder Gehirn getestet. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan2, Zeiss) oder dem LSM 510 Konfokal-Mikroskop (LSM 510, Zeiss) angefertigt.

Tabelle 3.12: Verwendete Antigendemaskierungen für IHC-Färbungen und eingesetzte Antikörperverdünnung für IHC- und ICC-Färbungen. IHC= Immunhistochemische Färbung; ICC= Immunzytochemische Färbung

Primärantikörper	Antigendemaskierung	Verdünnungen	
		IHC	ICC
Claudin4	Na-Citrat	1:50	1:100
CMTM3	-	-	1:500
DUSP6	Na-Citrat	1:50	1:100
Kif22	Na-Citrat	1:50	1:100
KLF6	keine	1:100	1:300

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 RNA- Isolation aus kultivierten Zellen und Gewebe

Die Präparation der Gesamt-RNA aus pelletierten Zellen erfolgte mithilfe des Qiagen RNeasy Mini-Kit (Qiagen) in Übereinstimmung mit der Herstelleranleitung.

Die RNA-Präparation aus isoliertem Gewebe erfolgte unter Verwendung eines Trizol-Chlorform-Gemisches im 5:1 Verhältnis (Invitrogen, Merck). Das Homogenisieren des Gewebes erfolgte mithilfe eines Polytrons (Kinematika) mit anschließender Inkubationszeit (5 min auf Eis), gefolgt von einer fünfminütigen Zentrifugation zur Phasentrennung bei 12000 rpm und 4°C (Hettich EBA 12R). Nach Auftrennung in eine untere organische Phase, eine proteinhaltige Interphase sowie eine wässrige, RNA-haltige obere Phase, wurde der wässrige Überstand mithilfe von Isopropanol und Glykogen präzipitiert. Das gefällte RNA-Gemisch wurde 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend pelletiert (20 min, 12000 rpm, 4°C). Das gewonnene RNA-Pellet wurde zur Entfernung von Salzresten mit 70 % Ethanol (Merck) gewaschen, für 5 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (10 min, 12000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde bei RT angetrocknet und im

RNase-freien ddH₂O resuspendiert und zum vollständigen Lösen für 10 min bei 50°C (Eppendorf Thermomixer) inkubiert.

Zur Entfernung unerwünschter genomischer DNA sowie zur Beseitigung von Verunreinigungen, wurde zusätzlich bei jeder RNA-Präparation eine DNaseI-Behandlung (RNase-Free DNase, Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Bestimmung des RNA-Gehalts einer Probe erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) unter Verwendung eines Spektralphotometers (Nano Drop, PEQLAB).

3.7.2 Reverse Transkription (RT-PCR)

Die Durchführung einer PCR-Reaktion (hier Echtzeit-PCR) mit RNA-Matrize erfordert die initiale Herstellung eines komplementären DNA Stranges (cDNA). Die cDNA-Synthese beginnt zunächst mit der Hybridisierung von speziellen Startprimern (Tabelle 3.13) an je 500 ng Gesamt-RNA aus Gewebeproben bzw. 1 µg aus Kulturzellen.

Tabelle 3.13: Verwendete Startprimer

Menge	Komponenten	Endkonzentration	Hersteller
1 µl	anchored oligo(dT) ₁₂₋₁₈	2,5 µg/µl	Invitrogen
1 µl	random Primer	3 µg/µl	Invitrogen
@ 12,5 µl	RNase-freies H ₂ O	-	Merck

Der Vorteil einer Mixtur beider Startprimer besteht darin, ein nahezu vollständiges cDNA-Abbild der mRNA-Matrizen zu synthetisieren. Zur Reduktion störender Sekundärstrukturen wurde die mRNA für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden folgende Reagenzien aus einem Mastermix zur Erststrang-Synthese hinzugefügt:

Tabelle 3.14: Zusammensetzung des cDNA-Mastermixes für die reverse Transkription

Menge	Komponenten	Endkonzentration	Hersteller
4 µl	5 x first strand buffer (200 u/µl)	1 x (1000 u)	Invitrogen
1 µl	dNTP mix	500 µM per dNTP	Invitrogen
1 µl	0,1 M DTT	0,1 M	Invitrogen
0,5 µl	RNasin (40 u/µl)	20 u	Promega
1 µl	RNase Superscript II™	0,4 U/µ	Invitrogen

Der fertige Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 25°C inkubiert. Die eigentliche cDNA-Synthese erfolgte für weitere 50 min bei 50°C und wurde durch eine abschließende Inaktivierung des Superscript-Enzyms durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C beendet. Alle temperaturabhängigen Prozesse wurden in einem Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

3.7.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative PCR wurde mithilfe eines 7000 HT Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) unter Benutzung von SYBR-Green als Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt. Verwendet wurde ein *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), der bereits PCR-Puffer, Nukleotide, AmpliTaqGold-Enzyme sowie AmpErase Uracil-N-glycosylase (UNG) enthielt. Die routinemäßige Erstellung eines Dissoziationsprofils der Amplifikationsprodukte war erforderlich, um die Genspezifität der verschiedenen PCR-Reaktionen abschätzen und/oder Primer-Dimere detektieren zu können.

Ein typischer Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

Tabelle 3.15: Zusammensetzung des Q-PCR-Reaktionsansatzes

Menge	Komponenten	Hersteller
15 µl	SYBR Green	Applied Biosystem
5 µl	cDNA	Eigenes Template
0,3-1,8 µl	Forward primer (5 µM)	genspezifisch, Metabion
0,3-1,8 µl	Reverse Primer (5 µM)	genspezifisch, Metabion
ad 30 µl	H ₂ O LiChrosolv	Merck

Das Standard-Temperaturprofil für die Amplifikation bestand aus folgendem Protokoll:

Tabelle 3.16: Temperaturprofil zum quantitativen Vergleich der Gesamt cDNA-Menge verschiedener Proben

Zeit	Temperatur	
10 min	95°C	} 45 Zyklen
2 min	50°C	
15 sek	95°C	
1 min	60°C	

Die Auswertungen der qRT-PCRs verliefen nach Herstellerangaben über eine *relative* Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Hierbei wird die Expression (Ct-Wert: Schwellenwertzyklus) des Zielgens auf die Expression eines möglichst konstant exprimierten Referenzgens bezogen: ΔC_t . Dadurch können individuelle Probeneffekte korrigiert werden, da sie Zielgen und Referenzgen gleichermaßen betreffen sollten. Anschließend werden von den ΔC_t -Werte der Probenbedingungen der ΔC_t -Wert einer zuvor bestimmten Kontrollbedingung abgezogen ($\Delta\Delta C_t$). Der relative Expressionsunterschied des Zielgens (Verhältnis) zwischen einer Probenbedingung und der Kontrollbedingung (normalisiert zum Referenzgen) ergibt sich dann aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Paffl, 2004). Als Referenzgene wurden von mir ODC, GAPDH, RNA Polymerase II und Cyclophilin verwendet.

3.7.4 Primerherstellung

Alle verwendeten genspezifischen Oligonukleotide wurden aufgrund ihrer mRNA Sequenz abgeleitet. Die Bestimmung geeigneter Primersequenzen erfolgte mit der *Primer Express Software 3.0* von Applied Biosystems. Zur Überprüfung der Spezifität wurde jede Primersequenz anschließend mit der Refseq mRNA-Datenbank abgeglichen. Ein sogenanntes Alignment erfolgte mit dem zur Verfügung stehenden BLAST Onlinetool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Die Oligonukleotidsynthese wurde von der Firma Metabion (Martinsried) durchgeführt

Tabelle 3.17: Gen-spezifische Oligonukleotide

Gen	Genname	Primerpaar
Cldn4	Claudin 4	<i>fwd</i> : TGT ATA CCC CCT CCC TCT TCA <i>rev</i> : TGG TGC AAT GCC ATC AGA C
Cmtm3	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3	<i>fwd</i> : TCT TTG GGC CCC TTT AAC CT <i>rev</i> : GAA CTG CAG TGA TTG GCT CTG T
Cyclophilin	Cyclophilin	<i>fwd</i> : CGA TGA CGA GCC CTT GG <i>rev</i> : TCT GCT GTC TTT GGA ACT TTG TC
Dusp6	dual-specific phosphatase	<i>fwd</i> : GCT GTA CGA GTC GTC GCA CAT <i>rev</i> : GAC GCC GCA GCA TGA TG
Gapdh	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	<i>fwd</i> : TCC GTT GTG GAT CTG ACA TGC <i>rev</i> : GCA TCA AAG GTG GAA GAA TGG
Kif22	kinesin family member 22	<i>fwd</i> : ATC CTC ATT GCC AAC ATC GC <i>rev</i> : AAA GGC CGG TTA ATC ACC TCC
Klf6	krüppel-like-factor 6	<i>fwd</i> : TCA TGT CAG AAG CGG CAT AG <i>rev</i> : AGA AAC CAG TGG TGA GTC CG
Odc	Ornithin-Decarboxylase	<i>fwd</i> : GGT TCC AGA GGC CAA ACA TC <i>rev</i> : GTT GCC ACA TTG ACC GTG AC
RNA Poly II	RNA Polymerase II	<i>fwd</i> : CAC AGC CAG CCA TCC TCA A <i>rev</i> : TGA GGG AGA AGA TTT GCT TGC

3.8 Zellkultur

Tabelle 3.18: Verwendete Zellkulturmedien

Reagenzien	Zusammensetzung/Hersteller
F11-Zell-Proliferationsmedium	DMEM Glutamax® (Gibco) 10 % FBS (Lonza) 100 U/ml Penizillin/Streptomycin (Gibco)
F11-Zell-Differenzierungsmedium	DMEM Glutamax® (Gibco) 0,5 % FBS (Lonza) ± 10 µM Forskolin (Sigma Aldrich) 100 U/ml Penizillin/Streptomycin (Gibco)
F11-Zell-Einfriermedium	DMEM Glutamax® (Gibco) 20 % DMSO (Sigma) 40 % FBS (Lonza) 100 U/ml Penizillin/Streptomycin (Gibco)
Plastik- und Glasbeschichtung für F11-Zellen	Poly-L-Lysin (PLL) 0,1 mg/ml (Sigma)
DRG Kulturmedium	DMEM (Gibco) 10 % FBS (Lonza) 2 mM Glutamine (Gibco) 100 U/ml Penizillin/Streptomycin (Gibco)
Glasbeschichtung für primäre DRG-Kulturen	Poly-D-Lysin (PDL), 0,5 mg/ml (Sigma) Laminin, 13 µg/ml (Sigma)
Collagenase type I	30 % (Sigma-Aldrich)
Glucose-Lösung	0,6 % Glucose in PBS (Merck)
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin (0,05 % Trypsin + 0,02 % EDTA)	Gibco

3.8.1 Kultivierung von F11-Zellen

Die Kultivierung der Fusionszelllinie F11 kann sowohl unter proliferierenden als auch differenzierenden Bedingungen stattfinden, wobei der Unterschied auf dem Anteil des Kälberserums (FBS) im Kulturmedium beruht (Tabelle 3.18). Alternativ wurde auch ein zweites Differenzierungsmedium verwendet, das zusätzlich zum Serumentzug noch 10 µM Forskolin (Sigma Aldrich) enthielt.

Die Kultivierung der F11-Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 10 % CO₂ in T75-Zellkulturflaschen (Greiner). Das Passagieren der Zellen erfolgte bei einer Zelldichte von ca. 70 % mithilfe von sterilem Trypsin/EDTA (Gibco).

3.8.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von F11-Zellen

Konfluent wachsende F11-Zellen wurden mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA (Gibco) für ca. 1 min bei RT von der Zellkulturflasche gelöst. Die Trypsin-Behandlung wurde mit Proliferationsmedium (Tabelle 3.18) gestoppt und die Zellen 5 min bei 1000 rpm pelletiert. Nach Resuspension des Zellpellets in Proliferationsmedium wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:1 mit Gefriermedium (Tabelle 3.18) gemischt, in Einfriergefäße überführt und bei – 20°C für eine Stunde eingefroren. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C für 24 Stunden inkubiert, bevor sie für eine längerfristige Aufbewahrung in den Flüssigstickstofftank überführt werden konnten.

Zur Revitalisierung von kryokonservierten Zellen wurden diese umgehend nach Verlassen der Stickstofflagerung in einem vorgewärmten Wasserbad (37°C) aufgetaut, und sehr rasch in Proliferationsmedium überführt. Die Zellen wurden pelletiert (10 min bei 1200 rpm), mit Proliferationsmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.8.3 Präparation von primären DRG-Kulturen

Unisex Wistar-Ratten, im postnatalen Alter von sechs Tagen, wurden für 5 min mit Isofluran anästhesiert und durch Enthauptung getötet. Nach Öffnung des Bauchraums sowie Entfernung der Eingeweide und des Muskelgewebes wurde die Wirbelsäule komplett geöffnet, die DRGs herausgenommen und in 0,6 %ige Glucose-Lösung überführt. Die Freipräparation der DRG-Neurone erfolgte durch gründliches Entfernen der restlichen Nervenfasern. Mit zwei Pinzetten wurden die DRG im DMEM dissoziiert und mit Trypsin/EDTA (Endkonzentration 0,025 %) sowie 0,5 ml Collagenase type I (30 %-Stocklösung) für 30 min (4 mg/ml DNase-Zugabe für die letzten 5 min) im Brutschrank inkubiert. Nach Trituierung, Zentrifugation (1500 rpm; 10 min) und resuspendieren im DRG-Medium wurden die Zellen auf beschichtetes Material ausgesät.

3.8.4 Immunzytochemie

Für immunzytochemische Färbungen erfolgte eine Kultivierung von Zellen auf Glascoverslips (\varnothing 13 mm) in 24Well-Kulturplatten. Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Zellen für 15 min in einer 4 %igen PFA-Lösung bei RT fixiert. Anschließend folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS. Die Färbung erfolgte entsprechend der unter 2.5 beschriebenen Fluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten.

3.9 Gentechnische Verfahren

3.9.1 Verwendete Vektoren

Die im Auftrag von der Fa. GeneScript (Piscataway, USA) synthetisch hergestellten kodierenden Regionen (CDS) der ausgewählten Kandidatengene wurden als Insertfragmente des pUC57-Vektors ausgeliefert. Zur Subklonierung in den Expressionsvektor pIRES2-EGFP wurden die jeweiligen CDS-Fragmente (Tabelle 3.7) durch enzymatische Hydrolyse mit den flankierenden Restriktionsenzymen Sac I und Sal I aus dem pUC57-Konstrukten isoliert. Anschließend wurden die mithilfe eines Agarosegels isolierten Fragmente in den mit Sac I / Sal I linearisierten bicistronischen Zielvektor einkloniert.

Eine schematische Übersicht der Vektorensysteme liefert folgende Abbildung:

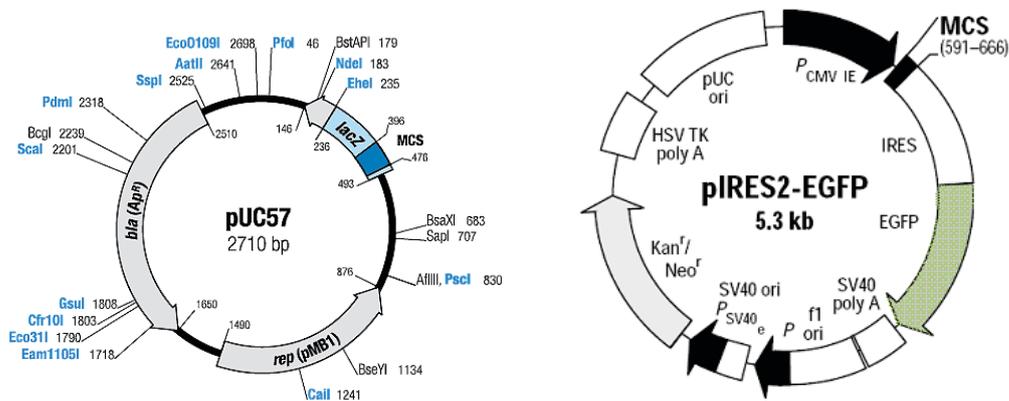


Abbildung 3.1: Vektorkarten von pUC57 und pIRES2-EGFP. Die kodierenden Sequenzen der Kandidatengene waren in pUC57 inseriert geliefert worden. Es erfolgte daher eine Restriktionsverdauung, Fragmentisierung und eine anschließende Klonierung in das pIRES2-EGFP Plasmid. Antibiotikumresistenzen: pUC57 = Ampicillin; pIRES2-EGFP = Kanamycin für Prokaryonten und Neomycin für Eukaryonten. [Auszug aus: <http://www.genscript.com>, <http://www.clontech.com>]

3.9.2 Isolierung und Ligation der Kandidatengen-Fragmente

Die Isolierung der Kandidatengen-CDS-Fragmente erfolgte mithilfe *FastDigest*-Restriktionsdoppelverdau (Sac I / Sal I; Thermo Scientific) der pUC57-Plasmide und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Agarosegel. Die jeweiligen Insertbanden wurden mithilfe des Gel-Extraktion-Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt. Für die Klonierung in einen entsprechend linearisierten pIRES2-EGFP Vektor wurden die aufgereinigten CDS-Fragmente durch eine T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verknüpft.

3.9.3 Transformation

Die Transformation wurde mit chemisch kompetenten *TOP 10-One Shot E.coli*-Bakterien (Invitrogen) unter Anwendung der Hitzeschockmethode nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert (Tabelle 3.5) und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag konnten einzelne Kolonien mit sterilen Zahnstochern von der Platte entnommen und in flüssiges Antibiotikum-haltiges LB-Medium überführt werden.

3.9.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Mini- bzw. Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Transformandenklonen erfolgte mittels alkalischer Lyse aus Übernachtskulturen. Die hierfür verwendeten Materialien stammten alle aus den Qiagen Mini/Maxi Plasmid-Präparationskits. Alle Arbeitsschritte wurden in Übereinstimmung mit der Anleitung des Herstellers ausgeführt. Zur internen Kontrolle wurde ein Restriktionsverdau aller präparierter Plasmide durchgeführt.

3.9.5 siRNA Resuspension

Die kommerziell erworbenen siRNA Pools (Thermo Scientific Dharmacon®) wurden nach Herstellerangaben in 1x siRNA Buffer (5x siRNA Buffer, Thermo Scientific Dharmacon®) resuspendiert, in 20 µM Stock-Lösungen aliquotiert und bei -30°C weggefroren.

3.9.6 Transfektion

Die Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen erfolgte mittels Lipofektamin (Lipofectamine™ LTX and PLUS™ Reagents, Invitrogen) nach Herstellerangaben.

Folgende Volumina wurden eingesetzt:

Tabelle 3.19: Übersicht der verwendeten Transfektionsvolumina für Überexpressionen

*= Für Transfektionen im 96well-Format müssen 1:10 Verdünnungen der PLUS- und LTX-Reagenzien hergestellt werden. Die tatsächliche Auftragsmenge ist dadurch 1 µl PLUS und 2,4 µl LTX.

Format	Fläche	Plasmid-DNA	PLUS	LTX	DMEM
96Well	0,3 cm ²	100 ng	0,1 µl*	0,24 µl*	10 µl
24Well	2,0 cm ²	500 ng	0,5 µl	1,2 µl	100 µl
6Well	9,6 cm ²	2,5 µg	2,4 µl	5,76 µl	480 µl
T25-Flasche	25 cm ²	6,25 µg	6,25 µl	15 µl	1,25 ml
T75-Flasche	75 cm ²	18,75 µg	18,75 µl	45 µl	3,75 ml

Für spezifische *Knock-down*-Experimente mit siRNA Pools wurde die Transfektion mithilfe des Dharmacon-Systems (Dharmacon® Thermo Scientific) nach Herstelleranleitung durchgeführt.

Hierfür wurden folgende Volumina verwendet:

Tabelle 3.20: siRNA-Transfektionsprotokoll

Reagenz	Einsatzmenge per Well (96Well-Format)
siRNA (5 µM in 1x siRNA buffer)	0,5 µl
1x siRNA buffer	4,55 µl
DF3	0,1 µl
DMEM (0,5 % FBS)	80 µl

Die Kultivierungsdauer nach Transfektion betrug insgesamt 48 Stunden. Anschließend wurden die Zellen mit 4 %iger PFA-Lösungen für 15 min fixiert.

3.10 Hochdurchsatz-Screenings der rekombinant modulierten RAG-Kandidaten

3.10.1 Probengenerierung

Die Auswirkungen der rekombinant modulierten RAG-Kandidatengene auf die Neuritogenese und das Neuritenwachstum kultivierter neuronaler Zellen wurden in Form eines Hochdurchsatz-Screenings mit dem Cellomics KineticScan HCS Reader (Thermo Scientific) in Kooperation mit dem *Department of Molecular and Cellular Neurobiology, Center for Neurogenomics and Cognitive Research, Neuroscience Campus Amsterdam, VU University Amsterdam* durchgeführt. Hierfür wurden, wie bereits unter 2.8.6 beschrieben, F11-Zellen mit den generierten Überexpressionskonstrukten oder den erworbenen siRNA Pools im 96Well-Format transfiziert. Je 5 Wells wurden je Konstrukt und Kultivierungsmedium (Proliferation/Differenzierung) angefertigt. Die Zell-Visualisierung erfolgte mit einer immunzytochemischen Färbung nach dem oben beschriebenen Protokoll (Kapitel 2.5), mit der Ausnahme, dass vor dem Blocken eine fünfminütige Vor-Permeabilisierung in 0,5 % Triton-X100 (Merck) stattfand.

3.10.2 Cellomics-basierte Analyse

Eine semiautomatisierte Datenaufnahme und -analyse erfolgte mithilfe eines Cellomics KineticScan HCS Readers (Thermo Scientific) und der *Cellomics Neuronal Profiling Bioapplication* Software. Eine repräsentative Bildansicht jedes Wells war durch eine 3x3 Bildmontage (9 Bilder/Well) mit dem 5x-Objektiv gewährleistet. Die Kalkulation relevanter Bildinhalte umfasste die Gesamtzellanzahl, die Neuritenanzahl und -länge sowie die Anzahl der Verzweigungspunkte jeder Bildansicht/Montage.

Folgende Parameter wurden für die zellmorphologische Analyse verwendet:

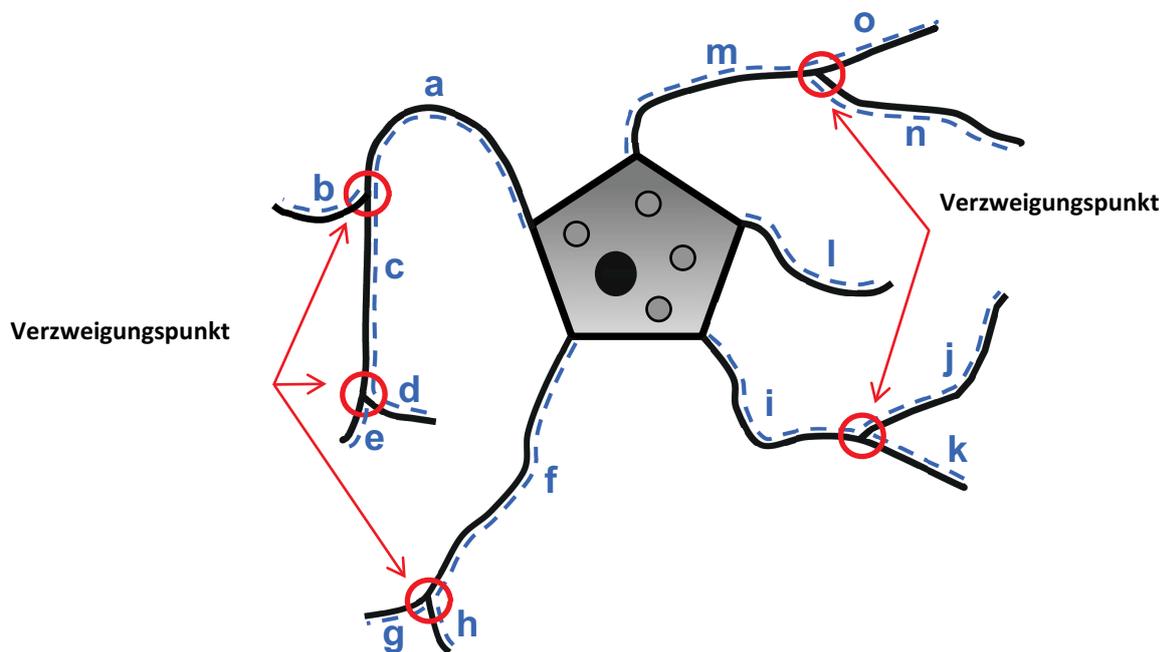


Tabelle 3.21: Zellmorphologische Parameter

Parameter (per Zelle)	Kalkulation
Neuritenanzahl	Summe (a+f+i+l+m)
Neuritenlänge	Länge (a+b+c+d+e+f+g+h+i+j+k+l+m+n+o)
Durchschnittliche Neuritenlänge	$\frac{\text{Länge (a+b+c+d+e+f+g+h+i+j+k+l+m+n+o)}}{\text{Summe (a+f+i+l+m)}}$
Anzahl Verzweigungspunkte	$\frac{\text{Summe (Verzweigungspunkte)}}{\text{Summe (a+f+i+l+m)}}$

3.10.3 Statistische Analyse

Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe der kommerziell erworbenen Statistiksoftware *GraphPad PRISM 5* (GraphPad Software) ermittelt. Für eine Well-basierte Analyse wurde die One-Way ANOVA (Varianzanalyse) mit dem Dunnett's *post hoc* Test (Signifikanztest) verwendet. pIRES2-EGFP-Überexpressions- bzw. siRNA-Effekte wurden mit den entsprechenden Kontrollen (pIRES2-EGFP-Leervektor bzw. nonsense siRNA) verglichen und ab einem p-Wert von < 0,05 als signifikant eingestuft.

Um potenzielle Schwankungen des Wachstums der F11-Kulturzellen zu berücksichtigen, wurden die Kalkulationen der zellmorphologischen Analysen zusätzlich mit der entsprechenden Kontrolle normalisiert. Dies ermöglicht eine prozentuale Darstellung der Ergebnisse sowie eine Zusammenfassung aller experimentellen Versuche.

4 Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen dienten der gezielten molekularen Charakterisierung der Kandidatengene *Cldn4*, *Cmtm3*, *Dusp6*, *Klf6* und *Kif22*, die in einer vorangegangenen Mikroarray-Studie aus dem Labor für Molekulare Neurobiologie als putativ neue Regenerations-assoziierte Gene identifiziert worden waren. Details der Expression sowie die Funktionen dieser Gene im Kontext der peripheren molekularen Nervenregenerationsprozesse waren zu Beginn dieser Arbeit ungeklärt. Es wurde aber aufgrund der läsionsinduzierten mRNA-Expressionsprofile der ausgewählten Gene vermutet, dass sie im traumatisch verletzten Gewebe eine wichtige Rolle spielen könnten. Eine funktionelle Charakterisierung dieser fünf Gene sollte deshalb zum einen die neuronale Expression dieser Gene im PNS belegen und darüber hinaus das Verständnis der möglichen Funktionen dieser Proteine verbessern, um nachfolgend zusammen mit weiteren Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe gegebenenfalls auch neue Ansatzpunkte zur Entwicklung von therapeutischen Interventionen nach einer traumatischen Nervenverletzung bzw. bei neurodegenerativen Erkrankungen zu liefern.

4.1 Validierung läsionsinduzierter Genexpressionsmuster und molekulare Charakterisierung putativer RAGs

Die jeweilige läsionsinduzierte mRNA-Expression aller RAG-Kandidatengene wurde mit Hilfe von qRT-PCR zu den Zeitpunkten acht und 24 Stunden sowie nach zwei, sieben und 21 Tagen nach der Nervenverletzung in DRG-Gewebe in Abhängigkeit der Läsionsparadigmen (i) Quetschläsion (*crush*) und (ii) Transsektion (*trans*) zur Kontrolle (*sham*) validiert. Die mRNA „*Steady-state-Level*“ der *sham*-operierten Tiergruppen zeigten für alle fünf Kandidatengene innerhalb der unterschiedlichen Untersuchungszeiten keine relevanten Regulationen und sind als eine Kontrollgruppe (Ktrl) mit dem Ausgangsniveau (= 1) zusammenfassend dargestellt. Die etablierten *housekeeping*-Gene *Odc* (Ornithin-Decarboxylase), *Gapdh* (Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), *RNA Polymerase II* und *Cyclophilin* dienten als Referenzgene zur Normalisierung. Die *RNA Polymerase II*

wurde als repräsentatives Normalisierungsgen verwendet, da dieses Gen die geringsten erkennbaren Regulationen innerhalb der Proben eines Läsionsparadigmas aufwies.

Darüber hinaus wurde auch die mRNA-Expression der ausgewählten Genkandidaten in Abhängigkeit des neuronalen Differenzierungszustands der F11-Zellen untersucht. Hierfür wurde die Gesamt-RNA der F11-Zellen nach 48 Stunden Inkubation unter folgenden drei Kultivierungsbedingungen präpariert: (i) Proliferationsmedium, (ii) Differenzierungsmedium (nach Serumentzug und der daraus resultierenden Reduzierung mitogener Faktoren im Medium) sowie (iii) mit Forskolin-versetztes Differenzierungsmedium. Als endogene Normalisierungskontrolle erwies sich das *housekeeping*-Gen *Odc* als am konstantesten. Bei den nachfolgenden statistischen Auswertungen dienten die mRNA-Level proliferierender F11-Zellen als normalisierende Kontrollbedingung.

Die zelluläre Verteilung der putativen RAG-Proteine wurde mit Immunfärbungen histochemisch an Gewebematerial aus (i) sensorischen DRG-Neuronen (L4-L6), (ii) lumbalen Rückenmarksabschnitten der Region L4 bis L6 sowie (iii) dem distalen Ischiasnervfragment in Abhängigkeit beider Läsionsparadigmen *in vivo* untersucht. Da mithilfe einer Fluoreszenz-basierten Immunfärbung keine quantitativen Unterschiede in der Proteinexpression zwischen Kontroll- und Läsionsgewebe feststellbar sind und die untersuchten Proteine der putativen RAG-Kandidaten sowohl im gesunden Kontroll- als auch im Läsionsgewebe ohne verletzungsbedingte Verteilungsunterschiede detektiert werden konnten, sind in den nachfolgenden Kapiteln nur repräsentative Beispiele der detektierten Proteinverteilungen in Abhängigkeit der untersuchten Gewebeart dargestellt.

Analog zu der immunhistochemischen Analyse wurde nachfolgend die Verteilung der RAG-Proteine auch in primären kultivierten DRG-Neuronen sowie in F11-Zellen unterschiedlicher Kultivierungs- bzw. Differenzierungsbedingungen untersucht.

4.1.1 Claudin4

Die qRT-PCR basierten Validierungen der *in vivo*-Expressionsprofile aus den vorangegangenen Mikroarray-Analysen für das 4-Transmembranprotein Claudin4 resultierten in einer weitest gehenden Bestätigung des läsionsinduzierten

Expressionsprofils (Daten nicht gezeigt). Jedoch ergab die sensitive qRT-PCR, dass die *Cldn4*-Induktion bereits zum frühesten untersuchten Zeitpunkt, acht Stunden nach Verletzung, in beiden Läsionsparadigmen nachweisbar ist und dass die maximale Expression mit einer größeren Regulationsdynamik (75fach, anstatt ca. 4fach; Abbildung 4.1 A). Obwohl auch die Validierungsexperimente der qRT-PCR einen deutlichen Rückgang von der maximalen *Cldn4*-Expression nach 21 Tagen andeuten, wird das unverletzte Ausgangsniveau des Kontrollnervs, wie bereits anhand der Mikroarray-Ergebnisse erwartet, noch nicht wieder erreicht (Abbildung 4.1 A).

Immunhistochemische Analysen zeigen eine unregelmäßige vesikuläre und in einigen Zellen perinukleäre *Cldn4*-Proteinanreicherung in DRG-Neuronenpopulationen (Abbildung 4.1 B, B'). Eine Lokalisation in Zellkernen oder den Axonen der DRG sowie im distalen Nervenabschnitt (Daten nicht gezeigt) konnte nicht festgestellt werden. Die Untersuchungen der *Cldn4*-Proteinverteilung im Rückenmark bestätigten die zuvor im DRG-Neuronen beobachtete neuronale zytoplasmatische *Cldn4*-Präsenz auch in den ventral im Rückenmark gelegenen Motoneuronen. Wie in den DRG ergaben die Färbungen auch dort keine Hinweise auf ein *Cldn4*-Vorkommen in neuronalen Dendriten oder Axonen (Abbildung 4.1 C, C').

Leider konnte aufgrund der schwachen endogenen *Cldn4* mRNA-Expression im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig mittels qRT-PCR geklärt werden, ob die *Cldn4*-mRNA in Abhängigkeit des neuronalen Differenzierungszustands der F11-Zellen reguliert ist (Rohdaten nicht gezeigt). Mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Färbemethode konnte in den kultivierten F11-Zellen eine deutliche zytoplasmatische und perinukleär angereicherte Proteinverteilung nachgewiesen werden (Abbildung 4.2). Während immunhistochemisch weder in DRG- noch in Rückenmarksneuronen eine *Cldn4*-Markierung des Nukleus beobachtet werden konnte, weisen F11-Zellen unabhängig von ihrem morphologischen Zustand eine konstante Nukleoli-Färbung auf (Abbildung 4.2 A', B'). Analog zu den *in vivo*-Resultaten wurde auch in kultivierten F11-Zellen keine neuriten-assoziierte *Cldn4*-Lokalisierung beobachtet.

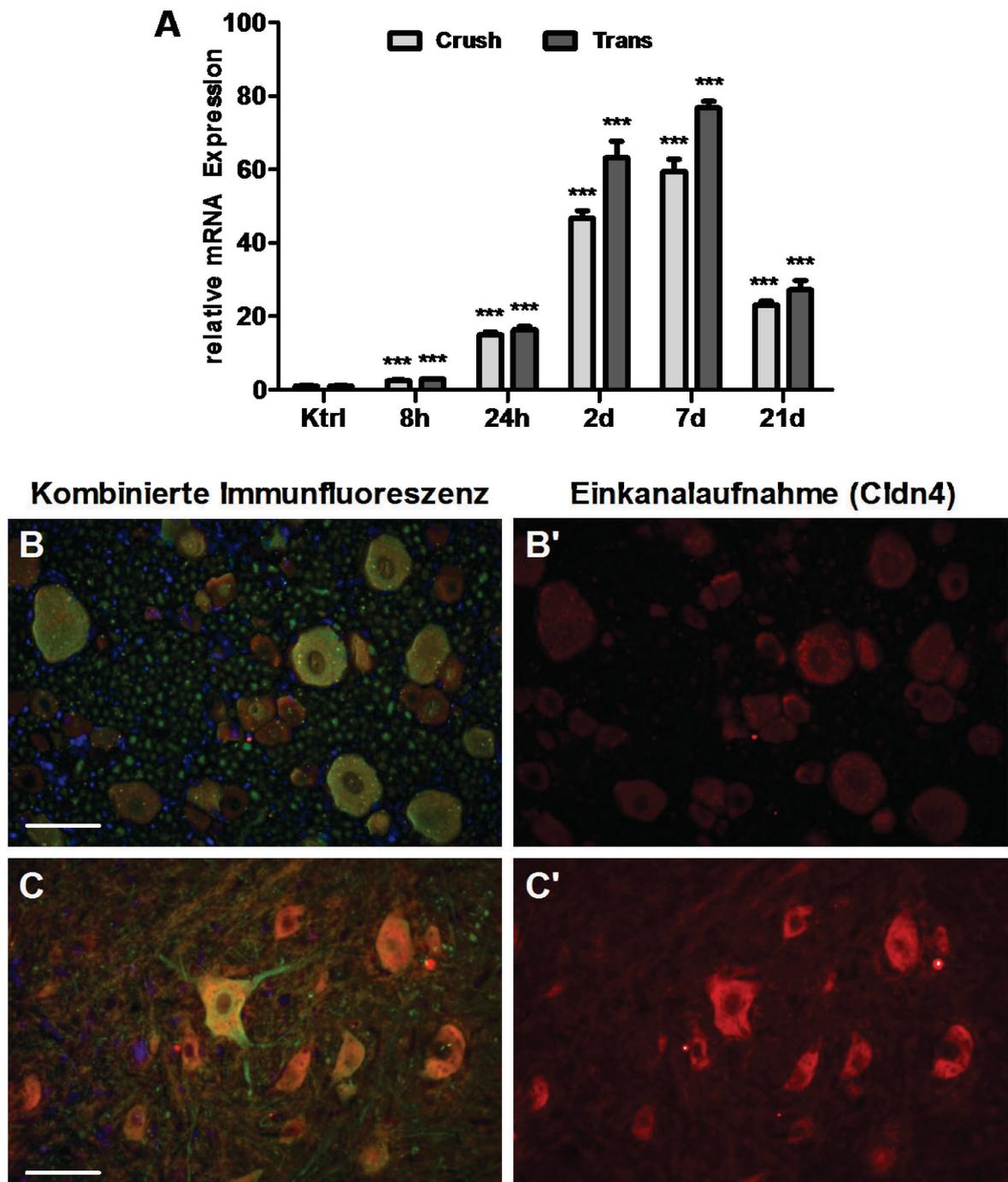


Abbildung 4.1: Quantitative Genexpressionsanalyse und immunhistochemische Untersuchungen der Claudin4-Verteilung. (A) Mittels qRT-PCR wurde die relative *Cldn4*-Genexpression zu den Zeitpunkten 8 und 24 Stunden (h), sowie 2, 7 und 21 Tage (d) nach einer Ischiasnerv Quetschläsion (*crush*) und Transektion (*trans*) untersucht. Das *housekeeping*-Gen *RNA Polymerase II* wurde als Referenz verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzeltiere [Tiergruppen je Läsionsmodell und Kontrolle: 8 und 24 Stunden n=4-5; 2, 7 und 21 Tage n=2-3]. Die Normalisierung erfolgte auf *sham*-operierte Kontrolltiere (Ktrl). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt: *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01. (B, B') Immunhistochemische Charakterisierungen in koronal-geschnittenen DRG und (C, C') Rückenmarksquerschnitten belegen eine zytoplasmatische *Cldn4*-Expression (B') in großen und kleinen DRG-Neuronen sowie (C') in ventralen Motoneuronen (NF 200 positiv) im Rückenmark. rot= *Cldn4*, grün= NF200, blau= DAPI, Gewebe= Quetschläsion nach 24 Stunden. Längensstandard= 100 μ m

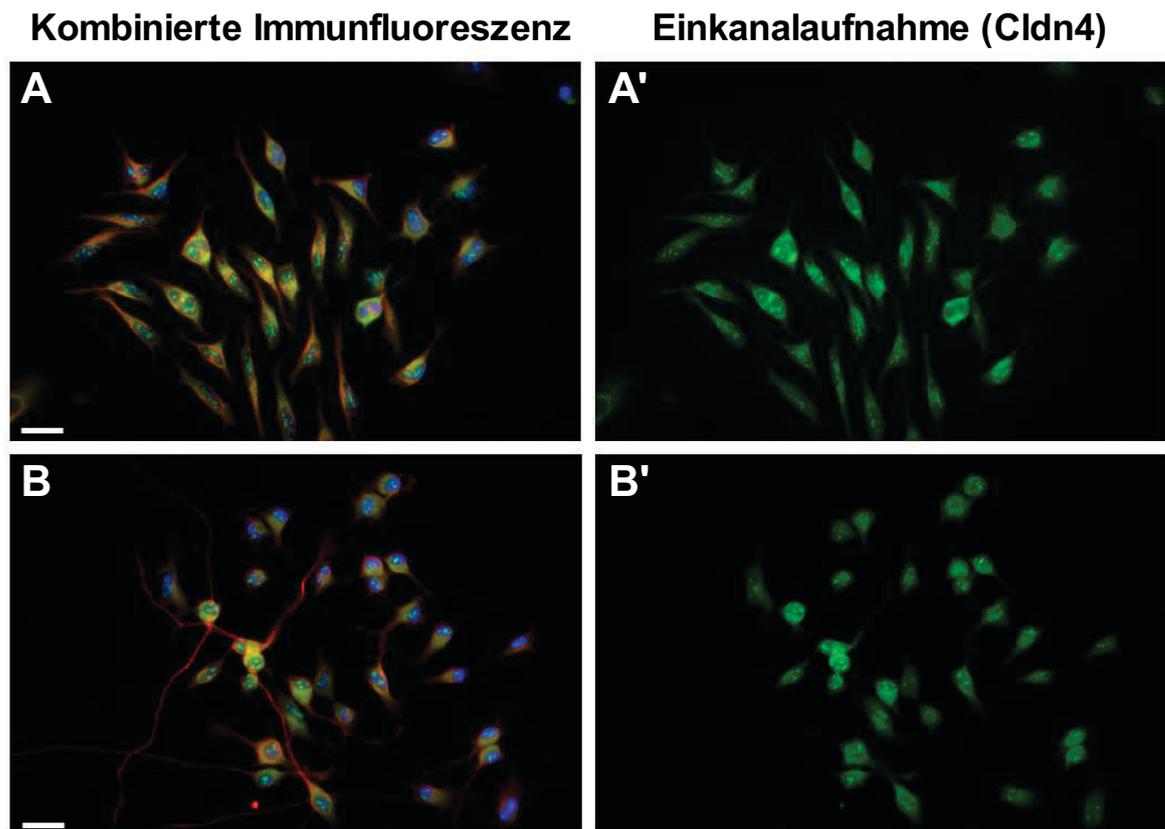
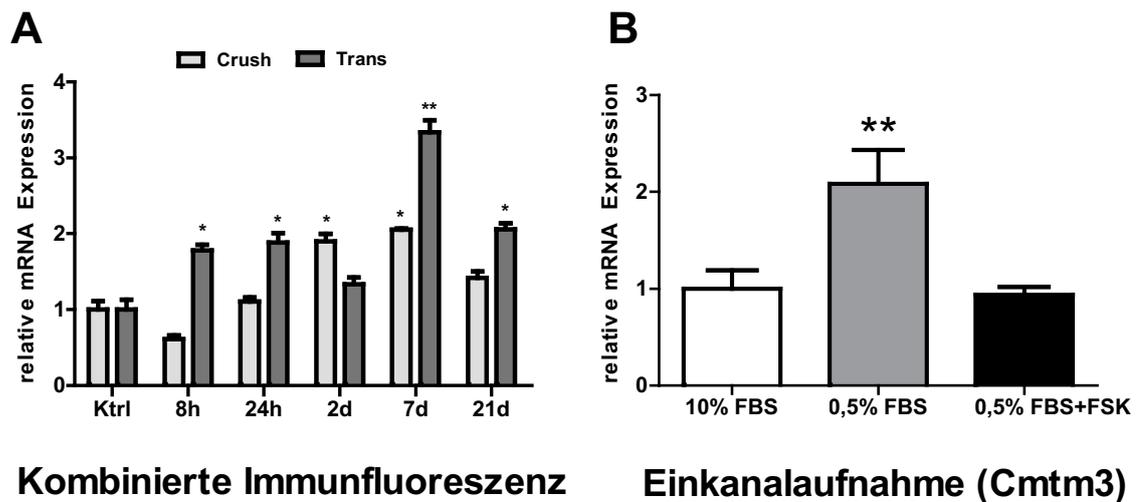


Abbildung 4.2 Immunzytochemische Analyse der Claudin4-Proteinverteilung in F11-Zellen unter (A, A') Kontrollbedingungen und (B, B') Differenzierungsbedingungen. Cldn4-Proteinlokalisierung aller F11-Zellen im Zytoplasma, perinukleär sowie in den Nukleoli detektierbar. Keine neuritenassoziierte Lokalisierung feststellbar. **grün**= Cldn4, **rot**= β -III-Tubulin, **blau**= DAPI. Längenstandard= 100 μ m

4.1.2 Cmtm3

qRT-PCR basierte Validierungsexperimente zur läsionsabhängigen *Cmtm3* mRNA-Expression bestätigten den Array-Expressionsverlauf (Daten nicht gezeigt) für die Quetschläsion nahezu exakt, während nach einer Transektion die sensitivere qRT-PCR-Analyse sogar eine noch etwas früher einsetzende Hochregulation (nach acht anstatt 24 Stunden), aufwies (Abbildung 4.3 A).



Kombinierte Immunfluoreszenz

Einkanalaufnahme (Cmtm3)

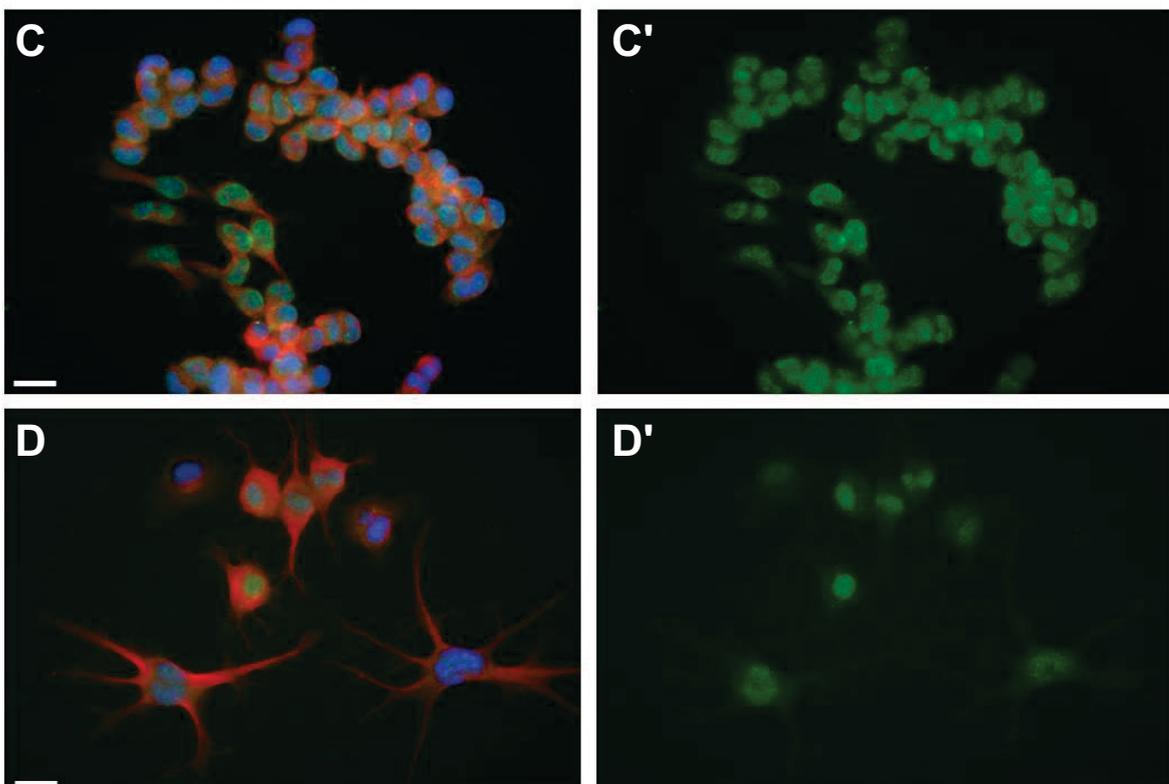


Abbildung 4.3 Quantitative Genexpressionsanalysen und immunzytochemische Untersuchung der *Cmtm3*-Verteilung in F11-Zellen unter (C, C') Kontrollbedingung und (D, D') Differenzierungsbedingungen. (A, B) Mittels qRT-PCR wurde die relative *Cmtm3*-Genexpression (A) in DRG-Neuronen zu den Zeitpunkten 8 und 24 Stunden (h), 2, 7 und 21 Tagen (d) nach einer Ischiasnerv Quetschläsion (*crush*) und Transsektion (*trans*) sowie (B) in F11-Zellen unter Kontrollbedingung (10 % FBS) bzw. Differenzierungsbedingungen (0,5 % FBS \pm 10 μ M Forskolin) nach 48 Stunden untersucht. Als Referenz wurden die *housekeeping*-Gene (A) *RNA Polymerase II* und (B) *Odc* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzeltiere [A: Tiergruppen je Läsionsmodell und Kontrolle: 8 und 24 Stunden n=4-5; 2, 7 und 21 Tage n=2-3] bzw. einzelner Experimente [B: n=3]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt: *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01. (C, D) Immunzytochemische Analyse von *Cmtm3* in F11-Zellen resultieren unter (C, C') Kontrollbedingungen in einer diffusen zytoplasmatischen und nukleären Lokalisierung. (D, D') Unter Differenzierungsbedingungen weisen F11-Zellen eine distinkt auf den Zellkern fokussierte Lokalisierung auf. grün= *Cmtm3*, rot= β -III-Tubulin, blau= DAPI. Längenstandard= 100 μ m

Während eine immunhistochemische Analyse der präparierten Gewebe zur Untersuchung der *Cmtm3*-Proteinverteilung *in vivo* mit den zur Verfügung stehenden kommerziell erworbenen Antikörpern (bislang nicht für immunhistochemische Analysen beschrieben), leider nicht etabliert werden konnte, war eine immunzytochemische Untersuchung der *Cmtm3*-Proteinlokalisierung an den kultivierten F11-Zellen durchführbar (Abbildung 4.3 C, D). Die Färbungen belegten eine deutliche, auf den Zellkern konzentrierte *Cmtm3*-Verteilung in ausdifferenzierten F11-Zellen (Abbildung 4.3 D, D'), während die proliferierenden Zellen eher eine diffuse, zytoplasmatische und nukleäre Färbung aufwiesen (Abbildung 4.3 C, C').

Interessanterweise zeigte das nach einer traumatischen Ischiasnervverletzung in DRG induzierte *Cmtm3* auch in F11-Zellen eine signifikante Hochregulation unter neuriten-induzierenden Kulturbedingungen durch Serumentzug im Medium (Abbildung 4.3 B). Obwohl das mikroskopische Bild weder in der Zellmorphologie der ausdifferenzierten F11-Zellen, noch in der Anzahl und Länge der Neuriten nach Serumentzug distinkte Unterschiede erkennen ließ (Daten nicht gezeigt), ergab die qRT-PCR überraschenderweise einen deutlichen Unterschied in der *Cmtm3*-Genexpression von differenzierten F11-Zellen (0,5 % FBS) mit und ohne Forskolin zu erkennen (Abbildung 4.3 B). Ausdifferenzierende F11-Zellen zeigten demnach in Gegenwart von Forskolin (anders als ohne Forskolin) keine Erhöhung der *Cmtm3*-Expression.

4.1.3 DUSP6

Die qRT-PCR basierte Validierung der RAG-ähnlichen Expression des MAP-Kinasen Inhibitors *Dusp6* ergab ein den zugrundeliegenden Mikroarray-Daten (Daten nicht gezeigt) vergleichbares verletzungsinduziertes Expressionsmuster (Abbildung 4.4 A), womit die RAG-spezifische Induktion auch dieses Kandidatengens bestätigt wurde.

Immunhistochemische Färbungen weisen eine vergleichbare *Dusp6*-Proteinverteilung im Zytoplasma und den Zellkernen aller Neuronenpopulationen (große wie kleine) der dorsalen Hinterwurzelganglien, als auch in den Motoneuronen des lumbalen Rückenmarks auf (Abbildung 4.4 B, C). Eine Lokalisierung in Axonen der DRG sowie im distalen Nervenabschnitt (Daten nicht gezeigt) wurde hingegen nicht festgestellt.

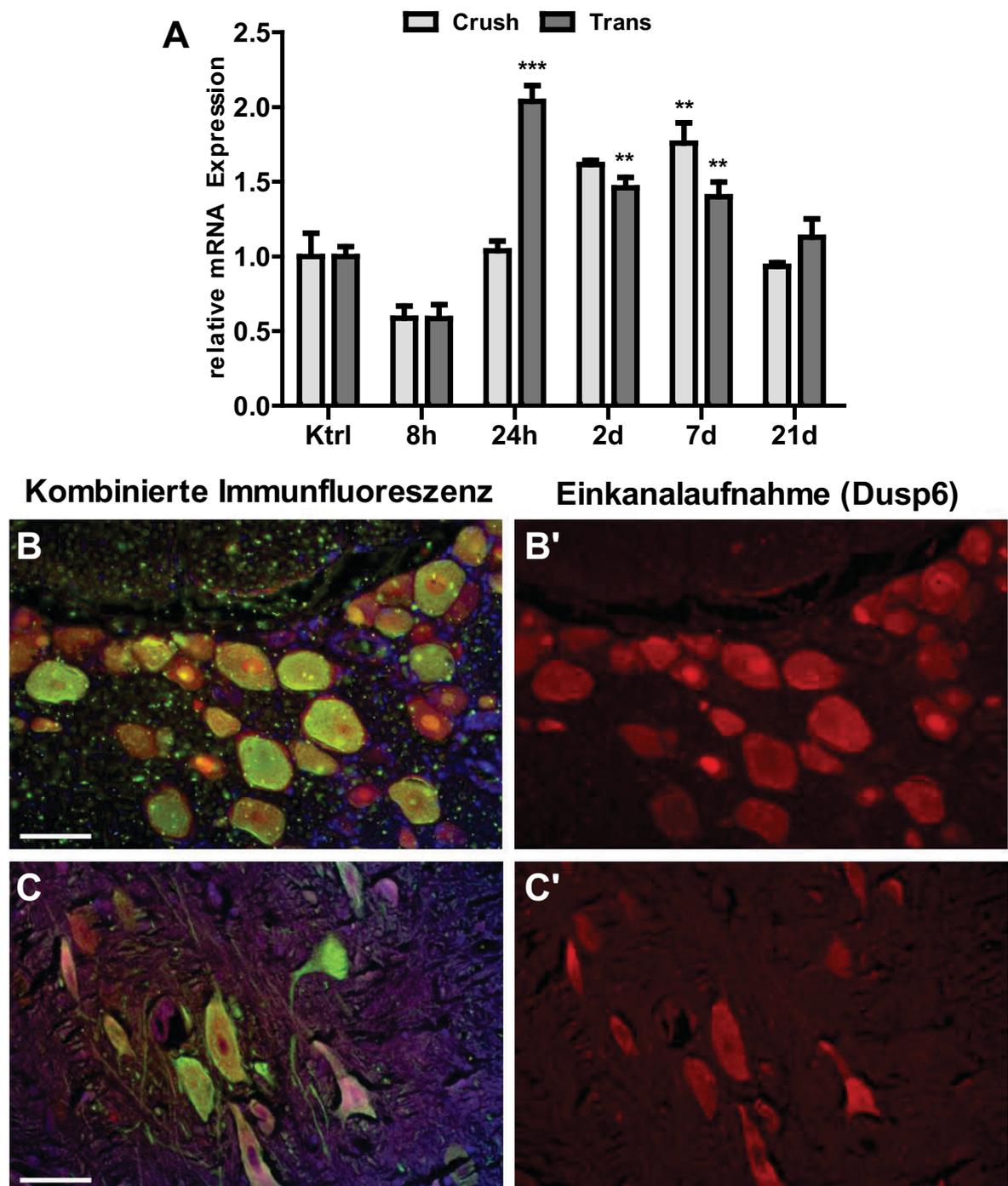


Abbildung 4.4: Quantitative Genexpressionsanalyse und immunhistochemische Untersuchungen der Dusp6-Verteilung. (A) Mittels qRT-PCR wurde die relative *Dusp6*-Genexpression zu den Zeitpunkten 8 und 24 Stunden (h), 2, 7 und 21 Tagen (d) nach einer Ischiasnerv Quetschläsion (*crush*) und Transsektion (*trans*) untersucht. Das *housekeeping*-Gen *RNA Polymerase II* wurde als Referenz verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzeltiere [Tiergruppen je Läsionsmodell und Kontrolle: 8 und 24 Stunden n=4-5; 2, 7 und 21 Tage n=2-3]. Nicht lädierte Kontrolltiere (Ktrl) wurden auf 1 normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt: *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01. (B, B') Immunhistochemische Charakterisierungen in koronal-geschnittenen DRG und (C, C') Rückenmarksquerschnitten belegen eine zytoplasmatische sowie nukleäre Dusp6-Expression (B') in großen und kleinen DRG-Neuronen sowie (C') in ventralen Motoneuronen (NF 200 positiv) im Rückenmark. rot= Dusp6, grün= NF200, blau= DAPI, Gewebe= Transsektion nach 2 Tagen. Längenstandard= 100 µm

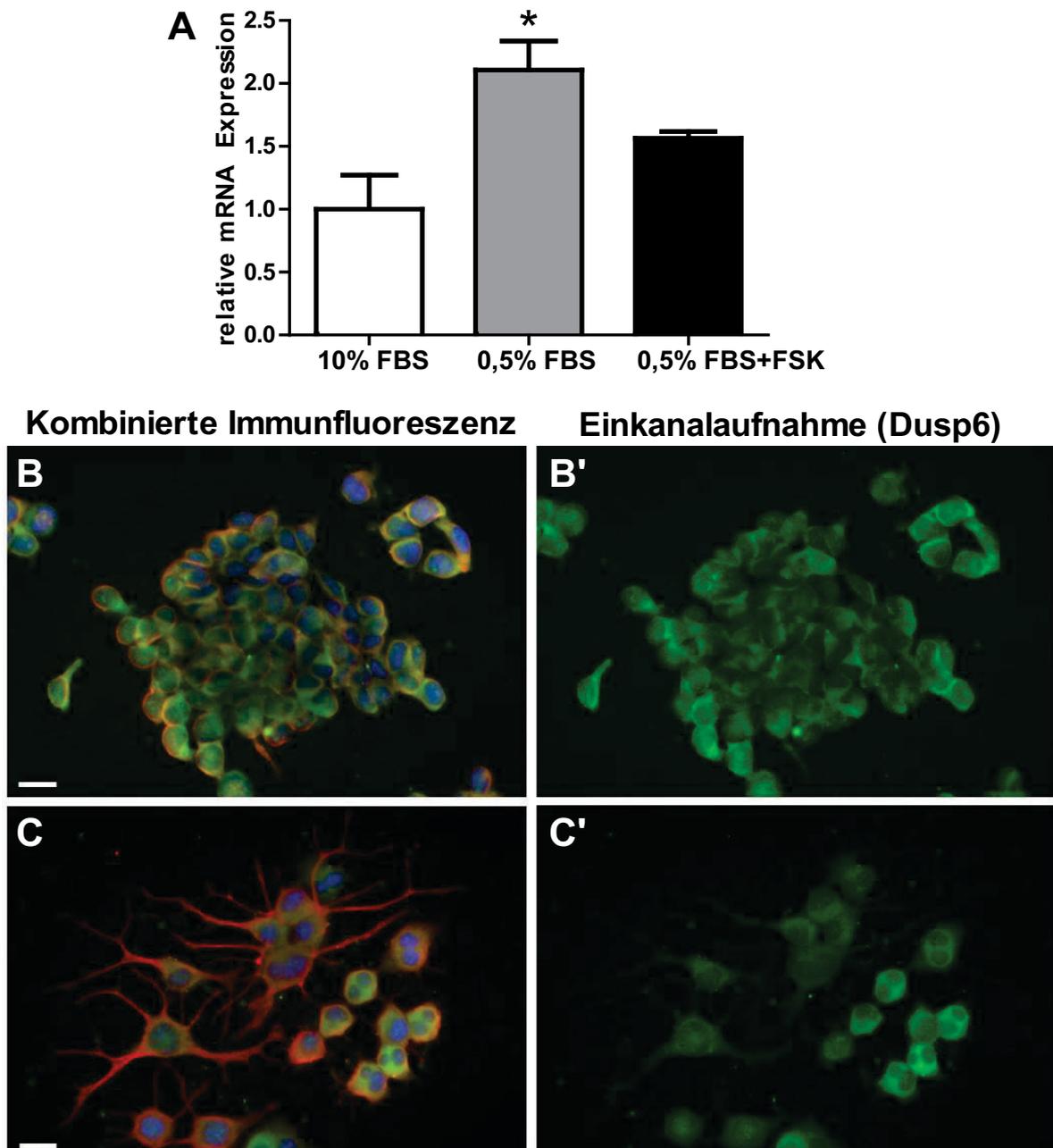


Abbildung 4.5 Quantitative Genexpressionsanalyse und immunzytochemische Untersuchung der Dusp6-Verteilung in F11-Zellen unter (**B, B'**) Kontrollbedingung und (**C, C'**) Differenzierungsbedingungen. (**A**) Mittels qRT-PCR wurde die relative *Dusp6*-Genexpression in F11-Zellen unter Kontrollbedingung (10 % FBS) bzw. Differenzierungsbedingungen (0,5 % FBS \pm 10 μ M Forskolin) nach 48 Stunden untersucht. Als Referenz wurde das *housekeeping*-Gen *Odc* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte einzelner Experimente [n=3]. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt: *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01. (**B, C**) Immunzytochemische Analyse von Dusp6 in F11-Zellen resultieren unter (**B, B'**) Kontrollbedingungen in einer diffusen zytosolischen Lokalisation. (**C, C'**) Unter Differenzierungsbedingungen weisen F11-Zellen eine vorwiegend zytosolische Proteinlokalisierung auf. grün= Dusp6, rot= β -III-Tubulin, blau= DAPI. Längenstandard= 100 μ m

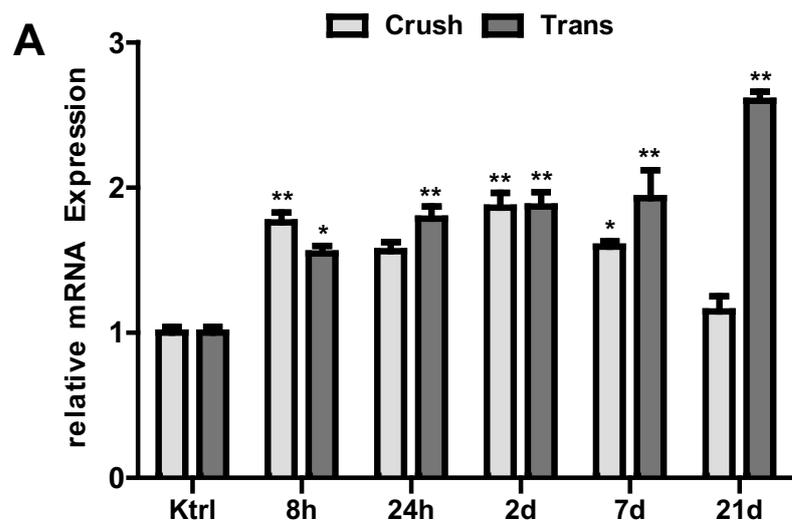
Die qRT-PCR basierte Untersuchung der F11-Zellen ergab eine Hochregulation von *Dusp6* unter beiden differenzierenden Wachstumsbedingungen (Abbildung 4.5 A), wobei die Regulation nur ohne Forskolin als statistisch signifikant berechnet wurde.

Im Gegensatz zu den immunhistochemischen Analysen der Gewebe (Abbildung 4.4), konnte in den kultivierten F11-Zellen vorwiegend nur eine zytosolische *Dusp6*-Verteilung beobachtet werden (Abbildung 4.5. B, C). Eine nukleäre *Dusp6*-Lokalisierung in F11-Zellen unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen konnte *in vitro* nicht verifiziert werden. Im Gegenteil, die immunzytochemische Färbung weist eine eindeutige, nicht positive Abgrenzung des Zellkerns auf (Abbildung 4.5 B', C').

4.1.4 Klf6

Die qRT-PCR basierte Validierung für den Transkriptionsfaktor *Klf6* bestätigte das aus der Mikroarray-Analyse (Daten nicht gezeigt) bekannte differentielle Regulationsprofil mit folgenden Unterschieden. Die *Klf6*-Induktion konnte aufgrund der größeren Sensitivität und höheren Dynamik der qRT-PCR Methode bereits nach acht Stunden detektiert werden. Außerdem wurde in der PCR-Analyse nur unter der *Crush*-Bedingung, nicht aber nach einer Nerven-Transsektion nach 21 Tagen eine Rückführung der Transkriptmenge auf das Ausgangsniveau detektiert (Abbildung 4.6 A).

Immunhistochemische Analysen belegen eine *Klf6*-Proteinverteilung vor allem in neuronalen DRG-Zellkernen, unabhängig der Zellgröße bzw. Neuronensubpopulation sowie in den NF200-positiven Motoneuronen der lumbalen Rückenmarksquerschnitte (Abbildung 4.6 B, D). Da aber auch Regionen parallel der axonalen Fortsätze im DRG auf eine *Klf6*-Lokalisierung hindeuteten, wurden zur weiteren Charakterisierung der *Klf6*-Verteilung auch Schwannzellen in Kollaborationsexperimenten mit dem Schwannzell-Marker S100 spezifisch angefärbt. Tatsächlich weist das Resultat eine zelluläre Kollaboration des nukleär lokalisierten *Klf6*-Proteins mit dem Schwannzell-spezifischen zytoplasmatischen S100-Markerprotein auf (Abbildung 4.6 C'; Pfeile). Des Weiteren sind auch Endothelzellen von Blutgefäßen positiv für *Klf6* (Abbildung 4.6 C'; Pfeilspitze).



Kombinierte Immunfluoreszenz

Einkanalaufnahme (Klf6)

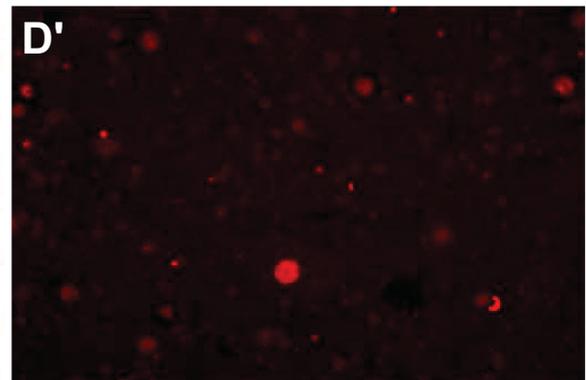
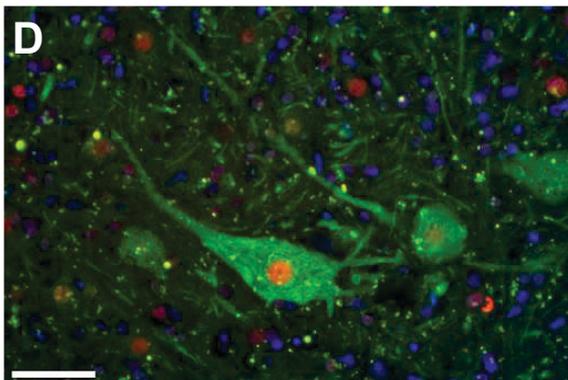
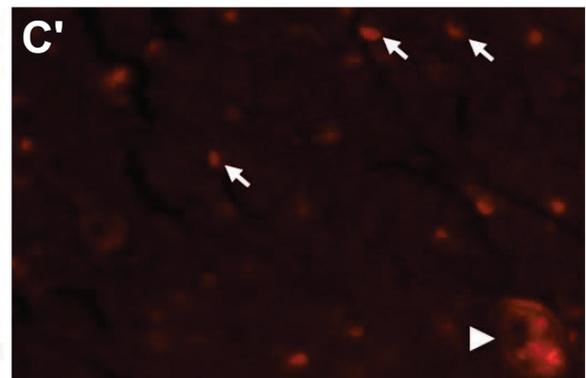
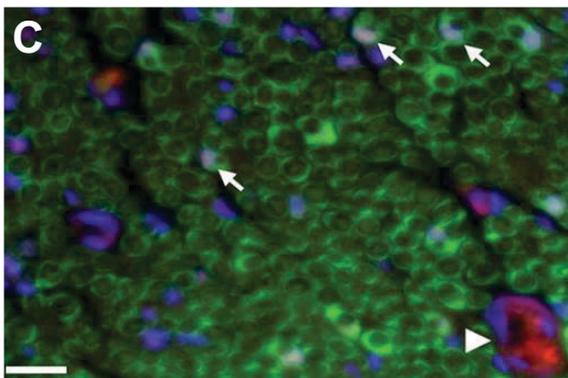
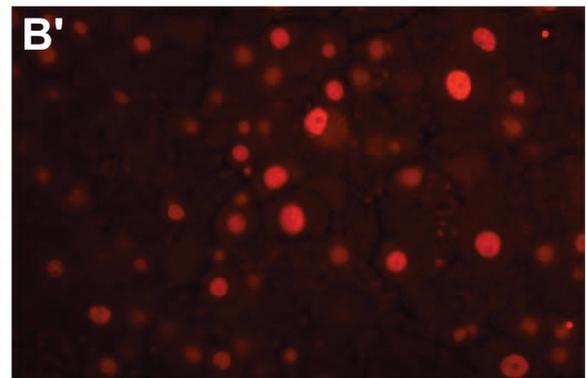
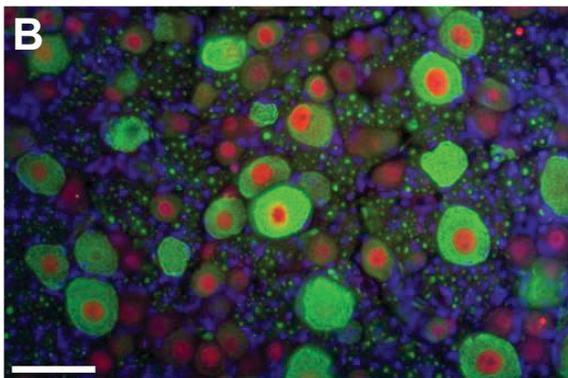


Abbildung 4.6: Quantitative Genexpressionsanalyse und immunhistochemische Untersuchungen der Klf6-Verteilung. (A) Mittels qRT-PCR wurde die relative *Klf6*-Genexpression zu den Zeitpunkten 8 und 24 Stunden (h), 2, 7 und 21 Tagen (d) nach einer Ischiasnerv Quetschläsion (*crush*) und Transsektion (*trans*) untersucht. Das *housekeeping*-Gen *RNA Polymerase II* wurde als Referenz verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzeltiere [Tiergruppen je Läsionsmodell und Kontrolle: 8 und 24 Stunden n=4-5; 2,7 und 21 Tage n=2-3]. Nicht lädierte Kontrolltiere (Ktrl) wurden auf 1 normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt: *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01. (B, B') Immunhistochemische Charakterisierungen in koronal-geschnittenen DRG und (C, C') Rückenmarksquerschnitten belegen eine distinkte nukleäre Klf6-Expression (B') in großen und kleinen DRG-Neuronen, (C'; Pfeile) Schwann- und (C'; Pfeilspitzen) Endothelzellen und (D') in ventralen Motoneuronen (NF 200 positiv) im Rückenmark. rot= Klf6, grün= NF200/S100, blau= DAPI, Gewebe= Quetschläsion nach 7 Tagen. Längenstandard= 100 µm

Die mRNA-Expressionsstudien von *Klf6* in kultivierten F11-Zellen ergaben eine signifikante Induktion in differenzierten F11-Zellen unabhängig von der Art des Differenzierungsmediums, womit auch mit diesem Genkandidaten eine RAG-ähnliche Neuritenwachstums-assoziierte Expression bestätigt werden konnte.

Während immunzytochemische Charakterisierungen von Klf6 unter proliferativen Kulturbedingungen *in vitro* eine nahezu homogene Proteinverteilung sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellkernen aufweisen, zeigten differenzierte F11-Zellen und primäre DRG-Neurone Unterschiede in der Klf6-Proteinlokalisierung (Abbildung 4.7 B, C, D). Eine neuronale Differenzierung der F11-Zellen ging auch mit einer generellen Intensivierung der zytoplasmatischen Klf6-Proteinfärbung sowie einer klaren Anreicherung in den Nuklei einher.

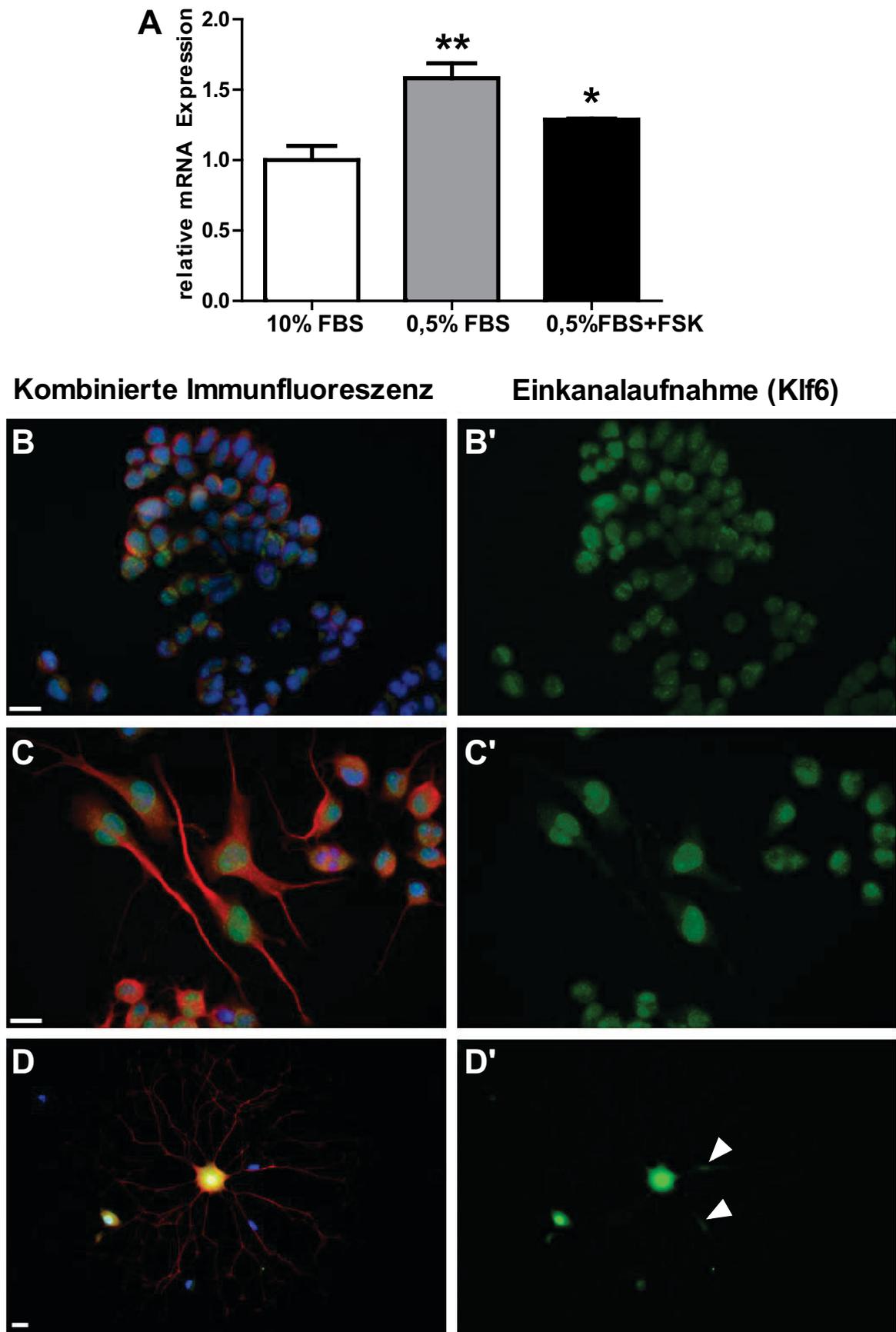


Abbildung 4.7: Quantitative Genexpressionsanalyse und immunzytochemische Klf6-Proteinverteilung in F11-Zellen und primären DRG-Neuronen. (A) Mittels qRT-PCR wurde die relative *Klf6*-Genexpression in

F11-Zellen unter Kontrollbedingung (10 % FBS) bzw. Differenzierungsbedingungen (0,5 % FBS \pm 10 μ M Forskolin) nach 48 Stunden untersucht. Als Referenz wurde das *housekeeping*-Gen *Odc* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte einzelner Experimente (n=3). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt: *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01. **(B, C, D)** Immunzytochemische Analysen von Klf6 in F11-Zellen sowie in primären DRG-Kulturen resultierten in einer distinkten nukleären Lokalisierung **(A', B')** in F11-Zellen, **(C')** primären DRG-Neuronen sowie **(D'; Pfeilspitzen)** Schwannzellen. **grün**= Klf6, **rot**= β -III-Tubulin/PAM, **blau**= DAPI. Längenstandard= 100 μ m

4.1.5 Kif22

Für das Mikrotubuli-assoziierte Motorprotein *Kif22* war laut Mikroarray-Analyse nach Ischiasnervläsion eine signifikante Induktion innerhalb von 24 Stunden zu erwarten, welche auch über sieben Tage nach einer Quetschläsion, bzw. über den gesamten untersuchten Zeitraum von 21 Tagen nach einer Transsektion konstant bestehen bleibt (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise konnte dieses Expressionsmuster durch die unabhängige qRT-PCR nicht ganz bestätigt werden. Die PCR-Ergebnisse belegen erst zum zwei Tage Zeitpunkt eine Induktion sowie in einem oszillatorischen Verlauf des *Kif22*-Expressionsprofils nach Transsektion, in dem die gemessene mRNA-Menge zum Zeitpunkt 21 Tage sogar auf nur noch ca. 15 % der Ausgangsmenge im unverletzten DRG abgesunken war (Abbildung 4.8 A).

Die erwartete nukleäre Kif22-Lokalisierung in DRG-Neuronen sowie Neuronen im lumbalen Rückenmarksgewebe konnte mit Hilfe von immunhistochemischen Analysen dokumentiert werden (Abbildung 4.8 B', C'). Allerdings scheint die nukleäre Kif22-Expression in DRG-Neuronen nur auf einige Subtypen begrenzt zu sein.

Interessanterweise ergab die qRT-PCR Untersuchung der F11-Zellen, dass sich die KIF22-mRNA-Expression umgekehrt proportional zum neuronalen Differenzierungszustand verhält, also nicht direkt mit dem Neuritenwachstum dieser Zellen assoziiert scheint, sondern in den proliferierenden Zellen am höchsten exprimiert ist (Abbildung 4.9 A).

Analog zu den immunhistochemischen Analysen ist Kif22 in F11-Zellen nukleär sowie zytoplasmatisch sowohl unter Proliferations- als auch neuronalen Differenzierungsbedingungen lokalisiert und interessanterweise war eine verstärkte Kif22-Präsenz im Wachstumskegel sich ausdifferenzierender F11-Neurone detektierbar (Abbildung 4.9 C'; Pfeilspitze).

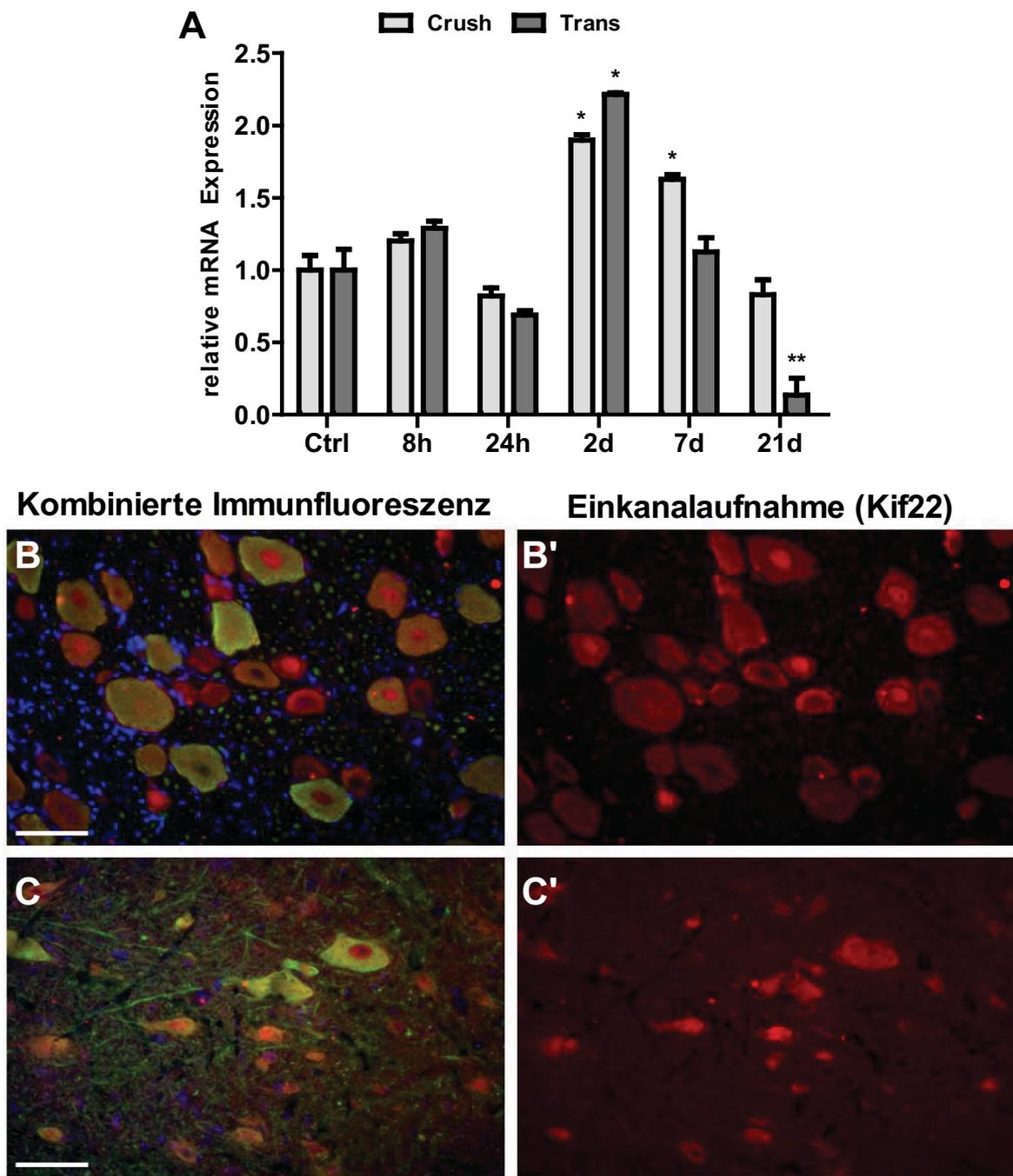


Abbildung 4.8: Quantitative Genexpressionsanalyse und immunhistochemische Untersuchungen der Kif22-Verteilung. (A) Mittels qRT-PCR wurde die relative *Kif22*-Genexpression zu den Zeitpunkten 8 und 24 Stunden (h), 2, 7 und 21 Tagen (d) nach einer Ischiasnerv Quetschläsion (*crush*) und Transsektion (*trans*) untersucht. Das *housekeeping*-Gen *RNA Polymerase II* wurde als Referenz verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzeltiere [Tiergruppen je Läsionsmodell und Kontrolle: 8 und 24 Stunden n=4-5; 2,7 und 21 Tage n=2-3]. Nicht lädierte Kontrolltiere (Ktrl) wurden auf 1 normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt: *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01. (B, C) Immunhistochemische Charakterisierungen in koronal-geschnittenen DRG und Rückenmarksquerschnitten belegen eine zytoplasmatische Anfärbung aller (B') DRG-Neurone, eine intensive Subneuronentyp-spezifische nukleäre Kif22-Expression sowie (C') eine Lokalisierung in ventralen Motoneuronen (NF200 positiv) im Rückenmark. **rot**= Kif22, **grün**= NF200, **blau**= DAPI, Gewebe= Transsektion nach 2 Tagen. Längenstandard= 100 µm

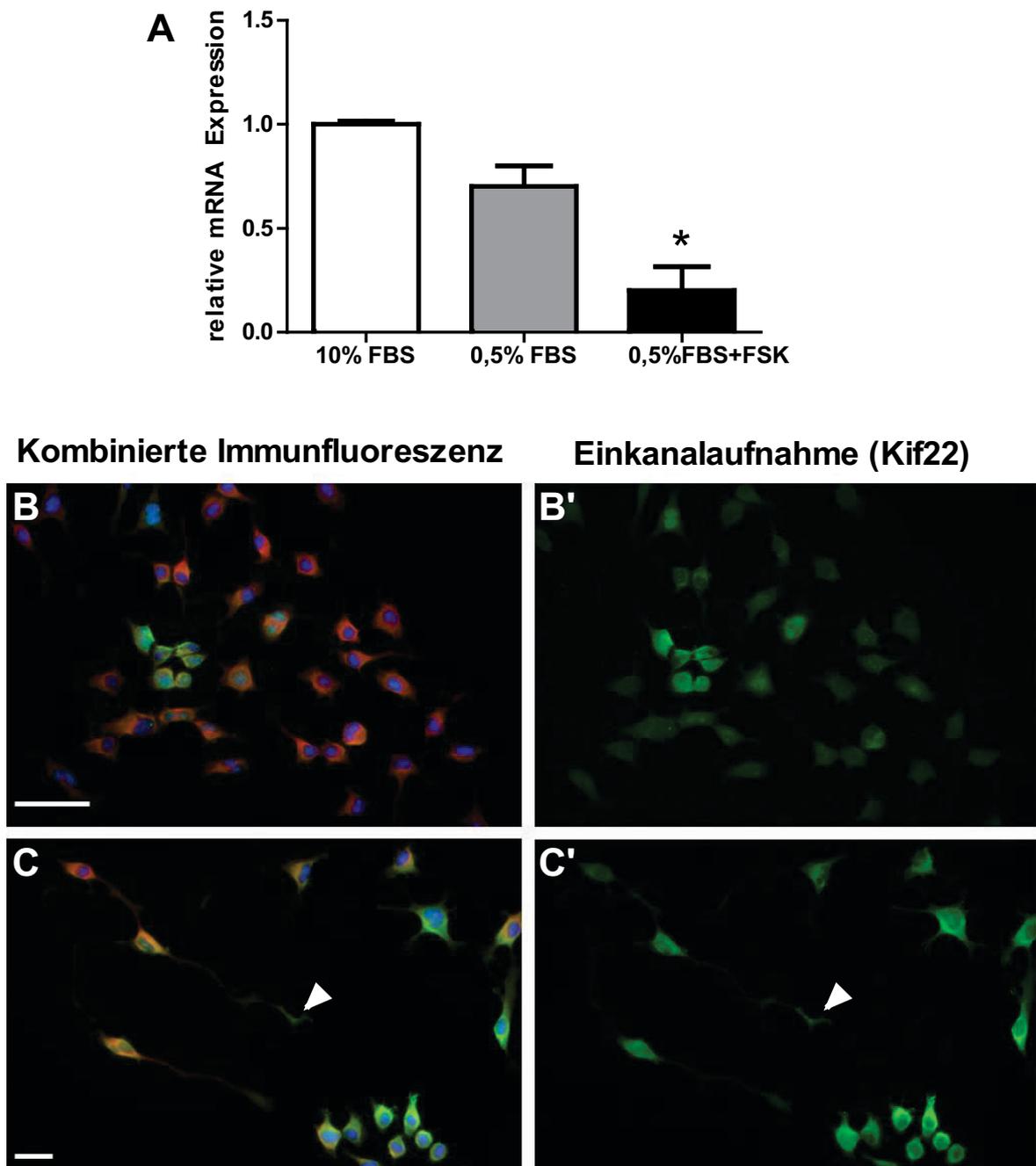


Abbildung 4.9: Quantitative Genexpressionsanalyse und immunzytochemische Kif22-Proteinverteilung in F11-Zellen unter (B, B') Kontrollbedingungen und (C, C') Differenzierungsbedingungen (A) Mittels qRT-PCR wurde die relative *Kif22*-Genexpression in F11-Zellen unter Kontrollbedingung (10 % FBS) bzw. Differenzierungsbedingungen (0,5 % FBS \pm 10 μ M Forskolin) nach 48 Stunden untersucht. Als Referenz wurde das *housekeeping*-Gen *Odc* verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte einzelner Experimente (n=3). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt: *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01. **(C, D)** Immunzytochemische Analysen von Kif22 in F11-Zellen resultieren unter beiden Kultivierungsbedingungen in einer zytoplasmatischen sowie perinukleären Lokalisierung. **(C'; Pfeilspitze)** Deutliche Kif22-Lokalisierung in Wachstumskegeln und Neuriten) grün= Dups6, rot= MAP2, blau= DAPI. Längenstandard= 100 μ m

4.2 *In vitro*-Funktionsuntersuchungen rekombinant modulierter RAG-Kandidaten in F11-Zellen

Um zu untersuchen, ob die rekombinante Modulation der Kandidatengene *Cldn4*, *Cmtm3*, *Dusp6*, *Kif22* und *Klf6* in F11-Zellen einen erkennbaren Einfluß auf deren Neuritenwachstum bewirkt, wurden (i) spezifische Genkonstrukte zur Überexpression generiert beziehungsweise (ii) siRNA Pools zur Suppression kommerziell erworben. Mit freundlicher Unterstützung von Frau Dipl. Biol. Marcia Gasis, wurden die für die Überexpression entsprechenden kodierenden Regionen der cDNA-Fragmente in den Expressionsvektor pIRES2-EGFP subkloniert. Abschließende Kontrollrestriktionen validierten die erfolgreiche Generierung der jeweiligen pIRES2-EGFP-Expressionsprodukte für alle fünf Kandidatengene (Daten nicht gezeigt).

Zur Verifikation der Wirksamkeit der jeweiligen Plasmidkonstrukte und siRNA Pools wurden F11-Zellen transfiziert und für je 48 Stunden sowohl unter Proliferationsbedingungen (10 % FBS) als auch Differenzierungsbedingungen (0,5 % FBS + Forskolin) kultiviert. Die Wirksamkeit der rekombinanten Modulation der Genexpressionen wurde mithilfe von qRT-PCR-Analysen unter Verwendung des endogenen Normalisierungsgens *Odc* für alle Kandidatengene überprüft und bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Zur funktionellen Analyse der Auswirkungen der modulierten Kandidaten-Expressionen auf das F11-Zell-Neuritenwachstum in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen, wurden F11-Zellen zum einen mit den generierten Überexpressionskonstrukten und zum anderen mit den entsprechenden siRNA Pools transfiziert. Achtundvierzig Stunden später wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch sowie mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert.

Eine automatisierte Datenaufnahme und semi-automatische Quantifizierung, basierend auf den Quantifizierungsparametern (i) durchschnittliche Neuritenanzahl, (ii) durchschnittliche Neuritenlänge sowie (iii) durchschnittliche Neuritenlänge pro Zelle, erfolgte mit dem Cellomics KineticScan HCS Reader zunächst mit freundlicher Unterstützung unseres Kooperationspartners Prof. Dr. Ronald van Kesteren (Institut für

Molekulare und zelluläre Neurobiologie, VU Universität Amsterdam) sowie von Frau Dipl. Biol. Marcia Gasis.

4.2.1 Einfluss der rekombinanten RAG-Überexpression auf das Neuritenwachstum

Um Auswirkungen der modulierten Überexpression der Kandidatengene auf das Neuritenwachstum der F11-Zellen in Abhängigkeit verschiedener Kulturbedingungen zu ermitteln, wurden speziell behandelte F11-Zellen als Kontrollen verwendet. Als Kontrollen für die Überexpressionsanalysen dienten zum einen mit dem pIRES2-EGFP-Leervektor transfizierte sowie zum anderen nur mit den Transfektionsreagenzien LTX und PLUS behandelte F11-Zellen. Innerhalb dieser beiden unterschiedlichen Kontrollen wurden keine relevanten Regulationen beobachtet, so dass nachfolgend stellvertretend die mit dem pIRES2-EGFP-Leervektor (LV) transfizierten Zellen als Kontrollbedingung (= 100 %) dargestellt sind.

Für die rekombinanten Überexpressionsanalysen war, aufgrund der vorhandenen und gezielt immunzytochemisch visualisierten GFP-Expression, eine selektive Datenanalyse möglich. Die dabei ermittelte Transfektionseffizienz der rekombinant bicistronischen Expression von GFP und des jeweiligen RAG-Kandidaten lag durchschnittlich bei ca. 23 % (Einzeldaten nicht aufgeführt).

Tatsächlich zeigten die Untersuchungen, dass drei der untersuchten RAG-Kandidaten, nämlich *Cldn4*, *Dusp6* und *Klf6*, eine deutliche Korrelation ihrer experimentell erhöhten Genexpression mit der Neuritenausprägung von F11-Zellen unter proliferativen Kultivierungsbedingungen aufwiesen. Sowohl die Anzahl der Neuriten, (Abbildung 4.10 A), als auch ihre Länge (Abbildung 4.10 B, C) waren signifikant beeinflusst. Während die durchschnittliche Neuritenanzahl für *Dusp6* um 21 % zunahm, ergab die statistische Analyse für *Cldn4* und *Klf6* je eine etwa 40 % Zunahme an neuritenartigen Zellausläufern. Prägnante positive Längenänderungen dieser Neuritenausläufer um bis zu 80 % wurden durch die *Klf6*-Überexpression erreicht (Abbildung 4.10 B, C).

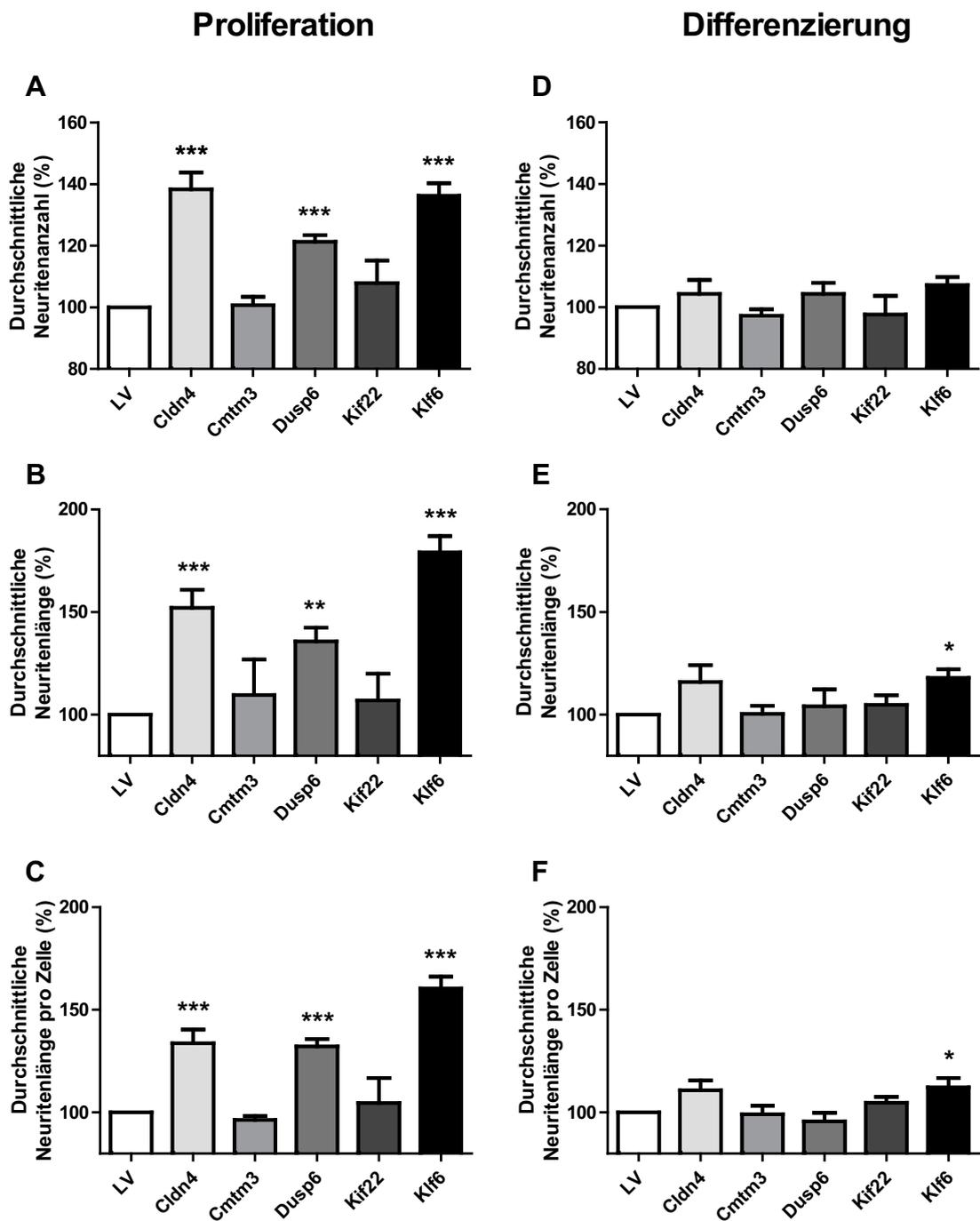


Abbildung 4.10: Cellomics-basierte Quantifizierung des Neuritenwachstums von F11-Zellen nach Überexpression unter proliferierenden (A, B, C) sowie differenzierenden (D, E, F) Kulturbedingungen. Einfluss der rekombinanten potenziellen RAG-Expression auf die durchschnittliche Neuritenanzahl pro Zelle, die durchschnittliche Neuritenlänge sowie die durchschnittliche Neuritenlänge pro Zelle. F11-Zellen wurden mit dem Leervektor (LV) pIRES2-EGFP sowie den jeweiligen Plasmidkonstrukten transfiziert und 48 Stunden kultiviert. Dargestellt ist eine GFP-selektive Analyse aus Mittelwerten von $n=3-10$ Experimenten von je 5 Wells [Cldn4 $n=6$; Cmtm3 $n=4$; Dusp6 $n=7$; Kif22 $n=3$, Klf6 $n=10$]. Leervektor-Transfektionen wurden auf ein Ausgangsniveau von 100 % normiert und Expressionseffekte prozentual aufgeführt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mittels One-Way ANOVA mit dem Dunnett's post hoc Test ermittelt.

Während die Analysen der RAG-Kandidaten unter differenzierenden Kulturbedingungen keine positiven Effekte auf die Neuritenanzahl ergaben, bewirkte die Überexpression des Transkriptionsfaktors *Klf6* trotz des ohnehin ausgeprägten Neuritenwachstums der F11-Zellen unter diesen Bedingungen noch eine signifikante Steigerung der durchschnittlichen Neuritenlänge um bis zu 17 % (Abbildung 4.10 E).

Die Untersuchungen zur rekombinanten Überexpression der Kandidatengene *Cmtm3* und *Kif22* ergaben hingegen keinen erkennbaren Einfluss auf die analysierten Parameter des Neuritenwachstums.

4.2.2 Einfluss der rekombinanten RAG-Suppression auf das Neuritenwachstum

Die Einflüsse der siRNA-vermittelten rekombinanten Suppression der putativen RAG-Kandidaten wurden analog zu den bereits beschriebenen Überexpressionsanalysen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen der F11-Zellen durchgeführt. Als Transfektionskontrollen dienten verschiedene F11-Zellpopulationen: (i) mit nonsense-siRNAs (*siNonTarget* Pool, siNT) transfizierte Zellen, (ii) mit dem Transfektionsreagenz Dharmafect 3 (DF3) behandelte Zellen sowie (iii) unbehandelte F11-Zellen. Aufgrund der Absenz von signifikanten Varianzen innerhalb der Kontrollen, sind in den Diagrammen nachfolgend die Ergebnisse der *siNonTarget* Pool transfizierten Zellen als Ausgangsniveau (= 100 %) dargestellt.

Die Analyse der supprimierten F11-Zellen unterschied sich aufgrund experimenteller Unterschiede substantiell von der Auswertung der pIRES2-EGFP-vermittelten Überexpressionsexperimente. Während das Neuritenwachstum nach Überexpression gezielt und selektiv über eine immunhistochemische Visualisierung des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) für die transfizierten Zellen möglich war, schließt die Auswertung der mit den siRNAs Pool-vermittelte Suppression aufgrund eines fehlenden positiven Transfektionsmarkers, alle Zellen in die statistische Auswertung ein. Demzufolge war keine siRNA-basierte Transfektionseffizienz gezielt ermittelbar, jedoch ist diese erfahrungsgemäß sehr hoch. Zur Unterscheidung, ob die jeweiligen Experimente erfolgreich waren und somit einen validen Status erhalten, wurde für jedes Experiment eine weitere interne Kontrolle verwendet. Zu den spezifischen siRNA-Pools der im Rahmen

dieser Arbeit untersuchten putativen RAG-Kandidaten wurde parallel immer auch ein spezifischer siRNA-Pool des etablierten Regenerations-assoziierten Gens *Atf3* transfiziert. Da dessen signifikanter Effekt auf das Neuritenwachstum von F11-Zellen bereits eindeutig beschrieben ist (MacGillavry *et al.*, 2009; MacGillavry *et al.*, 2011), diente der *Atf3*-Effekt als unabhängige positive Kontrolle für erfolgreiche siRNA-Transfektionsexperimente. Die Analyse der rekombinanten Suppression der Kandidatengen weist verschiedene signifikante Effekte auf das Neuritenwachstums der F11-Zellen auf. So wirkten sich die transfizierten *Cldn4*-, *Cmtm3*- und auch *Kif22*-spezifischen siRNAs unter differenzierenden Kultivierungsbedingungen negativ nicht nur auf die Anzahl, sondern auch auf die Länge der gebildeten Neuriten aus (Abbildung 4.11). Dabei bewirkte z. B. der *Kif22*-siRNA Pool eine Reduzierung der F11-Neuritenlänge um fast ein *Drittel* (28 %; Abbildung 4.11 E). Erwartungsgemäß zeigten die siRNAs unter proliferativen Wachstumsbedingungen kaum Effekte auf das rudimentäre Neuritenwachstum der F11-Zellen. Lediglich die *Kif22*-spezifischen siRNAs bewirken auch unter diesen Wachstumsbedingungen tendenziell einen negativen Effekt auf das Neuritenwachstum dieser Zellen. Während die beobachteten Auswirkungen auf eine reduzierte Länge der Zellausläufer statistisch noch unsicher erschienen, konnten die negativen Effekte auf die Neuritenanzahl (um 18 % reduziert) als signifikant ermittelt werden (Abbildung. 4.11 B, C).

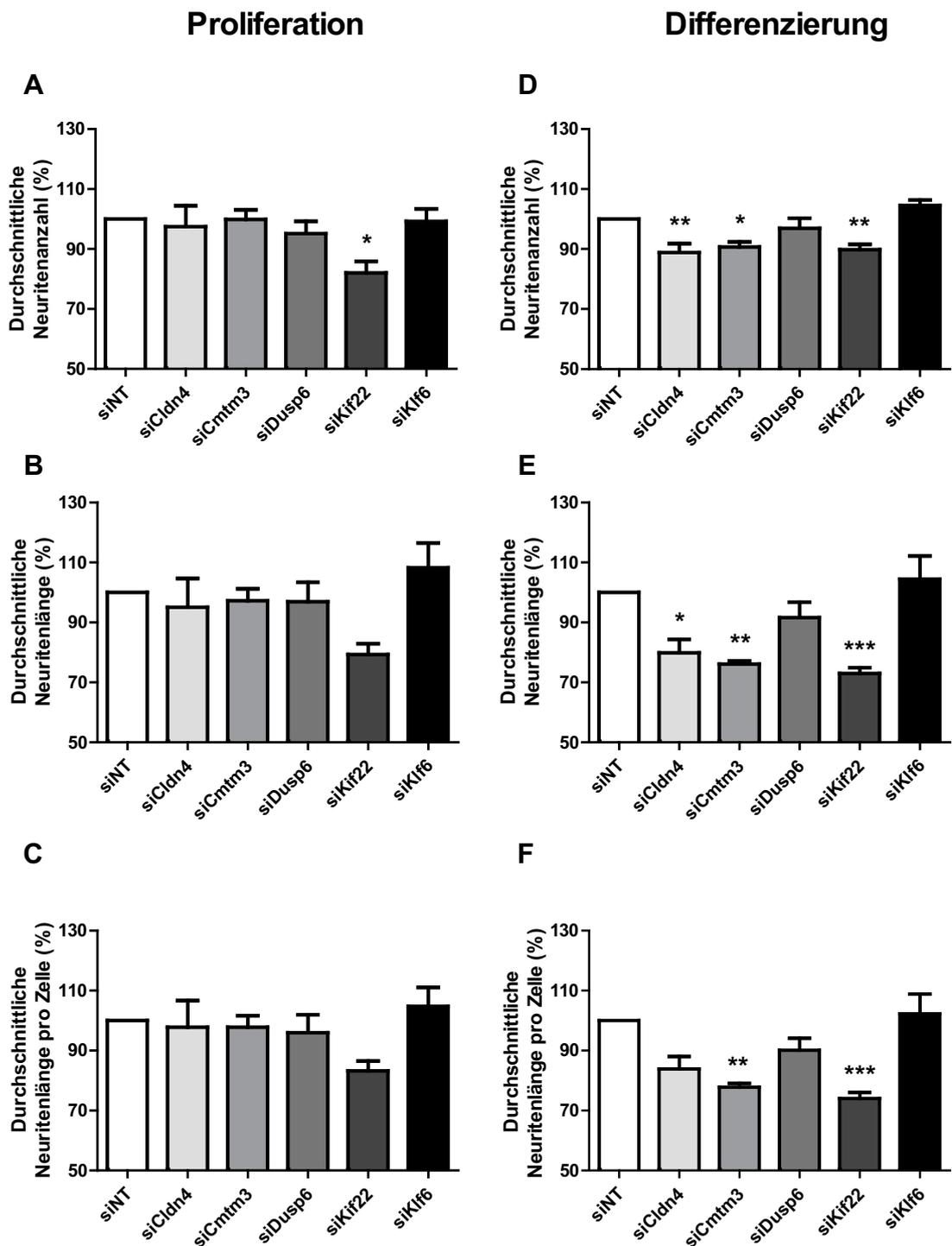


Abbildung 4.11: Cellomics-basierte Quantifizierung des Neuritenwachstums von F11-Zellen nach Suppression unter proliferierenden (A, B, C) sowie differenzierenden (D, E, F) Kulturbedingungen. Einfluss der rekombinanten potenziellen RAG-Expression auf die durchschnittliche Neuritenanzahl pro Zelle, die durchschnittliche Neuritenlänge sowie die durchschnittliche Neuritenlänge pro Zelle. F11-Zellen wurden mit der Target-unspezifischen siRNA *siNonTarget* (siNT) sowie den jeweiligen siRNA Pools der RAG-Kandidaten transfiziert und 48 Stunden kultiviert. Dargestellt ist eine Gesamtzell-Analyse aus Mittelwerten von n=6-9 Experimenten von je 5 Wells [Cldn4 n=6; Cmtm3 n=6; Dusp6 n=9; Klf22 n=9, Klf6 n=9]. *siNonTarget*-Transfektionen wurden auf ein Ausgangsniveau von 100 % normiert und Expressionseffekte prozentual aufgeführt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mittels One-Way ANOVA mit dem Dunnett's post hoc Test ermittelt.

Die experimentelle Suppression der Genkandidaten *Dusp6* und *Klf6* zeigte, weder unter proliferierenden noch unter differenzierenden Kultivierungsbedingungen, einen Einfluss auf die untersuchten Parameter des Neuritenwachstums der F11-Zellen.

4.2.3 Einfluss rekombinanter Ko-Expressionen der RAG-Kandidatengene auf das Neuritenwachstum

Neben der rekombinanten Modulation einzelner RAG-Kandidaten wurden im Rahmen dieser Arbeit auch kombinatorische Transfektionsexperimente durchgeführt. Aus diesem Grund wurden die fünf Genkandidaten aus unterschiedlichen Proteinfamilien und mit unterschiedlicher Funktion ko-transfiziert, um im Anschluss das Neuritenwachstum der transfizierten F11-Zellen zu analysieren.

Die Ko-Transfektionen wurden analog der oben beschriebenen Einzeltransfektionen durchgeführt. Um die für die Einzeltransfektionen als optimal ausgetestete Menge an siRNA bzw. DNA pro Transfektion/Reagenz bei den nachfolgenden Ko-Transfektionen nicht zu überschreiten, wurde für diese pro Kandidatengen nur die halbe Menge an siRNA bzw. DNA eingesetzt. In parallel durchgeführten Kontroll-Einzeltransfektionen wurde daher auch der mit der halben siRNA bzw. DNA-Menge erzielbare Effekt pro Konstrukt bestimmt.

Obwohl die positive siRNA-Kontrolle *Atf3* auch mit der halbierten siRNA-Menge zu den erwarteten signifikanten Effekten auf das Neuritenwachstum der F11-Zellen führte (Daten nicht gezeigt), ergaben die begleitenden Ko-Transfektionsexperimente der Kandidatengen-siRNAs leider keine Hinweise auf additive oder synergistische Effekte, weder unter proliferierenden, noch unter differenzierenden Wachstumsbedingungen der F11-Zellen.

Für die Ko-Überexpressionsexperimente wurde das in dieser Arbeit identifizierte neue RAG *Klf6*, welches stabil und zuverlässig in jedem der unter 4.2.1 beschriebenen Experimente signifikante Effekte bewirkte, als positive Kontrollbedingung eingesetzt, da robuste *Klf6*-Effekte auch mit der halben DNA-Menge erzielt werden konnten (Abbildung 4.12).

Proliferation

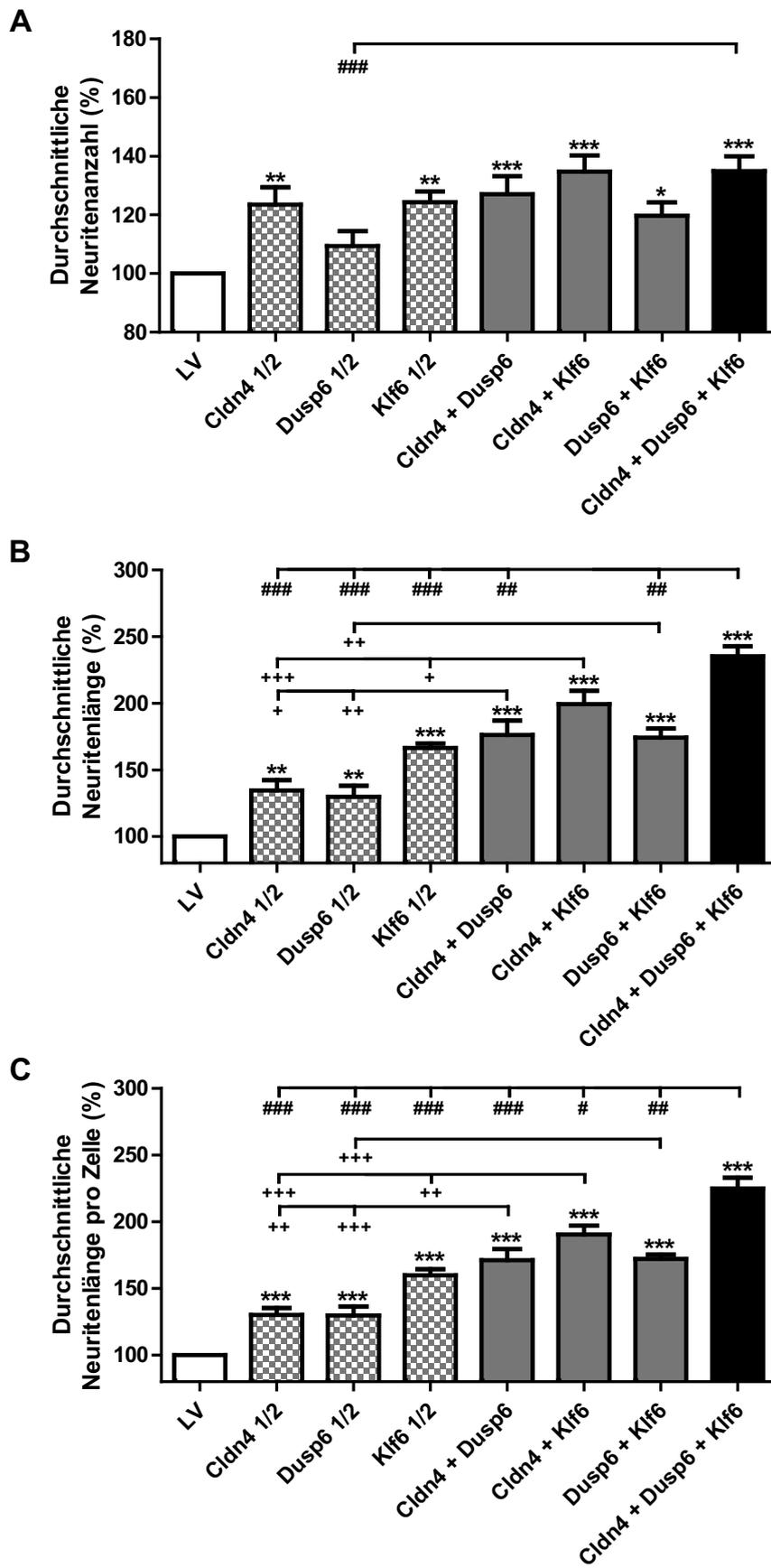


Abbildung 4.12: Cellomics-basierte Quantifizierung des Neuritenwachstums von F11-Zellen nach Ko-Überexpression unter proliferierenden Kulturbedingungen. Einfluss der rekombinanten RAG-Expression auf (A) die durchschnittliche Neuritenanzahl pro Zelle, (B) die durchschnittliche Neuritenlänge sowie (C) die durchschnittliche Neuritenlänge pro Zelle. F11-Zellen wurden mit dem Leervektor (LV) pIRES2-EGFP sowie den jeweils angezeigten Kombinationen an transfiziert und 48 Stunden kultiviert. Dargestellt ist eine GFP-selektive Analyse aus Mittelwerten von n= 4-9 Experimenten von je 5 Wells [Doppel-Transfektionen n=9; Trippel-Transfektionen n=4]. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mittels One-Way ANOVA mit dem Dunnett's post hoc Test ermittelt. (*)= Signifikanz zum LV; (+)= Signifikanz der Ko-Transfektion zur Einzel-Transfektion mit halbiertes Plasmidmenge (1/2); (#) Signifikanz der Trippel-Transfektion zur Ko- und Einzel-Transfektion.

Analog zur Kombinatorik der siRNAs wurden die pIRES2-EGFP Plasmidkonstrukte von *Cldn4*, *Dusp6* und *Klf6* in allen verschiedenen Kombinationen ko-transfiziert. Nachdem *Klf6* aufgrund der Einzel-Überexpressionsdaten als interne Kontrolle für alle Ko-Überexpressionsexperimente galt, zeigten analog auch *Cldn4* und *Dusp6* signifikant induzierte Effekte nach Einzel-Transfektion mit halbiertes Plasmidmenge (Abbildung 4.12).

Alle untersuchten Kombinationen (i) *Cldn4* + *Dusp6*, (ii) *Cldn4* + *Klf6* und (iii) *Dusp6* + *Klf6* übten signifikante Effekte auf die Neuritenanzahl sowie -länge im Vergleich zum Leervektor aus (Abbildung 4.12). Während aber die kombinatorische Überexpression einen gemäßigten positiven Effekt auf die gemessene Neuritenzahl im Vergleich zu den Einzel-Transfektionen hatte (Abbildung 4.12 A), wurde ein klarer additiver Effekt auf das Neuritenlängen-Wachstum unter der Kombination *Cldn4* + *Dusp6* sowie mit *Klf6* erzielt (Abbildung 4.12 B, C).

Während die Kombination von *Dusp6* mit *Cldn4* sowie mit *Klf6* zu einer ca. 70 %igen Steigerung des Neuritenwachstums im Vergleich zum Leervektor beigetragen hat, führte die Kombination von *Cldn4* und *Klf6* sogar zu einer Verdoppelung (ca. 100 %) der gemessenen Neuritenlänge (Abbildung 4.12 B, C).

Abschließend wurde auch der potenzielle Effekt nach einer Trippel-Transfektion mit *Cldn4*, *Dusp6* und *Klf6* analysiert. Dabei konnten die beobachteten additiven Transfektionseffekte sogar noch weiter gesteigert werden (Abbildung 4.12 C). Die statische Auswertung dokumentierte eine signifikante Steigerung der Neuritenlänge im Vergleich zu den drei durchgeführten Doppel-Transfektionen (Abbildung 4.12 C). So konnte mit einer tricistomischen Überexpression von *Cldn4*, *Dusp6* und *Klf6* eine bis 2,5

fache Induktion der Neuritenlänge im Vergleich zum Leervektor ermittelt werden (Abbildung 4.12 B, C).

Wie aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche der Einzeltransfektionen erwartet, konnten auch unter differenzierenden Kulturbedingungen keine statistisch signifikanten Effekte mit Doppel- sowie Trippel-Transfektionen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer potentieller Regenerations-assoziiertes Gene sowie deren histologische und funktionelle Charakterisierung im Kontext der peripheren Nervenregeneration. Im Rahmen einer vorangegangenen Mikroarray-Studie aus dem Labor für Molekulare Neurobiologie, wurden die Gene *Cldn4*, *Cmtm3*, *Dusp6*, *Klf6* und *Kif22* als putative neue RAGs ermittelt. Diese fünf ausgewählten Gene wurden daraufhin molekularbiologisch und immunhistochemisch im von einer experimentellen Ischiasnervverletzung betroffenen DRG-, Rückenmark- und Ischiasnerv-Gewebe sowie im F11-Zellkulturmodell *in vitro* analysiert. *In vitro*-Funktionsuntersuchungen in Anhängigkeit der experimentell modulierten Kandidatengenexpression sollten Aufschluss über eine mögliche Beteiligung dieser Gene am Neuritenwachstum der transfizierten F11-Zellen geben. Bei allen in der vorliegenden Arbeit analysierten Kandidaten handelte es sich um Gene, deren Funktion im Kontext der peripheren Nervenregeneration noch ungeklärt ist. Ein Einfluss dieser Gene auf das Neuritenwachstum wurde zuvor nur für das Kandidatengen *Klf6* im Bezug auf die intrinsische Regenerationskapazität zentraler Neurone diskutiert (Moore *et al.*, 2009).

5.1 Das RAG-Genexpressionsmuster

Während die Beschreibung neuer Regenerations-assoziiertes Gene zwar stetig zunimmt und bis zum heutigen Tag auch einige solcher Gene valide auf eine relevante Funktion im Kontext der Nervenregeneration untersucht worden sind (Kapitel 2.3), existiert zurzeit leider noch keine allgemeingültige RAG-Definition.

Das Resultat der temporären Regulationsprofile aus der vorangegangenen Mikroarray-Analyse deutete auf ein vorherrschendes läsionsinduziertes mRNA-Regulationsmuster der meisten etablierten RAGs hin. Dieses ist geprägt von einer signifikanten Induktion spätestens zwei Tage nach Verletzung, welche nach einer experimentellen Quetschläsion zumeist innerhalb von drei Wochen parallel vieler zellulärer und molekularer Prozesse einer erfolgreichen Regeneration (Fu & Gordon, 1997; Bosse *et al.*, 2001) auf das basale

Kontrollniveau zurückgeführt wird, während es im Falle der verhinderten Regeneration nach Transsektion zumeist bei einer länger andauernden Induktion bleibt (Abbildung 2.4). Dieser Regulationsverlauf, der für viele etablierte RAG-Gene, wie z. B. den Transkriptionsfaktor *Atf3* (Seijffers *et al.*, 2006; Seijffers *et al.*, 2007) typisch ist, ist allerdings nicht auf alle RAG-Expressionsprofile übertragbar. So zeigt z. B. das Gen für den axonalen Wachstumsmarker *Gap43* (Frey *et al.*, 2000; Bomze *et al.*, 2001) ebenso Abweichungen zum vorher beschriebenen Regulationsmuster, wie die ebenfalls als RAGs valide charakterisierten Gene *Sox11* (Jankowski *et al.*, 2009) oder *Galanin* (Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1992; Holmes *et al.*, 2000), welche alle im untersuchten Zeitfenster von drei Wochen nach einer Quetschung keine rasche Rückführung auf das unverletzte Kontrollniveau aufweisen, genauso, wie das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte *Claudin4*-Gen.

Aufgrund von sowohl läsionsspezifischen als auch funktionellen Unterschieden relevanter RAG-Proteine im komplexen Prozess der Regeneration scheint eine Erfassung vieler RAG-Gene anhand ihres ähnlichen läsionsinduzierten Genexpressionsprofils zwar häufig möglich, eine allgemeingültige Festlegung auf ein universelles einheitliches RAG-spezifisches Regulationsprofil ist jedoch weder sinnvoll noch möglich.

5.2 Experimentelle Validierungen der Ausgangsdaten

Die ausgewählten Kandidatengene *Cldn4*, *Cmtm3*, *Dusp6*, *Klf6* und *Kif22* zeigten in der Mikroarray-Analyse von verletzten DRG-Neuronen des Ischiasnervs der Ratte in einem Zeitfenster von acht Stunden bis 21 Tagen eine signifikante läsionsabhängige mRNA-Regulation. Die in dieser Arbeit validierten und detektierten läsionsinduzierten Expressionsprofile der putativen RAGs bestätigten weitgehend den postulierten Konsensusprofil zahlreicher etablierter RAGs, was auf relevante Funktionen der ausgewählten Kandidatengene im Kontext der komplexen molekularen Reaktionen der axonalen Regeneration des peripheren Nervensystems hindeutet. Die teilweise geringfügigen Unterschiede im Expressionsverlauf der Kandidatengene zwischen den initialen Arrayuntersuchungen und den nachfolgenden qRT-PCR-Analysen, basieren vermutlich weitgehend auf dem deutlich größeren Dynamikbereich sowie der höheren Sensitivität der PCR-Technik im Vergleich zur Hybridisierungsmethode der Mikroarray-

Analyse. Die Aufnahme Transkript-spezifischer Expressionsprofile wird zudem in der Mikroarray-Technik durch mögliche kreuzhybridisierende Proben sequenzverwandter Familienmitglieder sowie alternativer Spleißisoformen (welche für die Ratte partiell noch wenig charakterisiert sind) erschwert.

5.3 Zelluläre Lokalisation potenzieller RAG-Kandidaten *in vivo* und *in vitro*

5.3.1 Claudin4

Das am Aufbau von *tight junctions* beteiligte und die parazelluläre Kationen-Permeabilität von Epithelien regulierende Cldn4 (Angelow *et al.*, 2008; van Itallie *et al.*, 2001), konnte in Rahmen dieser Arbeit im Zytoplasma und im Zellkern von DRG-Neuronen großer und kleiner Neuronenpopulationen (Abbildung 4.1 B') sowie perinukleär und zytosolisch in F11-Zellen (Abbildung 4.2 A', B') nachgewiesen werden. Die Beobachtung einer fehlenden immunhistochemischen Anfärbung der axonalen Abschnitte sensorischer DRG-Neurone, der Dendriten und Axone von Motoneuronen im Rückenmark, sowie der Neuriten kultivierter F11-Zellen entsprechen und ergänzen die zuvor publizierten Ergebnisse, dass das Cldn4-Protein nicht im Endo- oder Perineurium des adulten peripheren Nerven lokalisiert ist (Alanne *et al.*, 2009).

Die Diskrepanz zwischen der Cldn4 Nukleus-Lokalisierung in DRG-Neuronen und der Cldn4-positiven Nukleoli-Färbung konnte nicht eindeutig geklärt werden und sollte in weiteren Untersuchungen aufgeschlüsselt werden. Es wird vermutet, dass Cldn4 als Transmembranprotein auf der Zellkernmembran fungiert und dadurch je nach DRG-Gewebeschnittebene für einige DRG-Neurone als Kernfärbung sichtbar wird. Inwieweit das Protein auch an einer möglichen Interaktion oder der funktionalen Organisation zwischen dem rauen ER und dem Zellkern beteiligt ist, was die signifikante perinukleäre Cldn4-Färbung in F11-Zellen nahelegt, bleibt ebenfalls Gegenstand weitergehender Untersuchungen.

Obwohl PCR-Daten eine mRNA-Expression von *Cldn4* im zentralen *Nervus auricularis magnus* (großer Ohrnerv) belegen, deuten Expressionsstudien im *Nervus ischiadicus* (Ischiasnerv) auf ein Fehlen von *Cldn4* im peripheren Nervensystem hin (Alanne *et al.*, 2009). Die von Alanne und Kollegen beschriebene Beobachtung, dass *Cldn4* nicht in den Axonen peripherer Nerven nachgewiesen wurde (Alanne *et al.*, 2009), wird in dieser Arbeit durch den Immunfärbungen getätigten Nachweis in den Zellkörpern sensorischer Neurone *in vivo* und *in vitro* klar widerlegt (Abbildung 4.1 B').

Nachdem nur wenige Claudinisoformen, wie zum Beispiel das Claudin11 (Mitic *et al.*, 2000), bislang im zentralen Nervensystem nachgewiesen wurden, kann nun aufgrund der hier geschilderten positiven Färbeargebnisse ventraler Motoneurone im Rückenmark auch das *Cldn4* zu dieser Gruppe gezählt werden.

Die funktionelle Bedeutung dieser neuronalen Expression ist zurzeit ebenso unbekannt wie die Bedeutung der postulierten Regenerations-assoziierten Funktion. Möglicherweise spielt *Cldn4* eine Rolle bei der für die Regeneration wichtigen Aufrechterhaltung und/oder Neuausbildung der neuronalen (apikalen) Polarität.

5.3.2 Cmtm3

Das vor allem im Immun- und männlichen Reproduktionssystem beschriebene (Zhong *et al.*, 2006) Tumorsuppressorprotein Cmtm3 (Zhang *et al.*, 2012) wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig immunzytochemisch in der neuronalen F11-Zelllinie charakterisiert (Abbildung 4.3 C, D). Die deutliche Cmtm3-Verteilung in Zellkernen ausdifferenzierter F11-Zellen (Abbildung 4.3 D') steht im Einklang mit der publizierten Beobachtung, dass Cmtm3 als ein stabilisierendes Proteingerüst in Zellkernen fungiert (Imamura *et al.*, 2004). In proliferierenden F11-Zellen ergaben die Immunfärbungen eher eine diffuse, nukleäre und zytoplasmatische Cmtm3-Färbung mit einer möglichen stärkeren Anfärbung des Endoplasmatischen Retikulums (Imamura *et al.*, 2004). Die neuronale Ausdifferenzierung der F11-Zellen unter Serumentzug ist somit mit einer Translokation/Anreicherung des Cmtm3-Proteins vom Zytoplasma in den Kern bzw. die Kernmembran assoziiert.

Durch den Besitz der Marvel-Domäne ist das Cmtm3-Protein geeignet, an der Ausbildung von Zellpolaritäten (apikal vs. basal) oder gar der Formation von *tight junctions* (Alonso &

Weissman, 1987; Pérez *et al.*, 1997; Puertollano *et al.*, 1999) beteiligt zu sein. Letztere Eigenschaft teilt *Cmtm3* mit dem anderen in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengen *Claudin4*, welches möglicherweise ebenfalls am Aufbau von *tight junctions* beteiligt ist. Die in dieser Arbeit immunzytochemisch ermittelten Verteilungsunterschiede dieser beiden Kandidatengene weisen aber eher auf nicht korrelierende Funktionen dieser beiden putativen *tight junction*-Gene in F11-Zellen hin. Da die F11-Zellen allerdings subkonfluente neuronale Monokulturen darstellen, sollten weitere *in vivo*-Untersuchungen an komplexeren Nervengewebe durchgeführt werden, um eine putative funktionelle Bedeutung dieser neuronalen Kandidatengene im Kontext junktionaler Verbindungen und Regeneration zu untersuchen. Weitere Analysen, unter anderem die konfokale mikroskopische Untersuchung von *Cmtm3*-immungefärbten F11-Zellen sowie eine Proteinlokalisierung primärer neuronaler Zellen des PNS sowie ZNS, stehen noch aus und sind für eine weitergehende *Cmtm3*-Charakterisierung notwendig.

5.3.3 Dusp6

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunfärbungen des MAP-Kinasen Inhibitors Dusp6 (Keyse, 2008) resultierten in unterschiedlichen Verteilungen der Dusp6-Proteine *in vitro* und *in vivo*. Während mithilfe von immunzytochemischen Analysen in kultivierten F11-Zellen vorwiegend eine zytosolische Verteilung beobachtet wurde (Abbildung 4.5 B', C'), wurde entgegen der Erwartungen mit den immunhistochemischen Gewebefärbungen zusätzlich eine nukleäre Dusp6-Lokalisierung sowohl in den sensorischen DRG-Neuronen, als auch in den Motoneuronen des lumbalen Rückenmarks (Abbildung 4.5 B', C') *in vivo* dokumentiert. Diese Ergebnisse deuten somit an, dass die bislang nur im Zytoplasma des Hippocampus' (Muda *et al.*, 1996) beschriebene Dusp6-Proteinlokalisierung darüber hinaus auch nukleär im lumbalen Rückenmark des ZNS sowie in DRG-Neuronen des PNS wichtige Funktionen aufweisen könnten.

Tatsächlich belegt eine parallel zu dieser Arbeit entstandene Publikation von Finelli und Mitarbeitern die in dieser Arbeit beobachtete Kernlokalisierung von Dusp6 auch für primäre embryonale DRG-Neurone (E.12.5; Finelli *et al.*, 2013a).

5.3.4 Klf6

Während eine Klf6-Proteinlokalisierung in ZNS-Neuronen und Endothelzellen des zerebralen Kortex bereits beschrieben wurde (Jeong *et al.*, 2009), belegt diese Arbeit zum ersten Mal eine Klf6-Proteinexpression in sensorischen DRG-Neuronen und F11-Zellen, also Bestandteilen des peripheren Nervensystem oder Derivaten. Immunhistochemische Analysen der neuronalen DRG-Populationen, sowie ventraler Motoneurone des Rückenmarks ergaben eine Expression des Klf6-Transkriptionsfaktors erwartungsgemäß in annähernd allen neuronalen Zellkernen (Abbildung 4.6 B', D'). Darüber hinaus ergaben die Immunfärbungen auch erstmals Hinweise auf eine nukleäre Klf6-Lokalisation in Schwanzzellen der sensorischen DRG-Wurzeln (Daten nicht gezeigt), in distalen Nervenfragmenten (Abbildung 4.6 C') sowie in der Schwanzzell-enthaltenden primären DRG-Mischkultur (Abbildung 4.7 D'), deren Bedeutung noch völlig unklar ist.

Zusammenfassend betrachtet entsprechen die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten zellulären Klf6-Proteinverteilungen *in vivo* sowie *in vitro* den Erwartungen, so dass kein Diskussionsbedarf wegen offensichtlicher Abweichungen oder Diskrepanzen zu den Vorkenntnissen besteht.

5.3.5 Kif22

Das zur Kinesin-10 Familie gehörende Mikrotubuli-assoziierte Motorprotein Kif22 ist an den Vorgängen der Spindelformation und der Chromosomenbewegung während der Mitose und Meiose wesentlich beteiligt (Tokai *et al.*, 1996; Tokai-Nishizumi *et al.*, 2005) und konnte im Rahmen dieser Arbeit erwartungsgemäß in den Kernen der untersuchten DRG-Neurone und Neuronen im lumbalen Rückenmarksgewebe *in vivo* detektiert werden (Abbildung 4.8 B', C'). Somit steht die in kultivierten F11-Zellen beobachtete nukleäre und zytoplasmatische Kif22-Lokalisation unter Proliferations- als auch Differenzierungsbedingungen *in vitro* in guter Übereinstimmung mit der Verteilung in den DRG-Neuronen (Abbildung 4.9 B', C'). Interessanterweise war zusätzlich eine distinkt verstärkte Kif22-Lokalisation im Wachstumskegel sich ausdifferenzierender F11-Zellen nachweisbar (Abbildung 4.9 C'; Pfeilspitze). Diese Beobachtung stimmt mit der bereits beschriebenen

Fähigkeit überein, dass Kif22 nicht nur mit Chromosomen sondern auch mit Mikrotubuli interagieren kann (Maddika *et al.*, 2009). Sowohl die neuronale Lokalisation in mitotisch nicht aktiven adulten DRG-Neuronen, als auch in Motorneuronen des ZNS deutet auf eine Motorproteinassoziation von Kif22 auch außerhalb des Spindelapparates hin. Außerdem suggeriert die Kif22-Verteilung in Wachstumskegeln eine interessante Rolle des Kif22-Proteins im Kontext der axonalen Nervenregeneration.

5.4 Einflüsse rekombinanter Modulationen potenzieller RAG-Kandidaten

5.4.1 Claudin4

Die im Rahmen der rekombinanten Überexpression erzielten Ergebnisse belegen nicht nur eine positive Korrelation der *Cldn4*-Expression mit der beobachteten Neuritenlänge, sondern darüber hinaus auch eine Korrelation mit der durchschnittlichen Neuriten-/Zellausläuferanzahl proliferierender F11-Zellen (Abbildung 4.10). In bereits neuronal ausdifferenzierten F11-Zellen konnten hingegen keine additiven Effekte einer *Cldn4*-Überexpression beobachtet werden.

Die rekombinante *Cldn4*-Suppression übte hingegen einen hemmenden Effekt sowohl auf die Neuritenanzahl, als auch auf deren Länge unter differenzierenden Wachstumsbedingungen aus (Abbildung 4.11). Die Tatsache, dass die *Cldn4*-Suppression unter proliferativer Kulturbedingung keinen signifikanten Einfluss auf die ohnehin nur wenigen und kurzen generierten neuritenähnlichen Fortsätze der F11-Zellen hat, ist zum einen wohl dem proliferativen Zellzustand geschuldet und zum anderen dem offensichtlich sehr geringem endogenen *Cldn4*-Expressionstatus *in vitro*, welcher mittels der qRT-PCR-Analysen auch nicht eindeutig detektiert werden konnte. Auch die um das 75fache läsionsspezifische Induktion von *Cldn4* in DRG-Neuronen *in vivo* (Abbildung 4.1 A), lässt auf eine geringere endogene *Cldn4*-Expression in reifen unverletzten DRG-Neuronen schließen.

Die durch die rekombinante *Cldn4*-Modulation erzielten funktionellen Ergebnisse belegen eindeutig, dass eine experimentell veränderte *Cldn4*-Expression signifikanten Einfluss auf das Neuritenwachstum der sensorischen neuronalen F11-Zelllinie nehmen kann. Da *Cldn4* als einziges der in dieser Arbeit untersuchten neuen Kandidatengene eindeutig inverse Effekte nach einer rekombinanten Überexpression bzw. siRNA-vermittelten Suppression auf das Neuritenwachstum der F11-Zellen ausübt, handelt es sich hierbei um einen sehr starken neuen RAG-Kandidaten, dessen molekularen Funktionen und Interaktionspartner im Rahmen der axonalen Regeneration in weiterführenden *in vivo*-Experimenten nun näher untersucht werden sollte.

Bislang ist die Regulation der Expression innerhalb der Claudin-Familie nur wenig erforscht. Erste Publikationen belegen, dass inflammatorische Zytokine, wie z. B. $\text{IL-}\beta$ (Interleukin β), $\text{TNF-}\alpha$ (Tumornekrosefaktor α) und $\text{IFN-}\gamma$ (Interferon γ) an der Modulation der *Cldn*-Expression beteiligt sind (Günzel & Yu, 2013). So reguliert z. B. $\text{TNF-}\alpha$ die Barriere-formenden Claudine, zu denen die Claudine *Cldn1*, -3, -4, -7 und -8 zugeordnet werden, herunter. Andere Studien belegen, dass mehrere Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine eine wichtige Rolle bei der Regulation der Claudin-Expression und Funktion aufweisen. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass $\text{TGF-}\beta$ (Transformierender Wachstumsfaktor β) die *Cldn*-Expression über Smad-abhängige sowie Smad-unabhängige Signalwege reguliert (Günzel & Yu, 2013). Die nachfolgende Abbildung fasst schematisch die zuzeit bekannten *Cldn*-Regulationen im $\text{TGF-}\beta$ Signalweg, welcher sowohl an der embryonalen Entwicklung, als auch an regenerativen Reaktionen von Zellen und Geweben beteiligt ist, zusammen. Demnach führt z. B. eine Smad-Hypermethylierung zu einer *Cldn4*-Repression (bei Brustkrebs), während eine Smad7-Überexpression (in Adenocarcinoma-Zellen), oder eine Inaktivierung der MEKK/p38/MAP-Kinase (in klonierten Zellen) zu einer erhöhten *Cldn4*-Expression führt (Abbildung 5.1).

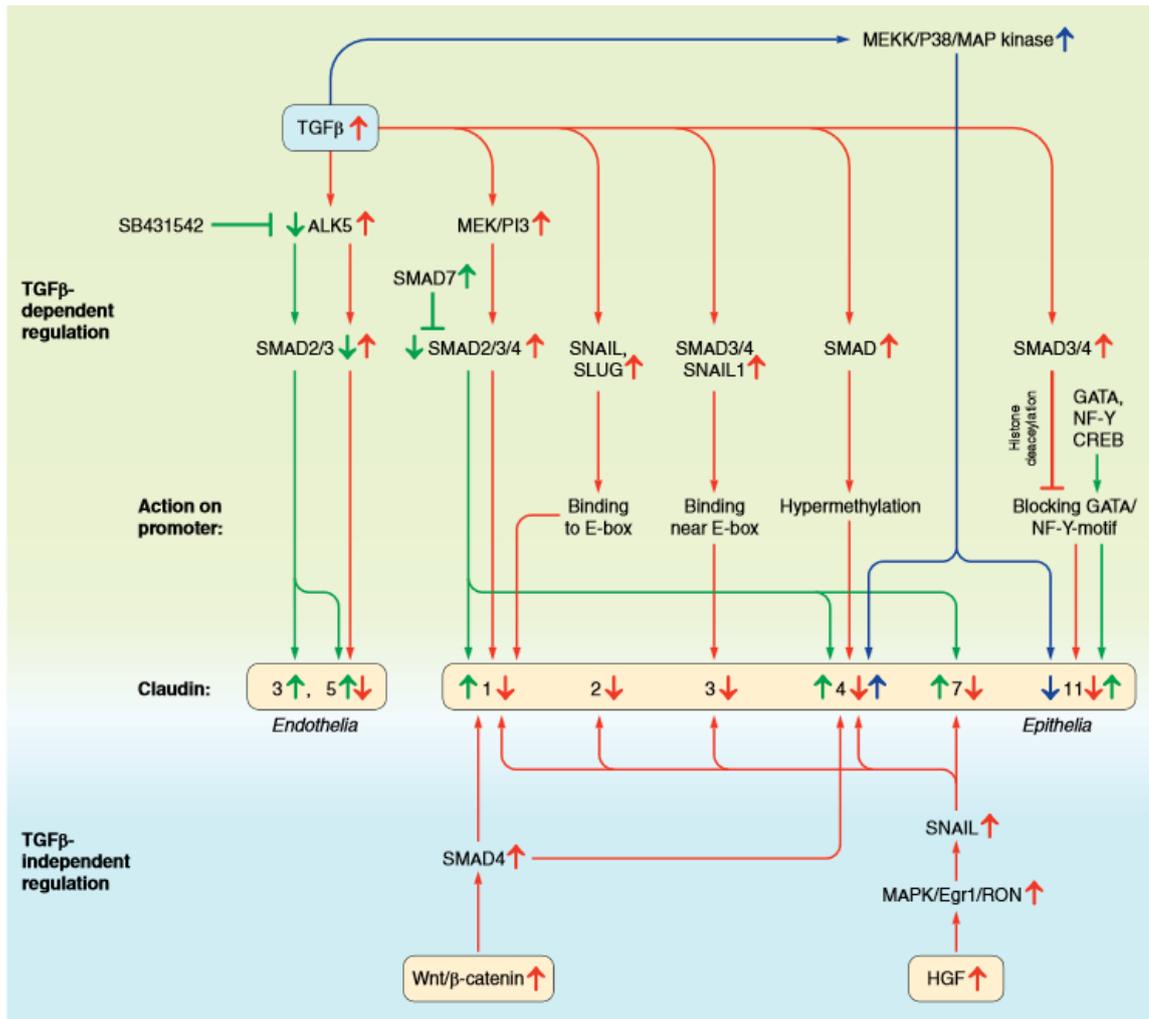


Abbildung 5.1: Schematische Zusammenfassung des TGF-β-abhängigen und -unabhängigen Smad-Signalwegs in Bezug auf die Claudin-Expression. Dargestellt sind die Abhängigkeiten einzelner Signalkaskadenmoleküle für die Expressionsänderung der Claudine 1-5, 6 und 11. [Auszug aus Günzel & Yu, 2013]

Tatsächlich sind im Kontext der Axonregeneration zum einen verschiedene epigenetische Reprogrammierungsprozesse Histon-modifizierender Enzyme (Finelli *et al.*, 2013b) und zum anderen BMP (*bone morphogenetic protein*)-Proteine (BMP2/4) identifiziert worden, die zusammen mit dem pro-regenerativen Transkriptionsfaktor Smad1 einen transkriptionellen Schalter bilden, um verletzte Neurone von einem transmittierenden Differenzierungszustand in einen aktiv regenerierenden Wachstumszustand zu bringen und die transkriptionelle Aktivierung von RAGs zu fördern (Zou *et al.*, 2009). Es bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären, inwieweit auch die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene (insbesondere *Cldn4* oder *Dusp6*) auf diese Weise läSIONSINDUZIERT werden.

5.4.2 Cmtm3

Die durchgeführten Genmodulationsexperimente mit der *Cmtm3*-spezifischen siRNA ergaben eine negative Korrelation der *Cmtm3*-Suppression auf die Neuritogenese differenzierter F11-Zellen (Abbildung 4.11). Dabei war zu beobachten, dass nicht nur die Anzahl, sondern auch die Länge der F11-Neuriten nach Suppression des *Cmtm3* signifikant reduziert ist. Damit liefern die *in vitro*-Analysen erste experimentelle Belege für eine neuronale, neuritenfördernde Funktion des *Cmtm3*-Gens, eine Rolle, die aufgrund der deutlichen läsionsinduzierten Regulation die Ausgangshypothese dieser Arbeit darstellte. Die vergleichende qRT-PCR basierte Quantifizierung der *Cmtm3*-Expression der verschiedenen Wachstumsbedingungen der F11-Zellen scheint diese Korrelation ebenfalls zu stützen (Abbildung 4.3 B). Denn die endogene *Cmtm3*-Expression ist unter der neuritenbildenden differenzierenden Kulturbedingung ohne Forskolin-Zusatz im Vergleich zur proliferierenden Bedingung nahezu verdoppelt. Jedoch dokumentiert die Untersuchung auch einen eklatanten *Cmtm3*-Genexpressionsunterschied zwischen den beiden differenzierenden Kulturbedingungen mit und ohne Forskolin (Abbildung 4.3 B), dessen Ursache noch nicht aufgeklärt werden konnte. Möglicherweise aber ersetzt die Zugabe von Forskolin (Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels) eine regulatorische *Cmtm3*-Rolle, so dass unter diesen Bedingungen nur eine basale *Cmtm3*-Menge exprimiert werden muss.

Es gibt mittlerweile verschiedene Belege dafür, dass Tumorsuppressorgene und deren beeinflusste Signalwege wichtige Funktionen bei der Regeneration komplexer Gewebe besitzen und deren Rolle unabhängig von der Regulation der Zellproliferation ist. So belegen Arbeiten von Di Giovanni und Mitarbeitern, dass der Prototyp eines Tumorsuppressors (p53) notwendige Funktionen bei der Regeneration zentraler und peripherer Nerven besitzt und diese Rolle über spezifische Targets (Coronin 1b und Rab13) ausführt, die sich deutlich von seinen Targets im Kontext von *Growth Arrest* und/oder Apoptose unterscheiden (Di Giovanni *et al.*, 2006). Auch der Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase and tension homolog*), ein negativer Regulator des mTOR-Signalwegs kann bei Deletion oder Suppression die axonale Regeneration von Neuronen deutlich verbessern (Park *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010a; Sun *et al.*, 2011).

Wie genau die Rolle des hier beschriebenen *Cmtm3* im Kontext der peripheren Regeneration aussieht, ist zurzeit leider noch unklar, aber die oben beschriebenen Beispiele lassen weiterführende Untersuchungen zur Funktion und Interaktion dieses besonderen und neuartigen Tumorsuppressorgens im Kontext regenerativer Prozesse des Nervensystems sinnvoll und lohnenswert erscheinen.

5.4.3 *Dusp6*

Die rekombinante *Dusp6*-Überexpressionsanalyse der mit Proliferationsmedium kultivierten F11-Zellen bewirkte eine signifikante Zunahme sowohl der Neuritenlänge, als auch der durchschnittlichen Neuritenanzahl und suggeriert damit Hinweise einer zunehmenden neuronalen Differenzierung, welche sich in einer verstärkten Neuritogenese dieser rekombinanten F11-Zellen manifestiert (Abbildung 4.10).

Die weiteren Transfektionsexperimente (*Dusp6*-Überexpression in bereits differenzierten F11-Zellen, bzw. siRNA-vermittelte *Dusp6*-Suppression unter beiden Kultivierungsbedingungen) hingegen ergaben keine weiteren Hinweise auf einen modulatorischen Einfluss auf die Neuritogenese oder die Neuritenlänge der rekombinanten F11-Zellen (Abbildung 4.10 und 4.11).

Im Kontext der Axonbildung während der Embryonalentwicklung wurde bereits ein Hinweis auf eine wichtige funktionelle Bedeutung von *Dusp6* festgestellt. Über eine Neurotrophin-vermittelte Linkerphosphorylierung des etablierten RAGs *Smad1* (Zou *et al.*, 2009) wird einerseits die Aktivität von Erk1/2 gefördert und andererseits die *Dusp6*-Transkription stimuliert, was über einen negativen *Feedback-Loop* wiederum zu einer Reduktion von phosphoERK1/2 führt (Finelli *et al.*, 2013a). Für die präzise Regulation des axonalen Wachstums und der präzisen Innervation ist demnach ein Gleichgewicht dieser beiden Antagonisten von enormer Bedeutung. Demnach verhindert *Dusp6* in diesem Kontext ein unkontrolliertes Axonwachstum (Finelli *et al.*, 2013a).

Auch andere Ergebnisse unterstützen diese regulatorische Wirkung von *Dusp6* in solchen zytoplasmatischen negativen *Feedback-Loops* auf Erk2. Dabei wurde nach *Dusp6*-Überexpressionen keine Interaktion mit den anderen MAP-Kinase-Gruppen p38 und JNK beobachtet, was die hohe Spezifität von *Dusp6* für Erk1/2 belegt (Keyse, 2008). Die

Bindung von Erk2 an Dusp6 erfolgt über zwei positiv geladene Arginine am N-terminalen Ende und führt zu einer Konformationsänderung am C-Terminus sowie der dort lokalisierten katalytischen Domäne, welche durch die Erk-Bindung aktiviert wird (Owens & Keyse, 2007). Der Feedback-Mechanismus beruht auf (i) Erk1/2 induzierter Dusp6-Transkription, (ii) Herunterregulierung der katalytischen Aktivität von Erk1/2 durch Dusp6 sowie (iii) den Erk1/2 simulierten proteosomalen Abbau von Dusp6 (Abbildung 5.2; Muda *et al.*, 1996; Marchetti *et al.*, 2005).

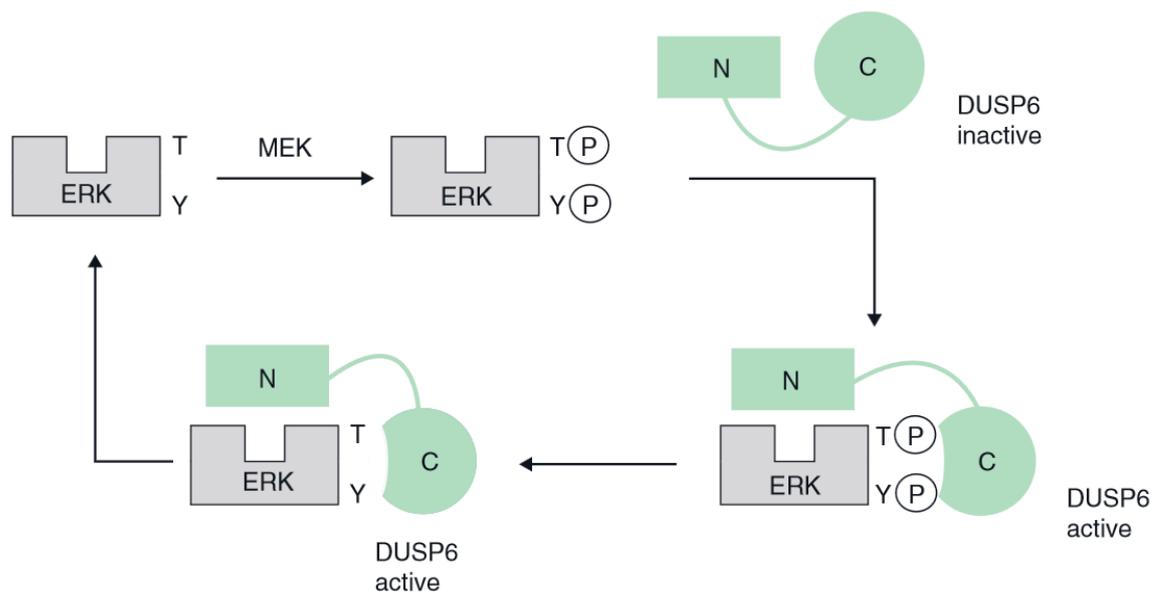


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Dusp6-Phosphatase Aktivierung bei Erk-Substrat Interaktion. Die Konformationsänderung des inaktiven Dusp6 nach Erk-Bindung führt zur Phosphatase-Aktivierung, und die daraus resultierende Erk-Dephosphorylierung zu einer nachfolgenden Dissoziation des Komplexes. C= katalytischer Carboxy-Terminus; N= Erk-bindender Amino-Terminus. [Auszug aus: Theodosiou & Ashworth, 2002]

In Phäochromozytom (PC12)-Zellen, einer klonalen Zelllinie aus einer Nebennierentumor-Zelle der Ratte (Greene & Tischler, 1976), resultierte eine *Dusp6*-Genexpressionsaktivierung und nachfolgende Erk2-Inaktivierung ebenfalls in verstärktem Neuritenauswuchs (Camps *et al.*, 1998).

Die Erk-Kaskade, die in vielen zellulären Prozessen, wie z. B. der Zell-Differenzierung und -Proliferation involviert ist, weist zahlreiche wichtige physiologische Funktionen auf, die auch im Kontext der molekularen Reaktionen der peripheren Nervenregeneration relevant sind. Somit deuten die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Dusp6-Phosphatase auf relevante Funktionen in der Zelldifferenzierung/Neuritogenese-Induktion von F11-Zellen, vermutlich durch eine Erk2-Inaktivierung sowie ein

kontrolliertes Axonwachstum hin. Damit und mit den Hinweisen aus der Literatur qualifiziert sich *Dusp6* als ein weiteres putatives RAG, dessen detaillierte biochemische Analyse der molekularen Wechselwirkungen im Kontext der Regenerations-assoziierten Signalwege lohnenswert erscheint.

5.4.4 *Klf6*

Die im Rahmen der rekombinanten Überexpression und Suppression des *Klf6*-Transkriptionsfaktors in proliferierenden F11-Zellen erzielten Ergebnisse belegen nicht nur eine deutlich positive Korrelation der *Klf6*-Expression mit der Neuritenlänge, sondern darüber hinaus auch mit der durchschnittlichen Neuritenanzahl pro F11-Zelle (Abbildung 4.10). Die im Rahmen dieser Arbeit an F11-Zellen dokumentierte positive Korrelation der *Klf6*-Expression mit dem Neuritenwachstum entspricht damit nicht nur den Erwartungen, die auf den von Moore und Mitarbeitern erstellten Ergebnissen mit primären Kulturen von Kortex-Neuronen und RGCs (Moore *et al.*, 2009) basieren, sondern erweitern deren Beobachtungen um eine neue Eigenschaft des *Klf6*-Transkriptionsfaktors. Denn die Tatsache, dass die *Klf6*-Überexpression in mit Proliferationsmedium kultivierten F11-Zellen nicht nur das Längenwachstum der vorhandenen neuritenähnlichen Fortsätze deutlich positiv beeinflusst, sondern unter dieser Kulturbedingung auch eine vermehrte Neuritenbildung induziert, ist eine qualitative neue und bislang so noch nicht beschriebene Auswirkung der rekombinanten *Klf6*-Überexpression. Diese Beobachtung in undifferenzierten F11-Zellen deutet darauf hin, dass die *Klf6*-Überexpression die undifferenzierten, überwiegend runden und proliferationsaktiven F11-Zellen vermehrt in Richtung differenzierter F11-Neurone beeinflusst, welche verstärkt Neuritenausläufer generieren. Ob dabei auch eine geringere Proliferationsaktivität gemessen werden kann, muss noch in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Sogar in bereits neuronal ausdifferenzierenden F11-Zellen führte eine rekombinante *Klf6*-Überexpression noch zu einer signifikanten Neuritenverlängerung (Abbildung 4.10). Somit unterstützen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse die Annahme, dass es sich bei *Klf6* um ein valides Regenerations-assoziiertes Gen handelt. Daher erscheinen weiterführende Untersuchungen, die die *in vivo*-Funktionen sowie die Aufklärung der

beteiligten Zielgene und Signalwege zu Beginn der axonalen Regeneration als unbedingt lohnenswert.

Überraschenderweise wurde in *Klf6*-supprimierten F11-Zellen kein negativer Einfluss auf die F11-Zell-Neuritogenese festgestellt, was die Annahme zulässt, dass F11-Zellen auch mit reduzierter *Klf6*-Expression zur neuronalen Differenzierung befähigt sind. Ein vollständiger Knock-out des *Klf6*-Gens wurde durch die Applikation der spezifischen siRNA Pools nicht erreicht, so dass Auswirkungen einer *Klf6*-Deletion auf F11-Zellen in den genannten Experimenten auch nicht untersucht werden konnte.

Bislang ist die Regulation der *Klf6*-Expression nur wenig erforscht. Kajimura und Mitarbeiter lieferten erste Hinweise auf *Klf7*-Effektoren, wie p21 und p23, Gap43 sowie TrkA und TrkB (*tropomyosin-related-kinase* Rezeptoren), welche teilweise über den Rho-Signalweg in die zellulären Mechanismen eingreifen (Kajimura *et al.*, 2007). Die Rezeptoren TrkA und TrkB sind bereits gut erforscht und binden unter anderem Signalstoffe, die ein zielgerichtetes Wachstum von Nervenzellen bewirken, die sogenannten Neurotrophine.

Die Feststellung, dass TrkA einen wichtiger Effektor für das strukturell am meisten mit *Klf6* verwandten *Klf7* darstellt (Lei *et al.*, 2001) und der Tatsache, dass NGF ausschließlich an diesen Rezeptor bindet (Kaplan *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1991), könnte potenziell erste Hinweise auch auf einen möglichen Signaltransduktionsweg des eng verwandten *Klf6* liefern. Da die in dieser Arbeit verwendeten F11-Zellen aus einer Fusion von primären DRG-Neuronen mit Maus-Neuroblastomazellen hervorgegangen sind (Platika *et al.*, 1985) und NGF ein wesentlicher neurotropher Faktor für das Kultivieren von primären DRG-Neuronen ist, erscheinen weiterführende Untersuchungen von *Klf6*-überexprimierenden F11-Zellen mit dem Fokus auf den TrkA-Rezeptor und dessen Signalweg lohnend.

Aufgrund der Identifizierung von Kajimura und Mitarbeitern, dass p21 und p23, Gap43 sowie TrkA und TrkB mögliche Targets des strukturell am meisten mit *Klf6* verwandten *Klf7* sind (Kajimura *et al.*, 2007), wurde in einer bisher präliminären qRT-PCR Untersuchung nach möglichen Interaktionspartnern von *Klf6* im Regenerationsprozess gesucht. Hierfür wurde die Expression der bereits etablierten RAGs *Atf3* (Seijffers *et al.*, 2006; Seijffers *et al.*, 2007), *Nfil3* (MacGillavry *et al.*, 2009), *Gap43* (Bomze *et al.*, 2001) nach rekombinanter Überexpression des *Klf6*-Gens in F11-Zellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht, um potenzielle Targets für *Klf6* zu identifizieren

(Abbildung 5.3). Tatsächlich wurden präliminäre Hinweise gewonnen, dass eine Korrelation der Regulation und somit Hinweise auf eine mögliche regulatorische Abhängigkeit zwischen *Klf6* und den etablierten RAGs *Atf3*, *Gap43* und *Nfil3* besteht. Für alle drei untersuchten RAGs wurde durch die *Klf6*-Überexpression eine signifikante Induktion der endogenen mRNA-Expression sowohl in proliferierenden, als auch in differenzierten (mit und ohne Forskolin) F11-Zellen beobachtet. Somit scheint das in der Entwicklung und der axonalen Regeneration involvierte *Gap43* nicht nur für *Klf7* ein Target zu sein (Kajimura *et al.*, 2007), sondern möglicherweise auch für das strukturell verwandte *Klf6*. Auch der Transkriptionsfaktor *Atf3*, ein zentraler Schlüsselregulator für die Aktivierung der intrinsischen Wachstumskapazität von peripheren Neuronen nach einer Verletzung, stellt aufgrund der hier vorgestellten *in vitro*-Daten ein wichtiges potenzielles *Klf6*-Target im Kontext der axonalen Regeneration dar. Die hier vorgelegten Ergebnisse werden von der Beobachtung, dass *Klf6* in Prostatakrebszellen direkt an den *Atf3*-Promotor bindet und damit das *Atf3*-Gen aktiviert unterstützt (Huang *et al.*, 2008).

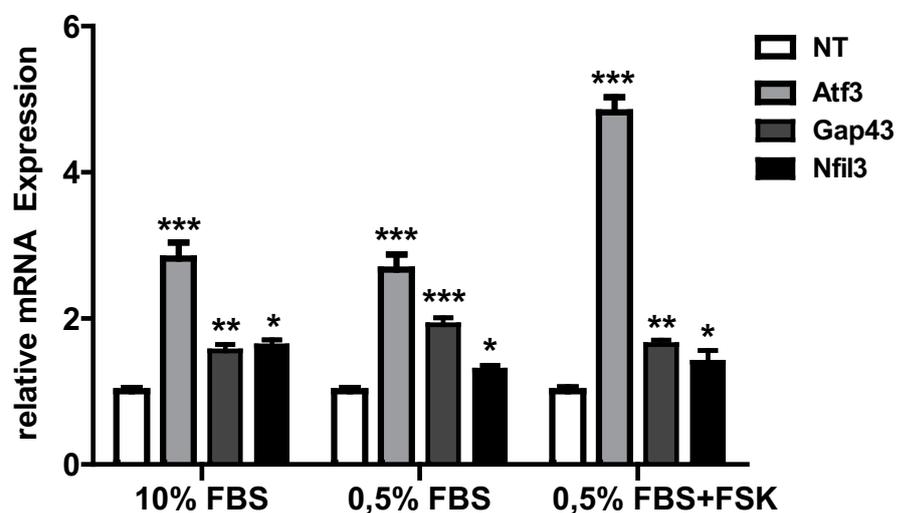


Abbildung 5.3: Quantitative Genexpressionsanalyse der etablierten RAGs *Atf3*, *Gap43* und *Nfil3* nach rekombinanter Überexpression der *Klf6*-Genexpression in F11-Zellen. Mittels qRT-PCR wurde die relative *Atf3*-, *Gap43*- und *Nfil3*-Genexpression in rekombinant *Klf6*-überpexprimierenden F11-Zellen unter Kontrollbedingung (10 % FBS) bzw. Differenzierungsbedingungen (0,5 % FBS ± 10 µM Forskolin) nach 48 Stunden untersucht. Als Referenz wurde das *housekeeping*-Gen *Odc* verwendet (n=1). Nicht transfizierte (NT) Zellen wurden auf das Ausgangsniveau von 1 normiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Die Signifikanz innerhalb des Experimentes wurde mittels t-Test ermittelt: *p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,01.

Für Nfil3, einem negativen Regulator der CREM-induzierten Expression etablierter RAGs, legen die vorgestellten Daten (Abbildung 5.3) ebenfalls eine Interaktion mit Klf6 nahe. Somit beeinflusst die rekombinante *Klf6*-Überexpression nicht nur das Neuritenwachstum positiv, sondern auch die Expression anderer, für eine erfolgreiche axonale Regeneration wichtiger RAGs. Es bleibt außerdem zu untersuchen, ob das *Klf6*-Gen möglicherweise auch eine Art *Recruiting*-Plattform darstellt, ähnlich wie es für das nah verwandte *Sp1*-Gen postuliert wurde (Kiryu-Seo & Kiyama, 2011).

5.4.5 Kif22

Interessanterweise wurde die Kif22-Induktion nach traumatischer Verletzung nicht nur im PNS, sondern auch im ZNS - nach einer Verletzung der Linsenkapsel des Auges - beobachtet, wobei die retinalen Ganglienzellen durch Faktoren der Linsenflüssigkeit in ein dem genetischen Wachstumsprogramm regenerierender peripherer Nerven vergleichbares Wachstumsprogramm versetzt werden (Fischer *et al.*, 2004).

Damit scheint die Kif22-Induktion möglicherweise ein relevanter Bestandteil eines läSIONSinduzierten Regenerationsprogramms zu sein, dessen Wirkung aber noch ungeklärt ist.

Die in dieser Arbeit untersuchte rekombinante Überexpression des Chromokinesins *Kif22* zeigte weder in proliferierenden, noch in neuronal differenzierten F11-Zellen einen positiven Einfluss auf das Neuritenwachstum (Abbildung 4.10). Erst eine siRNA-vermittelte Suppression führte, vor allem unter Differenzierungsbedingungen, zu einer signifikanten Reduktion des Neuritenwachstums (in Anzahl und Länge; Abbildung 4.11) und bestätigte damit die Selektion des *Kif22*-Gens als ein relevantes RAG.

Das Kif22-Motorprotein scheint eine aktivierende Funktion in der die Regeneration begleitenden axonalen Transportmaschinerie zu besitzen, welche nach einer rekombinanten Suppression unter Differenzierungsbedingung beeinträchtigt wird. Eine solche aktivierende Eigenschaft des Kif22 könnte für das kontrollierte axonale Wachstum von großer Bedeutung sein und unterscheidet sich. In diesem Kontext deutlich von der Funktion anderer Chromokinesine, wie z. B. das Chromokinesin 11 (auch Kif5 oder Eg5 genannt) oder das Chromokinesin 12 (Kif15), deren Inhibition die Neuritenlänge positiv

beeinflusst. So beschreiben Liu und Kollegen, dass eine rekombinante Suppression von *Kif15* zu verlängerten Neuriten in kortikalen und sympathischen Neuronen führte (Liu *et al.*, 2010b) und *Kif5*-Suppressionsexperimente an kultivierten DRG-Neuronen (Lin *et al.*, 2011) resultierten nicht nur in einem verstärktem Neuritenwachstum, sondern halfen darüber hinaus auch die wachstumsinhibierende (repulsive) Wirkung von CSPGs *in vitro* zu überwinden.

Obwohl die Motorprotein-Funktionen von Chromokinesinen und somit auch Kif22 während der Mitose bereits relativ gut erforscht sind (Tokai *et al.*, 1996; Levesque & Compton, 2001; Tokai-Nishizumi *et al.*, 2005; Ohsugi *et al.*, 2008), sind deren Effekte auf das regenerative axonale Wachstum und das Wissen der daran beteiligten Signalkaskaden bislang noch vollkommen ungeklärt. Ob die von Tokai und Mitarbeitern (Tokai *et al.*, 1996) beschriebene Kif22-Bindung an den Erb B2 (*human epidermal growth factor receptor 2*)-Promoter in diesem Kontext regulatorisch relevant ist oder nur auf einer experimentellen Unspezifität beruht, bleibt zunächst ungeklärt. Erb B2 (auch HER-2 genannt) ist ein epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor und stimuliert über die RAS-MAP-Kinase-Signalkaskade zelluläre Prozesse wie die Zellproliferation oder beeinflusst über den mTOR-Signalweg apoptotische Reaktionen (Olayioye, 2001). Der Liganden-freie Erb B2 Rezeptor ist nach einer Nervenverletzung in DRGs signifikant hochreguliert (Mizobuchi *et al.*, 2013) und seine Überexpression verbessert die Regeneration peripherer Nerven adulter Mäuse nach einer traumatischer Verletzung (Ronchi *et al.*, 2013). Aus diesem Grund erscheint eine genauere Untersuchung der potentiellen Interaktion von Kif22 und Erb B2 und der damit verbundenen putativen Beteiligung des RAS-MAP-Kinase-Signalwegs durchaus lohnenswert.

5.5 Kombinatorische Überexpressionen

Neben den rekombinanten Überexpressionen sowie Suppressionen einzelner RAG-Kandidaten, wurden auch die Effekte von Kombinationen der Überexpressionskonstrukten bzw. siRNAs auf das Neuritenwachstum *in vitro* untersucht, um Hinweise auf additive oder synergistische Effekte der Kandidatengene sowie gegebenenfalls auf Hinweise für Interaktionen beteiligter Signalwege zu stoßen. Aus

Experimenten mit retinalen Ganglienzellen ist bekannt, dass eine kombinierte Überexpression der verwandten Gene *Klf6* und *Klf7* synergistische Effekte, das Neuritenwachstum der RGCs betreffend, aufzeigt (Moore *et al.*, 2009).

Die kombinatorischen Überexpressionen von *Cldn4* mit (i) *Dusp6* sowie (ii) mit *Klf6* übten einen signifikanten additiven Effekt auf die Neuritenanzahl sowie -länge aus (Abbildung 4.12) und mögen unterschiedliche beteiligte Signalwege andeuten, da keine synergistischen Effekte festgestellt wurden. Die Tatsache, dass Ko-Transfektionen von *Klf6* mit *Dusp6* zu keiner Veränderung des Ergebnisses im Vergleich zur *Klf6*-Einzeltransfektion führten, lässt die Vermutung zu, dass *Dusp6* das durch *Klf6*-stimulierte gesteigerte Wachstum nicht weiter beeinflussen kann. Ob *Klf6* gar inhibitorische Effekte auf die *Dusp6*-aktivierten Signalkaskaden ausübt oder ob *Dusp6* und *Klf6* beispielsweise einer aktivierten Signalkaskade angehören lässt sich ohne weiterführende biochemische Analysen zu diesem Zeitpunkt nicht abschätzen.

Literaturverzeichnis

- Abe, N. & Cavalli, V. (2008) *Nerve injury signaling. Current opinion in neurobiology*, 18, 276–283.
- Alanne, M.H., Pummi, K., Heape, A.M., Grønman, R., Peltonen, J. & Peltonen, S. (2009) *Tight junction proteins in human Schwann cell autotypic junctions. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 57, 523–529.
- Alonso, M.A. & Weissman, S.M. (1987) *cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 1997–2001.
- Alshbool, F.Z. & Mohan, S. (2014a) *Emerging multifunctional roles of Claudin tight junction proteins in bone. Endocrinology*, 155, 2363–2376.
- Angelow, S., Ahlstrom, R. & Yu, A.S.L. (2008) *Biology of claudins. Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 295, F867-76.
- Aubert, I., Ridet, J.L., Schachner, M., Rougon, G. & Gage, F.H. (1998) *Expression of L1 and PSA during sprouting and regeneration in the adult hippocampal formation. J. Comp. Neurol.*, 399, 1–19.
- Benzeno, S., Narla, G., Allina, J., Cheng, G.Z., Reeves, H.L., Banck, M.S., Odin, J.A., Diehl, J.A., Germain, D. & Friedman, S.L. (2004) *Cyclin-dependent kinase inhibition by the KLF6 tumor suppressor protein through interaction with cyclin D1. Cancer research*, 64, 3885–3891.
- Bieker, J.J. (2001) *Krüppel-like factors: three fingers in many pies. J. Biol. Chem.*, 276, 34355–34358.
- Boland, L.M. & Dingledine, R. (1990) *Expression of sensory neuron antigens by a dorsal root ganglion cell line, F-11. Brain Res. Dev. Brain Res.*, 51, 259–266.
- Bomze, H.M., Bulsara, K.R., Iskandar, B.J., Caroni, P. & Skene, J.H. (2001) *Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. Nat. Neurosci.*, 4, 38–43.
- Bonilla, I.E., Tanabe, K. & Strittmatter, S.M. (2002) *Small proline-rich repeat protein 1A is expressed by axotomized neurons and promotes axonal outgrowth. J. Neurosci.*, 22, 1303–1315.
- Bosse, F. (2012) *Extrinsic cellular and molecular mediators of peripheral axonal regeneration. Cell Tissue Res.*, 349, 5–14.
- Bosse, F., Hasenpusch-Theil, K., Küry, P. & Müller, H.W. (2006) *Gene expression profiling reveals that peripheral nerve regeneration is a consequence of both novel injury-dependent and reactivated developmental processes. J. Neurochem.*, 96, 1441–1457.

- Bosse, F., Hasse, B., Pippirs, U., Greiner-Petter, R. & Müller, H.-W. (2003) *Proteolipid plasmalogen: localization in polarized cells, regulated expression and lipid raft association in CNS and PNS myelin. Journal of Neurochemistry*, 86, 508–518.
- Bosse, F., Küry, P. & Müller, H.W. (2001) *Gene expression profiling and molecular aspects in peripheral nerve regeneration. Restor. Neurol. Neurosci.*, 19, 5–18.
- Broude, E., McAtee, M., Kelley, M.S. & Bregman, B.S. (1997) *c-Jun expression in adult rat dorsal root ganglion neurons: differential response after central or peripheral axotomy. Exp. Neurol.*, 148, 367–377.
- Brück, W. (1997) *The role of macrophages in Wallerian degeneration. Brain Pathol.*, 7, 741–752.
- Brushart, T.M. (1991) *Central course of digital axons within the median nerve of Macaca mulatta. J. Comp. Neurol.*, 311, 197–209.
- Bunge, R.P. (1980) *Some observations on the role of Schwann cells in peripheral nerve regeneration. In j. McCaroll (Ed.). Nerve Repair and Regeneration-Its clinical and Experimental Basis. Masby, St. Louis, 1980, pp. 58.*
- Burgess, A.W., Cho, H.-S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, Thomas P J, Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W. & Yokoyama, S. (2003) *An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. Molecular cell*, 12, 541–552.
- Burnett, M.G. & Zager, E.L. (2004) *Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. Neurosurg Focus*, 16, E1.
- Cai, Q., Gerwin, C. & Sheng, Z.-H. (2005) *Syntaxin-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes. The Journal of cell biology*, 170, 959–969.
- Cameron, A.A., Vansant, G., Wu, W., Carlo, D.J. & Ill, C.R. (2003) *Identification of reciprocally regulated gene modules in regenerating dorsal root ganglion neurons and activated peripheral or central nervous system glia. Journal of cellular biochemistry*, 88, 970–985.
- Camps, M., Chabert, C., Muda, M., Boschert, U., Gillieron, C. & Arkininstall, S. (1998) *Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC12. FEBS letters*, 425, 271–276.
- Caspary, T. & Anderson, K.V. (2003) *Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. Nat. Rev. Neurosci.*, 4, 289–297.
- Chang, L. & Karin, M. (2001) *Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature*, 410, 37–40.
- Chong, M.S., Woolf, C.J., Haque, N.S. & Anderson, P.N. (1999) *Axonal regeneration from injured dorsal roots into the spinal cord of adult rats. J. Comp. Neurol.*, 410, 42–54.
- Chopra, B., Giblett, S., Little, J.G., Donaldson, L.F., Tate, S., Evans, R.J. & Grubb, B.D. (2000) *Cyclooxygenase-1 is a marker for a subpopulation of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. Eur. J. Neurosci.*, 12, 911–920.

- Claude, P. (1978) *Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens*. *The Journal of membrane biology*, 39, 219–232.
- Di Giovanni, S. (2009) *Molecular targets for axon regeneration: focus on the intrinsic pathways*. *Expert Opin. Ther. Targets*, 13, 1387–1398.
- Di Giovanni, S., Knights, C.D., Rao, M., Yakovlev, A., Beers, J., Catania, J., Avantaggiati, M.L. & Faden, A.I. (2006) *The tumor suppressor protein p53 is required for neurite outgrowth and axon regeneration*. *The EMBO journal*, 25, 4084–4096.
- Diefenbach, R.J., Diefenbach, E., Douglas, M.W. & Cunningham, A.L. (2002) *The heavy chain of conventional kinesin interacts with the SNARE proteins SNAP25 and SNAP23*. *Biochemistry*, 41, 14906–14915.
- Dowd, S., Sneddon, A.A. & Keyse, S.M. (1998) *Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases*. *Journal of cell science*, 111 (Pt 22), 3389–3399.
- Eblaghie, M.C., Lunn, J.S., Dickinson, R.J., Münsterberg, A.E., Sanz-Ezquerro, J.J., Farrell, E.R., Mathers, J., Keyse, S.M., Storey, K. & Tickle, C. (2003) *Negative feedback regulation of FGF signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos*. *Curr. Biol.*, 13, 1009–1018.
- Elkouby-Naor, L. & Ben-Yosef, T. (2010) *Functions of claudin tight junction proteins and their complex interactions in various physiological systems*. *International review of cell and molecular biology*, 279, 1–32.
- Fawcett, J.W. & Keynes, R.J. (1990) *Peripheral nerve regeneration*. *Annu. Rev. Neurosci.*, 13, 43–60.
- Fenrich, K. & Gordon, T. (2004) *Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems--current issues and advances*. *Can J Neurol Sci*, 31, 142–156.
- Finelli, M.J., Murphy, K.J., Chen, L. & Zou, H. (2013a) *Differential phosphorylation of Smad1 integrates BMP and neurotrophin pathways through Erk/Dusp in axon development*. *Cell reports*, 3, 1592–1606.
- Finelli, M.J., Wong, J.K. & Zou, H. (2013b) *Epigenetic regulation of sensory axon regeneration after spinal cord injury*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33, 19664–19676.
- Fischer, D., Petkova, V., Thanos, S. & Benowitz, L.I. (2004) *Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24, 8726–8740.
- Francel, P.C., Harris, K., Smith, M., Fishman, M.C., Dawson, G. & Miller, R.J. (1987) *Neurochemical characteristics of a novel dorsal root ganglion X neuroblastoma hybrid cell line, F-11*. *J. Neurochem.*, 48, 1624–1631.

- Frey, D., Laux, T., Xu, L., Schneider, C. & Caroni, P. (2000) *Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. J. Cell Biol.*, 149, 1443–1454.
- Fu, S.Y. & Gordon, T. (1997) *The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. Mol. Neurobiol.*, 14, 67–116.
- Fujita, K., Katahira, J., Horiguchi, Y., Sonoda, N., Furuse, M. & Tsukita, S. (2000) *Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. FEBS letters*, 476, 258–261.
- Fullmer, J.M., Riedl, M.S., Higgins, L. & Elde, R. (2004) *Identification of some lectin IB4 binding proteins in rat dorsal root ganglia. Neuroreport*, 15, 1705–1709.
- Funabiki, H. & Murray, A.W. (2000) *The Xenopus chromokinesin Xkid is essential for metaphase chromosome alignment and must be degraded to allow anaphase chromosome movement. Cell*, 102, 411–424.
- Gao, Y., Deng, K., Hou, J., Bryson, J.B., Barco, A., Nikulina, E., Spencer, T., Mellado, W., Kandel, E.R. & Filbin, M.T. (2004) *Activated CREB is sufficient to overcome inhibitors in myelin and promote spinal axon regeneration in vivo. Neuron*, 44, 609–621.
- Ghil, S.H., Kim, B.J., Lee, Y.D. & Suh-Kim, H. (2000) *Neurite outgrowth induced by cyclic AMP can be modulated by the alpha subunit of Go. J. Neurochem.*, 74, 151–158.
- Greene, L.A. & Tischler, A.S. (1976) *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 2424–2428.
- Groom, L.A., Sneddon, A.A., Alessi, D.R., Dowd, S. & Keyse, S.M. (1996) *Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. The EMBO journal*, 15, 3621–3632.
- Grothe, C., Haastert, K. & Jungnickel, J. (2006) *Physiological function and putative therapeutic impact of the FGF-2 system in peripheral nerve regeneration--lessons from in vivo studies in mice and rats. Brain research reviews*, 51, 293–299.
- Guan, K.L. & Butch, E. (1995) *Isolation and characterization of a novel dual specific phosphatase, HVH2, which selectively dephosphorylates the mitogen-activated protein kinase. The Journal of biological chemistry*, 270, 7197–7203.
- Günzel, D. & Yu, Alan S L (2013) *Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiological reviews*, 93, 525–569.
- Hall, S.M. (1986) *Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 12, 27–46.
- Han, W., Ding, P., Xu, M., Wang, L., Rui, M., Shi, S., Liu, Y., Zheng, Y., Chen, Y., Yang, T. & Ma, D. (2003) *Identification of eight genes encoding chemokine-like factor superfamily members 1-8 (CKLFSF1-8) by in silico cloning and experimental validation. Genomics*, 81, 609–617.

- Hanz, S. & Fainzilber, M. (2006) *Retrograde signaling in injured nerve--the axon reaction revisited. Journal of neurochemistry*, 99, 13–19.
- Hanz, S., Perlson, E., Willis, D., Zheng, J.-Q., Massarwa, R., Huerta, J.J., Koltzenburg, M., Kohler, M., van-Minnen, J., Twiss, J.L. & Fainzilber, M. (2003) *Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. Neuron*, 40, 1095–1104.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. & Niwa, S. (2009) *Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. Nature reviews. Molecular cell biology*, 10, 682–696.
- Hirokawa, N. & Takemura, R. (2004a) *Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. Experimental cell research*, 301, 50–59.
- Hirokawa, N. & Takemura, R. (2004b) *Molecular motors in neuronal development, intracellular transport and diseases. Current opinion in neurobiology*, 14, 564–573.
- Hoffman, P.N. & Cleveland, D.W. (1988) *Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific beta-tubulin isotype. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 4530–4533.
- Hoffman, P.N., Cleveland, D.W., Griffin, J.W., Landes, P.W., Cowan, N.J. & Price, D.L. (1987) *Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 3472–3476.
- Holmes, F.E., Mahoney, S., King, V.R., Bacon, A., Kerr, N.C., Pachnis, V., Curtis, R., Priestley, J.V. & Wynick, D. (2000) *Targeted disruption of the galanin gene reduces the number of sensory neurons and their regenerative capacity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 11563–11568.
- Huang, X., Li, X. & Guo, B. (2008) *KLF6 induces apoptosis in prostate cancer cells through up-regulation of ATF3. The Journal of biological chemistry*, 283, 29795–29801.
- Imamura, Y., Katahira, T. & Kitamura, D. (2004) *Identification and characterization of a novel BASH N terminus-associated protein, BNAS2. The Journal of biological chemistry*, 279, 26425–26432.
- Jankowski, M.P., McIlwrath, S.L., Jing, X., Cornuet, P.K., Salerno, K.M., Koerber, H.R. & Albers, K.M. (2009) *Sox11 transcription factor modulates peripheral nerve regeneration in adult mice. Brain Res.*, 1256, 43–54.
- Jeong, K.H., Kim, S.-K., Kim, S.Y. & Cho, K.-O. (2009) *Immunohistochemical localization of Krüppel-like factor 6 in the mouse forebrain. Neurosci. Lett.*, 453, 16–20.
- Kaczynski, J., Cook, T. & Urrutia, R. (2003) *Sp1- and Krüppel-like transcription factors. Genome biology*, 4, 206.
- Kajimura, D., Dragomir, C., Ramirez, F. & Laub, F. (2007) *Identification of genes regulated by transcription factor KLF7 in differentiating olfactory sensory neurons. Gene*, 388, 34–42.
- Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V. & Parada, L.F. (1991) *The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. Science (New York, N.Y.)*, 252, 554–558.

- Karaki, S.-i., Kaji, I., Otomo, Y., Tazoe, H. & Kuwahara, A. (2007) *The tight junction component protein, claudin-4, is expressed by enteric neurons in the rat distal colon. Neuroscience letters*, 428, 88–92.
- Keyse, S.M. (2008) *Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. Cancer Metastasis Rev.*, 27, 253–261.
- Kim, Y., Ratzliff, V., Choi, S.G., Lalazar, A., Theiss, G., Dang, Q., Kim, S.J. & Friedman, S.L. (1998) *Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. J. Biol. Chem.*, 273, 33750–33758.
- Kiryu-Seo, S. & Kiyama, H. (2011) *The nuclear events guiding successful nerve regeneration. Frontiers in molecular neuroscience*, 4, 53.
- Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E. & Barbacid, M. (1991) *The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. Cell*, 65, 189–197.
- Küry, P., Bosse, F. & Müller, H.W. (2001) *Transcription factors in nerve regeneration. Prog. Brain Res.*, 132, 569–585.
- Kwak, S.P. & Dixon, J.E. (1995) *Multiple dual specificity protein tyrosine phosphatases are expressed and regulated differentially in liver cell lines. The Journal of biological chemistry*, 270, 1156–1160.
- Laub, F., Aldabe, R., Ramirez, F. & Friedman, S. (2001) *Embryonic expression of Krüppel-like factor 6 in neural and non-neural tissues. Mech. Dev.*, 106, 167–170.
- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, Lawrence S B, Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R.L., McIntosh, J.R., Miki, H., Mitchison, T.J., Okada, Y., Reddy, Anireddy S N, Saxton, W.M., Schliwa, M., Scholey, J.M., Vale, R.D., Walczak, C.E. & Wordeman, L. (2004) *A standardized kinesin nomenclature. The Journal of cell biology*, 167, 19–22.
- Levesque, A.A. & Compton, D.A. (2001) *The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles. The Journal of cell biology*, 154, 1135–1146.
- Li, S., Liu, Q., Wang, Y., Gu, Y., Liu, D., Wang, C., Ding, G., Chen, J., Liu, J. & Gu, X. (2013) *Differential gene expression profiling and biological process analysis in proximal nerve segments after sciatic nerve transection. PloS one*, 8, e57000.
- Ligon, L.A. & Steward, O. (2000) *Movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. The Journal of comparative neurology*, 427, 340–350.
- Lin, S., Liu, M., Son, Y.-J., Timothy Himes, B., Snow, D.M., Yu, W. & Baas, P.W. (2011) *Inhibition of Kinesin-5, a microtubule-based motor protein, as a strategy for enhancing regeneration of adult axons. Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 12, 269–286.
- Lind, G.E., Ahlquist, T., Kolberg, M., Berg, M., Eknaes, M., Alonso, M.A., Kallioniemi, A., Meling, G.I., Skotheim, R.I., Rognum, T.O., Thiis-Evensen, E. & Lothe, R.A. (2008)

- Hypermethylated MAL gene - a silent marker of early colon tumorigenesis. Journal of translational medicine*, 6, 13.
- Liu, K., Lu, Y., Lee, J.K., Samara, R., Willenberg, R., Sears-Kraxberger, I., Tedeschi, A., Park, K.K., Jin, D., Cai, B., Xu, B., Connolly, L., Steward, O., Zheng, B. & He, Z. (2010a) *PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons. Nature neuroscience*, 13, 1075–1081.
- Liu, M., Nadar, V.C., Kozielski, F., Kozłowska, M., Yu, W. & Baas, P.W. (2010b) *Kinesin-12, a mitotic microtubule-associated motor protein, impacts axonal growth, navigation, and branching. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30, 14896–14906.
- Lundborg, G. (1988) *Nerve injury and repair*. Churchill Livingstone, Edinburgh, New York.
- Lundborg, G. (2000) *A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. J Hand Surg Am*, 25, 391–414.
- Ma, Chi H E, Brenner, G.J., Omura, T., Samad, O.A., Costigan, M., Inquimbert, P., Niederkofler, V., Salie, R., Sun, C.C., Lin, H.Y., Arber, S., Coppola, G., Woolf, C.J. & Samad, T.A. (2011) *The BMP coreceptor RGMb promotes while the endogenous BMP antagonist noggin reduces neurite outgrowth and peripheral nerve regeneration by modulating BMP signaling. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31, 18391–18400.
- MacGillavry, H.D., Cornelis, J., van der Kallen, Loek R, Sassen, M.M., Verhaagen, J., Smit, A.B. & van Kesteren, Ronald E (2011) *Genome-wide gene expression and promoter binding analysis identifies NFIL3 as a repressor of C/EBP target genes in neuronal outgrowth. Molecular and cellular neurosciences*, 46, 460–468.
- MacGillavry, H.D., Stam, F.J., Sassen, M.M., Kegel, L., Hendriks, W.T.J., Verhaagen, J., Smit, A.B. & van Kesteren, R.E. (2009) *NFIL3 and cAMP response element-binding protein form a transcriptional feedforward loop that controls neuronal regeneration-associated gene expression. J. Neurosci.*, 29, 15542–15550.
- Maddika, S., Sy, S.M.-H. & Chen, J. (2009) *Functional interaction between Chfr and Kif22 controls genomic stability. J. Biol. Chem.*, 284, 12998–13003.
- Marchetti, S., Gimond, C., Chambard, J.-C., Touboul, T., Roux, D., Pouyssegur, J. & Pagès, G. (2005) *Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. Molecular and cellular biology*, 25, 854–864.
- Martín-Belmonte, F., Arvan, P. & Alonso, M.A. (2001) *MAL mediates apical transport of secretory proteins in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells. The Journal of biological chemistry*, 276, 49337–49342.
- Mason, M R J, Lieberman, A.R. & Anderson, P.N. (2003) *Corticospinal neurons up-regulate a range of growth-associated genes following intracortical, but not spinal, axotomy. Eur. J. Neurosci.*, 18, 789–802.

- Masuda, K., Shima, H., Watanabe, M. & Kikuchi, K. (2001) *MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein. The Journal of biological chemistry*, 276, 39002–39011.
- Matsuda, S. & Uehara, Y. (1981) *Cytoarchitecture of the rat dorsal root ganglia as revealed by scanning electron microscopy. Journal of electron microscopy*, 30, 136–140.
- McConnell, B.B. & Yang, V.W. (2010) *Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. Physiological reviews*, 90, 1337–1381.
- McGraw, J., Oschipok, L.W., Liu, J., Hiebert, G.W., Mak, C F W, Horie, H., Kadoya, T., Steeves, J.D., Ramer, M.S. & Tetzlaff, W. (2004) *Galectin-1 expression correlates with the regenerative potential of rubrospinal and spinal motoneurons. Neuroscience*, 128, 713–719.
- McKerracher, L., Essagian, C. & Aguayo, A.J. (1993) *Marked increase in beta-tubulin mRNA expression during regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult mammals. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 13, 5294–5300.
- Méchaly, I., Bourane, S., Piquemal, D., Al-Jumaily, M., Ventéo, S., Puech, S., Scamps, F., Valmier, J. & Carroll, P. (2006) *Gene profiling during development and after a peripheral nerve traumatism reveals genes specifically induced by injury in dorsal root ganglia. Molecular and cellular neurosciences*, 32, 217–229.
- Mense, S. (1990) *Structure-function relationships in identified afferent neurones. Anat. Embryol.*, 181, 1–17.
- Miki, H., Okada, Y. & Hirokawa, N. (2005) *Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. Trends in cell biology*, 15, 467–476.
- Mitic, L.L., van Itallie, C M & Anderson, J.M. (2000) *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 279, G250-4.
- Mizobuchi, S., Kanzaki, H., Omiya, H., Matsuoka, Y., Obata, N., Kaku, R., Nakajima, H., Ouchida, M. & Morita, K. (2013) *Spinal nerve injury causes upregulation of ErbB2 and ErbB3 receptors in rat dorsal root ganglia. Journal of pain research*, 6, 87–94.
- Mohanna, P.N., Young, R.C., Wiberg, M. & Terenghi, G. (2003) *A composite poly-hydroxybutyrate-glia growth factor conduit for long nerve gap repairs. Journal of anatomy*, 203, 553–565.
- Moore, D.L., Apará, A. & Goldberg, J.L. (2011) *Krüppel-like transcription factors in the nervous system: novel players in neurite outgrowth and axon regeneration. Mol. Cell. Neurosci.*, 47, 233–243.
- Moore, D.L., Blackmore, M.G., Hu, Y., Kaestner, K.H., Bixby, J.L., Lemmon, V.P. & Goldberg, J.L. (2009) *KLF family members regulate intrinsic axon regeneration ability. Science*, 326, 298–301.

- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K. & Tsukita, S. (1999) *Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 511–516.
- Muda, M., Boschert, U., Dickinson, R., Martinou, J.C., Martinou, I., Camps, M., Schlegel, W. & Arkinstall, S. (1996) *MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase*. *The Journal of biological chemistry*, 271, 4319–4326.
- Muda, M., Boschert, U., Smith, A., Antonsson, B., Gillieron, C., Chabert, C., Camps, M., Martinou, I., Ashworth, A. & Arkinstall, S. (1997) *Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4*. *The Journal of biological chemistry*, 272, 5141–5151.
- Mumenthaler, M., ed (2007) *Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome*. Thieme, Stuttgart u.a.
- Neumann, S., Bradke, F., Tessier-Lavigne, M. & Basbaum, A.I. (2002) *Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation*. *Neuron*, 34, 885–893.
- Neumann, S. & Woolf, C.J. (1999) *Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury*. *Neuron*, 23, 83–91.
- Noble, J., Munro, C.A., Prasad, V.S. & Midha, R. (1998) *Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries*. *The Journal of trauma*, 45, 116–122.
- Ohsumi, M., Adachi, K., Horai, R., Kakuta, S., Sudo, K., Kotaki, H., Tokai-Nishizumi, N., Sagara, H., Iwakura, Y. & Yamamoto, T. (2008) *Kid-mediated chromosome compaction ensures proper nuclear envelope formation*. *Cell*, 132, 771–782.
- Olayioye, M.A. (2001) *Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members*. *Breast cancer research : BCR*, 3, 385–389.
- Owens, D.M. & Keyse, S.M. (2007) *Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases*. *Oncogene*, 26, 3203–3213.
- Pan, P. & Dobrowsky, R.T. (2013) *Differential expression of neuregulin-1 isoforms and downregulation of erbin are associated with Erb B2 receptor activation in diabetic peripheral neuropathy*. *Acta neuropathologica communications*, 1, 39.
- Park, K.K., Liu, K., Hu, Y., Smith, P.D., Wang, C., Cai, B., Xu, B., Connolly, L., Kramvis, I., Sahin, M. & He, Z. (2008) *Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway*. *Science (New York, N.Y.)*, 322, 963–966.
- Pérez, P., Puertollano, R. & Alonso, M.A. (1997) *Structural and biochemical similarities reveal a family of proteins related to the MAL proteolipid, a component of detergent-insoluble membrane microdomains*. *Biochemical and biophysical research communications*, 232, 618–621.

- Perry, M.J., Lawson, S.N. & Robertson, J. (1991) *Neurofilament immunoreactivity in populations of rat primary afferent neurons: a quantitative study of phosphorylated and non-phosphorylated subunits*. *J. Neurocytol.*, 20, 746–758.
- Pilling, A.D., Horiuchi, D., Lively, C.M. & Saxton, W.M. (2006) *Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in Drosophila motor axons*. *Molecular biology of the cell*, 17, 2057–2068.
- Platika, D., Boulos, M.H., Baizer, L. & Fishman, M.C. (1985) *Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 3499–3503.
- Puertollano, R., Martín-Belmonte, F., Millán, J., de Marco, M C, Albar, J.P., Kremer, L. & Alonso, M.A. (1999) *The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells*. *The Journal of cell biology*, 145, 141–151.
- Raivich, G., Bohatschek, M., Da Costa, C., Iwata, O., Galiano, M., Hristova, M., Nateri, A.S., Makwana, M., Riera-Sans, L., Wolfer, D.P., Lipp, H.-P., Aguzzi, A., Wagner, E.F. & Behrens, A. (2004) *The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration*. *Neuron*, 43, 57–67.
- Rask, C.A. (1999) *Biological actions of nerve growth factor in the peripheral nervous system*. *Eur. Neurol.*, 41 Suppl 1, 14–19.
- Ratziu, V., Lalazar, A., Wong, L., Dang, Q., Collins, C., Shaulian, E., Jensen, S. & Friedman, S.L. (1998) *Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 9500–9505.
- Richardson, P.M., Miao, T., Wu, D., Zhang, Y., Yeh, J. & Bo, X. (2009) *Responses of the nerve cell body to axotomy*. *Neurosurgery*, 65, A74-9.
- Rohan, P.J., Davis, P., Moskaluk, C.A., Kearns, M., Krutzsch, H., Siebenlist, U. & Kelly, K. (1993) *PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase*. *Science (New York, N.Y.)*, 259, 1763–1766.
- Ronchi, G., Gambarotta, G., Di Scipio, F., Salamone, P., Sprio, A.E., Cavallo, F., Perroteau, I., Berta, G.N. & Geuna, S. (2013) *ErbB2 receptor over-expression improves post-traumatic peripheral nerve regeneration in adult mice*. *PLoS one*, 8, e56282.
- Rui, M., Xia, D., Zhang, Y., Han, W., Wang, L., Ding, P., Zhong, Y., Song, Q. & Ma, D. (2003) *Molecular cloning and characterization of four isoforms of mCKLF, mouse homologues of human chemokine-like factor*. *Molecular biology reports*, 30, 229–237.
- Schaeffer, H.J. & Weber, M.J. (1999) *Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers*. *Molecular and cellular biology*, 19, 2435–2444.
- Seddon, H.J. (1943) *Three types of nerve injury*. *Brain*.

- Segond Banchet, G. von, Pastor, A., Biskup, C., Schlegel, C., Benndorf, K. & Schaible, H.-G. (2002) *Localization of functional calcitonin gene-related peptide binding sites in a subpopulation of cultured dorsal root ganglion neurons. Neuroscience*, 110, 131–145.
- Seiffers, R., Allchorne, A.J. & Woolf, C.J. (2006) *The transcription factor ATF-3 promotes neurite outgrowth. Mol. Cell. Neurosci.*, 32, 143–154.
- Seiffers, R., Mills, C.D. & Woolf, C.J. (2007) *ATF3 increases the intrinsic growth state of DRG neurons to enhance peripheral nerve regeneration. J. Neurosci.*, 27, 7911–7920.
- Shang, X., Lin, X., Alvarez, E., Manorek, G. & Howell, S.B. (2012) *Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases. Neoplasia (New York, N.Y.)*, 14, 974–985.
- Skene, J.H. (1989) *Axonal growth-associated proteins. Annu. Rev. Neurosci.*, 12, 127–156.
- Smith, D.S. & Skene, J.H. (1997) *A transcription-dependent switch controls competence of adult neurons for distinct modes of axon growth. J. Neurosci.*, 17, 646–658.
- Son, Y.J. & Thompson, W.J. (1995) *Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. Neuron*, 14, 125–132.
- Stam, F.J., MacGillavry, H.D., Armstrong, N.J., Gunst, M.C.M. de, Zhang, Y., van Kesteren, R.E., Smit, A.B. & Verhaagen, J. (2007) *Identification of candidate transcriptional modulators involved in successful regeneration after nerve injury. Eur. J. Neurosci.*, 25, 3629–3637.
- Stoll, G., Griffin, J.W., Li, C.Y. & Trapp, B.D. (1989) *Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. J. Neurocytol.*, 18, 671–683.
- Stoll, G., Jander, S. & Myers, R.R. (2002) *Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. J. Peripher. Nerv. Syst.*, 7, 13–27.
- Stoll, G. & Müller, H.W. (1999) *Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. Brain Pathol.*, 9, 313–325.
- Stowers, R.S., Megeath, L.J., Górski-Andrzejak, J., Meinertzhagen, I.A. & Schwarz, T.L. (2002) *Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel Drosophila protein. Neuron*, 36, 1063–1077.
- Sun, C.-H., Chang, Y.-H. & Pan, C.-C. (2011) *Activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway correlates with tumour progression and reduced survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. Histopathology*, 58, 1054–1063.
- Sunderland, S. (1951) *A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. Brain*, 74, 491–516.
- Suske, G., Bruford, E. & Philipson, S. (2005) *Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. Genomics*, 85, 551–556.
- Szpara, M.L., Vranizan, K., Tai, Y.C., Goodman, C.S., Speed, T.P. & Ngai, J. (2007) *Analysis of gene expression during neurite outgrowth and regeneration. BMC neuroscience*, 8, 100.

- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A. & Hirokawa, N. (1998) *Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. Cell, 93, 1147–1158.*
- Tanoue, T., Moriguchi, T. & Nishida, E. (1999) *Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. The Journal of biological chemistry, 274, 19949–19956.*
- Tanoue, T., Yamamoto, T., Maeda, R. & Nishida, E. (2001) *A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. The Journal of biological chemistry, 276, 26629–26639.*
- Teng, F.Y.H. & Tang, B.L. (2006) *Axonal regeneration in adult CNS neurons--signaling molecules and pathways. J. Neurochem., 96, 1501–1508.*
- Theodosiou, A. & Ashworth, A. (2002) *MAP kinase phosphatases. Genome biology, 3, REVIEWS3009.*
- Theodosiou, A., Smith, A., Gillieron, C., Arkinstall, S. & Ashworth, A. (1999) *MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases. Oncogene, 18, 6981–6988.*
- Theodosiou, A.M., Rodrigues, N.R., Nesbit, M.A., Ambrose, H.J., Paterson, H., McLellan-Arnold, E., Boyd, Y., Leversha, M.A., Owen, N., Blake, D.J., Ashworth, A. & Davies, K.E. (1996) *A member of the MAP kinase phosphatase gene family in mouse containing a complex trinucleotide repeat in the coding region. Human molecular genetics, 5, 675–684.*
- Tokai, N., Fujimoto-Nishiyama, A., Toyoshima, Y., Yonemura, S., Tsukita, S., Inoue, J. & Yamamoto, T. (1996) *Kid, a novel kinesin-like DNA binding protein, is localized to chromosomes and the mitotic spindle. The EMBO journal, 15, 457–467.*
- Tokai-Nishizumi, N., Ohsugi, M., Suzuki, E. & Yamamoto, T. (2005) *The chromokinesin Kid is required for maintenance of proper metaphase spindle size. Molecular biology of the cell, 16, 5455–5463.*
- van Itallie, C., Rahner, C. & Anderson, J.M. (2001) *Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. J. Clin. Invest., 107, 1319–1327.*
- van Itallie, Christina M, Fanning, A.S. & Anderson, J.M. (2003) *Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. American journal of physiology. Renal physiology, 285, F1078-84.*
- van Kesteren, Ronald E, Mason, Matthew R J, MacGillavry, H.D., Smit, A.B. & Verhaagen, J. (2011) *A gene network perspective on axonal regeneration. Frontiers in molecular neuroscience, 4, 46.*
- Waller, A. (1850) *Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. Philos. Trans. Roy. Soc. London 1850, 140:423–29*

- Wang, L., Wu, C., Zheng, Y., Qiu, X., Wang, L., Fan, H., Han, W., Lv, B., Wang, Y., Zhu, X., Xu, M., Ding, P., Cheng, S., Zhang, Y., Song, Q. & Ma, D. (2004) *Molecular cloning and characterization of chemokine-like factor super family member 1 (CKLFSF1), a novel human gene with at least 23 alternative splicing isoforms in testis tissue. The international journal of biochemistry & cell biology*, 36, 1492–1501.
- Wang, Y., Li, J., Cui, Y., Li, T., Ng, K.M., Geng, H., Li, H., Shu, X.-s., Li, H., Liu, W., Luo, B., Zhang, Q., Mok, Tony Shu Kam, Zheng, W., Qiu, X., Srivastava, G., Yu, J., Sung, Joseph J Y, Chan, Anthony T C, Ma, D., Tao, Q. & Han, W. (2009) *CMTM3, located at the critical tumor suppressor locus 16q22.1, is silenced by CpG methylation in carcinomas and inhibits tumor cell growth through inducing apoptosis. Cancer research*, 69, 5194–5201.
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X.J., Langel, U., Bedecs, K., Hökfelt, T. & Bartfai, T. (1992) *Galanin-mediated control of pain: enhanced role after nerve injury. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 3334–3337.
- Wong, J. & Oblinger, M.M. (1990) *A comparison of peripheral and central axotomy effects on neurofilament and tubulin gene expression in rat dorsal root ganglion neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 10, 2215–2222.
- Xie, J., Yuan, Y., Liu, Z., Xiao, Y., Zhang, X., Qin, C., Sheng, Z., Xu, T. & Wang, X. (2014) *CMTM3 is frequently reduced in clear cell renal cell carcinoma and exhibits tumor suppressor activities. Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 16, 402–409.
- Yu, Y. & Feng, Y.-M. (2010) *The role of kinesin family proteins in tumorigenesis and progression: potential biomarkers and molecular targets for cancer therapy. Cancer*, 116, 5150–5160.
- Yu, Y., Wang, X.-Y., Sun, L., Wang, Y.-L., Wan, Y.-F., Li, X.-Q. & Feng, Y.-M. (2014) *Inhibition of KIF22 suppresses cancer cell proliferation by delaying mitotic exit through upregulating CDC25C expression. Carcinogenesis*, 35, 1416–1425.
- Zhang, W., Mendoza, M.C., Pei, X., Ilter, D., Mahoney, S.J., Zhang, Y., Ma, D., Blenis, J. & Wang, Y. (2012) *Down-regulation of CMTM8 induces epithelial-to-mesenchymal transition-like changes via c-MET/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling. The Journal of biological chemistry*, 287, 11850–11858.
- Zhong, J., Wang, Y., Qiu, X., Mo, X., Liu, Y., Li, T., Song, Q., Ma, D. & Han, W. (2006) *Characterization and expression profile of CMTM3/CKLFSF3. J. Biochem. Mol. Biol.*, 39, 537–545.
- Zou, H., Ho, C., Wong, K. & Tessier-Lavigne, M. (2009) *Axotomy-induced Smad1 activation promotes axonal growth in adult sensory neurons. J. Neurosci.*, 29, 7116–7123.

Abkürzungsverzeichnis

Ankrd1	Ankyrin repeat domain1
Arg1	Arginase 1
AridA5	AT rich interactive domain 5A Mrf1 like
Atf3	aktivierender Transkriptionsfaktor 3
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	bone morphogenetic protein
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cap/BASP1	brain abundant, membrane attached signal protein 1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	kodierende Sequenz
CGRP	calcitonin gene related peptide
c-JUN	Jun-Onkogen
CKLF	chemokine-like factor
Cldn4	Claudin4
Cmtm3	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3
CREB	cAMP response element binding protein
CREM	cAMP responsive element modulator
crush	Quetschläsion
d	Tag(e)
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
dbcAMP	zyklisches Dibutyryl-Adenosinmonophosphat
DF3	Dharmafect 3
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DRG	dorsales Hinterwurzelganglion
DS	Eselserum
DTT	Dithiothreitol
Dusp6	dual specific phosphatase

EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erb B2	human epidermal growth factor receptor 2
Erk	extracellular signal-regulated kinases
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
F11	Fusionszelllinie (DRG-Neurone und N18TG2)
FBS	fötales Kälberserum
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
Gap43	Wachstums-assoziiertes Protein 43
Gapdh	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde(n)
HAT	Hypoxanthin/Aninopterin/Thymidin
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
IB4	Isolektin B4
ICC	Immunzytochemie
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
JNK	c-Jun amino-terminal kinases
Kid	kinesin-like DNA-binding protein
Kif22	kinesin family member 22
Klf6	krüppel-like-factor 6
Ktrl	Kontrolle
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAP	mitogen-activated protein
MKP	MAP-Kinase-Phosphatasen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NF200	Neurofilament (200 kDa große Untereinheit)
Nfil3	nuclear factor, Interleukin 3 regulated
NGF	Nervenwachstumsfaktor

ODC	Ornithin-Decarboxylase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC12	Phäochromozytom-Zellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PNS	Peripheres Nervensystem
PTEN	phosphatase and tension homolog
RAG	Regenerations-assoziierte Gene
Reanast.	Reanastomose / Koaptation
RGC	Retinalganglienzellen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
siRNA	RNS-Interferenz
Smad1	SMAD family number1
Sox11	SRY-box containing gene 11
Sprr1	small proline-rich repeat protein 1A
Stmn2	Stathmin2
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TM4SF	4-Transmembran-Superfamilie
trans	Transsektion
U	Units
u.a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

—

Katharina Schaepe

Düsseldorf, im Februar 2015

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht breite Hilfe und Unterstützung gehabt hätte. Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Hans Werner Müller aussprechen für die umfassende Betreuung und Unterstützung, ohne die dieses spannende Projekt und die daraus resultierende Dissertation nicht zustande gekommen wären.

Auch Herrn Univ.-Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich herzlich für die fakultätsübergreifende Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Frank Bosse möchte ich ganz herzlich für seine unermüdliche Betreuung, die vielen anregenden Gespräche, die umfassende Unterstützung und die hilfreichen Diskussionen danken.

Frau Dipl. Biol. Marcia Gasis gilt mein besonderer Dank für Ihr persönliches Engagement und die unermüdliche Unterstützung in allen Phasen meiner Promotion. Ohne meine Färbe-, Western- und Zellkultur-Queen hätte ich oft nicht weiter gewusst.

Die praktische Durchführung meiner Arbeit wäre ohne das stets persönliche Engagement meiner Arbeitskollegen nicht immer möglich gewesen. Dafür und für das stets unkomplizierte, freundschaftliche Klima möchte ich mich bei allen Kollegen und Mitarbeitern des Neurochemischen Labors bedanken. Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Jessica Schira, Marion Hendricks, Brigida Ziegler, Nadine Hamacher, Dr. André Heinen und Agnes Reineke.

Unendlich danke ich meinen Eltern, meinem Bruder, meinen Freunden und meinem Mann für die moralische Unterstützung und die vielen Aufmunterungen in schwierigen Phasen meiner Promotion.

Zuletzt danke ich der Jürgen Manchot Stiftung für mein dreijähriges Promotionsstipendium, ohne das es diese Dissertation nicht geben würde.