

Aus dem Institut für Anatomie II  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Charlotte von Gall

**Quantifizierung von STAT 1 und STAT 2 in murinen  
Gehirnarealen unterschiedlicher Altersstufen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stefanie Wernze

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. em. Mai

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hugger

In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern und meinem Mann gewidmet

## Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich der Expression der Transkriptionsfaktoren STAT 1 und STAT 2 in verschiedenen Gehirnarealen Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Mesencephalon und Thalamus der Maus. STATs spielen eine große Rolle bei der Regulierung der Genexpression anderer Gene. Speziell in der vorliegenden Dissertation wurde die Hypothese aufgestellt, dass STAT 1 und/oder STAT 2 als Transkriptionsfaktor für die Fucosyltransferasen IV und IX fungieren könnten.

Dazu wurden die murinen Gehirnabschnitte extrahiert und die Expressionsrate von STAT 1 und STAT 2 mit Hilfe der quantitativen PCR analysiert.

Dabei stellte sich heraus, dass das Expressionslevel von STAT 1 im Vergleich zu STAT 2 in allen Alterstufen des murinen Gehirns im Durchschnitt doppelt so hoch war. Eine besonders auffällige Expressionsrate von STAT 1 fand sich in den Gehirnabschnitten Thalamus, Cortex und Hippocampus wieder.

Die abweichende Expression von STAT 1 im Hippocampus könnte Einfluss auf die postnatale Neurogenese haben. In der adulten Neurogenese findet u.a. im Hippocampus eine Neubildung von Nerven- und Körnerzellen statt.

Die erhöhte Expression von STAT 1 könnte mit den unterschiedlichen Funktionen des Proteins zusammenhängen. Es könnte sein, dass STAT 1 eher als STAT 2 als Transkriptionsfaktor fungiert und ebenfalls das Zellwachstum und die Immunabwehr reguliert.

Um weiterführende Zusammenhänge zwischen der Expressionsrate von STAT 1 im Hippocampus und der adulten Neurogenese herzustellen und letztlich auch zur Klärung der Frage, ob STAT 1 eine Rolle bei Gedächtnis- und Lernprozessen einnimmt, sollten weitere Projekte durchgeführt werden.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Bdnf	brain derived neurotrophic factor
BMFZ	Biologisch Medizinisches Forschungszentrum
Bo	Bulbus olfactorius
BRCA	Breast cancer gene
BrdU	Bromodeoxyuridin
CA 1 und 3	kapilläre neuronale Verschaltungen im Hippocampus
CAN	Synonym für das Nup214-Protein
Cb	Cerebellum
CCD	Coiled-coil Domäne
CD15	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
Chip-Assay	Chromatin-Immunopräzipitation
Ct-Wert	cycle threshold
Cx	Cortex
DBB	„UV damage specific DNA binding protein“
DBD	DNA-bindende Domäne
DCX	Doublecortin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dUMP	Desoxyuracilmonophosphat
ELAM-1	endothel Leukozytenadhäsionsmolekül-1
ELEFT	ELAM-1-Ligand Fucosyltransferase
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
FucT IV	Fucosyltransferase IV
FUT	Fucosyltransferase
Gal-GlcNAc	Galactose-N-Acetyl-Glucosamin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	Interferon-Gamma Activated Sequenz
GDP	Guanosindiphosphat
GD	Gyrus dentatus
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin

GR	Growth Receptor
Hc	Hippocampus
HHU	Heinrich-Heine-Universität
hPIV	humanes Parainfluenza Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
IGF-1	insulin like growth factor
IL	Interleukin
INF	Interferon
ISGF 3	Interferon Stimulated Gene Faktor 3
ISRE	Interferon-Stimulated Response Elements
JAK	Janus Kinase
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
MCM	Minichromosome Maintenance
Mes	Mesencephalon
mRNA	messenger RNA
NCAM	neural cell adhesion molecule
NeuN	Marker für reife Neurone
NF-kB	Nuklear Faktor kB
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
NPC	Nuclear Pore Complex
NTD	N-terminale Domäne
p53	Tumormarker
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PSA-NCAM	polysialylated-neural cell adhesion molecule
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
S100	Astrozytenmarker
SeV	Respirovirus Sendai
SH2	Src Homology 2
SOC-3	Suppressor of cytokine signaling 3
SP1	Transkriptionsfaktor in D. melanogaster
Src	Rous sarcoma Kinase

SSEA1	Stufe- spezifische embryonales Antigen 1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transkription
SV	Simian-Virus
Sub	Subiculum
TAD	Transaktivierende Domäne
Th	Thalamus
UNG	Uracil-N-Glykosidase
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZNS	zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>II</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Familie der STAT- Proteine	1
1.1.1 Aufbau	1
1.1.2 Funktion	2
1.1.3 Domänen und Strukturen der STAT- Proteine	5
1.2 Das JAK/STAT- Signalsystem	7
1.3 Die Auswirkung infektiöser Pathogene auf STATs	8
1.4 Adulte Neurogenese	10
1.4.1 Neuronale Verschaltung im Hippocampus	11
1.4.2 Neu generierte Körnerzellen im hippocampalen Netzwerk	12
1.5 Alpha- 1,3/4 – Fucosyltransferasen	13
1.5.1 Fucosyltransferase IV	14
1.5.2 Fucosyltransferase IX	15
<b>2 Ziel und Hypothese der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1 Materialien	17
3.1.1 Tiere	17
3.1.2 Kits	17
3.1.3 Primer	17
3.1.4 Chemikalien	18
3.1.5 Puffer und Lösungen	18
3.1.6 Sonstige Reagentien	19
3.1.7 Labor- und Verbrauchsmaterialien	19
3.1.8 Laborgeräte	20
3.2 Methoden	22
3.2.1 Präparation von Versuchstieren	22



3.2.2	RNA – Extraktion aus murinem Gewebe	23
3.2.3	Konzentrationsbestimmung der RNA	24
3.2.4	Reverse Transkription der RNA	25
3.2.5	Quantitative PCR (qPCR)	27
3.2.6	Primer	31
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
4.1	Die Genexpression von STAT 1 und STAT 2	32
4.2	Die Quantität der Genexpression in den unterschiedlichen murinen Gehirnarealen	32
4.3	Der Vergleich von STAT 1 während der Altersentwicklung	37
4.4	Der Vergleich von STAT 2 während der Altersentwicklung	38
4.5	Direkter Vergleich von STAT 1 und STAT 2	40
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>41</b>
5.1	Der Vergleich von STAT 1 und STAT 2	41
5.2	STAT 1 und STAT 2 im Cortex	42
5.3	STAT 1 und STAT 2 im Thalamus	43
5.4	STAT 1 und STAT 2 im Hippocampus	44
5.5	STAT 1 und STAT 2 im Bulbus olfactorius und im Mesencephalon	46
5.6	Schlussfolgerung	46
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>63</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Familie der STAT – Proteine

### 1.1.1 Aufbau

STAT – Proteine (Signal Transducer and Activator of Transcription) sind Transkriptionsfaktoren. Sie treten meist in einem Stadium der Mehrzelligkeit in eukaryontischen Zellen auf. Sie sind vor allem in Schleimpilzen, Nematoden, Insekten und Vertebraten zu finden, nicht aber in Pflanzen und Pilzen (Begitt 2004, Levy and Darnell 2002, Lodige 2006, Meyer and Vinkemeier 2004, Reich 2007, Reich and Liu 2006, Wenta 2008).

Die STAT – Familie besteht aus insgesamt sieben Proteinen: STAT 1, STAT 2, STAT 3, STAT 4, STAT 5A, STAT 5B, STAT 6. Die ersten beiden STAT - Proteine wurden im Interferonsystem identifiziert (Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE, Kuriyan J 1998).

Beim Menschen sind die Gene als Gencluster für STAT 1 und STAT 4 auf dem Chromosom 2 lokalisiert, für STAT 2 und STAT 6 auf dem Chromosom 12 und für STAT 3, STAT 5A und STAT 5B auf dem Chromosom 17 (Copeland, Gilbert et al. 1995, Wenta 2008).

Alle sieben STAT – Proteine weisen die gleiche Grundstruktur auf. Sie bestehen aus 750 – 850 Aminosäuren und verfügen über sechs Domänen: eine N – terminale Domäne, eine Vier- Helix – Bündeldomäne, eine DNA – Bindedomäne, eine Linker Domäne, eine Src- Homologie- 2 – Domäne und eine carboxyterminale Transaktivierungsdomäne (Levy and Darnell 2002, Reich and Liu 2006).

## 1.1.2 Funktion

STAT- Proteine funktionieren als Transkriptionsfaktoren und sind im Zytoplasma lokalisiert. Je nach Protein verändern sich die nukleären Anteile der STATs. Die Signaltransduktion wird durch Zytokin-, Wachstumsfaktor- und Hormonrezeptoren in Gang gesetzt. Ferner wird über JAK Kinasen oder intrinsische Rezeptoren die Tyrosinkinaseaktivität ein oder mehrerer STATs aktiviert.

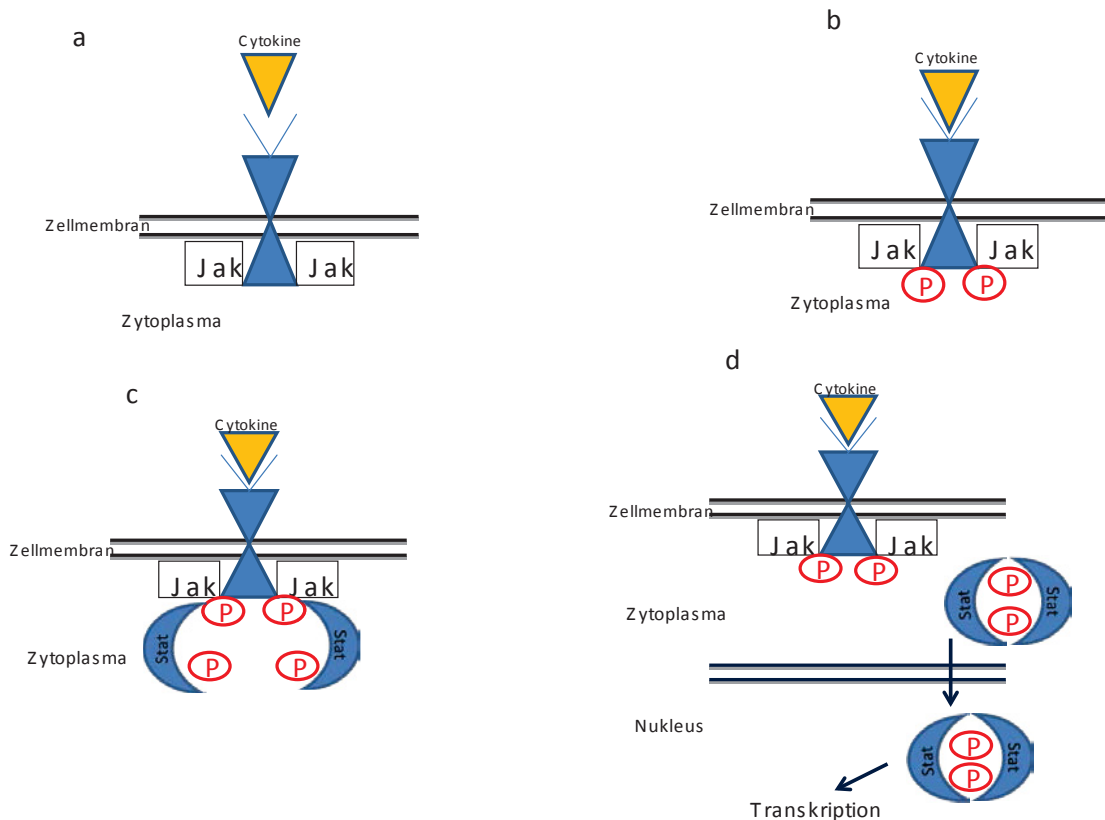
Durch die Induktion kommt es zum raschen Transport der STAT- Proteine ins Innere des Zellkerns (Köster and Hauser 1999, Pranada, Metz et al. 2004, Köster, Frahm et al. 2005). Hierbei sind zwei Gesichtspunkte von besonderer Bedeutung: Zum einen sind regulierte Transportmechanismen notwendig, zum anderen Sequenzmotive, die die STATs zum schnellen Import steuern (Melen, Kinnunen et al. 2001, Fagerlund, Melen et al. 2002).

STAT 1 Homodimere sind am Interferon II-Signalweg beteiligt. Dabei binden sie an die Interferon-Gamma Activated Sequence (GAS) im Promotor und induzieren die Expression von Interferon stimulierten Genen. Kommt ein extrazelluläres Signal, zum Beispiel vom Interferonsystem, an und aktiviert membranständige Proteine, wird eine Signalkaskade aktiviert. Die Signalkaskaden zur Aktivierung der STATs werden durch extrazelluläre Zytokine (s.u.) ausgelöst. Die Bindung der Zytokine aktiviert die intrazellulär liegende Janus Kinase, die die STATs an spezifischen Tyrosinresten phosphoryliert. Das dadurch aktivierte Dimer wird dann aktiv in den Nukleus transportiert und bindet dort an die oben beschriebenen spezifischen Sequenzen am Promotor ihrer Zielgene. Nukleäre Phosphatasen dephosphorylieren die STAT- Dimere wieder, was eine Deaktivierung der Proteine zur Folge hat. Die deaktivierten Proteine werden aus dem Nukleus heraus transportiert und im Zytoplasma gespeichert (Vinkemeier et al. 1998, s. Abb. 1).

STAT 1-STAT 2 Heterodimere aktivieren Gene im Interferon I-Signalweg. Sie binden an Interferon Response Factor 9 (IRF9) und formen den Interferon

Stimulated Gene Factor 3 (ISGF3). Dieser Komplex bindet dann an Interferon-Stimulated Response Elements (ISRE) im Promotor und startet die Expression der spezifischen Interferon I stimulierten Gene (Vinkemeier et al. 1998).

Durch diese Signalwege ist STAT 1 eher als STAT 2 mit an der Regulation der Immunabwehr beteiligt.



**Abb. 1:** Veranschaulichung der Aktivierung von STAT- Proteinen, die ins Innere des Nucleus transportiert werden und dort als Transkriptionsfaktoren fungieren

Die Proteine STAT 1, STAT 3, STAT 4, STAT 5A, STAT 5B und STAT 6 bilden Homodimere, während STAT 1 mit STAT 2 oder STAT 3 und STAT 5A mit STAT 5B auch Heterodimere bilden können. Kommt es zum Verlust oder zu Fehlregulation der STAT-Aktivitäten, hat dies schwerwiegende Folgen für den Organismus. Dieser reagiert darauf mit Störungen von entwicklungsphysiologischen Prozessen und mit Defekten in der Immunantwort. Tabelle 1 gibt jeweils eine Zusammenfassung der biologischen Bedeutung der STAT-Signalübertragung.

STAT-Protein	Biologische Bedeutung
STAT 1	Regulation der Zellentwicklung und der Wachstumskontrolle, Apoptose, Inhibierung des Zellwachstums, Immunantwort auf virale und bakterielle Infektionen
STAT 2	Inhibierung des Zellwachstums, Immunantwort auf virale und bakterielle Infektionen
STAT 3	Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Überleben, Apoptose, Regulation der Wachstumskontrolle, Zelluläre Transformation
STAT 4	Entwicklung von T-Zellen, Entwicklung und Aktivierung von natürlichen Killerzellen
STAT 5A und 5B	Regulation der Wachstumskontrolle, Hämatopoese, Anämie, T-Zellproliferation, Zelldifferenzierung der Erythrozyten
STAT 6	Proliferation von B- und T-Zellen

**Tabelle 1: Die biologische Bedeutung der STAT-Proteine.** (Begitt 2004, Krämer and Heinzl 2010, Levy et al. 2002, Lodige 2006, Reich et al. 2006, Schindler et al. 2007, Wenta 2008)

Aus Tabelle 1 geht hervor, dass die STAT-Proteine eine bedeutende Rolle in der Immunabwehr einnehmen. Kommt es zu einer viralen Infektion, so löst dies eine Kette an Reaktionen aus. Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel die Lymphozyten, werden aktiviert und lösen so die Produktion und Sekretion von Zytokinen aus. Als Zytokine werden Proteine bezeichnet, die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen regulieren. Bereits geringe Mengen reichen aus, um wirksam zu sein. Die sich auf den B-Zellen befindlichen Klasse 1 Zytokinrezeptoren aktivieren die STAT 6- Signaltransduktion, indem Zytokin das Interleukin 4 (IL-4) an Klasse 1 Zytokinrezeptoren bindet. Durch diese Aktivierung bedingt, wechseln die synthetisierten Immunglobuline ihre Klasse. Virusinfizierte Zellen produzieren und sezernieren zunächst Typ1 Interferone, welche an die Klasse II Zytokinrezeptoren von umliegenden, nicht infizierten

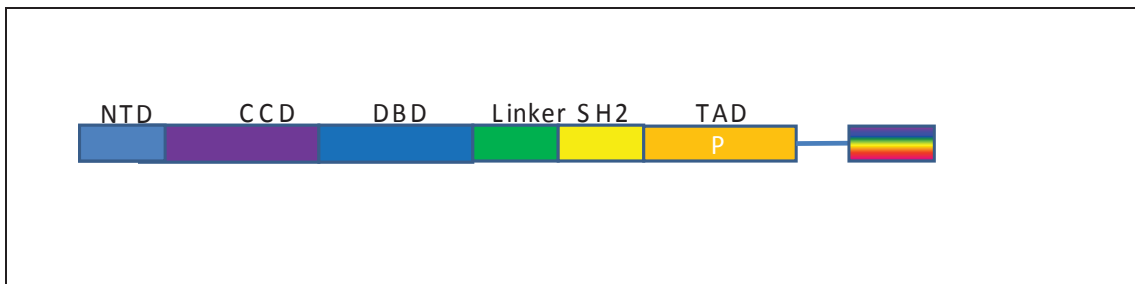
Zellen binden. Dies hat eine Resistenz gegen erneute Viruserkrankungen zur Folge, wobei in diesem Fall die Übertragung des Signals durch STAT 1-STAT 2-Heterodimere erfolgt.

STAT-Proteine werden auf vielfältige Weise von Zytokinen aktiviert, unter anderem auch durch Wachstumsfaktoren, die die Zellen zum Beispiel durch den Zellzyklus lenken. Die oben aufgeführten Beispiele gewähren einen Einblick in die Bedeutung der STAT-Signalübertragung und die Komplexität der STAT-Proteine (s. Tabelle 1). (Begitt 2004, Krämer and Heinzl 2010 , Levy et al. 2002, Lodige 2006, Reich et al. 2006, Schindler et al. 2007, Wenta 2008).

### **1.1.3 Domänen und Strukturen der STAT- Proteine**

Eine Gemeinsamkeit aller sieben STAT-Proteine beruht auf der Ausbildung einer sehr ähnlichen Domänenstruktur. Sie sind aufgebaut aus 750 – 850 Aminosäuren, haben eine N-terminale Domäne (NTD), eine Coiled-coil Domäne (CCD), bestehend aus vier Helices, eine DNA-bindenden Domäne (DBD), eine Linker Domäne, eine SH2- und eine Transaktivierende Domäne (TAD).

Die 3D-Strukturen der dimeren Proteine sind bekannt durch kristallographische Analysen von phosphoryliertem STAT 1 und drei Homodimeren, gebunden an DNA (Becker et al. 1998, Chen, Vinkemeier et al. 1998) sowie Dictyostelium in Abwesenheit von DNA (Soler-Lopez, Petosa et al. 2004).



**Abb.2: Vereinfachte Darstellung der Domänenstruktur der Familie der STAT-Proteine**

Die Aminosäuresequenz bildet von 5'-Aminoterminalen Teil aufeinander folgend folgende funktionelle Domänen aus: N-terminale Domäne, Coiled-coil-Domäne, DNA-Bindende Domäne, Linker, SH2-Domäne und Transaktivierende Domäne, die den bei der Aktivierung zur Phosphorylierung (P) notwendigen Tyrosinrest beinhaltet.

Somit sind die Kriterien der Abfolge der Helices in der Coiled-coil Domäne, die Wechselwirkung mit der DNA und die Dimerisierung der STATs über die SH2-Domänen festgelegt. Nicht enthalten in dieser Strukturinformation sind die N-terminalen Domänen sowie die transaktivierende Domäne. Da eine Strukturauflösung einschließlich der N-terminalen Domäne erzielt werden konnte, kam es zur Erweiterung der funktionellen Aspekte der Domänen durch neueste Strukturdaten von unphosphoryliertem STAT 1 (Mao, Ren et al. 2005).

Hier wurde deutlich, dass eine Wechselwirkung der N-terminalen Domäne mehrerer STAT-Moleküle untereinander stattfand. Diese Erkenntnis ging schon aus der Strukturanalyse der isolierten N-terminalen Domäne von STAT 4 hervor (Vinkemeier, Moarefi et al. 1998, Chen, Bhandari et al. 2003, Byrd, Bolken et al. 2002).

Die Tatsache, dass die Coiled-Coil Domäne mit der DNA- bindenden Domäne eines anderen STAT 1-Moleküls in Wechselwirkung treten kann, führt zur These, dass die unphosphorylierten STAT 1-Moleküle sowohl als präassoziierte Dimere als auch als Tetramere vorliegen können.

Die Translokation in den Kern und die DNA-Bindung, die durch die Dimerisierung zustande kommt, ist hingegen abhängig von der spezifischen Tyrosin-Phosphorylierung (Milocco, Haslam et al. 1999).

Weiterhin sind der N-terminalen Domäne (NTD) und der CCD unterschiedliche Funktionen zuzuschreiben. So übernimmt die NTD die Negativregulation der Signaltransduktion (PIAS, Phosphatase) und die CCD scheint verantwortlich für die Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren (NMI, IRF9, c-Jun, StIP1) zu sein.

Die DBD setzt sich aus mehreren beta-Faltblättern zusammen und bilden eine ähnliche Struktur wie die DBDn von NF-kB und p53. Die Wechselwirkung mit der DNA erfolgt sowohl in der großen als auch in der kleinen Furche der DNA-Helix. Die hier lokalisierten Phosphorylierungsstellen werden durch die Linker Domäne mit der DBD und der SH2 Domäne verbunden. Durch Mutationen in der Linker Domäne werden die Fähigkeiten zur Transaktivierung teilweise verhindert. Am gegensätzlichsten unter den STATs ist die Transaktivierende Domäne (TAD), die die Regulation der Promotoren am meisten beeinflusst. Interaktionen mit einigen anderen Transkriptionsaktivatoren (SP1, MCM3 und 5, BRCA, CBP/p300, GR) sind diskutiert worden (Park, Li et al. 2000).

Vergleicht man die TADs von murinen und humanen STAT 2, so findet sich hier eine Besonderheit, die darin besteht, dass die murine Sequenz eine 16 Nukleotid lange Mini-Satelliten Insertion aufweist (Park, Li et al. 2000).

## **1.2 Das JAK/STAT- Signalsystem**

Der JAK/STAT-Signalweg bietet für eukaryontische Zellen die Möglichkeit, extrazelluläre Signale von der Zellmembran intrazellulär weiterzuleiten, um einen signalspezifischen Effekt auszulösen. In der Außenmembran befinden sich Rezeptoren, die das Signal ins Zellinnere weiterleiten. Im Zytoplasma befinden sich Transkriptionsfaktoren und intrazelluläre Signalmoleküle. Beide führen zum Effekt des veränderten Genexpressionsmusters.

Hauptaktivator des JAK/STAT- Signalweges ist der Zytokinrezeptor (Gadina, Hilton et al. 2001). JAKs binden an den intrazellulären Rezeptoren und katalysieren die Tyrosinphosphorylierung. Die Tyrosinkinase der JAK-Familie



werden durch Phosphorylierung aktiviert (Bach, Tanner et al. 1996). Die nun aktivierten JAKs bewirken im intrazellulären Teil der Rezeptoren eine Transphosphorylierung der Tyrosinreste, welche nun wiederum die Rekrutierung von STAT-Proteinen sowie von anderen Signalmolekülen ermöglichen (Darnell 1997). Hierbei ist zu erwähnen, dass die Auswahl der STATs nicht zwingend durch JAKs katalysiert wird, sondern vielmehr durch die selektive Wirkung der Aminosäureumgebung zu Stande kommt. Nicht nur der spezifische Tyrosinrest, sondern auch der Serinrest ist in der Lage, STAT-Proteine zu phosphorylieren. Beispielsweise erfolgt die Phosphorylierung beim STAT 1 rezeptorunabhängig am Serin 727 (Uddin, Sassano et al. 2002), wodurch es zur Verstärkung durch die Aktivität der transaktivierenden Domäne kommt (Pilz, Ramsauer et al. 2003).

### **1.3 Die Auswirkung infektiöser Pathogene auf STATs**

Besondere Bedeutung im Abwehrmechanismus ist der Typ I IFN Signaltransduktion zuzuschreiben. Insbesondere Viren haben Strategien entwickelt, der Typ 1 IFN Signaltransduktion als Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen entgegenzuwirken. Ziel ist hierbei die Blockierung der Interferonwirkung mit dem Ergebnis viraler Replikationen in zellulärer Umgebung (Katze, He et al. 2002).

Bekannt ist, dass einige Erreger die IFN – vermittelte Signaltransduktion verhindern, indem sie STAT 1 und STAT 2 Proteine reduzieren. Hierbei handelt es sich um humanpathogene Erreger aus der Familie der Paramyxoviridae, aber auch der Rubulaviren und Respiraviren. Dies lässt sich am besten im Simian Virus (SV) 5 und 41, humanen Parainfluenza Virus (hPIV) 2, Herpes Simplex Virus (HSV) 1, Nipah Virus und im Mumps Virus, den Rubulaviren zugehörig, nachweisen (Poole, He et al. 2002, Yokota, Narazaki et al. 2001, Chee and Roizman 2004, Rodriguez, Cruz et al. 2004, Nishio, Garcin et al. 2002). Ferner sind diese Effekte von zwei wichtigen Faktoren abhängig. Zum einen von den viralen V-Proteinen (Parisien, Lau et al. 2001) und zum anderen von spezifischen zellulären Komponenten, wie zum Beispiel die „UV damage

specific DNA binding proteins“ DBB 1 und 2. Letzteres vermittelt die Zersetzung von STAT 1 und STAT 2 in SV5-infizierten Zellen (Andrejeva, Young et al. 2002).

Besonders hervorzuheben ist der Aspekt der Wirkung des V-Proteins des Nipah Virus (Rodriguez, Cruz et al. 2004). Durch die Ausbildung des V-Proteins wird die Lokalisierung von STAT 1 und STAT 2 sowohl grundlegend als auch im IFN - induzierten Status beeinflusst. Ähnliche Vorgänge findet man auch in Zellen, die mit chronischer Hepatitis C infiziert sind (Melen, Fagerlund et al. 2004). In der chronischen Hepatitis wird der nukleäre Import von STAT 1 und STAT 2 durch die Induktion von Supressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) stark beeinflusst, denn die besagte SOCS-3 Induktion verhindert die Aktivierung von STAT 1 (Bode and Dong 2003).

Forschungen an Zellen, die mit dem Respirivirus Sendai (SeV) infiziert waren, ergaben eine unterschiedliche Beeinflussung der IFN – Signaltransduktion durch verschiedene Varianten des C-Proteins (Gotoh, Komatsu et al. 2003). Alle Vorgänge laufen in Abhängigkeit von STAT 1 ab und verändern in unterschiedlichen Stadien der Infektion die basale Expression, den Phosphorylierungsstatus von Tyrosin und Serin (Komatsu, Takeuchi et al. 2000, Garcin, Marq et al. 2004), die Dimerisierung (Gotoh, Takeuchi et al. 2003) und die Dephosphorylierung von STAT 1 und STAT 2 (Saito, Ogino et al. 2002).

Je nach verwendeten Zellen und deren jeweiligem Stadium stellen sich die Auswirkungen der verschiedenen Zellen dar. Zwei wichtige Erkenntnisse verlangen hier ein besonderes Augenmerk: (1) Die Unterbindung der IFN Typ I Signaltransduktion als Folge der Verhinderung der Heterodimerisierung von STAT 1 und STAT 2 durch die Anreicherung von Y701-phosphorylierten monomeren STAT 1. (2) Ein Mechanismus, um die antivirale Konstitution der Zelle zu umgehen, ist dem unphosphorylierten STAT 1 zuzuschreiben, mit dem Effekt, dass das Basislevel der STAT 1- Expression zu verringert wird. In diesem Fall ist dem nicht modifizierten STAT 1 eine Aufgabe in der Induktion von antiviralen Genen zuzuschreiben. Ebenfalls Einfluss auf die IFN-vermittelte Signaltransduktion nehmen bakterielle Erreger, indem sie dem Prozess

entgegenwirken (Ottenhoff, Verreck et al. 2002), wie zum Beispiel die Pathogenität des Tuberkelbakteriums *Mycobacterium tuberculosis*, welche in Folge von IFN $\alpha$  –Behandlung die STAT 1 Dimerisierung inhibiert (Prabhakar, Qiao et al. 2003).

Da die STATs als mögliche Transkriptionsfaktoren für die Fucosyltransferasen IV und IX in Frage kommen, spielen sie indirekt bei der Synthese von Cluster of differentiation (CD15) eine Rolle. CD15 wird schon ab der Neuralplattenbildung im Mausembryo nachgewiesen. (Ashwell and Mai 1997a, 1997b, 1997c, 1997d).

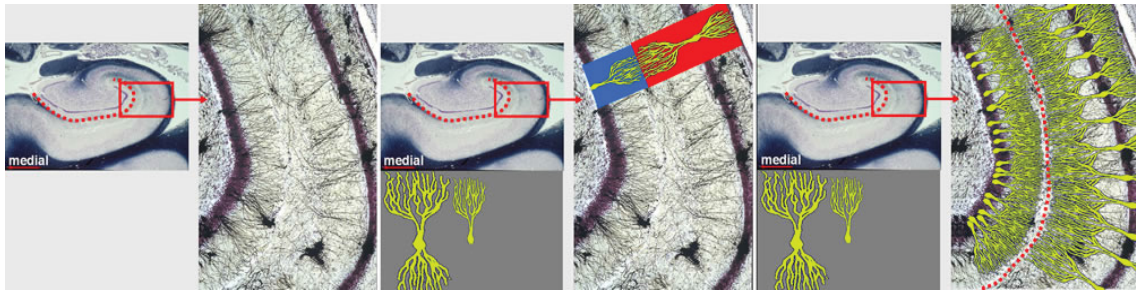
Daher sind alle Faktoren, STAT 1 und STAT 2, die alpha 1,3 Fucosyltransferase IV und IX und CD15 bei der normalen Gehirnentwicklung der Maus beteiligt.

## **1.4 Adulte Neurogenese**

Lange Zeit war in den Neurowissenschaften verbreitet, dass die Bildung aller Neurone des zentralen Nervensystems ein Prozess ist, der während der embryonalen und früheren postnatalen Entwicklung abläuft. Ming und Song beschrieben jedoch in ihren Studien, dass im Gehirn zwei Regionen existieren, der B. olfactorius und der Hippocampus, in denen auch bei erwachsenen Säugetieren ständig neue Nervenzellen gebildet werden (Ming and Song 2005).

Schon in vergangener Zeit konnte bei einer Reihe Patienten festgestellt werden, dass eine Läsion des Hippocampus und des angrenzenden Raums zu massiven Gedächtnisverlusten führen kann (Scoville and Milner 1957).

Wie das Gedächtnis gebildet wird und der Hippocampus es schafft, verschiedene Aspekte von Gedächtnisinhalten räumlich und zeitlich einzuordnen und miteinander zu verknüpfen, soll im Folgenden erläutert werden:

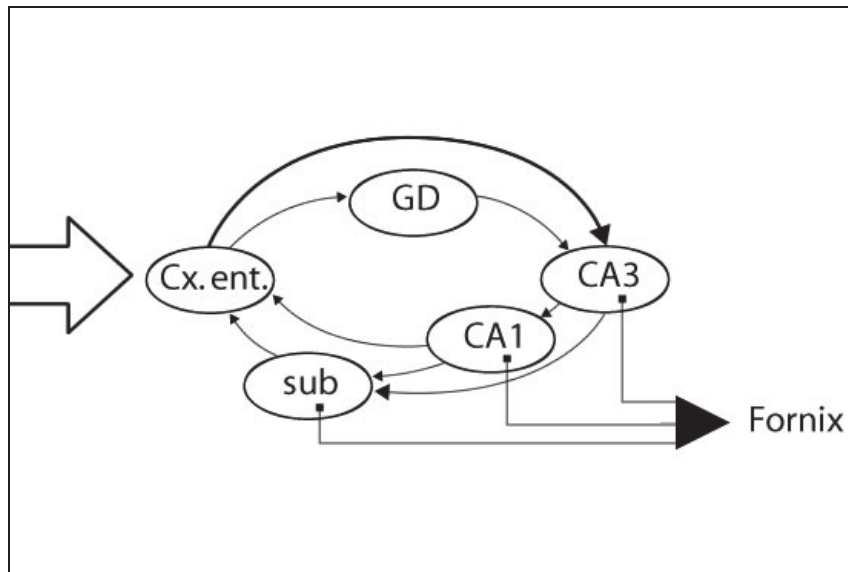


**Abb. 3:** Frontalschnitt durch den Hippocampus

(Quelle: Curriculum Funktionelle Anatomie, F. Samandari, J.K. Mai)

### 1.4.1 Neuronale Verschaltungen im Hippocampus

Abbildung 3 stellt einen Frontalschnitt durch den Hippocampus im Gehirn einer Maus dar. Im Hippocampus sind die verschiedenen Subregionen Gyrus dentatus, CA3 und CA1 lokalisiert. Oberflächliche Schichten des entorhinalen Cortex projizieren zu den Körnerzellen des Gyrus dentatus. Der entorhinale Cortex steht mit allen wichtigen neokortikalen Assoziationsarealen in Verbindung. Die Körnerzellen projizieren mit ihren Axonen, den sogenannten Moosfasern, zu den proximalen Dendriten der CA3-Pyramidenzellen. Diese Zellen projizieren nach CA1 und die CA1-Pyramidenzellen über das Subiculum wieder zurück zu den tiefen Schichten des entorhinalen Cortex. Dies wird auch als trisynaptischer Schaltkreis bezeichnet. Die entorhinalen Pyramidenzellen projizieren aber auch über den Tractus perforans direkt auf die distalen Dendriten der CA3- und CA1-Pyramidenzellen, so dass ein paralleler Informationsfluss über mehrere axonale Bahnen stattfinden kann. Eine wichtige Eigenschaft der synaptischen Verbindungen im Hippocampus ist die enorme funktionelle Plastizität. Aktivitäten können die Stärke der synaptischen Verbindungen beeinflussen. Sie können entweder vergrößert oder verkleinert werden. Die synaptische Plastizität wird als Langzeitpotenzierung (LTP) oder als Langzeitdepression (LTD) bezeichnet. Befunde unterstützen die These, dass die synaptische Plastizität im Hippocampus eine entscheidende Rolle in der Gedächtnisbildung einnimmt (Nakazawa, McHugh et al. 2004).



**Abb. 3a:** Verschaltung im Hippocampus

(Quelle: Curriculum Funktionelle Anatomie, F. Samandari, J.K. Mai )

### 1.4.2 Neu generierte Körnerzellen im hippocampalen Netzwerk

Ein wichtiger Teil des Hippocampus besteht aus dem autoassoziativen Netzwerk der CA3-Pyramidenzellen (Rolls and Treves 1994, Nakazawa, McHugh et al. 2004). Sie erhalten zum einen direkte synaptische Eingänge aus dem entorhinalen Cortex als auch neuronale Signale über die Moosfasern aus dem Gyrus dentatus (Abbildung 3a). Die präsynaptischen Moosfasern haben bemerkenswerte Eigenschaften, die unter anderem dazu führen, dass ihre Aktivierung relativ große EPSPs in den CA3- Pyramidenzellen erzeugt (Bischofberger, Engel et al. 2006).

Durch *in vivo*- Ableitungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität einer einzelnen Körnerzelle ausreichen kann, um in CA3-Pyramidenzellen Aktionspotentiale auszulösen. In der Zeit von zwei bis vier Wochen nach Zellteilung können bei neu generierten Körnerzellen lange axonale Projektionen, bis weit in die CA3-Region hinein, nachgewiesen werden (Zhao, Teng et al. 2006, Hastings and Gould 1999).

Für die anhaltende Neubildung von Körnerzellen im Gyrus dentatus könnte nach Auffassung von Kempermann die Ausdehnung der Körnerzellschicht bedeutsam sein, denn die Größe dieser Zellschicht spielt eine entscheidende Rolle, um die Größe des neuronalen Netzwerkes und damit die Speicherkapazität an die Bedürfnisse des Organismus dynamisch anzupassen (Kempermann 2006).

Möglich ist aber auch, dass nicht die wachsende Zahl von Körnerzellen entscheidend ist, sondern dass ständig eine Population neuer Neurone mit physiologisch distinkten Eigenschaften vorhanden ist (Aimone, Wiles et al. 2006). Die leichte Erregbarkeit der neuen Nervenzellen könnte großen Einfluss auf das Aktivitätsmuster in den CA3- Pyramidenzellen haben.

Allerdings ist es schwierig, diese beiden Auffassungen experimentell zu untermauern, da bisher weder selektiv die Zahl der neu gebildeten Körnerzellen beeinflusst werden kann, noch Körnerzell-spezifische Verhaltenstests verfügbar sind.

Welche Aufgabe den Körnerzellen innerhalb des hippocampalen Netzwerkes zugeschrieben werden und in welchen Zusammenhang sie mit STAT 1 und STAT 2 gebracht werden können, wird im Rahmen der in dieser Arbeit geführten Diskussion noch näher erläutert.

## **1.5 Alpha- 1,3 / 4 – Fucosyltransferasen**

Fucosyltransferasen sind sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten zu finden. Sie katalysieren die Übertragung von Guanidin-diphosphat Fucose auf verschiedene Akzeptormoleküle wie Oligosaccharide, Glykokonjugate, Glykoproteine und Glykolipide (Nakayama, Nishihara et al. 2001). Durch alpha-1,3/4-Fucosyltransferasen wird der Transfer von Fucose von dem Nucleotid-Zucker GDP-Fucose auf ein Akzeptorsubstrat katalysiert. So entstehen alpha-3- oder eine alpha-4-Bindungen zu GlcNAc und Gal-GlcNAc-Zuckerstrukturen (Javaud, Dupuy et al. 2003).

Genauer erfolgt der Fucosylierungsweg wie folgt: GDP Glucose wird vom Zytosol zum Golgi Apparat oder zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert (Luhn et al. 2004). Alpha- 1,3-Fucosyltransferasen sind Typ II Membran Proteine mit einer N-terminalen transmembranen Domäne, die am Golgi Apparat verankert sind. Die C-terminale Domäne hat eine katalytische Funktion die ins Lumen des Golgi Apparats hineinragt (Nilsson et al. 1993,1996).

Bisher sind beim Menschen sechs FUTs beschrieben worden, FUT III bis FUT VII und FUT IX (Kukowska-Latallo, Larsen et al. 1990, Weston, Nair et al. 1992, Weston, Smith et al. 1992, Natsuka, Gersten et al. 1994, Nishihara, Iwasaki et al. 1999).

Zwei alpha 1,3 Fucosyltransferasen werden im murinen Gehirn exprimiert: die alpha- 1,3 Fucosyltransferase IV und die alpha- 1,3 Fucosyltransferase IX. Die codierenden Sequenzen der beiden Enzyme sind hoch konserviert bei Menschen, Ratten, Mäusen und Hamstern (Ma et al. 2006, Kudo et al. 1998, Kaneko et al. 1999, Baboval et al. 2000, Patnaik et al. 2000).

### **1.5.1 Fucosyltransferase IV**

In den Studien von Goelz und Lowe wurde die Fucosyltransferase IV erstmalig beschrieben (Goelz, Hession et al. 1990, Lowe, Kukowska-Latallo et al. 1991). Und zwar im Zusammenhang mit der Bildung des Liganden für das endothele Leukozytenadhäsionsmolekül-1 (ELAM-1). Daher rührt auch sein ursprünglicher Name, ELAM-1-Ligand Fucosyltransferase (ELEFT). Heute wird es als FucT IV bezeichnet (Kumar, Potvin et al. 1991). Zwei wichtige Hauptfunktionen dieses Enzyms sind die Fucosylierung von GlcNAc mit einer alpha-3-Bindung in neutralen Akzeptormolekülen sowie die Produktion von LeX-Strukturen (de Vries, Srnka et al. 1995, Niemelä, Natunen et al. 1998). Das FUT IV- Gen ist auf dem Chromosom 11q22-q23 zu finden und wird ubiquitär in allen Geweben exprimiert (Gersten, Natsuka et al. 1995). Die größten Anteile von

Fucosyltransferase IV weisen myeloide Zellen, Magen, Darm, Uterus und Niere auf (Gersten, Natsuka et al. 1995).

### **1.5.2 Fucosyltransferase IX**

Die Fucosyltransferase IX wurde bereits in Form eines Klons aus einer murinen cDNA-Bibliothek beschrieben (Kudo, Ikehara et al. 1998) und ist beim Menschen auf dem Chromosom 6q16 lokalisiert (Kaneko, Kudo et al. 1999). Die FUT-9 Gensequenz und die Gensequenz der anderen alpha 1,3/4 Fucosyltransferasen weisen große Differenzen auf, allerdings findet man parallelen in den FUT9-Genen von Maus und Mensch. Ähnlich der FUT IV synthetisiert die FUT IX ebenfalls LeX- Strukturen. Die größte Expression der Fucosyltransferase IX spiegelt sich in Gehirn, Magen, Milz und Blutzellen wieder (Cailleau-Thomas, Coullin et al. 2000).

Durch unpublizierte Arbeiten im Labor konnten mögliche Transkriptionsfaktoren für die alpha- 1;3 Fucosyltransferasen IV und IX identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die Proteine der STAT 1 und STAT 2. Nach einer Überexpression der beiden Fucosyltransferasen *in vitro* wurde die Expression mittels eines Microarrays untersucht. Die höchste Expression nach dieser Überexpression zeigten die beiden STAT 1 und STAT 2.



## 2 Ziel und Hypothese der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich der Expression von STAT 1 und STAT 2 in verschiedenen Gehirnarealen der Maus zum Zeitpunkt P0, P42 und P365 und deren eventuelle Beteiligung an der Expression der Fucosyltransferasen IV und IX.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Wie verhält sich das Expressionslevel von STAT 1 und STAT 2 in den unterschiedlichen Altersstufen?
2. Wie verhält sich das Expressionslevel von STAT 1 und STAT 2 zueinander in den verschiedenen Gehirnarealen?

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigen eine sehr auffällige Heraufregulation der STAT 1 und STAT 2 Gene nach Überexpression der Fucosyltransferasen *in vitro*. Beide Proteine können als Dimere als Transkriptionsfaktoren fungieren. Bei Microarray Versuchen zeigte sich nach Überexpression von FUT 4 und FUT 9 eine sehr hohe Expression von STAT 1 und STAT 2. Die Heraufregulation der Expression der beiden Gene konnte ebenfalls mit Hilfe von Real Time Daten validiert werden.

Zu klären ist, ob dieser Zusammenhang auch *in vivo* besteht. Daher wurde ontogenetisch untersucht, in welchen Mengen STAT 1 und STAT 2 in den verschiedenen Gehirnarealen der Maus exprimiert wurden.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Materialien**

#### **3.1.1 Tiere**

Mus musculus Stamm C57B1/6 (Die Mäuse waren eigene Nachzuchten von der Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf).

#### **3.1.2 Kits**

Omniscript RT Kit Quiagen, Hilden, Germany

QuantiTect SYBR® Green Kit Quiagen, Hilden, Germany

RNeasy Mini Kit Quiagen, Hilden, Germany

#### **3.1.3 Primer**

Mm\_STAT 1\_1\_SG QuantiTect®  
Primer Assay Quiagen, Hilden, Germany

Mm\_STAT 2\_1\_SG QuantiTect®  
Primer Assay Quiagen, Hilden, Germany

Mm\_Gapdh\_3\_SG QuantiTect®  
Primer Assay Quiagen, Hilden, Germany

### 3.1.4 Chemikalien

Aqua Bidest	B. Braun, Melsungen, Germany
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck OHG, Hohenbrunn, Germany
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der Lösungen wurde durchgehend doppelt destilliertes Wasser verwendet, welches aus einer *Millipore – Super – Q –* Filtrationsanlage entnommen wurde.

PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf 1 l Aqua bidest
TE	1 mM Tris-HCl (pH:8,0) 10 mM EDTA auf 1 l Aqua bidest
Tris-HCl (pH: 8,7 und 6,8)	12,1 g Tris Base auf 100 ml Aqua bidest



MicroAmp – Optical 96 – Well – Plate	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Optical Adhesive Cover -4360954-	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Präparationsbesteck	Bayha, Tuttlingen, Germany
RNeasy MinElute Spin Columns	Quiagen, Hilden, Germany
RNeasy MinElute Collection Tubes 1,5 ml	Quiagen, Hilden, Germany

### 3.1.8 Laborgeräte

Gerätschaften, die im folgenden Abschnitt nicht aufgeführt werden, entsprechen einer Standard – Laborausstattung.

AbiPrism 7900HT Sequenz Detection System	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Centrifuge 4-15C	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Centrifuge 5417R	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Germany
Flexcycler, PCR Thermocycler	Analytik Jena, Jena, Germany
Mikroprozessor pH-mV-Meter pH 526	WTW, Weilheim, Germany
Nanodrop 2000c Spectrophotometer	ThermoScientific, Wilmington, USA

Pipetten

Eppendorf GmbH,  
Hamburg, Germany

Sonifier B-12® Cell Disruptor

Branson Sonic Power  
Company, Danbury, USA

Wasserbad

Dinkelberg Labortechnik,  
Gablingen, Germany

## **3.2 Methoden**

Die Durchführung der Versuche erfolgte in dem Institut Anatomie I der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Jürgen Konrad Mai in Zusammenarbeit mit dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU). Im späteren Verlauf wurden die Versuche mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. phil. nat. Charlotte von Gall des Instituts Anatomie II der HHU ermöglicht.

### **3.2.1 Präparation von Versuchstieren**

Die Tötung der Versuchsmäuse (Stamm C57Bl/6) der Altersstufen P42 und P365 erfolgte regelkonform nach § 4 des Tierschutzgesetzes durch Frau Dr. rer. nat. Beryl Schwarz-Herzke mittels Überdosierung von Isosulfan (Inhalationsnarkose). Versuchsmäuse (Stamm C57Bl/6) der Altersstufen P0 wurden nach §4 des Tierschutzgesetzes durch Dekapitation getötet.

Die nachfolgenden Schritte fanden alle unter ständiger Kühlung des Gewebes statt, um Denaturierungen der Nukleinsäuren und Degradation der Proteine zu vermeiden.

Bei der Präparation der Versuchsmäuse der Altersstufen P42 und P365 erfolgte die Dekapitation post mortem. Anschließend wurde die Haut und das Bindegewebe sagittal durchtrennt und die Schädeldecke freipräpariert. Die Kalotte wurde vorsichtig mittels einer scharfen Schere eröffnet. Der Schnitt erfolgte über das Foramen magnum lateral entlang der Kalotte nach ventral auf Höhe der Bulbi oculi. Behutsam wurde die Kalotte entfernt und die Bulbi olfactorii, als erste zu untersuchende Probeneinheit, dem Schädel entnommen. Sodann wurden die Hirnnerven mittels eines scharfen Skalpells durchtrennt und das Hirn in toto in eine mit kühlem PBS gefüllte Petrischale gelegt und gewaschen. Die weitere Präparation der zu untersuchenden Hirnareale erfolgte mit Hilfe einer Stereolupe. Als Nächstes wurde das Cerebellum vorsichtig an den Pedunculi cerebelli durchtrennt und entnommen. Die sagittale Separierung

beider Hemisphären fand entlang der Fissura longitudinalis cerebri statt. Nach anschließender Freilegung und Entnahme der Hippocampi wurden zudem Proben von Cortex-, Thalamus- und Mesencephalonanteilen zur Untersuchung erstellt.

Bei der Präparation der Versuchsmäuse der Altersstufe P0 wurden aufgrund der Größe nur Proben aus dem Cortex, Cerebellum, Bulbus olfactorius und dem Mesencephalon entnommen. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Proben in 1,5 ml Eppendorf Safe - Lock Gefäße bei -80 °C eingefroren.

### 3.2.2 RNA - Extraktion aus murinem Gewebe

Zur Isolierung der RNA wurde das RNeasy® Mini Kit von Quiagen (Hilden, Germany) verwendet. Um eine Kontaminierung mit RNasen zu vermeiden, wurde der Arbeitsbereich desinfiziert und zuletzt mit RNase AWAY® von Carl Roth (Karlsruhe, Germany) abgewischt.

Alle Arbeitsschritte fanden unter ständiger Kühlung des zu untersuchenden Materials statt. Der RLT Buffer wurde mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol als Anti-Oxidans versetzt. Auch dem Konzentrat des RPE Buffer wurde zur Aktivierung 20 ml Ethanol (96-100 %) hinzugefügt.

Buffer RLT
Buffer RW1
Buffer RPE
RNase-free Water
$\beta$ -Mercaptoethanol
Ethanol (96-100%)
Ethanol (70)

**Tabelle 2:** Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

Die Proben wurden mit 600  $\mu$ l RLT Buffer versetzt, mittels dem Sonifier B-12® Cell Disruptor von Branson Sonic Power Company (Danbury, USA) homogenisiert und anschließend bei max. Umdrehungszahl und 2°C für 3 Min. zentrifugiert. Dem Lysat wurden 600  $\mu$ l 70 %iges Ethanol hinzugefügt und anschließend behutsam mit Hilfe einer Pipette vermischt, ohne das sich gebildete Zellpellet aufzuwirbeln. Es wurden 700  $\mu$ l von der Lösung in ein RNeasy mini Spin Column abpipettiert und in einem RNeasy mini Collection Tube positioniert. Im Anschluss wurde das Lysat für 30 Sek. bei > 8000 g



und 2°C zentrifugiert. Der Durchfluss in Form von Zelldetritus und Proteinen wurde verworfen.

Nach Hinzufügen von 700 µl RW1 Buffer auf die Silikagel-Säule wurde der oben beschriebene Vorgang wiederholt. Als Nächstes wurden nun 500 µl RPE Buffer auf die Membran pipettiert, das Röhrchen samt Silikagel-Säule wurde wiederum bei > 8000 g und 2°C für 30 Sek. zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Diesmal betrug die Zentrifugationsdauer jedoch 2 Min. bei max. Umdrehungszahl, um die Entfernung des verwendeten Ethanol zu gewährleisten.

Das RNeasy mini Spin Column wurde nun in ein neues RNeasy mini Collection Tube inseriert und 50 µl RNase-freies Wasser vorsichtig direkt auf die RNeasy mini Silikagel-Membran pipettiert. Durch die anschließende zweiminütige Zentrifugation bei max. Umdrehungszahl und 2°C wurde die RNA mit 2 µl Wasser eluiert.

### **3.2.3 Konzentrationsbestimmung der RNA**

Die genaue Bestimmung der RNA - Konzentration erfolgte mit Hilfe des Nanodrop 2000c Spectrophotometer. Bei dem Nanodrop Photometer handelt es sich um ein Spezialphotometer zur Bestimmung der Lichtabsorption in sehr kleinen Volumina (1 bis 2 µl). Auf der Bedienungssoftware wurde der Button „Nukleinsäuren“ ausgewählt. Anschließend müssen zur Initialisierung des Gerätes 2 µl Wasser auf den Probenhalter pipettiert werden. Nach der Initialisierung wurde der Wassertropfen vom Probenhalter mit dem dort vorhandenen Kleenextuch abgewischt.

Danach erfolgt die Nullwerteneinstellung ebenfalls mit 2 µl Wasser, bzw. Puffer. Nach Abwischen des Wassers/Puffers werden 1 - 2 µl der Probe auf dem Probenhalter pipettiert und vermessen. Nach der Messung sollte nochmals zur Kontrolle Wasser vermessen werden, damit sichergestellt ist, dass der Probenhalter wieder sauber ist.

In diesem Versuch wurde die optische Dichte der Proben bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Als Referenzpunkt fungierte der ermittelte Messpunkt von Aqua destillata. Zur Überprüfung einer möglichen Kontamination mit Proteinen wurde der Absorptionsquotient von A260 zu A280 erfasst. Um die benötigte Reinheit der Proben zu garantieren, musste der Wert der DNA in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen und der Wert der RNA in einem Bereich zwischen 2,0 und 2,1.

Sample ID	Date	ng/ul	A260	A280	260/280
Hc 6 S	02.09.2010	128,09	3,202	1,657	1,93
Cx 6 S	02.09.2010	1062,60	26,565	12,995	2,04
Th 6 S	02.09.2010	157,24	3,931	1,988	1,98
Cb 6 S	02.09.2010	1510,52	37,763	20,057	1,88
Bo 6 S	02.09.2010	250,70	6,268	3,400	1,84
Mes 6 S	02.09.2010	299,45	7,486	3,571	2,10
Bo 7 S	02.09.2010	155,93	3,898	2,018	1,93

**Tabelle 3: Konzentration der extrahierten RNA**

Ergebniswerte einer Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop 2000c (Versuchsmäuse 6 S und 7 S) aufgeführt von links nach rechts: Proben, Datum, Konzentration in ng/ul, optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm und der Absorptionsquotient von 260/280

### 3.2.4 Reverse Transkription der RNA

Um virale RNA oder mRNA in einer PCR zu vervielfältigen, wird die RNA in einer Reverse-Transkriptase- Reaktion (RT-Reaktion) durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Reverse Transkriptase wird aus Retroviren extrahiert. Retroviren sind RNA-haltige Viren, die in der Wirtszelle ihre RNA in DNA umwandeln müssen, um sie stabil ins Genom des Wirtes einbauen zu können. Für die cDNA- Synthese werden Oligo dT-Primer und Hexanukleotide eingesetzt. Die mRNA weist eine Cap- Struktur am 3'-Ende auf, die durch posttranskriptionale Polyadenylierung charakterisiert ist, so dass OligodT- Primer eingesetzt werden können, um möglichst große cDNA-Fragmente vom 3'- Ende in Richtung 5'- Ende zu produzieren.

Damit die Proben für die nachfolgende quantitative PCR (qPCR) verwendet werden konnten, erfolgte zunächst die reverse Transkription der RNA in cDNA mit dem Omniscript RT Kit von Quiagen (Hilden, Germany). Vor Beginn wurde der Arbeitsplatz mit Ethanol (70%) desinfiziert und mittels RNase AWAY® von Carl Roth (Karlsruhe, Germany) aufbereitet, um eine Kontamination der angefertigten RNA-Proben zu vermeiden. Auch wurden alle Arbeitsschritte unter Kühlung durchgeführt, um einer vorzeitigen Degradation der RNA entgegenzuwirken.

Zur reversen Transkriptase Reaktion wurde jeweils 1 µg RNA eingesetzt. Für jede Probe musste die Menge an µl bestimmt werden, die benötigt wurde, um diese 1 µg RNA zu erhalten. Dies geschah mit Hilfe der vorangegangenen Konzentrationsbestimmung (siehe Kapitel 3.4) der RNA und folgender Formel:

$$1000 \text{ ng/Wert} \times \text{ng/ul} = \text{Wert} \times \text{ul}$$

Zunächst wurden für alle Probeneinheiten Mastermixe erstellt. Der Mastermix für einen Ansatz enthielt jeweils 10% 10x RT Buffer, 0,5 mM dNTP, 1µM Oligo dT Primer und 10 units RNase Inhibitor. 1 µg RNA wurde den jeweiligen Ansätzen hinzugefügt. Falls ein Gesamtvolumen von 20 µl nicht erreicht wurde, konnte die Differenz mit RNase freiem Wasser ausgeglichen werden.

10 x RT Buffer
dNTP Mix
Oligo dT Primer
RNase Inhibitor
Omniscript RT
RNase freies Wasser

**Tabelle 4:** Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

Zum Schluss wurden noch vier units Omniscript Reverse Transkriptase appliziert und mittels des Flexcyclers - PCR Thermocycler (Analytik Jena, Germany) wurde die Umwandlung der RNA in cDNA gestartet. Die reverse Transkriptase Reaktion verlief 60 Min. lang bei 37 °C.

Die verwendete reverse Transkriptase beinhaltet eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase und eine RNase H (Exoribonuklease). Im 1. Schritt der Transkription kam es zur Anlagerung (Annealing) des Poly-A-Schwanzes des Oligo dT

Primers an den mRNA Strang und zur Erstellung der cDNA mittels der RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Im 2. Schritt kam es durch die RNase H (Exoribonuklease) zur Degenerierung der nicht mehr benötigten RNA. Durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase folgte die nachgeschaltete cDNA Amplifikation.

Die erstellte cDNA wurde als Template für die nachfolgende qPCR verwendet. Die Lagerung der angefertigten Proben erfolgte bei -20 °C.

### 3.2.5 Quantitative PCR (qPCR)

Um die Expressionsrate der STAT 1 und STAT 2 in den jeweiligen Probenansätzen zu ermitteln, wurde das quantitative PCR (qPCR) Verfahren

2x QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix
RNase freies Wasser
QuantiTect® Primer Assay STAT 1
QuantiTect® Primer Assay STAT 2
QuantiTect® Primer Assay GAPDH

des Abi Prism 7900HT Sequenz Detection Systems von Applied Biosystems (Carlsbad, USA) benutzt. Die benötigten Arbeitsschritte erfolgten unter Kühlung. Für die qPCR wurde das QuantiTect SYBR®Green Kit von Qiagen (Hilden,

**Tabelle 5:** Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

Germany) verwendet. Die Primer Assays wurden ebenfalls von QuantiTect® Qiagen (Hilden, Germany) bezogen. Für die qPCR wurde ein System gewählt, bei dem die Reverse Transkriptase Reaktion gesondert vor der quantitativen PCR stattfand, um eine höhere Sensitivität der untersuchten Transkripte zu erreichen.

Zuerst wurden Mastermixe für die jeweiligen Ansätze vorbereitet. Der QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix enthielt bereits fast alle benötigten Lösungen (siehe Tabelle 4), so dass lediglich RNase-freies Wasser und die spezifischen Primer hinzugefügt werden mussten. Die Ansätze wurden für alle Proben - Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Thalamus, Hippocampus und Mesencephalon - erstellt. Pro Versuchsreihe wurden 12,5 µl des Mastermix mit 10 µM des jeweiligen Primers und 7µl RNase-freiem Wasser versetzt, anschließend noch 100ng cDNA hinzugefügt und mittels Pipette die Lösung vorsichtig vermischt.

HotStarTaq® DNA Polymerase
QuantiTect SYBR Green PCR Buffer
dNTP Mix, inkl. dUTP
SYBR Green
ROX (passiver Referenzfarbstoff)
5 mM MgCl <sub>2</sub>

**Tabelle 6:**

Inhalt 2x QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix

Das Gesamtvolumen eines einzelnen Ansatzes betrug 25 µl. Die Genexpression der zu untersuchenden Gene STAT 1, STAT 2 und GAPDH wurde für jede Probe ermittelt. GAPDH diente hierbei als Referenzgen. Von jeder Reihe wurden zwei Ansätze angefertigt und zusätzlich noch für jeden Primer Leerproben erstellt, um etwaige Verunreinigungen ersichtlich zu machen. Die gesamten Ansätze wurden auf eine 96-Well-Platte pipettiert (siehe Tabelle 7), welche mit einem Optical Adhesive Cover verschlossen wurde. Bevor die qPCR mittels AbiPrism 7900HT startete, wurde die 96-Well-Platte zentrifugiert, um auftretende Bläschen vom Grund der einzelnen Slots zu entfernen und eine homogene Verteilung aller Bestandteile zu gewährleisten.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A												
	B												
	C												
STAT 1	D	Cb	Cb	Bo	Bo	Hc	Hc	Th	Th	Mes	Mes	Cx	Cx
STAT 2	E	Cb	Cb	Bo	Bo	Hc	Hc	Th	Th	Mes	Mes	Cx	Cx
	F												
Gapdh	G	Cb	Cb	Bo	Bo	Hc	Hc	Th	Th	Mes	Mes	Cx	Cx
H2O	H			STAT 1	STAT 2	GAP DH							

**Tabelle 7:** Probenverteilung einer 96-Well-Platte

In der ersten Phase der q – PCR kam es zur Elimination von dUMP-haltigen Produkten durch die Uracil-N-Glycosylase (UNG) bei 50 °C über 2 Minuten. Hierbei entfernte die UNG das Uracil von den dUMP-haltigen Restprodukten der PCR und leitete deren Hydrolyse ein, um eine Verfälschung der Resultate durch Kontamination zu vermeiden. Dann folgte der initiale Schritt der q-PCR bei 95 °C mittels Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase für 10 Minuten, es startete die eigentliche PCR über 40 Zyklen.

Die PCR beinhaltete drei Phasen: die Denaturierung, das Annealing und die Extension. Die Denaturierung ist der Zerfall der doppelsträngigen DNA in zwei Einzelstränge durch Hitze. Dieser Schritt erfolgte bei 95 °C für 15 Sekunden. Im Anschluss kam es zur Anlagerung (Annealing) des sequenzspezifischen Primers an den entsprechenden flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genbereichs. Es folgte die Neubildung der doppelsträngigen DNA mittels der DNA-Polymerase und den in der Lösung vorhandenen Desoxyribonukleotiden. Während der Extension bei 72 °C wurde die durch die Expressionsrate entstehende Fluoreszenz gemessen. Anschließend erfolgte die erneute Denaturierung, das Annealing und die Extension über insgesamt 40 Zyklen.

Die Fluoreszenz wurde durch den interkalierenden Farbstoff SYBR Green I verursacht. SYBR Green I lagerte sich an die Lysine an und wurde in die cDNA eingebaut. Es emittiert grünes Licht ( $\lambda$  max. = 520 nm). Mit zunehmender Zyklusanzahl verstärkte sich das Signal, welches in der Extensionsphase gemessen wurde. Repräsentativ für die Fluoreszenz stand der angegebene Cycle-Threshold-Wert (Ct-Wert). Dieser markierte den Punkt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über das vorhandene Hintergrundrauschen stieg und spiegelte den Anfang des exponentiellen Wachstums wieder. Mit Hilfe der erfassten Werte konnte so für STAT 1, STAT 2 und Gapdh in den unterschiedlichen Hirnarealen ein Amplifikationsplot erstellt werden.

Auch wurden durch die unter Umständen gemessene Fluoreszenz in der Leerprobe Verunreinigungen aufgedeckt. Da jede Probe doppelt angesetzt wurde, musste als Nächstes der Mittelwert des Ct-Wertes berechnet werden. Um die relative Quantität zu ermitteln, wurde der Ct-Wert des Referenzgens von dem Ct-Wert des untersuchten Gens subtrahiert. Der so erhaltene  $\Delta$ Ct-Wert wurde nun in die Formel (siehe Tabelle 8) zur Berechnung der tatsächlichen Anzahl der spezifischen DNA Kopien eingesetzt. Da die Expression von gesunden, nicht modifizierten Gehirnarealen in verschiedenen Altersstufen untersucht wurde, wurde die n-fache Genexpression von STAT 1 und STAT 2 der Altersstufen P0, P42 und P365 gegenüber gestellt. Die Auswertung und Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Office Excel 2007.

$\begin{aligned} \text{Ct Referenzgen} - \text{CtProbe} &= \Delta\text{Ct} \\ \Delta\text{CtProbe} - \Delta\text{CtKontrolle} &= \Delta\Delta\text{Ct} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \end{aligned}$
---

**Tabelle 8:** Relative Quantifizierung mittels Ct-Wert

### **3.2.6 Primer**

Die Primer-Ansätze von Quiagen (Hilden, Germany) wurden lyophilisiert erhalten. Vor Nutzung wurden sie mit 1,1 ml TE (pH: 8,0) versetzt, homogenisiert und zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.



## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Die Genexpression von STAT 1 und STAT 2**

Ziel dieser Arbeit ist, die Expressionsraten von STAT 1 und STAT 2 in verschiedenen murinen Gehirnarealen zu ermitteln und gegenüberzustellen.

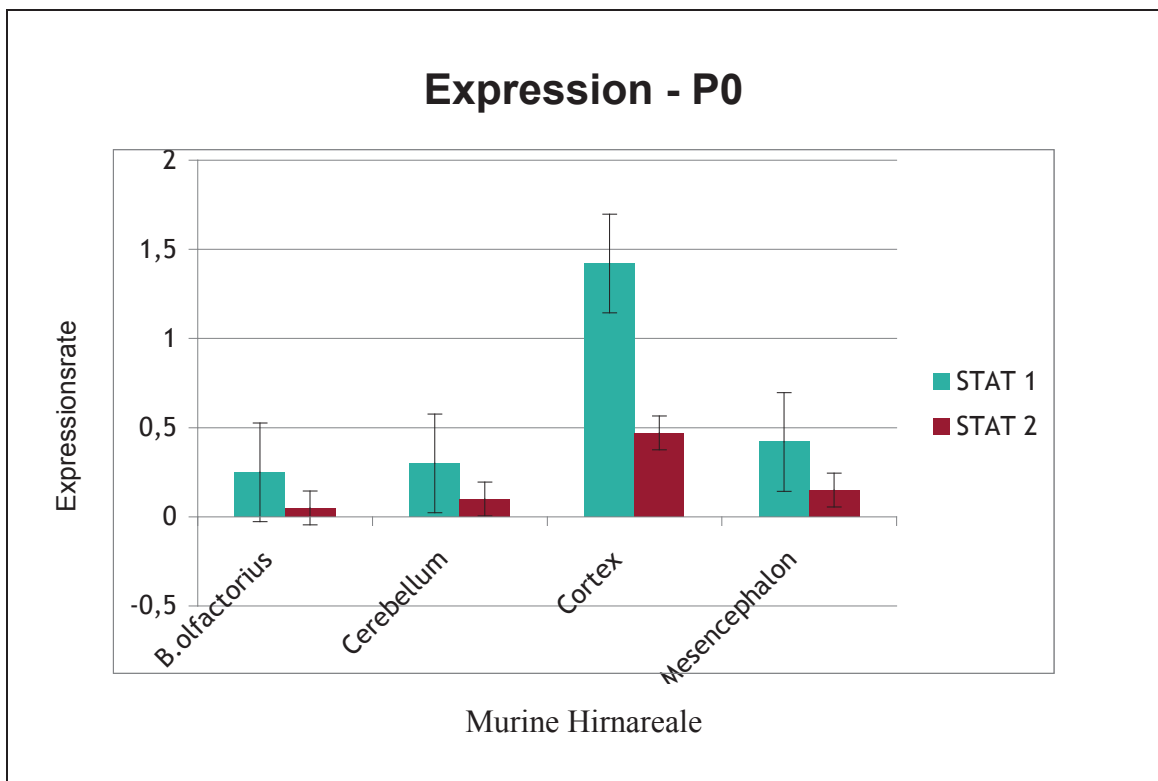
Für die Durchführung der Versuche wurden Gewebeproben von genetisch unveränderten Mäusen (Stamm: C57B16) der Altersstufen P0 (postnatal), P42 (sechs Wochen alt) und P365 (ein Jahr alt) entnommen. Die Gewebeproben aus verschiedenen Gehirnarealen umfassten den Bulbus olfactorius, das Cerebellum, den Cortex, den Hippocampus, das Mesencephalon und den Thalamus. Bei den Versuchstieren der Altersstufe P0 wurden aus technischen Gründen lediglich Proben aus dem Bulbus olfactorius, dem Cerebellum, dem Cortex und dem Mesencephalon entnommen.

### **4.2 Die Quantität der Genexpression in den unterschiedlichen murinen Gehirnarealen**

Um die Expressionsrate des murinen Gehirns genauer bestimmen zu können, wurden Gewebeproben aus den unter Punkt 4.1 beschriebenen Regionen entnommen. Bei einem Vergleich der murinen Hirnareale der Altersstufen P0, P42 und P365 miteinander wurde ersichtlich, dass die Expressionsraten nicht kongruent waren, sondern dass sie eine arealabhängige Expression widerspiegeln. Das Diagramm der Altersstufe P0 stellte zunächst einen erhöhten Expressionsspiegel von STAT 1 im Vergleich zu STAT 2 dar. Dies galt ausnahmslos für alle der in dieser Altersstufe untersuchten Hirnareale.

Es fiel auf, dass die mit Abstand höchste Expressionsrate von STAT 1 im Cortex zu finden war. Sie lag bei einem Wert von ca.1,4. Markant für dieses Gehirnareal in der Altersstufe P0 war auch das Verhältnis von STAT 1 zu STAT 2. Lag die Expressionsrate von STAT 1, wie oben beschrieben, bei einem Wert

von ca.1,4, lag die Rate von STAT 2 bei nur ca. 0,5 und war damit die größte Spanne zwischen STAT 1 und STAT 2 im Cortex. Die Expressionsraten in den übrigen Arealen lagen sowohl von STAT 1 als auch von STAT 2 immer unter 0,5. Dabei fiel auf, dass die Expressionsrate, von STAT 1 und STAT 2 beginnend, im B. olfactorius über das Cerebellum bis hin zum Mesencephalon zunahm. Die geringste Expression wurde demnach im B. olfactorius festgestellt (Expression STAT 1 bei ca. 0,2, Expression STAT 2 so gut wie gar nicht vorhanden).



**Abb. 4:** Aus Mäusen des Stammes C57Bl6 der Altersstufen P0, P42 und P365 wurden verschiedene Gehirnnareale extrahiert. Die Gewebeprouben aus verschiedenen Gehirnnarealen umfassten den Bulbus olfactorius, das Cerebellum, den Cortex, den Hippocampus, das Mesencephalon und den Thalamus. Mit Hilfe eines Kits wurde die mRNA aus den Gehirnnarealen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der qPCR analysiert.

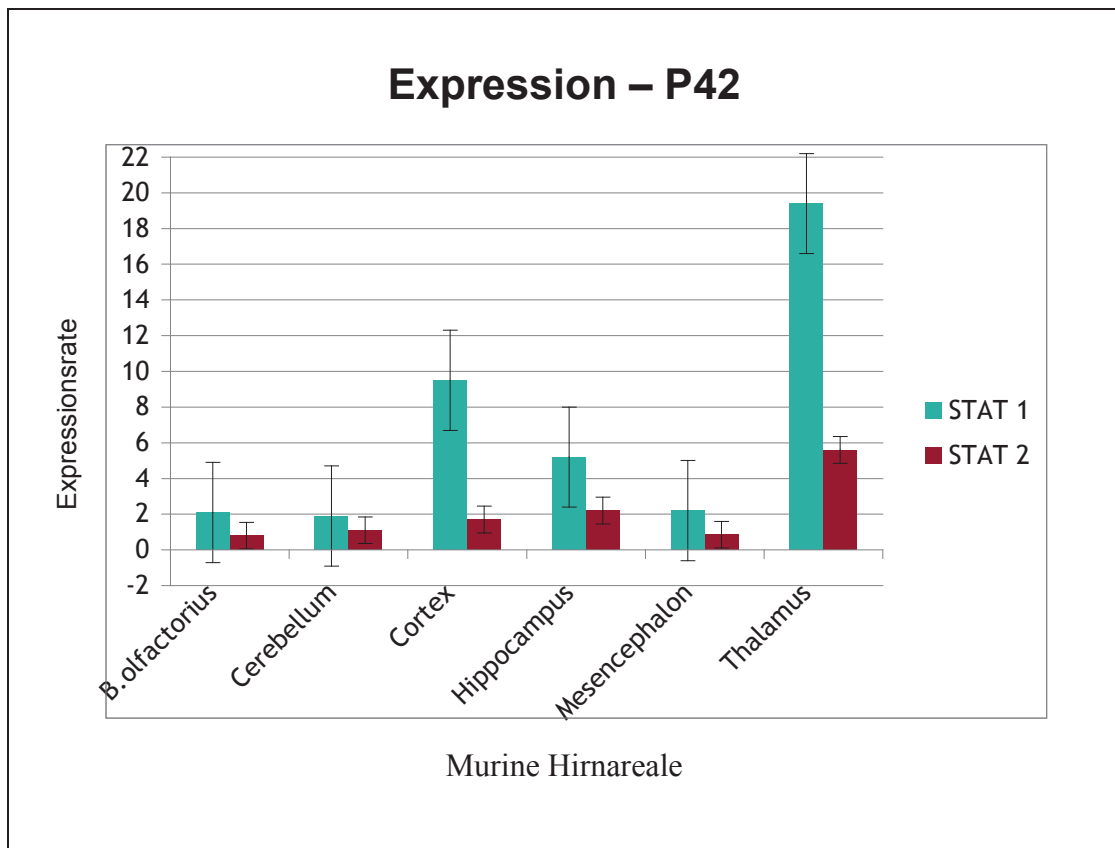
Die Abb. 4 zeigt den Vergleich der Transkriptionsrate von STAT 1 und STAT 2 in unterschiedlichen Gehirnnarealen in der Altersstufe P0.

Abszissenachse: die unterschiedlichen Gehirnnareale

Ordinatenachse: Genexpressionsrate, blau = STAT 1, rot = STAT 2

Die Expressionsrate von STAT 1 und STAT 2 bei den Versuchstieren von P42 beschreibt eine ungleiche Verteilung der Transkriptionsfaktoren. Auch waren keine Kongruenzen innerhalb der einzelnen Abschnitte erkennbar. STAT 1 war im Gegensatz zu STAT 2 immer in größerer Menge vorhanden. Dies galt für alle untersuchten Gehirnareale dieser Altersstufe. Die größte Expressionsrate fand sich im Thalamus. STAT 1 lag bei ca. 19,0, STAT 2 bei ca.5,0. Im Cortex lag STAT 1 ca. 9,0, STAT 2 ca.1,0 und im Hippocampus lag STAT 1 ca.5,0 und STAT 2 ca. 2,0. Im B. olfactorius, im Cerebellum und im Hippocampus wurde am wenigsten STAT 1 und STAT 2 exprimiert.

In den letzten drei genannten Gehirnarealen fand man auch die geringste Abweichung von STAT 1 zu STAT 2. Die Werte für STAT 1 lagen hier bei ca. 2,0 und für STAT 2 bei ca. 1,0. Thalamus und Cortex wiesen demnach die größte Abweichung der Expression von STAT 1 und STAT 2 auf (s.o.).



**Abb. 5:** Aus Mäusen des Stammes C57Bl6 der Altersstufen P0, P42 und P365 wurden verschiedene Gehirnapartee extrahiert. Die Gewebeprouben aus verschiedenen Gehirnaparteeen umfassten den Bulbus olfactorius, das Cerebellum, den Cortex, den Hippocampus, das Mesencephalon und den Thalamus. Mit Hilfe eines Kits wurde die mRNA aus den Gehirnaparteeen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der qPCR analysiert.

Die Abb. 5 zeigt den Vergleich der Transkriptionsrate von STAT 1 und STAT 2 in unterschiedlichen Gehirnaparteeen in der Altersstufe P 42.

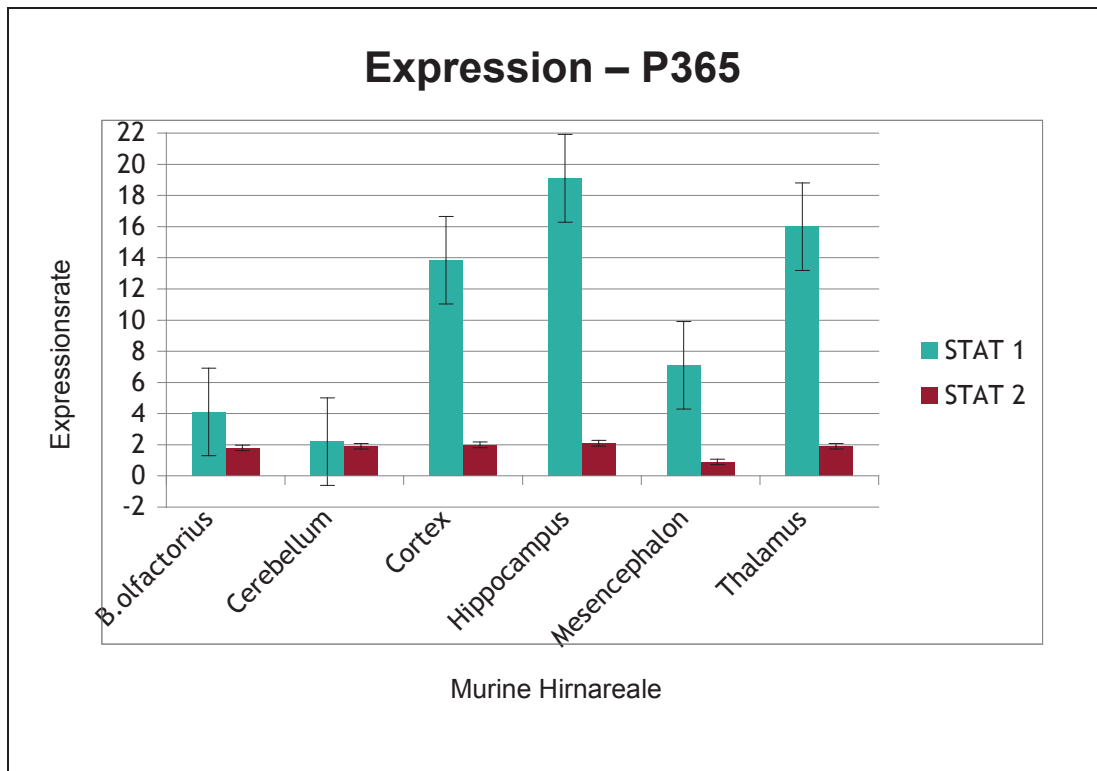
Abszissenachse: die unterschiedlichen Gehirnaparteeen

Ordinatenachse: Genexpressionsrate, blau = STAT 1, rot = STAT 2

Berechnete Standardabweichungen (=I), n = 8

Wie schon bei den Versuchstieren von P0 und P42 war auch als erstes Ergebnis bei den Versuchstieren von P365 eine verstärkte Expressionsrate von STAT 1 und STAT 2 vorhanden. Die markanteste Veränderung der Altersstufe P365 fand sich im Hippocampus wieder. Hier stieg die Expression von STAT 1 auf ca. 19,0 an, während die Expression von STAT 1 im Thalamus auf ca.16,0 und im Cortex auf ca. 14,0 abfiel. Der B. olfactorius, das Cerebellum und das Mesencephalon exprimierten am wenigsten STAT 1, wobei im Mesencephalon

ein deutlicher Anstieg um das Dreifache, im Gegensatz zu den Gewebeproben aus dem Mesencephalon von P42, erkennbar war. Hier lag der Wert bei ca. 6,0. Auch der B. olfactorius exprimierte ca. doppelt so viel STAT 1 (ca. 4,0) im Vergleich zu P42.



**Abb. 6:** Aus Mäusen des Stammes C57Bl6 der Altersstufen P0, P42 und P365 wurden verschiedene Gehirnoreale extrahiert. Die Gewebeproben aus verschiedenen Gehirnorealen umfassten den Bulbus olfactorius, das Cerebellum, den Cortex, den Hippocampus, das Mesencephalon und den Thalamus. Mit Hilfe eines Kits wurde die mRNA aus den Gehirnorealen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der qPCR analysiert.

Die Abb. 6 zeigt den Vergleich der Transkriptionsrate von STAT 1 und STAT 2 in unterschiedlichen Gehirnorealen in der Altersstufe P365.

Abszissenachse: die unterschiedlichen Hirnareale

Ordinatenachse: Genexpressionsrate, blau = STAT 1, rot = STAT 2

Berechnete Standardabweichungen (=I), n = 12

Die Expressionsrate von STAT 2 spiegelt ein homogenes Bild wider. In nahezu allen Gehirnabschnitten lag der Wert bei ca. 2,0, ausgenommen im Mesencephalon; dort lag der Wert bei 1,2. Insgesamt war also, bis auf das Mesencephalon und den Thalamus, ein leichter Anstieg der Expression von STAT 2 zu beobachten. Die größte Abweichung von STAT 1 und STAT 2 bei 42

Tage alten Mäusen stellt der Hippocampus, Cortex und Thalamus dar. Im Hippocampus lag der Wert von STAT 1 bei 19,0 und der Wert von STAT 2 bei 2,0.

### **4.3 Der Vergleich von STAT 1 während der Altersentwicklung**

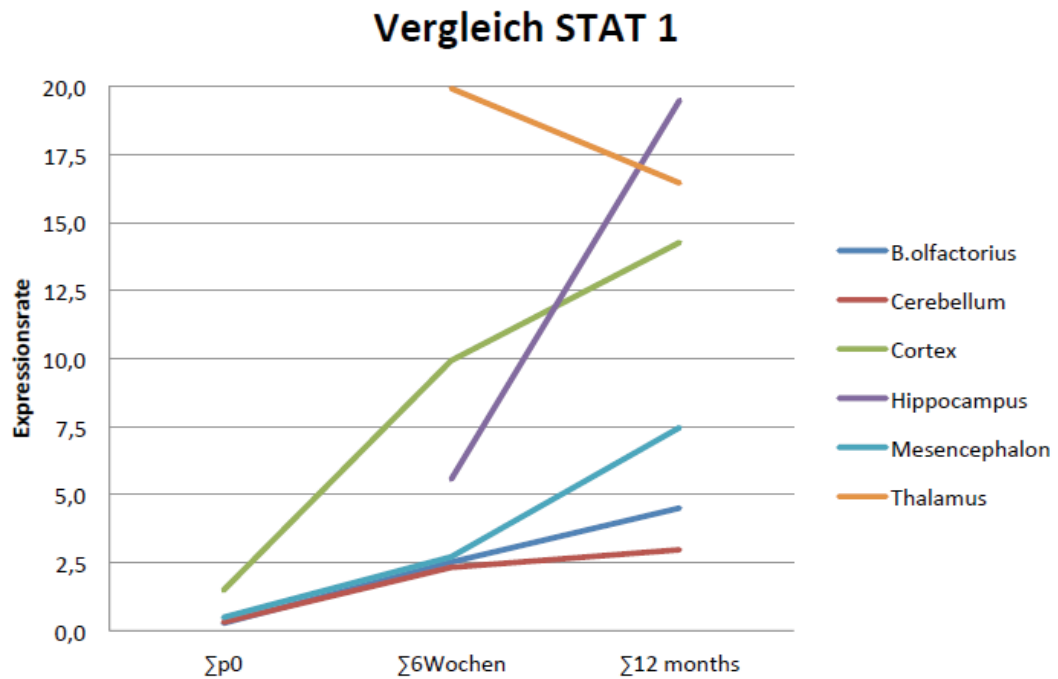
Bei einem Vergleich der Genexpression von STAT 1 der einzelnen Altersstufen war ein kontinuierlicher Anstieg der Expressionsrate von STAT 1 in allen Hirnregionen, ausgenommen im Thalamus, erkennbar. Da für die Altersstufen P0 keine Proben aus dem Hippocampus und dem Thalamus entnommen wurden, konnte für diese beiden Bereiche nur die Entwicklung der Genexpression zwischen P42 und P365 herangezogen werden. Der Thalamus nahm hier eine Sonderstellung ein: Als einzige Gehirnregion exprimierte der Thalamus in der Altersstufe P365 weniger STAT 1 als in der Altersstufe P42. Es war ein Abfall der Expressionsrate von ca. 20,0 (P42) auf ca. 16,0 (P365) zu beobachten.

Der stärkste Anstieg der Expressionsrate wurde im Hippocampus und im Cortex erzielt. Im Hippocampus war ein Anstieg von ca. 5,0 (P42) auf ca. 19,0 (P365) zu beobachten, im Cortex lagen die Werte bei ca. 1,4 für P0, bei ca. 10,0 für P42 und bei ca. 14,0 für P365.

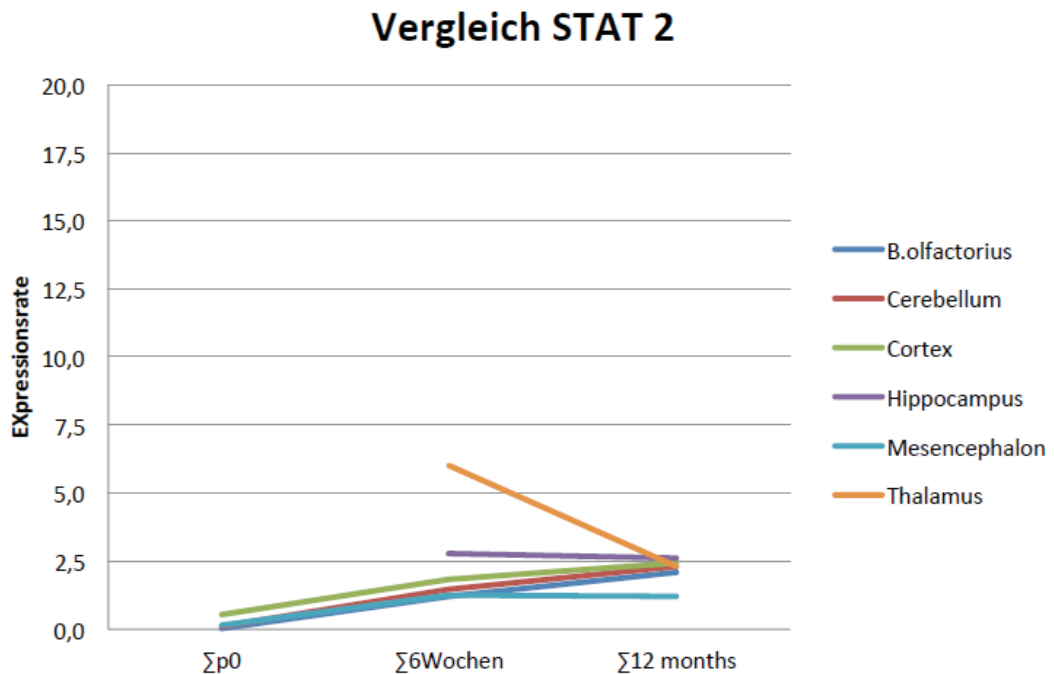
Ein kongruentes Bild fand sich wieder, wenn man die Expression für STAT 1 im B. olfactorius, im Cerebellum und im Mesencephalon in der Entwicklung von P0 zu P42 betrachtete. Diese drei Regionen exprimierten zu gleichen Anteilen gleiche Mengen STAT 1 (P0 ca. 0,2; P42 ca. 2,0). Ab einer Altersstufe von P42 stieg die Expressionsrate im Mesencephalon von ca. 2,0 auf ca. 7,5 (P365) an, gefolgt vom B. olfactorius von ca. 2,0 auf ca. 4,0 und Cerebellum von ca. 2,0 auf ca. 2,5. Dies sind, wie schon erwähnt, die drei Gehirnregionen mit der niedrigsten Expressionsrate von STAT 1.

#### **4.4 Der Vergleich von STAT 2 während der Altersentwicklung**

Auch im Vergleich von STAT 2 während der Altersentwicklung nahm der Thalamus erneut eine Sonderstellung ein. Er wies als einziges Gehirnareal eine Abnahme von STAT 2 im Alter auf. Wies die Expressionsrate im Alter von P42 noch einen Wert von ca. 6,0 auf, lag bei Versuchstieren im Alter von P42 nur noch eine Menge STAT 2 von ca. 2,0 vor. Ein minimaler Abfall der STAT 2-Konzentration konnte auch im Hippocampus nachgewiesen werden (von ca. 2,5 auf ca. 2,0). Bei weiterer Betrachtung der Verläufe in den restlichen Gehirnregionen fiel ein nahezu ähnliches Expressionsmuster von STAT 2 auf. Lediglich im Mesencephalon konnte man in der Entwicklungsphase von P42 zu P365 keinen Anstieg von STAT 2 beobachten, hier lag die Expressionsrate sowohl für P42 als auch für P365 bei ca. 1,5.



**Abb. 7:** Vergleich der Genexpression von STAT 1 der Altersstufen P0, P42, P365, Abszissenachse: Altersstufen, Ordinatenachse: Genexpressionsrate, Farberläuterungen bezüglich der unterschiedlichen Hirnareale s. Legende rechts.



**Abb. 8:** Vergleich der Genexpression von STAT 2 der Altersstufen P0, P42, P365, Abszissenachse: Altersstufen, Ordinatenachse: Genexpressionsrate, Farberläuterungen bezüglich der unterschiedlichen Hirnareale s. Legende rechts.



## 4.5 Direkter Vergleich von STAT 1 und STAT 2

Zusammenfassend kann Folgendes aus den Forschungsergebnissen geschlussfolgert werden:

1. Das Expressionslevel von STAT 1 und STAT 2 ist in der Entwicklungsphase von P0 und P42 in den Bereichen Cortex, Cerebellum und Mesencephalon in etwa gleich.
2. Im Zeitraum zwischen P42 und P365 war die Expressionsrate von STAT 1 in allen Arealen des Gehirns immer höher als die Expressionsrate von STAT 2.
3. Im einzigen Hirnareal festgestellt, fand im Thalamus ein Abfall sowohl von STAT 1 als auch von STAT 2 statt. Demgegenüber stiegen in allen übrigen Hirnabschnitten STAT 1 und STAT 2 während der Entwicklungsphase an. Somit fand sich in diesen Hirnabschnitten ein Maximum der Expression von STAT 1 und STAT 2 bei Versuchstieren der P365 – Gruppe. Der Thalamus erzielte die größte Expression bereits in einer Altersstufe von P42.

## 5 Diskussion

### 5.1 Der Vergleich von STAT 1 und STAT 2

STAT 1 und STAT 2 sind Transkriptionsfaktoren, die im JAK-STAT Signalweg eine Rolle spielen. Dort sind sie Schlüssel-Mediatoren, vor allem für die Aktivierung von IF I und IF III (Nancy Au-Yeung et al. 2013).

Im Gehirn ist STAT 1 an der Astrogliose beteiligt, was Versuche an Scrapie-infizierten Mäusen zeigten (Yeo-Jung Na et al. 2007). In dieser Arbeit war der Transkriptionsfaktor hauptsächlich im Hippocampus nach der Infektion stark exprimiert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich der Expression von STAT 1 und STAT 2 in verschiedenen Gehirnarealen der Maus zum Zeitpunkt P0, P42 und P365. Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Wie verhält sich das Expressionslevel von STAT 1 zu STAT 2 in den verschiedenen Gehirnarealen in den unterschiedlichen Altersstufen?
2. Wie verhält sich das Expressionslevel von STAT 1 und STAT 2 zueinander in den verschiedenen Gehirnarealen?

Dabei wurde methodisch wie folgt vorgegangen:

Zunächst erfolgte die Präparation der Gehirnareale Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Hippocampus, Mesencephalon und Thalamus. Nach der Präparation erfolgte die RNA-Extraktion aus murinem Gewebe. Um die mRNA in einer PCR zu vervielfältigen, wurde die RNA in einer Reversen-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) durch das Enzym Reverse Transkriptase aus Retroviren in cDNA umschrieben. Mit dem Verfahren der quantitativen PCR konnte im Folgenden die Expressionsrate von STAT 1 und STAT 2 in den jeweiligen Probenansätzen ermittelt werden.

Sowohl STAT 1 als auch STAT 2 haben die gemeinsame Funktion der Inhibierung der Proliferation und nehmen eine bedeutende Rolle in der Immunabwehr ein, indem sie eine Reaktion auf virale und bakterielle Infektionen auslösen. Weiter greift STAT 1 zusätzlich in die Regulation der Zellentwicklung und der Wachstumskontrolle ein (Begitt 2000, Krämer 2010, Levy et al. 2002, Lodige 2006, Reich et al. 2006, Schindler et al. 2007, Wenta 2008). Weiterhin zeigte sich eine Astrogliose, die mit einer erhöhten STAT 1 Expression in Zusammenhang gebracht wird (Yeo-Jung Na et al. 2007).

Der Vergleich der Expression der beiden Proteine zeigt ein erhöhtes STAT 1 – Expressionslevel in allen drei Altersstufen (s. Abb. 4, 5 und 6).

Da STAT 1 bei der Zellentwicklung und dem Wachstum der Zellen in den Zellzyklus regulierend eingreift, könnte dies eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in der Altersstufe P0 das Expressionslevel von STAT 1 dem Expressionslevel von STAT 2 überlegen ist. In diesem Altersstadium ist die Zellentwicklung und Wachstumskontrolle allerdings noch nicht ausgereift, was unter anderem einen Anstieg der Expression von STAT 1 in den weiteren Altersstufen P42 und P365 zur Folge haben könnte.

## **5.2 STAT 1 und STAT 2 im Cortex**

Die höchste Expressionsrate von STAT 1 unter den Gehirnavenen war im Cortex zu finden.

STAT 1 ist ebenfalls an der Differenzierung der Astrozyten, an der Aktivierung der Astrozyten und an astroglialen Genantworten beteiligt (Kahn et al. 1997). Astrozyten haben eine Stützfunktion im ZNS, beteiligen sich am Stoffaustausch zwischen Blut und Neuronen, umhüllen und isolieren die Synapsen und helfen bei der Synaptogenese.

Dieses Ergebnis zeigt, dass zum einen STAT 1 eine Funktion als Transkriptionsfaktor für die beiden im Gehirn vorkommenden

Fucosyltransferasen 4 und 9 sein könnte oder bei der Astrogliose unterstützend eingreifen könnte (Yeo-Jung Na et al. 2007).

In der Publikation von Yeo-Jung (Yeo-Jung Na et al. 2007) wurde gezeigt, dass nach Infektion mit Scrapie im Hippocampus von Mäusen eine erhöhte STAT 1 Expression stattfand. Da die Expression von STAT 1 im Cortex sehr hoch war, kann es unter anderem auch an der Anzahl der Astrozyten liegen. So lassen sich für die Maus beispielsweise Angaben ungefähr  $14,7 \times 10^3$  im Cortex (Chvatal et al. 2007) finden. Da sich jedoch  $83,2 \times 10^3$  Astrozyten im Hippocampus detektieren lassen (Ogata and Kosaka 2002), kann es nicht nur an den Astrozyten liegen. Daher müssen auch die Neurone und eventuell deren Aktivität eine Rolle bei der STAT 1 Expression spielen.

### **5.3 STAT 1 und STAT 2 im Thalamus**

Neben Cortex und Hippocampus wurde im Thalamus die höchste Expressionsrate von STAT 1 in beiden Altersstufen P42 und P365 nachgewiesen (s. Abb. 5 und 6). Auch in diesen Altersstufen ist STAT 2 generell in geringerem Maße vorhanden als STAT 1. Bei der Expressionsrate von STAT 1 im Thalamus stellt sich die Frage, warum in diesem Gehirnabschnitt besonders viel STAT 1 nachgewiesen wurde.

Über den Thalamus ist bekannt, dass er sich aus verschiedenen Kerngebieten zusammensetzt und eine starke Verbindung zum gesamten Cortex aufweist, was eine mögliche Erklärung dafür sein könnte, dass die Expressionsrate von STAT 1 in diesen Gehirnarealen erhöht ist, da allgemein bekannt ist, dass durch die Verbindungen der einzelnen Gehirnabschnitte die Astrozyten aktiviert werden. Auch dieses könnte zu einer Erhöhung des STAT 1-Expressionslevels beitragen. Es scheint aber nicht nur die Verbindung des Thalamus zum Cortex ein wichtiger Grund für die erhöhte STAT 1- Expressionsrate zu sein, sondern der Epithalamus und der Hypothalamus scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle in Bezug auf die Expressionsrate von STAT 1 einzunehmen.

Durch die vielen spezifischen Verbindungen kommt es zu einer hohen Expression an Genen in den Zellen des Thalamus. Somit werden auch Transkriptionsfaktoren wie STAT1 und STAT 2 exprimiert.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (s. Kapitel 1.1.2) werden STAT-Proteine auf vielfältige Weise von Zytokinen aktiviert, unter anderem durch Wachstumsfaktoren, die die Zellen z.B. durch den Zellzyklus lenken.

## **5.4 STAT 1 und STAT 2 im Hippocampus**

Die Expressionsrate von STAT 1 der Altersstufe P42 im Hippocampus spiegelt zwar nicht die größte Menge an exprimiertem STAT 1 wider, jedoch war zu erkennen, dass dort eine höhere Menge an STAT 1 im Gegensatz zu den Gehirnarealen B. olfactorius, Cerebellum und Mesencephalon nachgewiesen werden konnte.

Bemerkenswert ist die Altersstufe P365. Hier fand die markanteste Veränderung der Expression von STAT 1 im Hippocampus statt. Im Vergleich zur Altersstufe P42 stieg sie fast um das Dreifache an. Auch im B. olfactorius konnte eine Steigerung der Expression von STAT 1 beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigen einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expressionsrate von STAT 1 im Hippocampus und der adulten Neurogenese.

Lange Zeit war in den Neurowissenschaften verbreitet, dass die Bildung aller Neurone des zentralen Nervensystems ein Prozess ist, der während der embryonalen und früheren postnatalen Entwicklung abläuft. Ming und Song beschrieben jedoch in ihren Studien, dass im Gehirn zwei Regionen existieren, B. olfactorius und Hippocampus, in die auch bei erwachsenen Säugetieren ständig neue Nervenzellen von der SVZ wandern (Ming and Song 2005).

Neuronale Stammzellen im Hippocampus teilen sich unbegrenzt. Sie können sowohl zu verschiedenen Typen von Gliazelle als auch zu Neuronen ausdifferenzieren. Auch beim Menschen konnten neu gebildete Nervenzellen im

Hippocampus noch bis zu einem Alter von über 70 Jahren nachgewiesen werden (Eriksson, Perfilieva et al. 1998).

Neben der Neubildung von Neuronen existiert im Hippocampus auch eine Neubildung von Körnerzellen. Diese werden kontinuierlich von neuronalen Stammzellen in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus nachgebildet. Viele Faktoren beeinflussen die Neurogenese (Kempermann 2006).

In Experimenten von Ming und Song wurde aufgezeigt, dass adulte Stammzellen des Gyrus dentatus nur in zwei Regionen in der Lage sind, Nervenzellen zu proliferieren: zum einen im Hippocampus, zum anderen im B. olfactorius, nicht aber in anderen Regionen, wie z. B. im Rückenmark. Dies scheint auf eine spezielle Population von Astrozyten zurückzuführen zu sein. Sie scheint dafür verantwortlich zu sein, dass durch die Expression verschiedener Signalmoleküle die Teilung der Stammzellen im Gyrus dentatus reguliert wird (Ming and Song 2005).

Vorliegend wird davon ausgegangen, dass die Vorläuferzellen nicht in der Lage sind, sich über einen unbegrenzten Zeitraum teilen zu können. Aus diesem Grund werden sie immerzu von den eigentlichen Stammzellen nachgebildet. Dadurch bedingt, ist die Zahl der neu gebildeten Zellen beachtlich. So konnten im Hippocampus von jungen adulten Ratten 9000 Zellen pro Tag nachgewiesen werden (Cameron and McKay 2001).

Ferner beschreibt Kempermann zirkulierende Faktoren, wie Glukokortikoide aus der Nebennierenrinde, die unter Stressbedingungen die Neurogenese reduzieren: Kommt es im hohen Alter zur Reduktion der Neurogenese, könnte die erhöhte Expression von Glucocorticoid- Rezeptoren ein möglicher Grund dafür sein (Kempermann 2006). In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Ergebnisteil handelt es sich um Versuchstiere der Altersstufen P42 und P365.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Hippocampus, genauer gesagt die subgranuläre Zone des Gyrus dentatus, derjenige Ort ist, in dem die Neurogenese stattfindet. Dadurch ist es Organismen möglich, Informationen im

Kurzzeitgedächtnis zu speichern. Differenzieren die neugebildeten Neurone, beginnen sie ebenfalls zu einem ihnen bestimmten Ort zu wandern. Dies beginnt mit neuronalen Stammzellen (Typ 1) mit asymmetrischen Teilungen, multipotent und einer astrozyten-ähnlichen Morphologie.

Danach differenzieren sich die jungen Zellen zu Typ 2a und Typ 2b Neurone, die eine eher oligodendritische Morphologie aufweisen. Auf diesen Zelltypen folgen dann Typ 3 Zellen, PSA-NCAM-positiv (Kempermann et al. 2012).

## **5.5 STAT 1 und STAT 2 im Bulbus olfactorius und Mesencephalon**

Auch im Bulbus olfactorius und im Mesencephalon lässt sich in den Altersstufen P42 und P365 ein höheres Expressionslevel an STAT 1 als STAT 2 nachweisen (s. Abb. 5 und 6).

Da auch in der subventrikulären Zone Neurogenese stattfindet, wandern Zellen in den Bulbus olfactorius. Die Expression von STAT 1 könnte auf diese neu gebildeten Zellen zurückzuführen sein.

## **5.6 Schlussfolgerung:**

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit sind:

1. Wie verhält sich das Expressionslevel von STAT 1 zu STAT 2 in den verschiedenen Gehirnarealen in den unterschiedlichen Altersstufen?
2. Wie verhält sich das Expressionslevel von STAT 1 und STAT 2 zueinander in den verschiedenen Gehirnarealen?

Zusammenfassend kommt die Arbeit zu folgenden Ergebnissen:

1. Das Expressionslevel von STAT 1 ist höher als das von STAT 2.

STAT 1 kann als Transkriptionsfaktor fungieren. Transkriptionsfaktoren können jedoch nie allein an den Promotor eines Genes binden. Viele Faktoren spielen eine Rolle, die zusammengenommen das Transkriptom bilden. Im Fall von STAT 1 braucht es noch ein weiteres Molekül zur Bildung eines Heterodimers oder eines Homodimers. Erst dann kann es mit Hilfe noch kleinerer Proteine an den jeweiligen DNA-Strang binden. STAT 2 ist dasjenige Molekül, das mit STAT 1 ein Heterodimer bildet und somit einen Transkriptionsfaktor. Daher ist davon auszugehen, dass die Expression von STAT 2 mit der von STAT 1 zusammenhängt. Aufgrund der Fähigkeit von STAT 1, auch als Homodimer einen funktionierenden Transkriptionsfaktor bilden zu können, kann STAT 2 in geringeren Mengen exprimiert werden. Daher bleibt das Level dieses Proteins immer ein wenig unter der Anzahl von STAT 1.

Diese Homo- und Heterodimere könnten sich an die Promotoren der Gene der alpha 1,3 Fucosyltransferasen 4 und 9 setzen und die Expression der beiden Enzyme aktiviert haben. Durch die Heraufregung der Genaktivität der beiden Enzyme kommt es zu einer vermehrten Synthese von CD15.

Da jedoch die Transkriptionsrate auf mRNA-Ebene nicht unbedingt etwas über die Anzahl der translatierten Proteine und schon gar nichts über deren Aktivität aussagt, sollten an diesem Punkt weitere Experimente durchgeführt werden.

Zu untersuchen wäre, ob STAT 1 und STAT 2 tatsächlich als Transkriptionsfaktoren der Fucosyltransferasen 4 und 9 fungieren können. Dafür wäre es nötig, eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP-Assay) durchzuführen.

Die Chromatin-Immunopräzipitation ist eine Methode zur Untersuchung der DNA-Protein-Interaktionen. Dabei werden Protein-DNA-Bindungen in Geweben oder lebenden Zellen durch Fixierung mit Formaldehyd festgehalten. Das Chromatin wird extrahiert und mit Hilfe von Restriktionsenzymen oder Ultraschall zerkleinert. Dadurch entstehen kleine DNA-Bruchstücke, die aber noch die an ihr haftenden Proteine gebunden haben. Mit Hilfe von spezifischen



Antikörpern gegen das „Protein of interest“ werden dann die spezifischen DNA-Stücke beschwert und zentrifugiert. Dadurch werden sie immunopräzipitiert. Nun wird die Protein-DNA-Bindung gelöst und die DNA Stücke können mit verschiedenen Methoden wie der Real Time PCR oder der einfachen Sequenzierung identifiziert werden. Durch diese Methoden kann genau festgestellt werden, an welchen Stellen STAT 1 und STAT 2 binden.

Eine weitere, fast auf demselben Prinzip beruhende Methode ist der DNase-Footprinting-Assay. Ein Nachteil zu der oben beschriebenen Methode ist allerdings, dass hier radioaktiv gearbeitet werden muss.

2. Es besteht eine auffallend hohe Expressionsrate von STAT 1 in den Gehirnarealen Thalamus und Cortex in den Altersstufen P42 und P365.

Auffallend ist, dass STAT 1 in den untersuchten adulten Gehirnen, in Thalamus und Cortex, stark exprimiert war. Dies bedurfte einer Klärung. Es waren die Zelltypen, in denen STAT 1 und STAT 2 hauptsächlich exprimiert werden, zu identifizieren. Astrozyten spielen eine zentrale Rolle im zentralen Nervensystem. Sie unterstützen die Plastizität der Neurone, deren Funktion und versorgen die Neurone mit Nährstoffen. Sie bilden eine Gruppe morphologisch sehr heterogener Zellen, zu denen die protoplasmatischen, die fibrillären und laminären Astrozyten sowie die Ependymzellen und radiären Gliazellen gehören. Durch den Nachweis verschiedener Markerproteine wie GFAP, S100 oder GS können diese Zellen molekular identifiziert werden.

Allerdings treten nicht immer alle drei Marker gleichzeitig auf. So gibt es auch Astrozyten, die kein GFAP exprimieren. Aufgrund der Phosphorylierung des Proteins ist der Nachweis von GFAP generell problematisch, da er stark von der Phosphorylierung des Proteins abhängt.

Astrozyten bilden Zellfortsätze aus, die die Kapillaren vollständig umhüllen, jedoch keine Tight Junctions, sind also nicht direkt an der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke wird

durch Tight Junctions zwischen den Kapillarendothelzellen bewirkt, für deren Induktion die Astrozyten allerdings eine wichtige Rolle spielen.

Zwischen den Astrozytenendfüßchen finden sich vor allem Gap Junctions, so dass sie ein funktionelles Synzytium bilden, in dem niedermolekulare Substanzen (Ionen, Botenstoffe, Metabolite) frei fließen können.

Die perineuralen Fortsätze bedecken die Oberfläche des neuronalen Zellkörpers sowie große Teile der Dendriten, mit Ausnahme der Synapsen. Mit den Axonen treten die Astrozyten überwiegend nur indirekt über die Oligodendrozyten in Kontakt. Aufgrund ihrer Lage und Morphologie kann man verschiedene Astrozytentypen unterscheiden: Protoplasmatische Astrozyten, fibrilläre Astrozyten und laminäre Astrozyten. Protoplasmatische Astrozyten liegen in der grauen Substanz. Sie haben vergleichsweise kurze Fortsätze, mit denen sie die Perikaryen der Neurone und die Hirnkapillaren berühren. Fibrilläre Astrozyten liegen in der weißen Substanz. Sie berühren mit ihren sehr viel längeren Fortsätzen einerseits die Hirnkapillaren, andererseits die Myelinscheiden der Axone sowie die Axone an den Ranvier-Schnürringen.

Eine Spezialform der protoplasmatischen Astrozyten sind die sog. laminären Astrozyten, die vor allem in der Körnerzellschicht des Kleinhirns vorkommen. Ihre Fortsätze sind zu segelartigen Fächern ausgezogen, mit denen sie einerseits die Hirnkapillaren umgeben, andererseits die Synapsen in den Glomeruli cerebellares.

Insbesondere dieser Zelltyp muss viele morphologische Veränderungen „durchführen“ können und an den protoplasmatischen Fortsätzen in der Lage sein, sich auszubreiten und schnell zu agieren. Daher ist nicht ausgeschlossen, dass CD15 und natürlich seine gekoppelten Enzyme und deren Genexpression gerade in dieser Zellpopulation in hohem Maße vorkommt.

Um dies zu testen, müsste über die oben genannten Markerproteine für Astrozyten, zusammen mit spezifischen Markern gegen CD15 und/oder der

Fucosyltransferasen mit Hilfe der Immunhistochemie oder Immunzytochemie, der Nachweis des Zelltyps erbracht werden.

Gleichzeitig könnte eine Doppelfärbung oder sogar Tripelfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen CD15, einer Fucosyltransferase und Neuronenmarkern wie Doublecortin (DCX) und NeuN Aufschluss über weitere Zelltypen bringen, denn DCX wird ausschließlich im Cytoplasma unreifer Neurone nachgewiesen, während NeuN nach Reifung zu fertigen Neuronen exprimiert wird.

## 6 Literaturverzeichnis

Aimone, J. B., J. Wiles and F. H. Gage (2006). "Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories." Nat Neurosci **9**(6): 723-727.

Andrejeva, J., D. F. Young, S. Goodbourn and R. E. Randall (2002). "Degradation of STAT 1 and STAT 2 by the V proteins of simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2, respectively: consequences for virus replication in the presence of alpha/beta and gamma interferons." J Virol **76**(5): 2159-2167.

Ashwell KW, Mai JK., (1997a) "Developmental expression of the CD15 epitope in the hippocampus of the mouse". *Cell Tissue Res.* **289**: pp 17–23.

Ashwell KW, Mai JK., (1997b) "Developmental expression of the CD15-epitope in the brainstem and spinal cord of the mouse". *Anat Embryol (Berl)*. **196**: pp 13–25.

Ashwell KW, Mai JK., (1997c) "A transient CD15 immunoreactive sling in the developing mouse cerebellum". *Int J Dev Neurosci.* **15**: pp 883–889.

Ashwell KW, Mai JK., (1997d) "Transient developmental expression of CD15 in the motor and auditory cortex of the mouse". *Brain Res Dev Brain Res.* **100**: pp 143–148.

Au-Yeung N, Roli Mandhara, Curt M Horvath, (2013). "Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway."

Baboval T, Crandall JE, Kinnally E, Chou DK, Smith FI. *Glia*. (2000) Aug;31(2):144-54 "Restriction of high CD15 expression to a subset of rat cerebellar astroglial cells can be overcome by transduction with adenoviral vectors expressing the rat alpha 1,3-fucosyltransferase IV gene". Aug;31(2):144-54.

Bach, E. A., J. W. Tanner, S. Marsters, A. Ashkenazi, M. Aguet, A. S. Shaw and R. D. Schreiber (1996). "Liga" Mol Cell Biol **16**(6): 3214-3221.

Baden, H. A., S. P. Sarma, R. B. Kapust, R. A. Byrd and D. S. Waugh (1998). "The amino-terminind-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in

intact cells.al domain of human STAT4. Overproduction, purification, and biophysical characterization." J Biol Chem **273**(27): 17109-17114.

Banninger, G. and N. C. Reich (2004). "STAT 2 nuclear trafficking." J Biol Chem **279**(38): 39199-39206.

Becker S, Corthals GL, Aebersold R, Groner B, Muller CW(1998). "Expression of a tyrosine phosphorylated, DNA binding Stat3 beta dimer in bacteria". FEBS LETTERS **441** (1): 141-147 DEC 11 1998.

Begitt, A. (2004). Nucleocytoplasmatischer Transport und Geninduktion durch den Transkriptionsfaktor STAT1. Dissertation, freie Universität Berlin.

Begitt, A., T. Meyer, M. van Rossum and U. Vinkemeier (2000). "Nucleocytoplasmic translocation of STAT 1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10418-10423.

Bischofberger, J., D. Engel, M. Frotscher and P. Jonas (2006). "Timing and efficacy of transmitter release at mossy fiber synapses in the hippocampal network." Pflugers Arch **453**(3): 361-372.

Bode, A. M. and Z. Dong (2003). "Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction." Sci STKE **2003**(167): RE2.

Byrd, C. M., T. C. Bolken, K. F. Jones, T. K. Warren, A. T. Vella, J. McDonald, D. King, Z. Blackwood and D. E. Hruby (2002). "Biological consequences of antigen and cytokine co-expression by recombinant Streptococcus gordonii vaccine vectors." Vaccine **20**(17-18): 2197-2205.

Cailleau-Thomas, A., P. Coullin, J. J. Candelier, L. Balanzino, B. Mennesson, R. Oriol and R. Mollicone (2000). "FUT4 and FUT9 genes are expressed early in human embryogenesis." Glycobiology **10**(8): 789-802.

Cameron, H. A. and R. D. McKay (2001). "Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus." J Comp Neurol **435**(4): 406-417.

Chee, A. V. and B. Roizman (2004). "Herpes simplex virus 1 gene products occlude the interferon signaling pathway at multiple sites." J Virol **78**(8): 4185-4196.

Chen, X., R. Bhandari, U. Vinkemeier, F. Van Den Akker, J. E. Darnell and J. Kuriyan (2003). "A reinterpretation of the dimerization interface of the N-terminal domains of STATs." Protein Sci **12**(2): 361-365.

Chen, X., U. Vinkemeier, Y. Zhao, D. Jeruzalmi, J. E. Darnell and J. Kuriyan (1998). "Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA." Cell **93**(5): 827-839.

Chvatal A, Anderova M, Hock M, Prajerova I, Neprasova H, Chvatal V, Kirchhoff F, Sykova E. (2007). "Three dimensional confocal morphometry reveals structural changes in astrocyte morphology in situ." J Neurosci Res **85**(2):260-71.

Copeland, N. G., D. J. Gilbert, C. Schindler, Z. Zhong, Z. Wen, J. E. Darnell, A. L. Mui, A. Miyajima, F. W. Quelle and J. N. Ihle (1995). "Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes." Genomics **29**(1): 225-228.

Darnell, J. E. (1997). "STATs and gene regulation." Science **277**(5332): 1630-1635.

de Vries, T., C. A. Srnka, M. M. Palcic, S. J. Swiedler, D. H. van den Eijnden and B. A. Macher (1995). "Acceptor specificity of different length constructs of human recombinant alpha 1,3/4-fucosyltransferases. Replacement of the stem region and the transmembrane domain of fucosyltransferase V by protein A results in an enzyme with GDP-fucose hydrolyzing activity." J Biol Chem **270**(15): 8712-8722.

Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Björk-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson and F. H. Gage (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-1317.

Fagerlund, R., K. Mélen, L. Kinnunen and I. Julkunen (2002). "Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5." J Biol Chem **277**(33): 30072-30078.

Gadina, M., D. Hilton, J. A. Johnston, A. Morinobu, A. Lighvani, Y. J. Zhou, R. Visconti and J. J. O'Shea (2001). "Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after." Curr Opin Immunol **13**(3): 363-373.

Garcin, D., J. B. Marq, F. Iseni, S. Martin and D. Kolakofsky (2004). "A short peptide at the amino terminus of the Sendai virus C protein acts as an independent element that induces STAT 1 instability." J Virol **78**(16): 8799-8811.

Gersten, K. M., S. Natsuka, M. Trinchera, B. Petryniak, R. J. Kelly, N. Hiraiwa, N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copeland and J. B. Lowe (1995). "Molecular cloning, expression, chromosomal assignment, and tissue-specific expression of a murine alpha-(1,3)-fucosyltransferase locus corresponding to the human ELAM-1 ligand fucosyl transferase." J Biol Chem **270**(42): 25047-25056.

Goelz, S. E., C. Hession, D. Goff, B. Griffiths, R. Tizard, B. Newman, G. Chi-Rosso and R. Lobb (1990). "ELFT: a gene that directs the expression of an ELAM-1 ligand." Cell **63**(6): 1349-1356.

Gotoh, B., T. Komatsu, K. Takeuchi and J. Yokoo (2003). "The C-terminal half-fragment of the Sendai virus C protein prevents the gamma-activated factor from binding to a gamma-activated sequence site." Virology **316**(1): 29-40.

Gotoh, B., K. Takeuchi, T. Komatsu and J. Yokoo (2003). "The STAT 2 activation process is a crucial target of Sendai virus C protein for the blockade of alpha interferon signaling." J Virol **77**(6): 3360-3370.

Hastings, N. B. and E. Gould (1999). "Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells." J Comp Neurol **413**(1): 146-154.

Javaud, C., F. Dupuy, A. Maftah, R. Julien and J. M. Petit (2003). "The fucosyltransferase gene family: an amazing summary of the underlying mechanisms of gene evolution." Genetica **118**(2-3): 157-170.

Kahn MA, Huang CJ, Caruso A, Barresi V, Nazarian R, Condorelli DF, de Vellis J (1997). "Ciliary neurotrophic factor activates JAK/Stat signal transduction cascade and induces transcriptional expression of glial fibrillary acidic protein in glial cells."

Kaneko, M., T. Kudo, H. Iwasaki, Y. Ikehara, S. Nishihara, S. Nakagawa, K. Sasaki, T. Shiina, H. Inoko, N. Saitou and H. Narimatsu (1999). "Alpha1,3-fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX." FEBS Lett **452**(3): 237-242.

Katze, M. G., Y. He and M. Gale (2002). "Viruses and interferon: a fight for supremacy." Nat Rev Immunol **2**(9): 675-687.

Kempermann, G. (2006): "Adult Neurogenesis: stem cells and neuronal development in the adult brain". *Oxford University Press*, Oxford UK.

Kempermann, G., Rupert W. Overall<sup>1</sup>, Maciej Paszkowski-Rogacz<sup>2</sup> (2012). "The Mammalian Adult Neurogenesis Gene Ontology (MANGO) Provides a Structural Framework for Published Information on Genes Regulating Adult Hippocampal Neurogenesis."

Komatsu, T., K. Takeuchi, J. Yokoo, Y. Tanaka and B. Gotoh (2000). "Sendai virus blocks alpha interferon signaling to signal transducers and activators of transcription." J Virol **74**(5): 2477-2480.

Krämer, O. H. and T. Heinzel (2010). "Phosphorylation-acetylation switch in the regulation of STAT 1 signaling." Mol Cell Endocrinol **315**(1-2): 40-48.

Köster, M., T. Frahm and H. Hauser (2005). "Nucleocytoplasmic shuttling revealed by FRAP and FLIP technologies." Curr Opin Biotechnol **16**(1): 28-34.

Köster, M. and H. Hauser (1999). "Dynamic redistribution of STAT 1 protein in IFN signaling visualized by GFP fusion proteins." Eur J Biochem **260**(1): 137-144.

Kudo, T., Y. Ikehara, A. Togayachi, M. Kaneko, T. Hiraga, K. Sasaki and H. Narimatsu (1998). "Expression cloning and characterization of a novel murine alpha1, 3-fucosyltransferase, mFuc-TIX, that synthesizes the Lewis x (CD15) epitope in brain and kidney." J Biol Chem **273**(41): 26729-26738.

Kukowska-Latallo, J. F., R. D. Larsen, R. P. Nair and J. B. Lowe (1990). "A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group alpha(1,3/1,4)fucosyltransferase." Genes Dev **4**(8): 1288-1303.



Kumar, R., B. Potvin, W. A. Muller and P. Stanley (1991). "Cloning of a human alpha(1,3)-fucosyltransferase gene that encodes ELFT but does not confer ELAM-1 recognition on Chinese hamster ovary cell transfectants." J Biol Chem **266**(32): 21777-21783.

Levy, D. E. and J. E. Darnell (2002). "Stats: transcriptional control and biological impact." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 651-662.

Lodige, I. (2006). "Untersuchungen zur Rolle des Kernexportes des Transkriptionsfaktors STAT1 in der Cytokinabhängigen Geninduktion." Dissertation.

Lowe, J. B., J. F. Kukowska-Latallo, R. P. Nair, R. D. Larsen, R. M. Marks, B. A. Macher, R. J. Kelly and L. K. Ernst (1991). "Molecular cloning of a human fucosyltransferase gene that determines expression of the Lewis x and VIM-2 epitopes but not ELAM-1-dependent cell adhesion." J Biol Chem **266**(26): 17467-17477.

Lühn K, Laskowska A, Pielage J, Klämbt C, Ipe U, Vestweber D, Wild MK. Exp Cell Res.(2004). "Identification and molecular cloning of functional GDP-Fucose transporter in *Drosophila melanogaster*." Dec 10;301(2):242-50.

Ma, B., Simala-Grant, JL. And Taylor DE., (2006) "Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes." Glycobiology Vol. 16 no. 12: 158R-184R.

Mao, X., Z. Ren, G. N. Parker, H. Sonderrmann, M. A. Pastorello, W. Wang, J. S. McMurray, B. Demeler, J. E. Darnell and X. Chen (2005). "Structural bases of unphosphorylated STAT 1 association and receptor binding." Mol Cell **17**(6): 761-771.

Melen, K., R. Fagerlund, J. Franke, M. Kohler, L. Kinnunen and I. Julkunen (2003). "Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT 1, STAT 2, and influenza A virus nucleoprotein." J Biol Chem **278**(30): 28193-28200.

Melen, K., L. Kinnunen and I. Julkunen (2001). "Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs." J Biol Chem **276**(19): 16447-16455.

Melén, K., R. Fagerlund, M. Nyqvist, P. Keskinen and I. Julkunen (2004). "Expression of hepatitis C virus core protein inhibits interferon-induced nuclear import of STATs." J Med Virol **73**(4): 536-547.

Meyer, T. and U. Vinkemeier (2004). "Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors." Eur J Biochem **271**(23-24): 4606-4612.

Milocco, L. H., J. A. Haslam, J. Rosen and H. M. Seidel (1999). "Design of conditionally active STATs: insights into STAT activation and gene regulatory function." Mol Cell Biol **19**(4): 2913-2920.

Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." Annu Rev Neurosci **28**: 223-250.

Nakayama, F., S. Nishihara, H. Iwasaki, T. Kudo, R. Okubo, M. Kaneko, M. Nakamura, M. Karube, K. Sasaki and H. Narimatsu (2001). "CD15 expression in mature granulocytes is determined by alpha 1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by alpha 1,3-fucosyltransferase IV." J Biol Chem **276**(19): 16100-16106.

Nakazawa, K., T. J. McHugh, M. A. Wilson and S. Tonegawa (2004). "NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory." Nat Rev Neurosci **5**(5): 361-372.

Natsuka, S., K. M. Gersten, K. Zenita, R. Kannagi and J. B. Lowe (1994). "Molecular cloning of a cDNA encoding a novel human leukocyte alpha-1,3-fucosyltransferase capable of synthesizing the sialyl Lewis x determinant." J Biol Chem **269**(32): 20806.

Niemelä, R., J. Natunen, M. L. Majuri, H. Maaheimo, J. Helin, J. B. Lowe, O. Renkonen and R. Renkonen (1998). "Complementary acceptor and site specificities of Fuc-TIV and Fuc-TVII allow effective biosynthesis of sialyl-TriLex and related polylectosamines present on glycoprotein counterreceptors of selectins." J Biol Chem **273**(7): 4021-4026.

Nilsson, T., Slusarewicz, P., Hoe, M.H., and Warren, G., (1993) "Kin recognition. A model for the retention of Golgi enzymes". *FEBS Lett.*, **330**, pp 1-4.

Nilsson, T., Rabouille, C., Hui, N., Watson, R., and Warren, G., (1996) "The role of the membrane-spanning domain and stalk region of N-acetylglucosaminyltransferase I in retention, kin recognition and structural maintenance of the Golgi apparatus in HeLa cells." *J. Cell Sci.*, 109, pp 1975–1989.

Nishihara, S., H. Iwasaki, M. Kaneko, A. Tawada, M. Ito and H. Narimatsu (1999). "Alpha1,3-fucosyltransferase 9 (FUT9; Fuc-TIX) preferentially fucosylates the distal GlcNAc residue of polylactosamine chain while the other four alpha1,3FUT members preferentially fucosylate the inner GlcNAc residue." *FEBS Lett* **462**(3): 289-294.

Nishio, M., D. Garcin, V. Simonet and D. Kolakofsky (2002). "The carboxyl segment of the mumps virus V protein associates with Stat proteins in vitro via a tryptophan-rich motif." *Virology* **300**(1): 92-99.

Ogata K, Kosaka T. (2002). "Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience*" 113(1):221-33.

Ottenhoff, T. H., F. A. Verreck, E. G. Lichtenauer-Kaligis, M. A. Hoeve, O. Sanal and J. T. van Dissel (2002). "Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae." *Nat Genet* **32**(1): 97-105.

Parisien, J. P., J. F. Lau, J. J. Rodriguez, B. M. Sullivan, A. Moscona, G. D. Parks, R. A. Lamb and C. M. Horvath (2001). "The V protein of human parainfluenza virus 2 antagonizes type I interferon responses by destabilizing signal transducer and activator of transcription 2." *Virology* **283**(2): 230-239.

Park, C., S. Li, E. Cha and C. Schindler (2000). "Immune response in STAT 2 knockout mice." *Immunity* **13**(6): 795-804.

Patnaik SK, Zhang A, Shi S, Stanley P (2000). "alpha(1,3)fucosyltransferases expressed by the gain-of-function Chinese hamster ovary glycosylation mutants LEC12, LEC29, and LEC30." *Arch Biochem Biophys.* **2000** Mar 15;375(2):322-32.

Pilz, A., K. Ramsauer, H. Heidari, M. Leitges, P. Kovarik and T. Decker (2003). "Phosphorylation of the STAT 1 transactivating domain is required for the response to type I interferons." *EMBO Rep* **4**(4): 368-373.

Poole, E., B. He, R. A. Lamb, R. E. Randall and S. Goodbourn (2002). "The V proteins of simian virus 5 and other paramyxoviruses inhibit induction of interferon-beta." Virology **303**(1): 33-46.

Prabhakar, S., Y. Qiao, Y. Hoshino, M. Weiden, A. Canova, E. Giacomini, E. Coccia and R. Pine (2003). "Inhibition of response to alpha interferon by Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun **71**(5): 2487-2497.

Pranada, A. L., S. Metz, A. Herrmann, P. C. Heinrich and G. Müller-Newen (2004). "Real time analysis of STAT3 nucleocytoplasmic shuttling." J Biol Chem **279**(15): 15114-15123.

Reich, N. C. (2007). "STAT dynamics." Cytokine Growth Factor Rev **18**(5-6): 511-518.

Reich, N. C. and L. Liu (2006). "Tracking STAT nuclear traffic." Nat Rev Immunol **6**(8): 602-612.

Rodriguez, J. J., C. D. Cruz and C. M. Horvath (2004). "Identification of the nuclear export signal and STAT-binding domains of the Nipah virus V protein reveals mechanisms underlying interferon evasion." J Virol **78**(10): 5358-5367.

Rolls, E. T. and A. Treves (1994). "Neural networks in the brain involved in memory and recall." Prog Brain Res **102**: 335-341.

Saito, S., T. Ogino, N. Miyajima, A. Kato and M. Kohase (2002). "Dephosphorylation failure of tyrosine-phosphorylated STAT 1 in IFN-stimulated Sendai virus C protein-expressing cells." Virology **293**(2): 205-209.

Sasaki, K., K. Kurata, K. Funayama, M. Nagata, E. Watanabe, S. Ohta, N. Hanai and T. Nishi (1994). "Expression cloning of a novel alpha 1,3-fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl Lewis x carbohydrate determinants in leukocytes." J Biol Chem **269**(20): 14730-14737.

Schindler, C., D.E. Levy, und T.Decker (2007). "JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines." J Biol Chem. 282:20059-63.

Scoville, W. B. and B. MILNER (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." J Neurol Neurosurg Psychiatry **20**(1): 11-21.

Soler-Lopez, M., C. Petosa, M. Fukuzawa, R. Ravelli, J. G. Williams and C. W. Müller (2004). "Structure of an activated Dictyostelium STAT in its DNA-unbound form." Mol Cell **13**(6): 791-804.

Uddin, S., A. Sassano, D. K. Deb, A. Verma, B. Majchrzak, A. Rahman, A. B. Malik, E. N. Fish and L. C. Plataniias (2002). "Protein kinase C-delta (PKC-delta ) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of STAT 1 on serine 727." J Biol Chem **277**(17): 14408-14416.

Vinkemeier, U., I. Moarefi, J. E. Darnell and J. Kuriyan (1998). "Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4." Science **279**(5353): 1048-1052.

Wenta, N. (2008). Einfluss der Tyrosin-Phosphorylierung auf die Selbstassoziation des Transkriptionsfaktors STAT1 . Dissertation. Freie Universität Berlin.

Weston, B. W., R. P. Nair, R. D. Larsen and J. B. Lowe (1992). "Isolation of a novel human alpha (1,3)fucosyltransferase gene and molecular comparison to the human Lewis blood group alpha (1,3/1,4)fucosyltransferase gene. Syntenic, homologous, nonallelic genes encoding enzymes with distinct acceptor substrate specificities." J Biol Chem **267**(6): 4152-4160.

Weston, B. W., P. L. Smith, R. J. Kelly and J. B. Lowe (1992). "Molecular cloning of a fourth member of a human alpha (1,3)fucosyltransferase gene family. Multiple homologous sequences that determine expression of the Lewis x, sialyl Lewis x, and difucosyl sialyl Lewis x epitopes." J Biol Chem **267**(34): 24575-24584.

Yeo-Jung Na, Jae-Kwang Jin, Jae-Il Kim, Eun-Kyoung Choi, Richard I. Carp, Young-Sun Kim (2007). "JAK-STAT signaling pathway mediates astrogliosis in brains of scrapie- infected mice. Journal of Neurochemistry, 103,637-649."

Yokota, A., M. Narazaki, Y. Shima, N. Murata, T. Tanaka, M. Suemura, K. Yoshizaki, H. Fujiwara, I. Tsuyuguchi and T. Kishimoto (2001). "Preferential and persistent activation of the STAT 1 pathway in rheumatoid synovial fluid cells." J Rheumatol **28**(9): 1952-1959.

Zhao, C., E. M. Teng, R. G. Summers, G. L. Ming and F. H. Gage (2006). "Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus." J Neurosci **26**(1): 3-11.

## 7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Veranschaulichung der Aktivierung von STAT- Proteinen	3
Abbildung 2:	Vereinfachte Darstellung der Domänenstruktur der Familie der STAT-Proteine	6
Abbildung 3:	Frontalschnitt durch den Hippocampus	11
Abbildung 3a:	Verschaltung im Hippocampus	12
Abbildung 4:	Vergleich der Transkriptionsrate von STAT 1 und STAT 2 in unterschiedlichen Gehirnarealen in der Altersstufe P0	33
Abbildung 5:	Vergleich der Transkriptionsrate von STAT 1 und STAT 2 in unterschiedlichen Gehirnarealen in der Altersstufe P42	35
Abbildung 6:	Vergleich der Transkriptionsrate von STAT 1 und STAT 2 in unterschiedlichen Gehirnarealen in der Altersstufe P365	36
Abbildung 7:	Vergleich der Genexpression von STAT 1 der Altersstufen P0, P42, P365	39
Abbildung 8:	Vergleich der Genexpression von STAT 2 der Altersstufen P0, P42, P365	39

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die biologische Bedeutung der STAT- Proteine	4
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen	23
Tabelle 3: Konzentration der extrahierten RNA	25
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen	26
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen	27
Tabelle 6: Inhalt 2x QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix	28
Tabelle 7: Probenverteilung einer 96-Well-Platte	29
Tabelle 8: Relative Quantifizierung mittels Ct- Wert	30



## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Stefanie Wernze