

**Speziesspezifische proteomische Aspekte der axonalen
Regeneration retinaler Ganglienzellen am Beispiel
der Ratte (*Rattus norvegicus*) und
des Affen (*Callithrix jacchus*)**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Karin Rose
aus Meschede

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 02.09.2004 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. P. Imming

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. S. Thanos

Tag der mündlichen Prüfung am 03.09.2004

Das Leben ist voller Geheimnisse.

Das Abenteuer liegt darin, sie zu entdecken.

Meiner Familie

Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank *Herrn Prof. Dr. Dr. Solon Thanos*, Leiter der Experimentellen Ophthalmologie der Universitäts-Augenklinik Münster, für die ausgezeichnete Betreuung dieser Dissertation und mehrjährige enge Zusammenarbeit. Durch die Vergabe dieses interessanten und lehrreichen Themas, sowie anregenden Diskussionen und Hilfestellungen war er wesentlich an meiner wissenschaftlichen Ausbildung auf dem faszinierenden Gebiet der Regenerationsforschung beteiligt. Die Kombination seiner wissenschaftlichen Expertise, Kreativität und Menschlichkeit haben mich immer wieder beeindruckt. Über die ideellen Aspekte der Betreuung hinaus, hat er meine Stelle aus Drittmitteln finanziert.

Ferner bedanke ich mich ganz herzlich bei ...

...*Herrn Prof. Dr. Peter Imming*, Institut für Pharmazeutische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für sein Interesse an dieser Arbeit, interessante Gespräche und nicht zuletzt für die Übernahme des Erstgutachtens.

... *Frau Mechthild Langkamp-Flock* für die exzellente Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung bei allen, insbesondere den biochemischen Arbeiten. Durch ihr unermüdliches Engagement hat sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

... *Frau Mechthild Wissing, Frau Ilka Romann* und *Frau Helene Seifried* für die stets umsichtige und zuverlässige Hilfe beim Anfertigen der Kryoschnitte und immunhistochemischen Experimente.

... *Frau Dr. Simone König* und *Herrn Martin Zeller*, IFG Münster, für die Durchführung und Auswertung der MALDI-MS-Analysen und darüber hinaus entwickelte Freundschaft.

... *Herrn PD Dr. Peter Heiduschka* und *Herrn Fabian Volk* für ihre Hilfe bei den zahlreichen Computerproblemen.

... *Frau Dr. Rita Naskar* für die Unterstützung im linguistischen Bereich, bei immunhistochemischen Experimenten und die kritische Durchsicht von Manuskripten.

... *Frau Marlies Wagner* und *Frau Susanne von der Heide* für die hervorragende und schnelle Ausführung aller Photoarbeiten.

... *Frau Magdalena Reis* für die zuverlässige Hilfe bei der Textverarbeitung und verwaltungstechnischen Fragen.

... *Frau Dr. Petra Ahmann* und meinem Patenonkel *Herrn Karl-Heinz Stork* für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

... bei allen Kollegen der Abteilung für das angenehme, produktive Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

... dem IZKF Münster, das das Projekt finanziell unterstützte.

Nicht zuletzt gilt besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, ohne deren stetige Unterstützung Studium und Promotion nicht möglich gewesen wären.

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfat
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
KoIG	Kollagen G
2D-E	Zweidimensionale Gelelektrophorese
2D-DIGE	Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese
DiI	1, 1' – Dioctadecyl- 3, 3, 3', 3' – tetramethylindocarbocyaninperchlorat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazellulärmatrix
FCs	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAP-43/43P	<i>growth-associated protein-43 kDa/phosphorylated</i>
GCL	Ganglienzellschicht (<i>ganglion cell layer</i>)
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
INL	Innere Kernschicht (<i>inner nuclear layer</i>)
IPL	Innere plexiforme Schicht (<i>inner plexiform layer</i>)
IPG	<i>immobilized pH-gradient</i>
kDa	Kilodalton
LM-1	Laminin-1
LM-2	Laminin-2, Merosin
2-ME	2-Mercaptoethanol
MALDI-TOF-MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
mc	<i>monoclonal</i>
ONL	Äußere Kernschicht (<i>outer nuclear layer</i>)
OPL	Äußere plexiforme Schicht (<i>outer plexiform layer</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
pc	<i>polyclonal</i>
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Peripheres Nervensystem
RGZ	Retinale Ganglienzelle (n)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
TBST	<i>tris-buffered saline-Tween</i>
TEMED	N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZNS	Zentrales Nervensystem

Verwendete Abkürzungen für die verschiedenen Operationstechniken und Proben:

LI	Linsenverletzung (<i>lens injury</i>)
OC	Offene Quetschung (<i>open crush</i>)
OC+LI	Kombination von <i>open crush</i> und <i>lens injury</i>
Expl. Kontrolle	explantierte, unbehandelte Retina
Expl. Kontrolle inv	invers explantierte, unbehandelte Retina
Expl. Sh-op+Rti	explantierte, "schein"-operierte und durch Einstich auf Limbushöhe verletzte Retina
Expl. OC	explantierte, durch <i>open crush</i> vorbehandelte Retina
Expl. LI	explantierte, durch <i>lens injury</i> vorbehandelte Retina
Expl. OC+LI	explantierte, durch <i>open crush</i> und <i>lens injury</i> vorbehandelte Retina
Expl. OC+LI inv	invers explantierte, durch <i>open crush</i> und <i>lens injury</i> vorbehandelte Retina
LH	Linsenhomogenat (<i>lens homogenate</i>)
Nbrb	Gehirnhomogenate neugeborener Ratten (<i>new born rat brain</i>)

Inhaltsverzeichnis

Seite

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Vorwort	1
1.2. Das Problem der Regeneration im Zentralnervensystem	1
1.2.1. Inhibitorische Einflüsse der glialen Umgebung im ZNS	2
1.2.2. Altersabhängiger Rückgang der intrinsischen Regenerationsfähigkeit.....	5
1.2.3. Mangel an regenerationsfördernden Substanzen	6
1.3. Kristalline.....	7
1.4. Proteomik und 2D-Elektrophorese	9
1.5. Aufbau und Funktion der Retina.....	12
1.6. Ziele der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Versuchstiere	15
2.1.1. Ratten.....	15
2.1.2. Affen.....	15
2.2. Operationen an der Ratte	16
2.2.1. Material.....	16
2.2.2. Anästhesie, postoperative Versorgung und Tötung der Ratten.....	16
2.2.3. Offene Quetschung (<i>open crush</i>) des Sehnervs der Ratte.....	17
2.2.4. Traumatisierung der Linse (<i>lens injury</i>) durch Kapselruptur.....	18
2.2.5. Schein-Operationen	19
2.3. Gewebekultur.....	20
2.3.1. Material.....	20
2.3.1.1. Kulturmedien, Puffer und Verbrauchsmaterial	20
2.3.1.2. Geräte und sonstiges Material.....	21
2.3.2. Vorbereitung und Anlegen der Gewebekultur	22

2.3.2.1. Kultivierungssubstrate	22
2.3.2.2. Beschichtung der Petripermschalen	23
2.3.2.3. Präparation und Explantation der Retina	24
2.3.3. Kulturbedingungen	27
2.3.4. Quantifizierung der Regenerationseffizienz von retinalen Ganglienzellen.....	27
2.3.5. Ermittlung der Faserlänge und der Wachstumsgeschwindigkeit	28
2.4. Lichtmikroskopische Untersuchungen und retrograde Färbung	28
2.4.1. Material.....	28
2.4.2. Immunhistochemie	30
2.4.2.1. Gewinnung von Kryostatschnitten.....	31
2.4.2.2. Immunhistochemie an Kryoschnitten der Retina und Retinaexplantaten	31
2.4.2.3. Immunhistochemie an <i>Whole-mounts</i> von Retinaexplantaten	32
2.4.3. Fluoreszenzmikroskopie	32
2.4.3.1. Retrograde Färbung regenerierender retinaler Ganglienzellen	32
2.5. Biochemische Verfahren.....	33
2.5.1. Material.....	33
2.5.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	33
2.5.1.2. Geräte und Zubehör	35
2.5.2. Probengewinnung	36
2.5.3. Proteinbestimmung	36
2.5.4. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.5.4.1. Lösungen.....	37
2.5.4.2. Gießen der Gele	38
2.5.4.3. Probenaufarbeitung, Probenauftrag und Elektrophoresebedingungen	39
2.5.4.4. Färbung der Gele.....	40
2.5.5. Western Blotting.....	42
2.5.5.1. Proteintransfer.....	42
2.5.5.2. Detektion und immunologischer Nachweis	43
2.5.6. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)	45
2.5.6.1. Lösungen.....	47
2.5.6.2. Probenaufarbeitung	48
2.5.6.3. Probenauftrag und Rehydratation eines IPG-Streifen	49
2.5.6.4. Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension).....	49
2.5.6.5. Gießen der Gele	50
2.5.6.6. Äquilibration der fokussierten IPG-Streifen	51
2.5.6.7. Kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2. Dimension)	51
2.5.6.8. Färbung der Gele.....	51
2.5.6.9. Auswertung der 2D-Gele	52

2.5.6.10. Massenspektrometrische Proteinanalyse (MALDI-MS)	53
2.6. Statistik.....	53
3. Ergebnisse	55
3.1. Regeneration der Rattenretina.....	55
3.1.1. Quantifizierung und Charakterisierung der Regeneration der Rattenretina	55
3.1.2. Einfluß der Vorbehandlung auf die Regeneration	58
3.1.3. Einflüsse der Extrazellulärmatrix	61
3.1.3.1. Einfluß der Extrazellulärmatrix auf die Regeneration	61
3.1.3.2. Einfluß der Extrazellulärmatrix auf die Länge und Wachstumsgeschwindigkeit der Fasern..	63
3.2. Proteomanalyse der regenerierten Rattenretina	66
3.2.1. Expressionsanalyse bekannter Proteine der Rattenretina.....	66
3.2.1.1. Western Blot-Analyse der Rattenretina.....	67
3.2.1.1.1. Einfluß der Regeneration u. weiterer modulierender Effekte auf die Proteinexpression	67
3.2.1.1.2. Detaillierte Analyse des GAP-43 und GFAP	71
3.2.1.2. Immunhistochemische Detektion bekannter Proteine	73
3.2.1.2.1. Einfluß der Regeneration	73
3.2.1.2.2. Einfluß der Vorbehandlung auf die GAP-43- und GFAP-Expression	80
3.2.2. Untersuchung differentiell exprimierter Proteine mittels 2D-PAGE.....	82
3.2.2.1. Etablierung und Optimierung der 2D-PAGE der Rattenretina.....	82
3.2.2.2. Kartierung des Retinaproteoms der Ratte	85
3.2.2.3. Vergleichende Analyse der 2D-Gele	88
3.2.2.4. Experimentelle Strategien zur Optimierung der Identifizierung differentiell exprimierter Proteine	89
3.3. Regeneration der Affenretina.....	91
3.3.1. Quantifizierung und Charakterisierung der Regeneration der Affenretina	91
3.3.2. Nachweis der neuronalen Herkunft der auswachsenden Fasern	93
3.3.3. Charakterisierung der regenerierenden Ganglienzellen	94
3.3.4. Substratabhängigkeit der Regeneration	95
3.3.5. Altersabhängigkeit der Regeneration.....	98
3.3.6. Einfluß des Alters auf die Regenerationsgeschwindigkeit und Faserlänge	101
3.4. Proteomanalyse der regenerierten Affenretina	103
3.4.1. Expressionsanalyse bekannter Proteine der Affenretina.....	103
3.4.1.1. Western Blot-Analyse der Affenretina.....	103
3.4.1.1.1. Regenerationsabhängige Proteinexpression	103
3.4.1.1.2. Altersabhängige Proteinexpression	106

3.4.1.2. Immunhistochemische Analyse der Affenretina	108
3.4.2. Untersuchung differentiell exprimierter Proteine mittels 2D-PAGE.....	111
3.4.2.1. Kartierung des Retinaproteoms des Affen	111
3.4.2.2. Analyse differentiell exprimierter Proteine.....	114
3.4.2.3. Altersabhängige Proteinexpression	114
3.4.2.3.1. Regenerationsabhängige Proteinexpression	117
3.4.2.4. 2D-DIGE-Analyse	120
4. Diskussion.....	122
4.1. Regeneration retinaler Ganglienzellen von Ratte und Affe.....	122
4.2. Einfluß der intrinsischen Fähigkeit auf die Regeneration	126
4.3. Regenerationsstimulierende Wirkung der Linsenverletzung.....	129
4.3.1. Welche Effekte hat die Linsenverletzung?	129
4.3.2. Wodurch werden die Effekte der Linsenverletzung vermittelt?	131
4.4. Einfluß der Glia auf die Regeneration.....	135
4.5. Einfluß der Kristalline auf die Regeneration	138
4.6. Proteomanalyse der regenerierten Retina.....	143
4.6.1. 2D-Analyse	143
4.6.2. Eignung der Modellsysteme	147
4.6.3. 2D-Kartierung der Retina	152
4.6.4. Bedeutung regulierter Spots für das Regenerationsgeschehen	154
4.6.4.1. Differentiell exprimierte Proteine der Rattenretina.....	154
4.6.4.2. Differentiell exprimierte Proteine der Affenretina.....	157
4.6.5. Schlussbetrachtung	162
5. Zusammenfassung	163
6. Literaturverzeichnis	165
7. Lebenslauf	191
8. Publikationsliste.....	193

1. Einleitung

1.1. Vorwort

Im Verlauf seines Lebens ist der Organismus permanent sich verändernden Umweltbedingungen, Krankheiten und Verletzungen ausgesetzt, an die er sich durch den kontinuierlichen Ersatz von Zellen in Form und Funktion anpassen kann. Eine Ausnahme stellt dabei das Zentrale Nervensystem (ZNS) von Vögeln und Säugetieren dar, dessen Neurone nach ihrer Ausdifferenzierung die Fähigkeit zur Teilung und Regeneration durchtrennter Axone verlieren. Als Konsequenz führen Verletzungen und Schädigungen des ZNS, wie etwa durch Trauma, Blutung oder Ischämie, zu irreversiblen partiellen oder totalen funktionellen Defiziten. Diese äußern sich in kognitiven Störungen oder Demenz (M. Parkinson, M. Alzheimer) sowie bei Durchtrennung zentraler Nervenbahnen des Rückenmarks oder Sehnervens in Lähmungen bzw. Erblindung. Neben dem damit verbundenen individuellen Leid der Betroffenen unterstreichen auch die nachfolgenden enormen Rehabilitations- und Pflegekosten unter sozioökonomischem Aspekt die Dringlichkeit der Suche nach Therapiemöglichkeiten in der ZNS Regeneration. Während sich eine Forschungsstrategie auf den Ersatz zerstörter Zellen bzw. Nervenbahnen durch Transplantation von Stammzellen und Axonen des regenerationsfähigen, peripheren Nervensystems konzentriert, strebt der zweite Ansatz, der auch im Rahmen dieser Arbeit verfolgt wurde, die Aufklärung der am Überleben und Regeneration der Neurone beteiligten Signalwege und daraus resultierender medikamentöser Interventionsmöglichkeiten an.

1.2. Das Problem der Regeneration im Zentralnervensystem

Die Entwicklung von Gehirn und Rückenmark ist durch zahlreiche Zellproliferationen, -migrationen und Wachstum von Neuronen charakterisiert. Im Zuge ontogenetischer Entwicklungs- und postnataler Reifungsprozesse, gehen diese Fähigkeiten jedoch im adulten ZNS von Säugern und Vögeln verloren. Das periphere Nervensystem (PNS) sowie das ZNS von kaltblütigen Wirbeltieren wie Fischen und Amphibien behält dieses Regenerationsvermögen dagegen zeitlebens (Sperry, 1944). Nach der Beobachtung von Ramon y Cajal, dass durchtrennte ZNS Axone adulter Säugetiere nicht erneut

auswachsen und die verletzten Neurone abstarben, etablierte sich das Dogma der Nichtregenerierbarkeit zentraler Neurone. Erst 1981 konnten David und Aguayo zeigen, dass Neurone des adulten ZNS von Säugern grundsätzlich zur Regeneration von Axonen fähig sind, sofern eine geeignete, wachstumspermissive Umgebung vorliegt. Ihre Beobachtung, dass durchtrennte Axone des Spinaltrakts der Ratte in ein Transplantat aus peripheren Nerven (z.B. Ischiasnerv) wachsen, initiierte zahlreiche weitere Untersuchungen zur Regenerationsfähigkeit verschiedener Nervenzellen des ZNS. So konnte die Regeneration zentraler Neurone in verschiedenen ZNS-Regionen, wie etwa im *Cortex* (Benfey and Aguayo, 1982), im olfaktorischen System (Friedman and Aguayo, 1985) oder am Sehnerv (Vidal-Sanz et al., 1987) bestätigt werden. Ebenso zeigten adulte Retinae nach Explantation auf Laminin-beschichteten Kulturschalen ein axonales Auswachsen (Bähr et al., 1988). Diese grundlegenden Versuche offenbarten, dass neben dem reifungsassoziierten Verlust bzw. der Reduktion der intrinsischen Regenerationsfähigkeit der Neurone die Modulation der glialen Mikroumgebung eine entscheidende Bedeutung für das Regenerationsgeschehen hat. Nachfolgend sollen die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Aspekte der verschiedenen regenerationsmodulierenden Einflüsse dargestellt werden.

1.2.1. Inhibitorische Einflüsse der glialen Umgebung im ZNS

Die regenerationshemmende Wirkung der Glia im ZNS wurde bereits von Ramon y Cajal (1914) postuliert und durch verschiedene Ansätze der letzten Jahre bestätigt und modifiziert. Die Glia des ZNS umfasst Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikrogliazellen, deren regenerationsrelevante Charakteristika kurz vorgestellt werden sollen.

Oligodendrozyten

Das von Oligodendrozyten des ZNS gebildete Myelin übt bei Kontakt mit den Axonen einen wachstumshemmenden Effekt aus (Crutcher and Marfurt, 1988, Schwab and Caroni, 1988, Vanselow et al., 1990), der von der Präsenz neurotropher Faktoren unabhängig zu sein scheint (Schwab and Thoenen, 1985). In wegweisenden Arbeiten konnten Caroni und Schwab (Caroni and Schwab, 1988a, 1988b) zeigen, dass von Membranproteinen myelinisierender Zellen regenerationshemmende Effekt ausgehen.

Gegen diese neuriteninhibierenden Proteine von 35 und 250 kDa (NI-35, NI-250) wurden Antikörper entwickelt, deren Applikation *in vitro* die wachstumshemmende Wirkung weißer Gehirns substanz aufheben konnte (Savio and Schwab, 1989) und das Einwachsen von sensorischen Axonen in adulte Sehnerv explantate ermöglichte (Caroni and Schwab, 1988a). Ebenso konnte *in vivo* nach Applikation der Antikörper beim gequetschten Sehnerven der Ratte (Weibel et al., 1994) oder Implantation von Antikörperproduzierenden Zellen in den verletzten corticospinalen Trakt des Rückenmarks (Savio and Schwab, 1990) eine verstärkte Regeneration der Axone beobachtet werden. Die Inhibitoren wurden sequenziert und als Nogos bezeichnet (Chen et al., 2000), erwiesen sich jedoch als nicht myelengebunden, sondern an das Endoplasmatische Retikulum assoziierte Proteine, sogenannte *Reticulone* (GrandPré et al., 2000). Die Regeneration isolierter Wurzelganglionneurone nach Implantation in die weiße Gehirns substanz durch die Gruppe um Silver (1997) wurde dahingehend interpretiert, dass die inhibitorischen Proteine nur bei Verletzung der Oligodendrozyten freigesetzt werden oder an deren Oberfläche gelangen und eine solche Verletzung durch das minimalinvasive Vorgehen hier weitestgehend verhindert wurde (Goldberg and Barres, 2000). Dies stützte die oben genannte Beobachtung von GrandPré und Schwab.

Neben Nogo-A, das dem NI-250 entspricht, vermitteln auch weitere myelin-assoziierte Proteine wie MAG (*myelin-associated glycoprotein*) (McKerracher et al., 1994, Mukhopadhyay et al., 1994) und OMgp (*oligodendrocyte-myelin glycoprotein*) (Wang et al., 2002) ihre regenerationsinhibierende Wirkung durch den neuronalen Nogo-Rezeptor. Seine Blockade in retinalen Ganglienzellen (RGZ) durch Transfektion mit einer dominant-negativen Form (NgR^{DN}) resultierte in einer verstärkten axonalen Regeneration, unter der Voraussetzung, dass die Ganglienzellen sich in einem aktivierten Wachstumsstadium befinden (Fischer et al., 2004). Dies belegte erneut die Bedeutung dieser inhibitorischen Faktoren sowie der intrinsischen Fähigkeit der Neurone für eine erfolgreiche Regeneration.

Oligodendrozyten bilden ferner auch Proteine der Extrazellulärmatrix (EZM) wie Tenascin-R, welches sich als inhibitorisch für die axonale Regeneration adulter Retinaexplantate erwies (Becker et al., 2000).

Astrozyten

Astrozyten stellen den häufigsten Zelltyp im ZNS dar und spielen eine entscheidende

Rolle bei dessen Entwicklung und Homöostase (Tardy, 2002), ZNS-Immunität sowie Plastizität und Regulation von Synapsen (Pfrieger and Barres, 1996). Eine Verletzung des ZNS führt zur lokalen Aktivierung und Hypertrophie der Astrozyten, die durch degenerierte Neurone entstandene Hohlräume narbig ausfüllen. Diese sogenannte Astroglieose kann von regenerierenden Axonen nicht überwunden werden, was zum einen auf eine mechanische Barriere (Cajal, 1928), zum anderen auf die Expression und Ablagerung inhibitorischer Faktoren wie z.B. Chondroitinsulfatproteoglykanen durch die reaktiven Astrozyten erklärt wird (Canning et al., 1996). Die tatsächlichen Ursachen und die Rolle der Astrozyten in diesem Geschehen sind jedoch nicht eindeutig geklärt, da diese auch eine Vielzahl von neurotrophen Faktoren, Zytokinen und EZM-Molekülen, wie z.B. Laminin, exprimieren. Zudem führten neuere Untersuchungen zu der Erkenntnis, dass ihre Anwesenheit essentiell für das Überleben der Neurone ist (Cui et al., 2001, Zhao et al., 2003) und in Kokultur neuronale Regeneration ermöglicht bzw. fördert (Ard et al., 1991, Piontek et al., 2002).

Mikroglia

Mikrogliazellen sind die einzigen mesodermalen Zellen des ZNS. Es wird angenommen, dass Promonozyten der frühembryonalen Phase vor der Etablierung der Blut-Hirn-Schranke aus dem Blut in das ZNS-Parenchym einwandern und dort zu residenten Mikrogliazellen werden (Moore and Thanos, 1996). Sie besitzen wesentliche Eigenschaften immunkompetenter Zellen und sind in der Lage, traumatisierte Zellen als solche zu erkennen und selektiv aus dem Gewebeverbund zu eliminieren (Schnitzer and Scherer, 1990). Neben der beobachteten Phagozytose-Aktivität ist auch eine aktive Beteiligung am Zelltod möglich. Während Mikrogliazellen einerseits neurotrophe Faktoren wie *nerve growth factor* (NGF) (Nagata et al., 1993), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und Laminin produzieren (Rabchevsky and Streit, 1997), können sie andererseits neurotoxische Substanzen wie *tumor necrosis factor α* (TNF α) oder Stickstoffmonoxid (NO) sezernieren (Giulian, 1993, Giulian et al., 1993). Ihre Bedeutung für das Überleben bzw. die Regenerationsfähigkeit axotomierter RGZ konnte durch intravitreale Applikation des *microglia inhibiting factor* (MIF) gezeigt werden. Dies resultierte in einer deutlichen Zunahme überlebender RGZ und regenerierender Axone in ein an den Sehnervstumpf angenähtes Ischiasnervtransplantat in einem bis dahin nicht beobachteten Ausmaß (Thanos and Mey, 1995, Thanos et al., 1993).

1.2.2. Altersabhängiger Rückgang der intrinsischen Regenerationsfähigkeit

ZNS-Neurone wie auch RGZ zeigen eine altersabhängige Abnahme der Fähigkeit zur axonalen Regeneration, die durch eine Verminderung oder gar Verlust des intrinsischen Regenerationspotentials infolge postnataler Reifung und Entwicklung erklärt wird. Als Regenerationsfähigkeit wird dabei die Aktivierung oder Regulation intrazellulärer Signalwege und darin involvierter Komponenten, sowie die Expression wachstumsassoziierter Faktoren verstanden. Eine Verminderung dieser intrinsischen Fähigkeit führt zu einer veränderten Neuritenregeneration *in vitro* (Mey and Thanos, 1991, Vanselow et al., 1991), Affinität zu EZM-Molekülen (Cohen et al., 1986, Hall et al., 1987), Reaktion auf Neurotrophine (Shen et al., 1999) sowie Expression bzw. Modifizierung von Zelladhäsionsmolekülen und Rezeptoren (Cohen et al., 1989, Neugebauer and Reichardt, 1991).

Der Verlust des intrinsischen Regenerationspotentials der Neurone ist jedoch partiell reversibel und wird u.a. durch die neuronale Umgebung beeinflusst. So zeigen sich nicht alle Neuronenpopulationen des adulten ZNS gleichermaßen regenerationsunfähig. Die Transplantation eines peripheren Nerven in *Thalamus*, *Striatum* oder *Cerebellum* ermöglicht die Regeneration zahlreicher Axone aus den Neuronen der entsprechenden Kerngebiete, wogegen thalamocorticale bzw. striatale Projektionsneurone oder Purkinje Zellen des *Cortex* kaum regenerieren (Anderson et al., 1998). Wie in diesem Fall korreliert die Regeneration vieler Neurone, u.a. der RGZ (Meyer et al., 1994, Schaden et al., 1994), mit der Expression des *growth-associated-protein-43* (GAP-43). Die bedeutende Rolle des GAP-43 während der Axonelongation embryonaler Zellen und seine Herunterregulation während der Reifung wurde mit der Abnahme des Regenerationspotentials des adulten ZNS in Korrelation gesetzt (Benowitz and Routtenberg, 1997). Ein weiterer Beleg dafür ist seine kontinuierliche Expression in Gehirnregionen hoher synaptischer Plastizität (Benowitz and Routtenberg, 1997, Skene, 1989) und Reexpression nach Axotomie oder Transplantation des PNS (Plunet et al., 2002, Wouters et al., 1998). Ein Mangel an GAP-43 in retinalen Ganglienzellen der Maus beeinträchtigt jedoch nicht deren Regeneration, sondern die korrekte Wegfindung im optischen Chiasma (Strittmatter et al., 1995). Diese und weitere Beobachtung lassen den

Schluß zu, dass GAP-43 vermutlich über die Modulation von Signalkaskaden und nicht autonom die Regeneration begünstigt (Fishman, 1996).

Ein weiterer Faktor, der die Elongation von Axonen kontrolliert, könnte Bcl-2 sein. Dieses Protooncogen wird in embryonalen RGZ von Mäusen verstärkt exprimiert, dann jedoch parallel zu der abnehmenden Regenerationsfähigkeit der RGZ während der Reifung herunterreguliert (Castren et al., 1994, Chen et al., 1997). Seine Überexpression führte zu einer verbesserten Regeneration adulter RGZ in tectale Explantate (Chen et al., 1997) und demonstrierte seine regulative Funktion für das Überleben und Auswachsen der RGZ.

Daneben stellte sich auch der endogene Gehalt an cAMP (Cai et al., 2001) und Purinnukleosiden wie Inosin (Benowitz et al., 2002, Benowitz et al., 1998) als kritisch für die Regenerationsfähigkeit heraus. Nicht zuletzt muß beachtet werden, dass diese Veränderung nicht unabhängig von der Umgebung der Neurone abläuft, die sich ebenso wie die Neurone selbst, entwicklungsabhängig verändert.

1.2.3. Mangel an regenerationsfördernden Substanzen

Die Axotomie zentraler Neurone führt zu einem verzögerten, retrograden Zelltod, dessen Ausmaß und Beginn sowohl von der Art der Verletzung als auch der Entfernung zum Zellsoma und dem Alter des Tieres abhängt (Berkelaar et al., 1994, Villegas-Perez et al., 1993).

Für eine erfolgreiche Regeneration zentraler Neurone nach Verletzung ist zunächst ihr Überleben essentiell, welches von verschiedenen extrinsischen Faktoren benachbarter und Zellen des Zielgebietes abhängt. Es handelt sich dabei um peptidische Substanzen wie Neurotrophine oder Cytokine, die überwiegend an transmembranäre Thyrosinkinase-Rezeptoren binden und intrazelluläre Signalwege aktivieren. Diese führen zur Aufrechterhaltung wachstumsgerichteter Stoffwechselprozesse und unterdrücken gleichzeitig apoptotische Signalwege (Jacobson et al., 1997). Eine Vielzahl dieser Faktoren wird in den axonalen Zielgebieten der Neurone synthetisiert und gelangt über den retrograden, axonalen Transport in die Zellsomata (Oppenheim, 1991). Kommt es infolge einer Axotomie zu einer Unterbrechung dieser Verbindung und dem Verlust der trophischen Stimuli, können wachstumsgerichtete Stoffwechselfvorgänge nicht länger aufrechterhalten werden und ein retrograder, vorwiegend apoptotischer Zelltod tritt ein

(Berkelaar et al., 1994, Garcia-Valenzuela et al., 1994, Purves, 1988).

Nach neueren Erkenntnissen führt die Axotomie neben dem Verlust der Neurotrophinversorgung auch zu einer verminderten Responsivität der verletzten Neurone auf diese Peptide (Goldberg and Barres, 2000). Dies würde erklären, dass die intravitreale Injektion von neurotrophen Faktoren wie *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) oder *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) den Degenerationsprozeß axotomierter RGZ nur vorübergehend retardiert (Mansour-Robaey et al., 1994, Mey and Thanos, 1993). Die reduzierte Responsivität der verletzten Neurone wird auf verminderte, intrazelluläre cAMP-Spiegel infolge reduzierter elektrischer und synaptischer Aktivität zurückgeführt (Blinzinger and Kreutzberg, 1968, Northmore, 1987), und kann durch entsprechende pharmakologische Maßnahmen wieder gesteigert werden (Shen et al., 1999).

In vitro-Kulturen vereinzelter Rückenmarksneurone und RGZ zeigten ferner, dass die Applikation einzelner neurotropher Faktoren nur schwache, die simultane Gabe mehrerer Faktoren dagegen starke überlebensfördernde Effekte hat (Hanson et al., 1998, Meyer-Franke et al., 1995). Das Überleben verletzter ZNS-Neurone hängt demnach von der kontinuierlichen und kombinierten Freisetzung neurotropher Substanzen durch verschiedene Zellen des optischen Traktes ab. Neben den bereits beschriebenen Faktoren der Zielzellen, wie z.B. BDNF, wirken Faktoren der retinalen Zellen einschließlich der RGZ wie bFGF, LIF und IGF-1 der Astrozyten und das EZM-Protein Merosin neurotroph.

Weitere neurotrophe Faktoren werden fortlaufend entdeckt. So zeigte eine parallel zur Axotomie der RGZ erfolgte Linsenverletzung neuroprotektive und regenerative Effekte (Fischer et al., 2000, Leon et al., 2000). Während diese einerseits auf von Makrophagen sezernierte Faktoren zurückgeführt werden (Yin et al., 2003), scheinen auch intralenticale Faktoren, v.a. Kristalline, eine bedeutende Rolle zu spielen (Fischer et al., 2000).

1.3. Kristalline

Kristalline sind wasserlösliche Proteine, die nach absteigendem Molekulargewicht und zunehmendem isoelektrischen Punkt in α -, β - und γ -Kristalline eingeteilt werden. Nach

ihrer Entdeckung als Hauptbestandteile und Strukturproteine der Linse konnten sie auch in nicht-lentikulären Geweben wie z.B. der Retina nachgewiesen werden. Ihre Aufgaben und Funktionen in diesen Geweben sind jedoch noch nicht voll verstanden (Graw, 1997, Xi et al., 2003).

α -Kristallin

α -Kristalline bilden heteromere Agglomerate von 800-1000 kDa, die sich aus α_A - und α_B -Monomeren (20 bzw. 22 kDa) zusammensetzen. Sie zeigen starke Homologien zu *small heat shock proteins* (sHSP) und wurden neben der Linse (30%) in zahlreichen weiteren Geweben wie auch Gehirn und Retina identifiziert (Bhat and Nagineni, 1989). Neben ihrer Chaperon-Aktivität und Interaktion mit dem Zytoskelett (FitzGerald and Graham, 1991) besitzen sie zellprotektive Funktionen bei thermischem und metabolischem Streß (Klemenz et al., 1991) und können Apoptose durch Inhibierung von Caspasen unterdrücken (Kamradt et al., 2001). Eine Überexpression von α_B -Kristallin wurde bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen des ZNS wie Morbus Parkinson, Adenoleukodystrophie (ADL) und Multipler Sklerose (MS) beobachtet, wenngleich ein direkter Zusammenhang nur bei letzterer postuliert wird (van Noort et al., 2000, van Stipdonk et al., 2000, Xi et al., 2003).

β/γ -Kristalline

β - und γ -Kristalline zeigen gleichartige, konservierte Monomerstrukturen und bilden eine gemeinsame β/γ -Superfamilie. Ihre Proteinstrukturen weisen *Greek-Key*-Motive auf, die ihnen eine ausgeprägte Stabilität und Struktur verleihen, welche für die Linsenfunktion von essentieller Bedeutung ist (Mandal and Lerman, 1993).

β -Kristalline liegen in 6 verschiedenen Monomeren mit einem Molekulargewicht von 22-29 kDa vor, die Di-, Tetra-, Hexa- und Oktamere ausbilden. Dagegen kommen γ -Kristalline vermutlich aufgrund ihres differentiellen N-Terminus nur als Monomere von ca. 20 kDa vor. Obgleich sie in der Retina und anderen Geweben identifiziert wurden (Jones et al., 1999, Magabo et al., 2000), ist die Funktion der β - und γ -Kristalline in nicht-lentikulärem Gewebe unklar. Neben ihrer Aufgabe als Strukturproteine in der Linse, ist eine Funktion für die Erhaltung der Calcium-Homöostase denkbar, da die 4 *Greek-Key*-Motive der Hauptstruktur Calcium binden (Rajini et al., 2001).

1.4. Proteomik und 2D-Elektrophorese

In den vergangenen Jahren spielte die Analyse des Genoms, das die Gesamtheit aller Gene in einem Organismus umfasst, eine entscheidende Rolle in der Forschung und führte zur Sequenzierung zahlreicher Organismen, u.a. des Menschen im Rahmen des *Human Genome Project* (HUGO). Das Genom eines Organismus ist jedoch im Wesentlichen eine Konstante und enthält alle Informationen für mögliche Proteine. Wie das Beispiel der Raupe und des Schmetterlings, beides Phänotypen des identischen Genoms, eindrucksvoll veranschaulicht, hängt der tatsächliche Status einer Zelle von denen zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandenen Proteinen, ihren Funktionen und Wechselwirkungen untereinander ab (Wilkins et al., 1997). Die Erforschung des Proteoms, d.h. der Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle oder einem Gewebetyp exprimiert wird, ist daher nun im Fokus des wissenschaftlichen Interesses und erfasst neben den genetischen Faktoren, die tatsächlich vorhandenen Proteinmengen, den metabolischen Zustand, posttranslationale Modifikationen und Proteininteraktionen. Die Proteomanalyse, kurz Proteomik, bedient sich dazu einer Kombination hochentwickelter Techniken wie 2D-Gelelektrophorese, Bildanalyse, Massenspektrometrie, Edman-Sequenzierung und Bioinformatik (Abb. 1).

Eine der größten Herausforderungen der Proteomanalyse liegt in der reproduzierbaren, quantitativen Auftrennung der bis zu 10000 Proteine einer Zelle, die in Konzentrationen von 10 bis 10^6 Proteinkopien pro Zelle vorliegen können. Die derzeit bestgeeignete Methode dazu ist die 1975 von O'Farrell und Klose entwickelte 2D-Gelelektrophorese (2D-E) (Klose, 1975, O'Farrell, 1975). Dabei werden solubilisierete Proteine zunächst durch isoelektrische Fokussierung (IEF) (1. Dimension) nach ihrer Ladung bzw. isoelektrischen Punkt (pI) und in der sich anschließenden SDS-PAGE (2. Dimension) nach ihrem Molekulargewicht separiert. Das resultierende 2D-Gel zeigt nach Anfärbung oder Autoradiographie mehrere tausend Proteinspots, die jeweils einer einzelnen Proteinspezies der Probe entsprechen. Neben der quantitativen (Hoch- u. Herunterregulation) und qualitativen Analyse (Neusynthese) können auch Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierungen oder Glykosylierungen, die zu einem veränderten pI und/oder Molekulargewicht und daraus resultierender Verschiebung innerhalb des Proteinmusters führen, erfasst und untersucht werden (Abb. 2).

Ogleich das Potential dieser Technik schon lange bekannt ist, führte erst die Entwicklung immobilisierter pH-Gradienten in der 1. Dimension, apparative Verbesserungen, neue massenspektrometrische Techniken sowie die Verfügbarkeit und Erweiterung von Sequenzdatenbanken in den letzten Jahren zur Schaffung der Voraussetzungen für eine rationale Proteomanalyse. Neben ihrer Anwendung zur Charakterisierung von Wirkmechanismen, Zelldifferenzierungsvorgängen und toxikologischen Effekten wird Proteomik auch bei der Untersuchung von Krankheiten wie z.B. Krebs, M. Alzheimer, Schizophrenie (Edgar et al., 1999) oder Makuladegeneration (Crabb et al., 2002) eingesetzt.

Im Bereich des optischen Systems wurde mit Hilfe der 2D-E eine Kartierung der Photorezeptorproteine vorgenommen (Matsumoto and Komori, 2000) und die veränderte Expression und der Transport von Proteinen im optischen Nerv transgener, myelindefekter Mäuse (Jensen and Celis, 1998), nach Axotomie retinaler Ganglienzellen der Ratte (Wodarczyk et al., 1997) oder nach Regeneration beim Goldfisch (Hall and Schechter, 1991) beobachtet. Diese Technik schien daher für die im Rahmen dieser Arbeit angestrebte Untersuchung der differentiellen Proteinexpression regenerativer Zustände der Retina sehr geeignet zu sein und wurde im Labor etabliert.

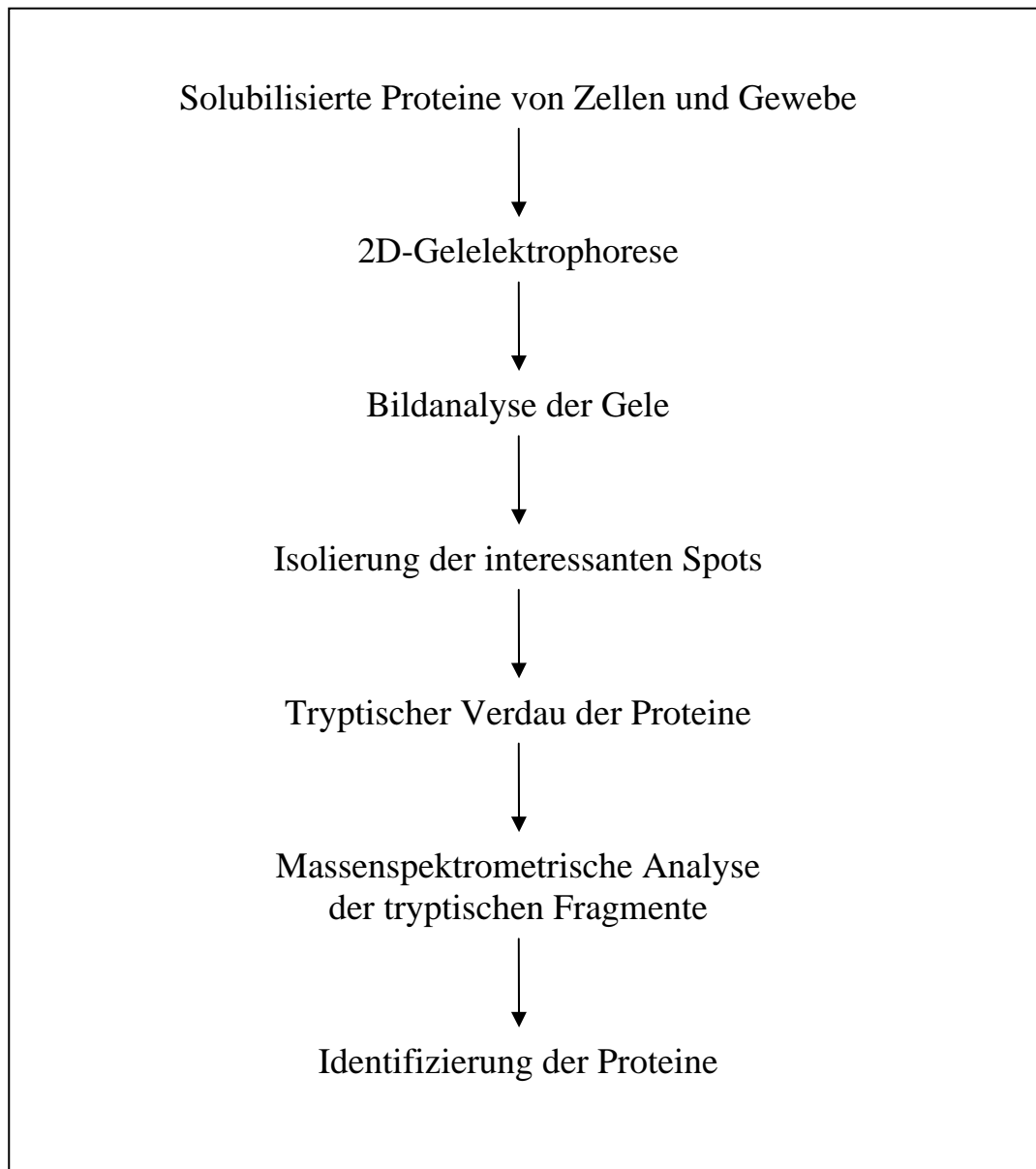


Abb. 1: Flusschema der Proteomik

1.5. Aufbau und Funktion der Retina

Die Retina ist ein gut untersuchter und experimentell leicht zugänglicher Teil des ZNS, deren neuronale Zellen in einer übersichtlichen, geschichteten Struktur angeordnet sind. Die in der äußeren Schicht lokalisierten RGZ bilden als typische Projektionsneurone lange Axone aus, die gebündelt als Sehnerv die Verbindung zu den viszeralen Zielgebieten des Gehirns, Colliculus superior und Nucleus geniculatum, schaffen. Unter experimentellen Bedingungen können diese selektiv geschädigt und nachfolgend zur Regeneration stimuliert werden. Die Retina wird daher häufig, so auch in dieser Arbeit, als Modellsystem zur Untersuchung der Regeneration zentraler Neurone verwendet. Ihre Anatomie und Funktion soll hier anhand einer Graphik kurz vorgestellt werden (Abb. 3).

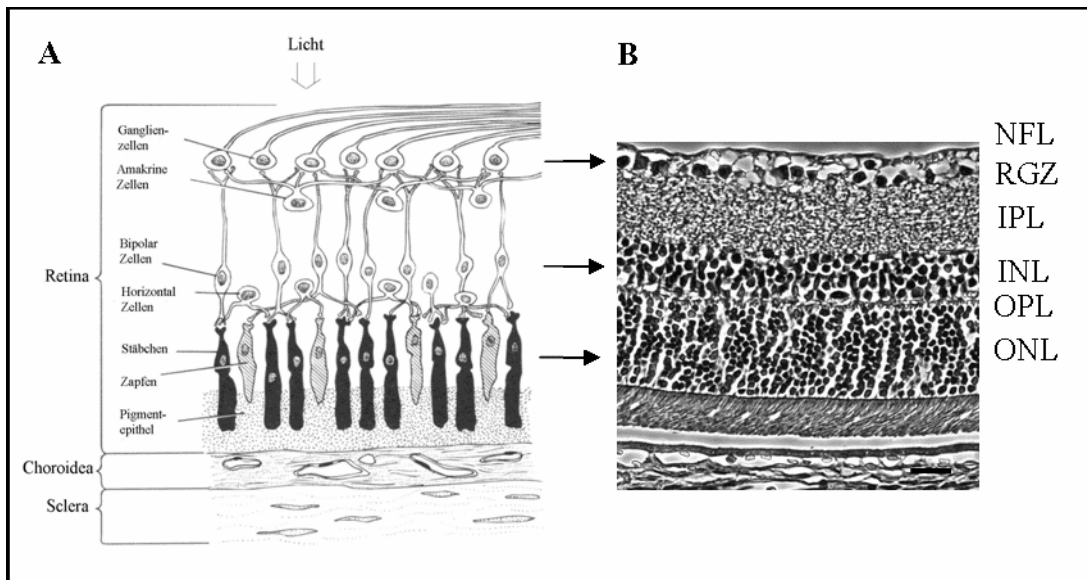


Abb. 3: Aufbau und Funktion der Retina

A) Schematischer Querschnitt durch die Retina

B) Querschnitt (4 µm) durch eine Rattenretina nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Maßstab: 20 µm

Licht fällt von der Ganglienzellschicht her ein und wird in den Photorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen) in elektrische Signale umgewandelt. Das Signal wird über Bipolarzellen der inneren nukleären Schicht (INL) zu den Ganglienzellen weitergeleitet, deren Axone die Optische Faserschicht (NFL) bzw. den Sehnerven bilden. Horizontale und amakrine Zellen bilden intensive Quervernetzungen in den synaptischen Zonen und modulieren die Signalweiterleitung. Dem Pigmentepithel kommen v.a. Funktionen bei der Wiederverwertung des Sehpigmentes Rhodopsin zu. Über die Choroidea (Aderhaut) wird die Retina mit Nährstoffen versorgt, während die kollagenhaltige Sklera (Lederhaut) im Zusammenwirken mit dem intraokularen Druck die Form des Bulbus aufrechterhält.

1.6. Ziele der Arbeit

Das Problem der Nichtregenerierbarkeit zentraler Neurone ist noch immer nicht hinreichend verstanden oder gar gelöst. Verschiedene Ansätze wie die Überexpression oder Stimulation wachstumsassoziierter oder neuroprotektiver Faktoren (Bomze et al., 2001, Cai et al., 2001) führten zu einer begrenzten neuronalen Regeneration (Chen et al., 1997, Gianola and Rossi, 2004) und zeigten, dass eine gezielte Aktivierung des Regenerationsprogramms durch einzelne Komponenten möglich ist. Die im Rahmen dieser Arbeit angestrebte Identifizierung weiterer, in das Regenerationsgeschehen involvierter Faktoren und Signalwege würde zu einem tieferen Verständnis und neuen Ansatzpunkten für die gezielte, umfangreiche Modulation des Regenerationsprozesses bzw. einer möglichen Therapie führen.

Als Modellsystem zur Untersuchung regenerationsassoziierter Veränderungen zentraler Neurone dienten Retinaexplantatkulturen der Ratte und des Affen. Retinale Ganglienzellen, die physiologisch dem ZNS zugerechnet werden, sind morphologisch (Fukuda, 1977, Thanos, 1988) und physiologisch (Fukuda, 1977, Keirstead et al., 1985) eingehend beschrieben und die Retinaorgankultur ein etabliertes System zur Beobachtung regenerativer Vorgänge *in vitro* (Bähr et al., 1988, Ford-Holevinski et al., 1986, Thanos et al., 1989). Das Modell erlaubt eine direkte Beobachtung und Quantifizierung der Regeneration, die Austestung verschiedener Parameter, wie beispielsweise das Ansprechen auf unterschiedliche Extrazellulärmatrices, sowie die Gewinnung des regenerierten Materials für weitere Analysen.

Kürzlich zeigte sich, dass eine parallel zur konditionierenden Quetschung des Sehnerven erfolgende Verletzung der Linse zu einer Regeneration retinaler Ganglienzellen in einem bis dahin noch nicht erzielten Ausmaß führt (Fischer et al., 2000). Damit war es erstmals möglich hochregeneratives Material zu gewinnen, das eine rationale Untersuchung von regenerationsbedingten Proteinexpressionsdifferenzen erlaubt.

Die Identifizierung regenerationsassoziierter Proteine und Signalwege wurde über folgende experimentelle Ziele angestrebt:

1. Charakterisierung und Quantifizierung der Regeneration der Rattenretina im Explantationsmodell

Die Bestimmung der Substratabhängigkeit und des Einflusses von Quetschung und Linsenverletzung sollten erste Hinweise auf regenerationsassoziierte Moleküle und Signalwege geben. Dabei waren v.a. die durch die Linsenverletzung vermittelten Effekte von besonderem Interesse.

2. Etablierung und Charakterisierung des Retinaexplantationsmodells beim Affen

Die für die quantitative Regeneration der RGZ der Ratte notwendige Vorbehandlung in Form einer Quetschung des Sehnervs und Verletzung der Linse erhöht die Komplexität dieses Regenerationsmodells bzw. dessen regenerationsabhängiger Proteinexpression. Es wurde daher ein von einer Vorbehandlung unabhängiges, spontan regenerierendes System gesucht und schließlich in der Retina des Affen *Callithrix jacchus* gefunden. Das Explantationsmodell sollte auf diese Spezies übertragen und optimiert werden. Neben Untersuchungen der alters- und substratspezifischen Regeneration sollte auch in diesem Modell die regenerationsassoziierte Proteinexpression analysiert werden.

3. Identifizierung differentiell exprimierter Proteine in beiden Modellen

Die zweidimensionale Gelelektrophorese sollte etabliert und zur Auftrennung des regenerierten Materials genutzt werden. Resultierende Proteinmuster sollten verglichen und differentiell exprimierte Proteine analysiert werden.

4. Vergleich der regenerationsassoziierten Proteinexpression der beiden Spezies

Für die Entwicklung von neuroprotektiven und -regenerativen Strategien mit klinischer Relevanz ist es von fundamentaler Bedeutung, ob der axonale Regenerationsvorgang speziesübergreifende oder -spezifische Proteomveränderungen hervorruft. Diese Fragestellung sollte daher durch den Vergleich der regenerationsabhängigen Proteinexpression der beiden Modelle diskutiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

2.1.1. Ratten

Als Versuchstiere dienten weibliche Albinoratten des Sprague-Dawley Stammes (*Rattus Norvegicus*) mit einem Gewicht von 180 bis 220 g, die von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen oder selbst gezüchtet wurden (Tierstall UKM). Die Tiere wurden paarweise oder zu dritt bei Raumtemperatur (18-20 °C) unter 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus in üblichen Zuchtbehältern (Makrolonkäfig, Typ III) gehalten und durch eine *ad libitum* Diät aus Standard Zucht- und Haltungsfutter (Altromin GmbH, Lage) und Leitungswasser ernährt. Alle genehmigungspflichtigen Versuche wurden mit Zulassung des Regierungspräsidiums (Versuchsnummern A49/99; G73/99), unter Verantwortung von Prof. Dr. Dr. Thanos durchgeführt und über die Operationen gemäß § 9a (1) des Tierschutzgesetzes Protokoll geführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 112 Ratten benötigt, deren Verteilung sich wie folgt aufschlüsselt:

Regenerationsstudien <i>in vitro</i> (Retinaexplantate) in Abhängigkeit der Vorbehandlung	64 Tiere
der EZM	25 Tiere
Gewinnung von Retinae für biochemische und immunhistochemische Versuche, Western Blotting und 2D-PAGE	23 Tiere

Die Retinaexplantate der Regenerationsstudien *in vitro* wurden anschließend für die biochemischen und immunhistochemischen Versuche verwendet.

2.1.2. Affen

Weibliche und männliche Krallenaffen vom Stamm *Callithrix jacchus jacchus* unterschiedlichen Alters (P0 bis adult) werden vom Institut für Reproduktionsmedizin in Familienverbänden (2-10 Tiere) gehalten und gezüchtet (Haltungsgenehmigungs-Nr.

G67/01). Die Haltung erfolgt in Großraumkäfigen unter Klimatisierung (24°C, 50-55% rel. LF) und einem 12stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Tiere werden durch eine 2mal täglich angebotene Mischung aus Standarddiät (Affen Altromin 0633, Altromin GmbH, Lage) und Spezialnahrung sowie Leitungswasser *ad libitum* ernährt.

Die Tötung der Tiere erfolgte im juvenilen Alter durch Dekapitation, im adulten Stadium nach Narkotisierung der Tiere mit 0,1 ml Ketamin (Ketamin-Lsg 10%, LEVA, Düsseldorf) pro kg KG und anschließendem Ausbluten über die *Arteria* und *Vena femoralis*.

Für die nachfolgenden Versuche wurden uns freundlicherweise die Augen von 42 Affenkadavern (27 neugeborene, zwei 10 Wochen alte, ein 6 Monate altes und 12 adulte Tiere), die im Rahmen der Versuche des Instituts anfielen, zur Verfügung gestellt. Diese wurden enukleiert, die Augen auf Eis zu uns transportiert und unmittelbar präpariert.

Retinaexplantate der Regenerationsstudien *in vitro* wurden anschließend für die biochemischen und immunhistochemischen Versuche verwendet.

2.2. Operationen an der Ratte

2.2.1. Material

Die für die chirurgischen Eingriffe benötigten Instrumente (feine Pinzetten, Dumont-Pinzetten Nr. 4 und Nr. 5, chirurgische Pinzetten, Kapsulotomie-, Vannas-, Präparationsscheren, Faden- und Skalpellhalter mit spitzen und stumpfen Klingen, Knochenzange) stammten von den Firmen Hermle (Tuttlingen) und Roth (Karlsruhe). Tupfer (Zelluvit) von der Größe 2-5 mm wurden selbst zugeschnitten.

Die Operationen wurden an einem Zeiss Operationsmikroskop (OMI 19-FC) bei 4- bis 16-facher Vergrößerung durchgeführt. Des Weiteren standen ein Handstaubsauger und ein handelsüblicher Rasierapparat zur Verfügung.

2.2.2. Anästhesie, postoperative Versorgung und Tötung der Ratten

Alle Operationen wurden an vollständig anästhesierten Tieren nach Kontrolle der Schmerzfreiheit vollzogen. Die Narkose wurde üblicherweise durch eine einmalige intraperitoneale Injektion (i.p.) von 2 mg Xylazin (Xylazin 2%, Sanofi) und 12,5 mg

Ketamin (Ketanest 10%, Sanofi) pro 100 g Körpergewicht herbeigeführt und hielt bei kompletter Analgesie für ca. 1,5 h an. Nach Erreichen des Narkosestadiums, das durch Erlöschen des Lidreflexes sichergestellt werden konnte, wurde vor allen Eingriffen die Kopfhaut der Tiere rasiert. Die Fixierung der Tiere am Operationstisch erfolgte mit Hilfe einer Maulklemme und Klebestreifen, mit denen die Extremitäten befestigt wurden.

Um eine bakterielle Infektion der Hautnähte und ein Austrocknen der Hornhaut zu verhindern, wurden diese postoperativ mit antibiotikahaltiger Salbe (Gentamytrex, Dr. Mann Pharma) versorgt und die Tiere in einen Käfig mit frischer Streu überführt. Einige Stunden nach dem jeweiligen Eingriff sowie an den darauffolgenden Tagen wurden alle Tiere auf Schmerzen und den einwandfreien Zustand der Hautnähte optisch kontrolliert.

Die Tötung der Tiere geschah schmerzlos in CO₂-Atmosphäre.

2.2.3. Offene Quetschung (*open crush*) des Sehnervs der Ratte

Die Quetschung des Sehnervs wurde 5 Tage vor Gewebentnahme für die Regenerationsstudien *in vitro* als konditionierende, das Neuritenwachstum stimulierende Verletzung (Bähr et al., 1988) durchgeführt. Bei allen Versuchen erfolgte dieser Eingriff nur an dem operativ leichter zugänglichen Sehnerv des linken Auges, so dass die Tiere nie beidseitig erblindeten. Die rasierte Kopfhaut der Ratte wurde mit einem Skalpell durch einen ca. 1,5 cm langen, sagittalen Schnitt entlang der Medianlinie aufgetrennt, vorsichtig vom Schädel losgelöst und der linke Kopfhautlappen mit einem chirurgischen Faden (4.0, Ethicon) über das linke Auge weggespannt. Es folgte ein Schnitt durch das Bindegewebe oberhalb des Augapfels entlang des *Os frontale*, durch den der Zugang zur Orbita unter minimaler Verletzung kleinerer Blutgefäße geschaffen wurde. Nach einer partiellen Resektion der Tränendrüse zur leichteren Auffindung des Sehnervs im Retrobulbärraum, wurden die extraokulären Muskeln durchtrennt und Haltefäden (7.0, Ethicon) an ihre am Bulbus verbleibenden Enden angebracht. Der Augapfel wurde vorsichtig aus seiner Höhle gezogen und fixiert, sowie der *N. opticus* aus dem umgebenden Bindegewebe und dem *M. retractor bulbi* freigelegt. Unter Beachtung der Unversehrtheit der *A. centralis*, die die Blutversorgung der Netzhaut sichert und in den Meningen des Sehnervs verläuft, wurde das Perineurium mit einer kleinen Schere längs aufgeschnitten, so dass der freie Sehnerv hervortrat. Dieser wurde nun mit einer feinen Pinzette (4.0) umfasst und für ca. 10 sek gequetscht (*open crush*). Nach Entfernung der

Pinzette blieb eine deutlich sichtbare Läsionsstelle am Sehnerv zurück (Abb. 3).

Eine Überprüfung der intakten Blutversorgung der Retina fand im Anschluß der Operation funduskopisch durch Aplanation der *Cornea* statt. Dazu wurde diese mit Augentropfen (Vidisic, Dr. Mann Pharma) benetzt und der Augenhintergrund durch Andrücken eines Objektträgers an die *Cornea* betrachtet. Eine Verletzung der *A. centralis* konnte bei einer guten Durchblutung der retinalen Gefäße ausgeschlossen werden. Eine parallele Induktion eines traumatischen Katarakts (s. 2.2.4.) erfolgte an dieser Stelle, bevor die Kopfhaut durch eine Naht wieder verschlossen wurde.

2.2.4. Traumatisierung der Linse (*lens injury*) durch Kapselruptur

Für die Regenerationsstudien *in vitro* wurde eine Verletzung der Linse gezielt zur Stimulation der axonalen Regeneration (Fischer et al., 2000) 5 Tage vor der Gewebentnahme herbeigeführt. Dazu mußte zunächst das intraorbitale Operationsfeld analog zur Quetschung geöffnet werden. Mit einer Mikrokapillare, die zuvor mit einem Elektrodenpuller (Narishige, Japan) aus einer Glaskapillaren (50 µl Einmalkapillaren, Brand, Wertheim) gezogen wurde, erfolgte ein transskleraler, transretinaler Einstich in den posterioren Teil der Linse nahe des Linsen-Äquators. Vor dem Herausziehen der Kapillare wurde diese mehrmals leicht um die eigene Achse gedreht, um so den Einstichkanal zu vergrößern. Anhand des deutlich sichtbaren Einstichkanals sowie der in den nachfolgenden Tagen zu beobachteten Eintrübung der Linse (Kataraktentwicklung) wurde eine erfolgreiche Linsenverletzung sichergestellt. Die Linsenverletzung wurde entweder allein (LI) oder in Kombination mit einer Quetschung (OC+LI) durchgeführt (Abb. 3).

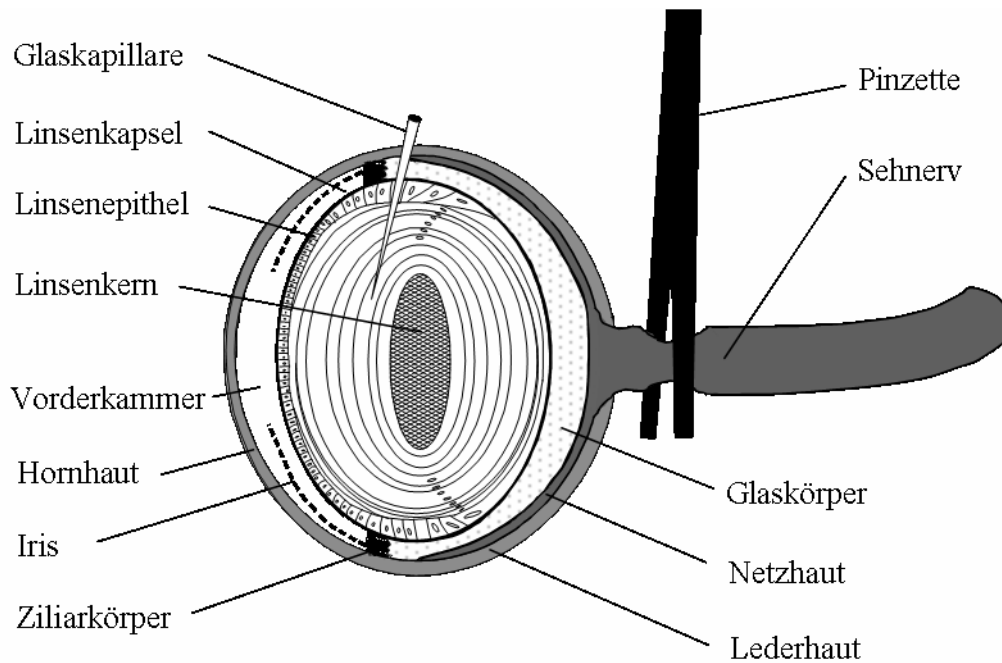


Abb. 3: Offene Quetschung und Linsenverletzung

Der freigelegte Nervus opticus wird mit einer feinen Pinzette umfaßt und für 10 sek gequetscht. Anschließend wird die Linse durch einen transskleralen, transretinalen Einstich mit Hilfe einer Glaskapillare traumatisiert.

2.2.5. Schein-Operationen

Zur Kontrolle der durch die Anästhesie und Operationstraumata evtl. hervorgerufenen Effekte, wurden Tiere analog zu dem bereits beschriebenen Verfahren anästhesiert und der Orbita freigelegt. Parallel wurde die mit der Verletzung der Linse einhergehende Inflammationsreaktion der Retina durch eine Punktion der Retina simuliert. Weitere Eingriffe blieben aus (Sh-op+Rti).

2.3. Gewebekultur

2.3.1. Material

2.3.1.1. Kulturmedien, Puffer und Verbrauchsmaterial

"S4-Medium":

Es handelt sich dabei um ein serumfreies Medium auf der Basis des DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) nach (Needham et al., 1987), das von der Firma Promocell als "Astrocyte Microglia Growth Medium Customer Formulation" produziert wird. Nach Zugabe der 3 separat gelieferten Komponenten BSA+Fettsäuren, Insulin und Choleratoxin setzt sich das Medium wie folgt zusammen:

Glucose	3,50 g/l	MoO ₃	0,14 µg/l
Hepes	3,57 g/l	ZnSO ₄ x H ₂ O	0,29 µg/l
Insulin	5 mg/l	<u>Aminosäuren:</u>	
Choleratoxin	0,01 mg/l	L-Alanin	3,6 mg/l
Putreszin	8 mg/l	L-Asparagin	4,0 mg/l
Na ₂ SeO ₃	4,3 µg/l	L-Asparaginsäure	4,0 mg/l
<u>BSA, Fettsäuren:</u>		L-Glutaminsäure	4,3 mg/l
Rinderserumalbumin	792 mg/l	L-Prolin	8,0 mg/l
Linolsäure	1,51 mg/l	<u>Vitamine:</u>	
Linolensäure	1,00 mg/l	Vitamin C	1 mg/l
<u>Spurenelemente:</u>		MgCl ₂ x 6 H ₂ O	40 mg/l
CrCl ₃ x 6 H ₂ O	0,27 µg/l	Biotin	0,024 mg/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,25 µg/l	DL-α-Liponsäure	0,12 mg/l
MnSO ₄	0,15 µg/l	Vitamin B ₁₂	1,35 mg/l

Hanks's buffered salt solution, pH 7,5 (HBSS, Gibco):

NaCl	8000 mg/l
KCl	400 mg/l
KH ₂ PO ₄	60 mg/l
Na ₂ HPO ₄	48 mg/l
Glucose	1000 mg/l
NaHCO ₃	350 mg/l
Phenolrot	10 mg/l

Angleichung des pH-Wertes mit 0,1 N HCl

Substrate zum Beschichten der Kulturschalen:

Poly-D-Lysin, 200 – 400 kD	(Sigma)
Laminin-1	(Roche)
Laminin-2 (Merosin)	(Chemicon)
Kollagen G	(Biochrom)
Kollagen I (Koll)	(freundl. Gabe von Prof. Galla, Institut für Biochemie, WWU Münster)

Verbrauchsmaterial:

Nitrozellulosefilter (Sartorius): schwarz, Durchmesser 50 mm, Porengröße 0,45 µm

Filterpapier (Whatman): weiß und steril

Petripermschalen (Vivascience): hydrophil, Durchmesser 60 mm, steril

Petrirschalen (Greiner): steril, Durchmesser 35 mm

2.3.1.2. Geräte und sonstiges Material

Axiovert 135 (Zeiss): inverses Mikroskop mit Kamera

Begasungsbrutschrank: BB 6060 (Heraeus), Gaszufuhr von O₂ und CO₂ aus
entsprechenden Hochdruckflüssigkeitsbehältern (Westfalen-Gas)

Gewebehacker: McIlwain Tissue Chopper (Mickle Laboratory Engineering, USA)

Kaltlichtquelle (Schott): KL 1500 electronic

Präparations-Stereomikroskop (Zeiss): STEMI-SR
Sterilbank (Biohit-Helios): vollständig ausgestattet

Präparationsbesteck:

Feine Pinzetten, Löffelchen, Skalpellhalter, Kapsulotomieschere (Hermle, Tuttlingen)
spitze und runde Skalpellklingen (Nr. 10, Nr. 11) (Feather)

Filme:

Iford HP5 Plus: 400 ASA Schwarz-Weiß-Film
Fujichrome sensia II: 400 ASA Farbdia

2.3.2. Vorbereitung und Anlegen der Gewebekultur

2.3.2.1. Kultivierungssubstrate

Folgende Substrate und Extrazellulärmatrices wurden bei den Studien zur EZM-Abhängigkeit der Regeneration getestet:

Poly-D-Lysin:

Poly-D-Lysin ($C_6H_{12}N_2O \times HBr)_n$ (Sigma) ist ein weißer kristalliner Feststoff unterschiedlicher Viskosität, beginnend bei einem Molekulargewicht von 1000-4000 kDa bis hin zu > 300.000 kDa. Seine Eigenschaft auf vielen Materialien (Glas, Plastik, etc.) haften zu können, macht man sich zur Unterstützung der Zellanhaftung an feste Substrate bzw. Kulturböden zu nutze, wobei sich der Einsatz des Hydrobromids mit einem Molekulargewicht > 70.000 kDa als günstig erwiesen hat (Jacobson and Branton, 1977).

Laminin:

Laminine stellen die Hauptkomponente der nicht-kollagenen Glykoproteine der Basalmembran dar. Es handelt sich dabei um große (ca. 800 kDa), heterotrimere Glykoproteine, die sich aus je einer α -, β - und γ -Polypeptidkette zusammensetzen. Diese sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden, glycosyliert und bilden eine kreuzförmige Struktur (Timpl et al., 1979). Laminin ist an einer Vielzahl von Zell-Basalmembran- und Zell-Zell-Interaktionen, wie z.B. Adhäsion, Migration, Proliferation,

Differenzierung und Morphologie beteiligt.

Laminin-1:

LM-1 setzt sich aus je einer α_1 -, β_1 -, und γ_1 -Polypeptidkette zusammen. Im Rahmen dieser Arbeit verwendetes LM-1 (Roche) wird als Laminin-Nidogen-Komplex nach der Methode von (Timpl et al., 1979) aus Maus-Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Sarkom isoliert.

Laminin-2 (Merosin):

LM-2 setzt sich aus je einer α_2 -, β_1 -, und γ_1 -Polypeptidkette zusammen. Hier eingesetztes LM-2 (chemicon) wird aus humanen Placentae gewonnen und chromatographisch aufgereinigt.

Kollagen:

Kollagen ist das häufigste Protein bei Säugern und wichtigster Faserbestandteil von Haut, Knochen, Sehnen, Zähnen und Knorpel. Das stabförmige Molekül ist ca. 300 nm lang, besitzt einen Durchmesser von 1,5 nm und setzt sich aus 3 helikalen α -Polypeptidketten von jeweils 1000 Aminosäuren Länge zusammen. Die Ketten zeigen eine wiederholende Tripeptidsequenz Gly-X-Y, wobei es sich bei X und Y hauptsächlich um Prolin und Hydroxyprolin handelt, sind über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden und bilden Superhelixkabel. Neben Struktur- und Stützfunktion, sind sie an der Zelladhäsion an Substrate, Zelldifferenzierung und der Plättchenaggregation beteiligt (Bornstein and Sage, 1980).

Kollagen I:

Im Arbeitskreis von Prof. Galla (Institut für Biochemie, WWU Münster) wurde Kollagen Typ I nach der Methode von Bornstein (Bornstein, 1958) aus Rattenschwänzen gewonnen und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Kollagen G:

Das gelbildende Kollagen G (biochrom) wird aus Kalbshaut gewonnen. Es handelt sich dabei um eine Mischung aus Kollagen Typ I (95%) und Kollagen Typ III (5%).

2.3.2.2. Beschichtung der Petripermschalen

Das Anlegen der Retinakulturen erfolgte in Petripermschalen, deren dünner, gaspermeabler Membranboden einen guten Gasaustausch des filterbedeckten Gewebes

nach unten erlaubt (Halfter and Deiss, 1984) und die Lebendbeobachtung wachsender Neuriten bei starker Vergrößerung mit dem inversen Mikroskop ermöglicht.

Als Substrat für retinales Neuritenwachstum hatte sich eine natürliche, polykationische Oberfläche als günstig erwiesen (Letourneau, 1979), die als Grundlage für das Glykoprotein Laminin dient. Laminin ist das, soweit bekannt, beste Wachstumssubstrat für Axone retinaler Ganglienzellen (Bähr et al., 1988, Ford-Holevinski et al., 1986, Smalheiser et al., 1984). Durch die Kombination von Poly-D-Lysin und Laminin, kann die ansonsten mäßige Adhäsion des Gewebes an Laminin verbessert und die Anzahl auswachsender Neurite erhöht werden. Zur sterilen Doppelbeschichtung der Schalen wurden diese zunächst mit 1,5 ml Poly-D-Lysin in HBSS ($\cong 15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) vollständig bedeckt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung dieser Lösung und 3×5 min Waschen mit HBSS wurde die Schale mit 1,5 ml Laminin in HBSS ($\cong 1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) befüllt. Diese Lösung verblieb für mindestens 1 h, in der Regel jedoch für 3-4 h (37°C), in der Schale und wurde erst direkt vor Explantation der Retina abgesaugt.

Für die Regenerationsstudien in Abhängigkeit von der verwendeten Extrazellärmatrix wurden die Schalen einfach mit Poly-D-Lysin ($\cong 15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) oder doppelt, mit Poly-D-Lysin als erste Grundlage, mit Laminin-1 ($\cong 1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Laminin-2 (=Merosin) ($\cong 1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Kollagen G (=Kollagen I + III) ($\cong 13,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) oder Kollagen I ($\cong 2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) analog beschichtet.

2.3.2.3. Präparation und Explantation der Retina

Das operierte Auge wurde mit Hilfe einer gebogenen Präparationsschere enukleiert, von anhaftendem Bindegewebe befreit und in eiskalter, sauerstoffgesättigter HBSS-Lösung transportiert und präpariert. Die Präparation mußte unter keimfreien Bedingungen und möglichst rasch erfolgen, so dass das Gewebe zwischen seiner Entnahme aus dem Tier und dem Inkubationsbeginn in Kultur nicht länger als 30 min von der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung abgeschnitten war. Schnelles Arbeiten wurde durch folgende Vorbereitungsschritte unterstützt:

1. Dünne Whatmanfilterpapiere wurden mehrere Tage zuvor zurechtgeschnitten, autoklaviert und im Trockenschrank bei 90°C getrocknet.

2. Nitrozellulosefilter zur Ausbreitung der Netzhaut wurden direkt vor der Präparation in 3-6 Sektoren geschnitten und bis zu ihrer Verwendung in sterilem HBSS inkubiert.
3. Zur Herstellung einer eiskalten, sauerstoffgesättigten HBSS-Lösung wurde reiner Sauerstoff für mindestens 10 min in die Flüssigkeit eingeleitet, bis diese eine violette Färbung annahm. Die Lösung wurde bis zu ihrer Verwendung dicht verschlossen auf Eis aufbewahrt.
4. Die abnehmbare Plattform und die Rasierklinge des Gewebhackers sowie das Präparationsbesteck wurden durch eine 15-minütige Inkubation in Ethanol (70%) desinfiziert.

Die Präparation wurde unter aseptischen Bedingungen an einer Sterilbank mit Hilfe eines binokularen Präparationsmikroskops bei 8- bis 20-facher Vergrößerung ausgeführt. Es war dabei darauf zu achten, dass das Gewebe stets von sterilem, sauerstoffgesättigtem und eisgekühltem HBSS umgeben war.

Durch einen Skalpelleinstich am *Limbus* wurde ein Ansatzpunkt für den nachfolgenden zirkumferentiellen Schnitt mit einer Kapselschere, der die Abtrennung des vorderen Augeabschnittes mit *Cornea*, Iris und Linse gestattete, geschaffen. Es folgten 4 radiale Einschnitte im Winkel von je 90°, die im nächsten Schritt eine flächige Ausbreitung der halbkugelförmigen Retina auf einem Nitrozellulosefilter erlaubten. Die Netzhaut wurde mit Hilfe von 2 feinen Pinzetten vorsichtig von der Sklera abgelöst und durch einen Schnitt mit einer gebogenen Mikroschere hinter der Papille vollständig abgetrennt. Die nun freischwimmende Retina konnte dann kleeblattförmig, die Ganglienzellschicht dem Präparator zugewandt, auf dem Nitrozellulosefilter ausgebreitet werden. Der Filter wurde auf trockenes, weißes Filterpapier (Whatman) transferiert, welches die Flüssigkeit nach unten wegsaugte, ohne das Gewebe vollständig auszutrocknen. Dadurch konnte der transparente, gelartige Glaskörper von der Retina abgezogen werden. Die so präparierte Retina wurde mit dem Filter auf die Arbeitsplattform des Gewebhackers gelegt und in 8 (Ratte) bzw. 12 (Affe), in der Pupille zentrierte Sektoren gehackt. Dabei war eine ständige Befeuchtung des Gewebes, notfalls durch Auftropfen von HBSS, zu gewährleisten. Die über die Retina herausragenden Filterränder wurden unter dem Stereomikroskop abgetrennt und die Sektoren mit der RGZ-Schicht dem Substrat zugewandt in die vorbereiteten Kulturschalen explantiert. Nach vorsichtigem Andrücken

und kontrolliertem Antrocknen der Retina für ca. 8 min, wurden die Explantate jeweils mit einem Tropfen raumtemperiertem Kulturmedium bedeckt, die Schalen verschlossen und in den Inkubator gestellt. Nach 2 h (Inkubation), in denen sich die Anhaftung der Explantate gefestigt hatte, wurden die Schalen vorsichtig mit 4 ml raumtemperiertem Kulturmedium aufgefüllt (Abb. 4).

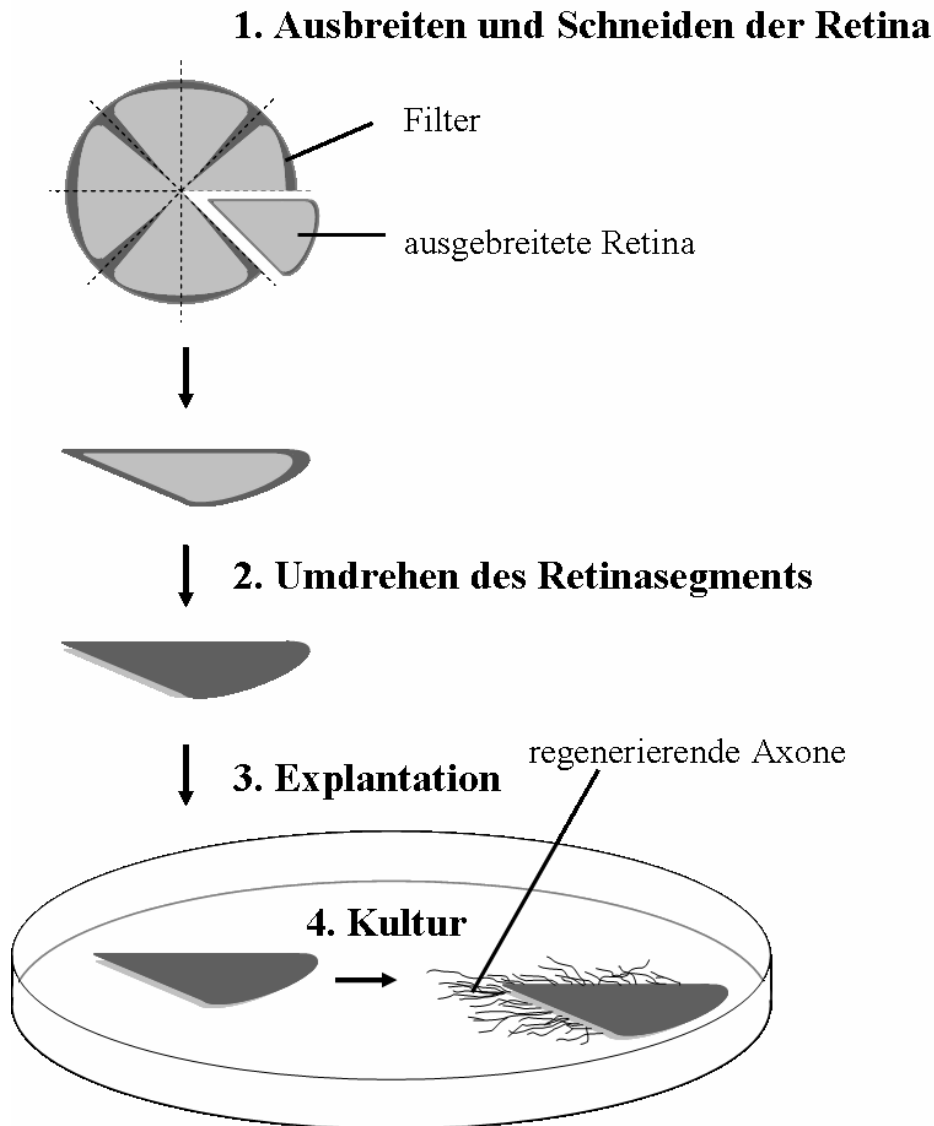


Abb. 4: Explantationsmodell der Retina

Retinae werden nach auf einem Filter ausgebreitet und nach Entfernung des Glaskörpers in 8 bzw. 12 Sektoren gehackt. Diese werden mit der RGZ-Schicht dem lamininbeschichteten Boden zugewandt explantiert und zeigen nach mehrstündiger Kultivierung ein Auswachsen neuronaler Fasern.

2.3.3. Kulturbedingungen

Als Kulturmedium diente das S4-Medium (s. 2.3.1.1.), das durch seine Serumfreiheit unerwünschtes Fibroblastenwachstum verhinderte (Needham et al., 1987) und darüber hinaus eine kontrollierte biochemische Umgebung für die Explantate schuf. Kurz vor dessen Gebrauch wurde dem Medium Penicillin/Streptomycin (10.000 Einheiten, Sigma), sowie im Fall der Affenretinakultur zusätzlich Ciprofloxacin (Ciprobay, Bayer) zugesetzt (500 µl/50 ml).

Ein erhöhter Sauerstoffpartialdruck hatte sich als förderlich für das Auswachsen von regenerierenden Axonen herausgestellt, so dass im Begasungsbrutschrank folgende Kulturbedingungen konstant gehalten wurden:

Temperatur	= 37°C
P [O ₂]	= 55 %
P [CO ₂]	= 5 %
Rel. Luftfeuchtigkeit	= 100 %

2.3.4. Quantifizierung der Regenerationseffizienz von retinalen Ganglienzellen

Nach verschiedenen Kultivierungszeiten (12, 24, 48, 72, 96 h) wurden bei allen Explantaten die Anzahl der auswachsenden Neurite sowie deren Länge mit Hilfe eines inversen Mikroskops bei 200-facher Vergrößerung erfasst. Alle Neurite, die eine imaginäre Linie von ca. 200 µm vom Rand des Explantats überschritten hatten, wurden gezählt, wobei Verzweigungen der Fasern nicht berücksichtigt wurden. Es wurde vermieden Axone, die im Bogen zum Explantat zurückwuchsen, doppelt zu zählen. Ebenso wurde die Zahl der in einem Faszikel wachsenden Fasern nach distaler Auflösung der Bündel in einzelne Axone soweit möglich korrigiert. Ein bis zwei Explantate pro Kultur, die aufgrund zu geringer Haftung an das Substrat eine schlechtere Regeneration oder gar ein vollständiges Ablösen zeigten, wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Die verbleibenden Retinasegmente wurden zur Berechnung des arithmetischen Mittels und der Standardabweichung der Versuchsgruppen herangezogen.

2.3.5. Ermittlung der Faserlänge und der Wachstumsgeschwindigkeit

Explantierte Retinae wurden zu verschiedenen Zeitpunkten unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet und die Länge der regenerierten Fasern mit Hilfe eines Meßokulars bestimmt. Dazu wurde eine randomisierte Auswahl von 10, möglichst gerade und unverzweigt ausgewachsenen Axonen je Explantat vermessen und die Werte zur durchschnittlichen axonalen Länge gemittelt. Diese wurde gegen die jeweilige Inkubationszeit in Kultur aufgetragen, die Punkte durch eine Ausgleichsgerade verbunden und aus deren Steigung die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit ermittelt.

2.4. Lichtmikroskopische Untersuchungen und retrograde Färbung

2.4.1. Material

Einbettungsmedium für Kryostatschnitte: Tissue-Tek (Sakura)

Beschichtung der Objektträger:

Die Objektträger (Engelbrecht, Edermünde) wurden mit absolutem Alkohol sorgfältig gereinigt, mit frisch filtrierter Beschichtungslösung (0,5% Gelatine (Sigma) und 0,05% $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck)) behandelt und für ca. 2 h in einer staubfreien Umgebung getrocknet.

Blockierlösung: Fötale Kälberserum (10 %) (Seromed)

Eindeckelmedium: Mowiol 4-88 (Hoechst)

12 Gramm Mowiol wurden zunächst in 30 g fluoreszenzfreiem Glycerol unter intensivem Rühren gelöst, mit 30 ml destilliertes Wasser versetzt und unter Rühren weitere 60 ml einer 0,2 M Tris/HCl-Puffer-Lösung (pH 8,5) hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei 56 °C für 10 min leicht gerührt, unlösliche Bestandteile bei 5000 g für 15 min abzentrifugiert und der Überstand bei -20 °C aufbewahrt.

Aufgetauten Aliquots wurde der Farbstoff Hoechst 33258 (Sigma), ein Bisbenzimid zur

Zellkernfärbung, in einer Konzentration von 10 µg/ml zugesetzt.

Erstantikörper (alle IgG):

Anti-Bcl2 (mc, mouse)	Verdünnung 1: 50	Sigma
Anti-CNTF (pc, rabbit)	Verdünnung 1:100	PromoCell
Anti- α_B -Kristallin (pc, rabbit)	Verdünnung 1:100	Sanbio
Anti- β_H -Kristallin (pc, rabbit)	Verdünnung 1:100	Sanbio
Anti- γ -Kristallin (pc, rabbit)	Verdünnung 1:100	freundl. Gabe von S. Ziegler
Anti-bFGF (pc, rabbit)	Verdünnung 1: 50	PromoCell
Anti-Gap-43 (mc, mouse)	Verdünnung 1:500	Sigma
Anti-GFAP (mc, mouse)	Verdünnung 1:400	Sigma
Anti-Hsp27 (pc, rabbit)	Verdünnung 1: 50	Upstate
Anti- $\alpha_5\beta_1$ -Integrin (mc, mouse)	unverd. Zellüberstand	freundl. Gabe von D. Vestweber
Anti- $\alpha_6\beta_1$ -Integrin (pc, rabbit)	Verdünnung 1:200	Chemicon
Anti-Neurofilament (mc, mouse)	Verdünnung 1: 100	Sigma

Fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper (alle IgG):

Anti-Mouse-Cy-2 (goat)	Verdünnung 1:200	Dianova
Anti-Rabbit-Cy-2 (goat)	Verdünnung 1:200	Dianova
Anti-Sheep-FITC (donkey)	Verdünnung 1:50	Dianova
Anti-Mouse-TRITC (Verdünnung 1:300	Sigma
Anti-Rabbit-TRITC (goat)	Verdünnung 1:400	Sigma

Phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,4 (PBS):

NaCl	9 g
Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	1,42 g
KH ₂ PO ₄	0,27 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Fixierlösung:

Paraformaldehyd (PFA) 40 g
PBS ad 1000 ml

Die Suspension wird unter Erwärmen (max. 56°C) gerührt, bis sich der Feststoff klar gelöst hat und anschließend in lichtgeschützten Flaschen aufbewahrt.

Geräte und sonstige Materialien:

Das hierfür benötigte Präparations-Stereomikroskop mit Kaltlichtlampe, sowie das Präparationsbesteck sind bereits unter 2.3.1.2. aufgeführt.

Axiophot (Zeiss): Fluoreszenzmikroskop mit Epifluoreszenzeinrichtung und
Fluoreszenzfiltern 450 bis 490 nm, 510 bis 560 nm und 395 bis
440 nm

Kryostat (Reichert-Jung): 2800 Frigocut E

Quecksilberhochdrucklampe: HBO 100 W

Kamerasystem und Bildanalysesoftware: Axiovision (Zeiss)

Verbrauchsmaterial:

Filterpapier (Whatman): weiss

Nitrozellulosefilter (Sartorius): schwarz, Durchmesser 50 mm, Porengröße 0,45 µm

Petrischalen (Greiner): Durchmesser 35 mm

2.4.2. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie basiert auf der spezifischen Bindung eines unmarkierten Antikörpers an Membranantigenen oder an anderen Proteinen des Gewebes. Durch einen mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Zweitantikörper, der seinerseits spezifisch an den Erstantikörper bindet, kann das Membranantigen bzw. Protein unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

2.4.2.1. Gewinnung von Kryostatschnitten

Für die Gewinnung der Kryostatschnitte wurden Retina und Retinaexplantate wie bereits beschrieben präpariert, für 1 h mit 4%-igem PFA fixiert und über Nacht (4°C) in Sucrose-Lösung (30 %) inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe auf plan-geschnittene Tissue-Tek-Blöcke transferiert, eingefroren und 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt.

2.4.2.2. Immunhistochemie an Kryoschnitten der Retina und Retinaexplantaten

Alle immunhistochemischen Färbungen an Kryostatschnitten wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Fixierung der Schnitte in –20°C kaltem Methanol (Merck) für 10 min
2. Waschen der Schnitte für 3 x 5 min in PBS pH 7,4
3. Blocken der Schnitte mit FCS (10 %) für 30 min und Entfernen der Blockierlösung
4. Waschen der Schnitte für 1 x 5 min in PBS pH 7,4
5. Pipettieren des Erstantikörpers in FCS (10%) auf die Schnitte und Inkubation über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer
6. Waschen der Schnitte für 3 x 5 min in PBS pH 7,4
7. Pipettieren des Zweitantikörpers in FCS (10 %) auf die Schnitte und Inkubation in einer feuchten Kammer für 1 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit
8. Waschen der Schnitte für 3 x 5 min in PBS pH 7,4
9. Eindeckeln der Schnitte in Mowiol (mit 10 µg/µl Hoechst 33258)
10. Betrachtung, Auswertung und Dokumentation unter dem Fluoreszenzmikroskop mittels zugehöriger Bildanalysesoftware
11. Lagerung der Schnitte bei – 20 °C und bei Dunkelheit

Die entsprechenden Negativkontrollen wurden bei sonst identischer Verfahrensweise mit FCS (10%) ohne Erstantikörperzugabe durchgeführt. Bei Doppelfärbungen wurden die entsprechenden Erst- bzw. Zweitantikörper simultan eingesetzt.

2.4.2.3. Immunhistochemie an *Whole-mounts* von Retinaexplantaten

Zur Unterscheidung der glialen oder neuronalen Herkunft der aus Retina-Explantaten *in vitro* auswachsenden Fasern wurden an verschiedenen Kulturen immunhistochemische Färbungen gegen GFAP und die 200 kDa Untereinheit der Neurofilamente (NF) durchgeführt.

Nach etwa 1 h Fixierung in 4% PFA bei Raumtemperatur wurden die Explantate für 3 x 20 min mit PBS zur Entfernung des Fixativs gewaschen. Dabei war darauf zu achten, dass die verwendeten Lösungen und das Gewebe in etwa gleich temperiert sind, um ein Ablösen der Neurite von der Kulturoberfläche zu vermeiden. Die Immunfärbung der Explantate erfolgte analog des oben beschriebenen Protokolls, an dessen Ende der Boden der Petripermschalen ausgeschnitten und auf einem Objektträger in Mowiol eingebettet wurde. Anschließend erfolgte die Betrachtung, Auswertung und Dokumentation unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der zugehörigen Bildanalysesoftware.

2.4.3. Fluoreszenzmikroskopie

2.4.3.1. Retrograde Färbung regenerierender retinaler Ganglienzellen

Lipophile Farbstoffe, wie das hier verwendete Carbocyanin 1,1'-Dioctadecyl-3, 3, 3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiI, Molecular Probes), besitzen die Eigenschaft, sich in Membranen aldehydfixierter Zellen zu lösen und anschließend durch laterale Diffusion über die gesamte Zellmembran auszubreiten (Godement et al., 1987). Diese Charakteristik ermöglicht die morphologische Identifizierung und Klassifizierung neuronaler und nicht-neuronaler Zellen durch Anfärbung feinsten Zellstrukturen (Pavlidis et al., 2003). Von Nachteil ist dabei jedoch die relativ langsame Diffusionsgeschwindigkeit des Farbstoffes, so dass je nach Axonlänge der Neurone eine Färbedauer von mehreren Wochen bis Monaten erforderlich ist.

Zur Charakterisierung der regenerierenden RGZ der Affenretina wurden regenerierte Explantate mit 4 %-igem PFA über Nacht fixiert. Nach Absaugen des überschüssigen Fixativs mit einer Pipette und Filterpapier erfolgte eine Ortung der ausgewachsenen Axone an einem Mikroskop mit Phasenkontrastoptik. DiI-Kristalle wurden mit Hilfe einer fein ausgezogenen Glaskapillare direkt auf die Axone, ca. 1 – 2 mm vom Explantatrand,

positioniert, und die Schalen nach Auffüllen mit PBS zur Beschleunigung der Farbstoffpenetration in die Membran für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das PBS gegen 1-2 %iges PFA ausgetauscht und die Kulturschalen bis zu ihrer Auswertung mit Hilfe eines Fluoreszenz-Photomikroskops (Axiophot, Zeiss) für mehrere Wochen lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt.

2.5. Biochemische Verfahren

2.5.1. Material

2.5.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien:

Acrylamid-Stammlösung (0,8% Bisacrylamid, 30% Acrylamid)	Roth
Agarose	Merck
Ammoniumsulfat p.A.	Merck
Ampholine® 3,5 – 9,5	Pharmacia
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth
Benzonase	Merck
Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromphenol-sulphonaphtalein)	Sigma
BSA (Rinderserumalbumin), Standard für Proteinbestimmung	Sigma
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfat)	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G 250	Merck
<i>DryStrip</i> Cover Fluid	Amersham
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck
DTT (Dithiothreitol)	Roche
ECL (“Enhanced Chemoluminescence”)	Amersham
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma
Essigsäure (96%)	Roth
Ethanol (absol.)	J. T. Baker
Formaldehydlösung (37%)	Sigma
Glycerin (87%)	Roth
Glycin	Merck

Harnstoff, ultra pure	Merck
Iodoacetamid	Sigma
Isobutylalkohol (2-Methyl-1-propanol)	Sigma
Isopropanol	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Magermilchpulver für die Molekularbiologie	Merck
β -Mercaptoethanol, p.A.	Sigma
Methanol	Riedel-deHäen
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Merck
Natriumdihydrogensulfat-Dihydrat	Merck
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck
Phosphorsäure 85%	Merck
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
Ponceau-S	Sigma
Rainbow-Marker® (10 - 250 kD)	Amersham
Saccharose	Merck
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Sigma
Silbernitrat	Merck
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyldiamin)	Sigma
Thioharnstoff	Merck
Tris (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan)	Roth
Triton X-100	Sigma
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat)	Fluka

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von den Firmen Merck oder Sigma bezogen.

Verbrauchsmaterial:

Halbmikroküvetten	Sarstedt
IPG-Streifen (pH 4-7, pH 3-10, 18 cm)	Amersham
Nitrozellulosemembran Hybond ECL	Amersham
Röntgenfilme (Curix HC 1000G)	Agfa
Whatmann 3 MM Filterpapier dick und dünn	3 MM

2.5.1.2. Geräte und Zubehör

Gelgießstand für Polyacrylamid-Minigele und Zubehör:

7 Sets Glasscheiben, Spacer 0, 75 mm, Trennscheiben aus Plexiglas, Probenkämme
 Elektrophoreseapparatur für PAGE Fa. Hanischmacher

Reswelling Tray Amersham
 EttanDALT Six Gel Caster für 2D-Polyacrylamid-Gele Amersham
 Multiphor II und Zubehör für die isoelektrische Fokussierung Amersham
 EttanDALT Six Electrophoresis Unit Amersham
 Biologische Testschalen (25 x 25 cm) Nunc

Stromversorgung:

EPS 3501 XL Amersham
 Power Pac 3000 BioRad
 Power Supply Modell 200/2.0 BioRad

pH-Elektrode: pH-Meter 766 Calimetric Knick
 Tischzentrifuge: 5415 C Eppendorf
 Große Zentrifuge: 6K15 Sigma
 Ultrazentrifuge mit Rotor (TLA 100.4) Beckmann
 Ultraschallhomogenisator UW 70 Bandelin
 Photometer: Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech
 Blockthermostat: BT 200 Kleinfeld
 Kühlung Omnilab, National Lab
 Schüttler Vibrax VXR, IKA
 Röntgenfilmentwicklungsmaschine: Curix 60 Agfa

Aufnahme- und Bildanalyssysteme:

Kamera (Minerva, Grundig), Leuchtkasten und Diskus-Software (Zeiss) zur
 Geldokumentation
 FX-Imager zur Aufnahme der 2D-Gele Biorad
 PD Quest 7.0 zur Analyse der 2D-Gele Biorad

2.5.2. Probengewinnung

Zur Gewinnung der Gewebeproben für die biochemischen Untersuchungen wurden die kultivierten und quantifizierten Retinaexplantate mit kalter, isotonischer Sucrose-Lösung (8,5 %) gewaschen und vorsichtig mit einem Skalpell zusammengeschaht. Nach Überführung der Fragmente in ein Eppendorf-Cup wurde dieses in Flüssig-Stickstoff schockgefroren und bei -20 oder -80°C aufbewahrt. Ebenso wurde mit den präparierten Retinae (s. 2.3.2.2.) nach Ablösen vom Filter verfahren.

2.5.3. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit der Methode nach (Bradford, 1976). Sie basiert auf der selektiven Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 an Proteine, wodurch sich sein Absorbptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Da der Extinktionskoeffizient über einen weiten Konzentrationsbereich konstant bleibt, kann die Proteinkonzentration bei geeigneter Probenverdünnung unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes photometrisch ermittelt werden.

Bradford-Reagenz: 0,01 % Coomassie Brilliant Blue G 250
8,5 % Phosphorsäure
4,7 % Ethanol

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde ein definiertes Volumen der jeweiligen Probenlösung mit Aqua dest. auf 100 µl aufgefüllt, mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und gevortext. Nach 5-minütiger Inkubation und Überführung in Halbmikroküvetten, erfolgte die Vermessung der Proben bei 595 nm. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden definierte Mengen BSA (2 - 10 µg) analog eingesetzt und dem verwendeten Probenvolumen entsprechend Lysepuffer addiert, um Harnstoff- und Detergenzienbedingte Veränderungen des Absorptionskoeffizienten auszugleichen.

2.5.4. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteingemischen. Die Proteine werden dazu denaturiert und durch Zugabe des anionischen Detergenz SDS zur gleichen Ladungsdichte gebracht. In der nachfolgenden Elektrophorese wandern die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe zur Anode, wobei sie durch den Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix nach ihrem Stokes-Radius und damit ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Das diskontinuierliche Puffersystem bei unterschiedlich weitporigem Trenn- und Sammelgel führt dabei zur besseren Trennschärfe. Dieses Verfahren fand im Rahmen der vorliegenden Arbeit Anwendung zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen, Proteinauftrennung für Western Blots und als zweiter Trennschritt nach isoelektrischer Fokussierung.

2.5.4.1. Lösungen

Zur Durchführung wurden nachfolgende Stammlösungen angesetzt, die bis zu 6 Monaten im Kühlschrank aufbewahrt wurden.

Sammelgelpuffer (4x): 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
 0,4 % SDS

Trenngelpuffer (4x): 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
 0,4 % SDS

Laufpuffer (10x): 250 mM Tris
 1,92 M Glycin
 0,1 % SDS

Lysepuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5
 300 mM Saccharose
 0,1 mM EDTA
 1 % Triton
 0,1 % Mercaptoethanol
 0,1 mM PMSF (jeweils frisch zugesetzt)

Probenpuffer: 130 mM Tris/HCl, pH 6,8
 10 % SDS
 10 % Mercaptoethanol
 20 % Glycerin
 0,06 % Bromphenolblau

Lyse- und Probenpuffer wurden aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Sammelgel-, Trenngel- und Laufpuffer wurden 0,02 % NaN₃ zur Konservierung zugesetzt.

2.5.4.2. Gießen der Gele

Zur Herstellung der Gele wurden die Glasplatten der Minigele in Form von Sandwiches (kleine Scheibe mit Ausschnitt, Spacer, große Scheibe) in den Gelgießstand geschichtet, dieser mit Plexiglasplatten plan aufgefüllt und schließlich mit einer weiteren großen Plexiglasscheibe und Klammern abgedichtet. Danach wurde unter Verwendung der unten aufgeführten Stammlösungen mit dem Gießen der Trenngele begonnen. Es wurden zumeist 5 Gele mit der Abmessung von 85 x 100 x 0,75 mm (L x B x T) gegossen, für die nachfolgend aufgeführte Mengen verwendet wurden. Die verschiedenen Geldichten (%T) richteten sich nach dem jeweils gewünschten Trennbereich, meistens 12 %.

% T	8	10	12	14
Acrylamid-Stammlösung (30 %)	16 ml	20 ml	24 ml	28 ml
Trenngelpuffer (4x)	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml
Aqua dest.	29 ml	25 ml	21 ml	17 ml

Die Lösung wurde zum Start der Polymerisation mit 50 µl Temed und 100 µl APS (20 %) versetzt, vorsichtig verrührt und zügig in den Gelgießstand überführt, wobei ca. 3 cm bis zum oberen Glasplattenrand für das Sammelgel frei gelassen wurden. Eine direkte Übersichtung jedes Gels mit 1 ml Isobutylalkohol führte zum Ausschluß von Luftsauerstoff und einer ebenen Oberfläche. Nach Beendigung der Polymerisation (ca. 1 h) wurde der Alkohol durch gründliches Waschen mit Wasser entfernt, die Probenkämme eingesetzt und die Sammelgele unter Verwendung folgender Lösungen und Mengen gegossen.

% T	4,5
Acrylamid-Stammlösung (30 %)	3 ml
Sammelgelpuffer (4x)	5 ml
Aqua dest.	12 ml

Zum Polymerisieren wurden 30 µl Temed und 60 µl APS (20%) zugesetzt, die Lösung kurz verrührt und sofort mit einer Pasteurpipette auf die Trenngele gegeben. Es war dabei darauf zu achten, daß keine Luftblasen zwischen oder unter den Taschen eingeschlossen wurden. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels, in ca. 30 min bei Raumtemperatur, wurden die Gele aus dem Gießstand entnommen, in Frischhaltefolie eingepackt und bis zu ihrer Verwendung, jedoch nicht länger als 14 Tage, in einem wasserdampfgesättigten Gefäß aufbewahrt.

2.5.4.3. Probenaufarbeitung, Probenauftrag und Elektrophoresebedingungen

Eine Retina bzw. 8 Retinaexplantate wurden in 100 - 200 µl Lysepuffer aufgenommen und mit einem konischen Micropistill (Eppendorf) mechanisch zerkleinert. Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer feinen Kanüle sowie Sonifizierung der Proben (5 x 3 Stöße, 50 % Intensität) wurden diese weiter aufgeschlossen. Unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (15000 g, 20 Min, 4°C, Sigma-Zentrifuge) abgetrennt. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde abpipettiert und der Proteingehalt nach Bradford (s. 2.5.2.) bestimmt.

Die Proteinlösungen wurden mit Probenpuffer versetzt (Verdünnung 3+1), zur vollständigen Denaturierung im Thermoblock erhitzt (5 min, 95°C) und anschließend kurz gevortext und zentrifugiert.

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und der obere und untere Puffertank mit jeweils 150 ml frisch angesetzttem Laufpuffer gefüllt. Nach Entfernung der Probenkämme konnten die vorbereiteten Proben mit Hilfe einer feinen Pipette in die Geltaschen gefüllt werden. Die Elektrophorese wurde durch Anlegen einer Spannung von 100 V gestartet und nach Übergang der Proteine in das Trenngel bei 250 V durchgeführt. Die Auftrennung wurde beendet, sobald die Bromphenolblaufront das Ende des Geles erreicht hatte und in die Pufferlösung austrat.

2.5.4.4. Färbung der Gele

Um die Auftrennung der Proteine nach der Elektrophorese, sowie die Homogenität der Probenauftragsmenge und der nach dem Blotten im Gel verbliebenen Proteinmengen zu kontrollieren, wurden die Gele je nach gewünschter Empfindlichkeit mit Coomassie oder Silber gefärbt.

Coomassie-Färbung:

Die Coomassie-Färbung beruht auf der selektiven Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 an Proteine. Sie ist einfach und schnell durchführbar, kann jedoch Proteine nur bis zu einer Nachweisgrenze von ca. 100 ng pro Bande detektieren.

Die Polyacrylamidgele wurden zur Fixierung und Färbung in unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur für mindestens 20 min im Färbebad inkubiert. Nach Abgießen der Färbelösung und Abspülen der Lösungsreste mit Wasser wurden die Gele mehrfach mit Entfärbelösung gewaschen. Waren die Proteinbanden deutlich sichtbar, wurde diese gegen Aqua dest. und etwas Essigsäure ausgetauscht und das Gel über Nacht bei 4°C zwecks vollständiger Entfernung des Hintergrundes aufbewahrt.

Coomassie-Färbelösung: 0,2 % Coomassie Brilliant Blue G 250
 10 % Essigsäure
 50 % Methanol

Diese Lösung wurde nach der Herstellung filtriert und lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt. Sie konnte mehrfach verwendet werden.

Entfärbelösung: 7,5 % Essigsäure
 30 % Ethanol

Silberfärbung:

Bei der Silberfärbung bilden Ag^+ -Ionen Komplexe mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Reduktionsmittel wie $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ reduzieren Ag^+ -Ionen zu elementarem Ag° , welches sich entsprechend niederschlägt und die Proteinbanden folglich sichtbar macht. Die Färbung besitzt eine Nachweisgrenze von ca. 10-20 ng pro Bande und ist damit etwa 10-fach empfindlicher als die Coomassie-Färbung.

Zur Silberfärbung bedurfte es folgender Stammlösungen:

Fixiermittel: 50 % Methanol
 12 % Essigsäure

Waschlösung: 30 % Ethanol

Imprägnierlösung: 150 ml Aqua dest.
 100 μl Formaldehyd (35 %)
 75 μl $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (43%)

Silbernitratinkubationslösung: 150 ml AgNO_3 (0,2%)
 100 μl Formaldehyd (35 %)
 (lichtgeschützt aufzubewahren)

Reduktionslösung: 250 ml Na₂CO₃ (6 %)
 125 µl Formaldehyd (35 %)
 2,5 µl Na₂S₂O₃ (43 %)

Stopplösung: 7 % Essigsäure

Die Polyacrylamidgele wurden in einem 1l-Becherglas entsprechend folgendem Protokoll gefärbt:

1. Fixierung: 3 x 20 min in 200 ml Fixierlösung
2. Waschen mit Ethanol 30 %: 3 x 5 min
3. Imprägnierlösung: 45 sek unter kräftigem Schwenken
4. Waschen mit Aqua dest.: 3 x 1 min
5. Inkubation mit Silbernitratlösung: 20 – 60 min
6. Kurzes Waschen mit Aqua dest.: 15 sec
7. Reduktion: Zugabe von zunächst 50 ml Reduktionslösung, kurzes Schwenken und Abgießen des ausgefällten AgCO₃, danach Entwicklung mit restlicher Lösung
8. Nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität kurz mit Aqua dest. spülen
9. Stoppen der Reduktion mit Essigsäure (7 %)
10. Kurz waschen mit Aqua dest.: 5 min
11. Lagerung in Ethanol (30 %) bei 4°C

Zur Dokumentation und Auswertung der Gele wurden sie auf dem Leuchtkasten mit Hilfe einer Videokamera und des Diskus-Programmes aufgenommen und anschließend auf dem Geltrockner konserviert.

2.5.5. Western Blotting

2.5.5.1. Proteintransfer

Beim *Western Blotting* werden Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf die Oberfläche einer Membran (Nitrozellulose oder PVDF) transferiert, wo sie für Antikörper zugänglich und folglich immunologisch detektierbar sind (Kyhse-Andersen, 1984).

In der vorliegenden Arbeit wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch das Semidry-Blotting-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde folgender Transferpuffer verwendet:

25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % Methanol

Das Polyacrylamidgel, auf entsprechende Größe zurechtgeschnittene Whatmanpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Danach wurde auf der Anode des Semidryblotters das Blotsandwich in Form von 3 Whatmanpapieren, der Nitrozellulosemembran, dem Polyacrylamidgel und 3 weiteren Whatmanpapieren aufgebaut. Um potentiell vorhandene Luftblasen zu entfernen wurde mit einem Glasstab mehrmals sanft über das Sandwich gerollt, bevor schließlich die Kathode aufgesetzt und der Proteintransfer durch Anlegen einer Spannung von 10 V für 1 h gestartet wurde.

Der quantitative Transfer der Proteine auf die Membran wurde durch Coomassie- bzw. Silberfärbung des geblotteten Gels sowie einer Ponceau-Färbung der Membran überprüft. Letztere diente gleichzeitig auch zur besseren Fixierung der Proteine auf der Membran und zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmengen. Die Membran wurde dazu nach dem Semidry-Blotting für 5 min in der Ponceau-S-Färbelösung inkubiert und anschließend mit Aqua dest. bis zur Differenzierung der Banden vom Hintergrund gewaschen. Die vollständige Entfärbung erfolgt durch Waschen mit TBST.

Ponceau-S-Färbelösung: 0,2 % Ponceau-S
3 % Trichloressigsäure

2.5.5.2. Detektion und immunologischer Nachweis

Für die nachfolgend beschriebene immunochemische Detektion der aufgetrennten Proteine auf der Membran wurden folgende Puffer und Antikörper verwendet:

Tris-buffered saline-Tween (TBS-T): 10 mM Tris/HCl, pH 7,6
 150 mM NaCl
 0,1 % Tween-20

Erstantikörper:

Anti-Actin (mc, mouse)	Verdünnung 1: 500	Sigma
Anti-Actin (mc, rabbit)	Verdünnung 1: 500	Sigma
Anti-CNTF (pc, rabbit)	Verdünnung 1: 750	PromoCell
Anti- α_B -Crystallin (pc, rabbit)	Verdünnung 1: 500	Sanbio
Anti- γ -Crystallin (pc, rabbit)	Verdünnung 1: 750	(freundl. Gabe von S. Ziegler)
Anti-bFGF (pc, rabbit)	Verdünnung 1: 250	PromoCell
Anti-GAP-43 (mc, mouse)	Verdünnung 1:2000	Sigma
Anti-GAP-43 phosphoSer41 (pc, rabbit)	Verdünnung 1:1000	Chemicon
Anti-GDNF (pc, goat)	Verdünnung 1:1000	R&D Systems
Anti-GFAP (mc, mouse)	Verdünnung 1:5000	Sigma
Anti-Rhodopsin (mc, mouse)	Verdünnung 1:1000	Chemicon

Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper:

Anti-Goat IgG (donkey)	Verdünnung 1:200000	Jackson Imm. Research
Anti-Mouse IgG (goat)	Verdünnung 1:50000	Sigma
Anti-Rabbit (goat)	Verdünnung 1:50000	Sigma

Für den immunologischen Nachweis bestimmter Antigene in den aufgetrennten Proben wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

1. Blocken unspezifischer Bindungen durch Inkubation der Nitrocellulosemembran in einer Magermilchpulversuspension (5 % in TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur
2. Waschen: 1 x 15 min, 3 x 5 min in TBS-T
3. Inkubation mit dem Erstantikörper: in TBS-T verdünnt, über Nacht bei 4 °C
4. Waschen: 1 x 15 min, 3 x 5 min in TBS-T

5. Inkubation mit dem Zweitantikörper: in TBS-T verdünnt, 1 h bei Raumtemperatur

6. Waschen: 1 x 15 min, 3 x 5 min in TBS-T

7. Nachweisreaktion:

Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz als Folge der Reaktion der an den Zweitantikörper gekoppelten Peroxidase mit ECL. Dazu wurde der Blot in einer im Verhältnis 1:1 frisch angesetzten Mischung aus ECL-Lösung 1 und 2 für genau 1 min inkubiert, mit der Rückseite auf eine trockene Glasplatte gelegt und mit Haushaltsfolie überzogen. Durch Auflegen und Belichten eines Röntgenfilms sowie dessen anschließender Entwicklung konnten die entsprechenden Banden sichtbar gemacht werden.

Parallel zu jedem Western Blot wurden entsprechende Negativkontrollen durchgeführt, bei denen auf eine Inkubation mit dem Erstantikörper verzichtet wurde. Gleicher Proteinauftrag wurde durch Aktin-Detektion oder Coomassie-Färbung parallel beladener Gele verifiziert.

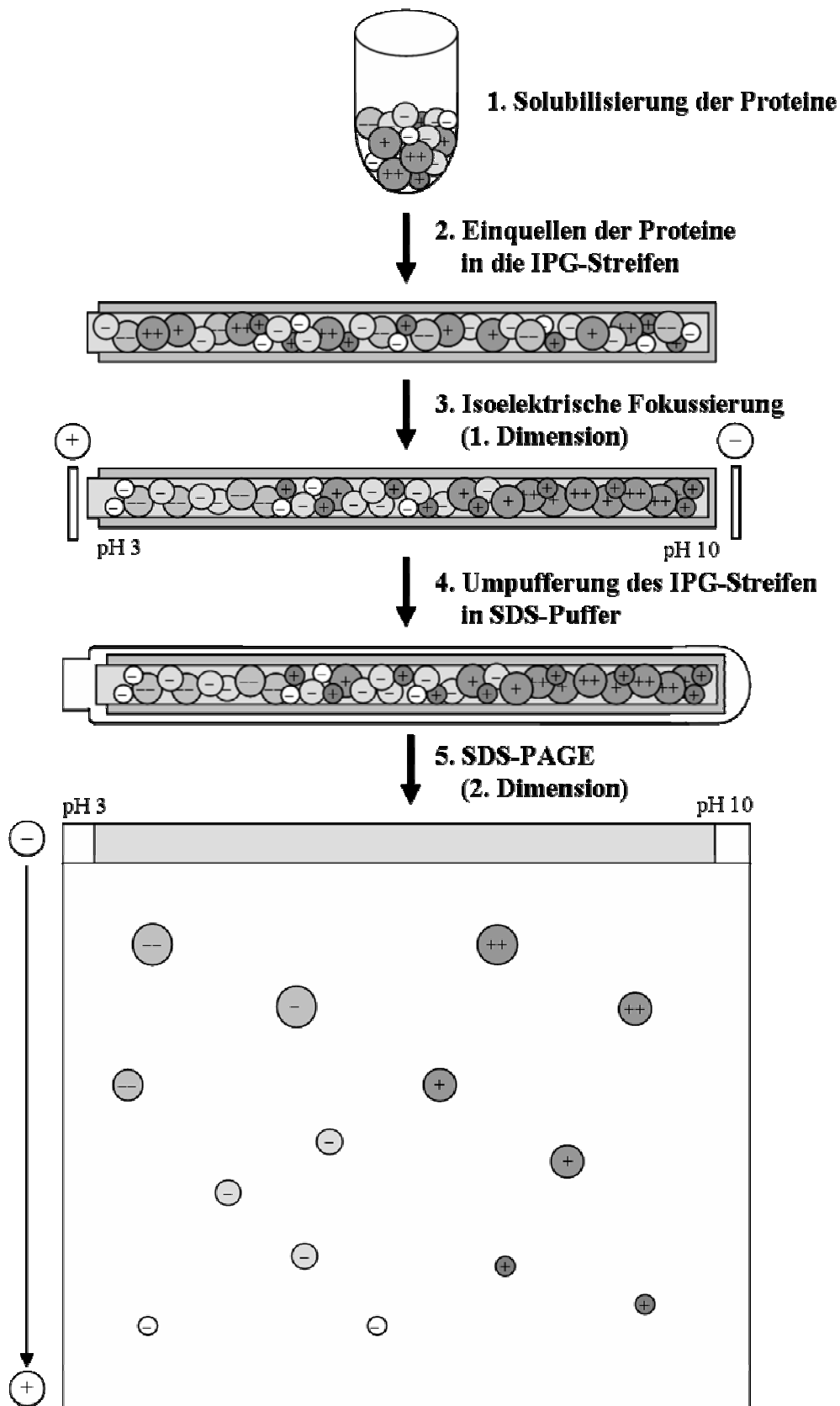
2.5.6. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE)

Die zweidimensionale Elektrophorese (2D-E) (Klose, 1975, O'Farrell, 1975) ist eine hochauflösende Technik zur Analyse komplexer Proteingemische. Dabei werden die Proteine in zwei aufeinanderfolgenden Schritten aufgetrennt:

In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, werden die gelösten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Gel mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) (Görg et al., 1988) gemäß ihrer Molekülladung separiert. Die amphoteren Proteine wandern dabei solange im elektrischen Feld, bis sie den pH-Wert erreicht haben, an dem ihre Nettoladung Null ist, den sogenannten isoelektrischen Punkt (pI). Dieser resultiert aus dem Anteil basischer und saurer Aminosäuren eines Proteins und kann bei ansonsten massengleichen Proteinen sehr unterschiedlich sein.

In der folgenden zweiten Dimension werden die isoelektrisch fokussierten Proteine dann mit der bereits beschriebenen SDS-PAGE (s. 2.4.5.3.) aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt. Es resultiert ein zweidimensionales Punktmuster von bis zu mehreren tausend verschiedenen Proteinen, das eine quantitative und qualitative Proteomanalyse der Probe erlaubt (Abb. 5).

Abb. 5:



zu Abb. 5: Prinzip der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Ein komplexes Gemisch solubilisierter Proteine unterschiedlicher Molekülladung und Masse wird durch Einquellen oder mittels Aufgabetrichter in die Gelmatrix mit immobilisiertem pH-Gradienten gebracht. Durch Anlegen hoher Spannungen kommt es im 1. Schritt zur isoelektrischen Fokussierung (IEF), d.h. Wanderung der Proteine in dem elektrischen Feld bis zum Erreichen ihres isoelektrischen Punktes (1. Dimension). Nach Umpufferung des IPG-Streifen in SDS-Puffer wird der Streifen auf ein SDS-Polyacrylamidgel transferiert und die Proteine in Abhängigkeit ihrer Größe und bzw. molekularen Masse separiert. Es resultiert ein zweidimensionales Punktmuster der Probe.

2D-DIGE-Analyse:

Eine Weiterentwicklung der herkömmlichen 2D-PAGE ist die 2D-DIGE-Technik (*two-dimensional difference gel electrophoresis*). Dabei werden verschiedene in Masse und Ladung abgegliche CyDye-Fluoreszenzfarbstoffe über kovalente Bindungen an Proteine einer bestimmten Probe gebunden. Die Möglichkeit der unterschiedlichen spektralen Anregung erlaubt nachfolgend eine Vermischung und Analyse von bis zu 3 verschiedenen, markierten Proteinmischungen in einem 2D-Gel. Dies erlaubt den direkten Vergleich von behandelter und unbehandelter Probe, sowie den Einsatz eines internen Standards, wodurch das Problem der Variationen zwischen den einzelnen Gelen weitgehend gelöst wird. Darüberhinaus sind diese Fluoreszenzfarbstoffe sehr sensitiv (125 pg Protein/Spot) und zeigen eine lineare Absorption über 5 Größenordnungen (10^5), so dass auch schwach exprimierte Proteine detektiert bzw. weniger Probe eingesetzt werden kann.

2.5.6.1. Lösungen

Zur Durchführung wurden nachfolgende Lösungen angesetzt und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C aufbewahrt:

Einzellösungen:	5,3 M DTT
	10 % SDS
	100 mM PMSF (gelöst in Isopropanol)
	1 % Bromphenolblau

Lysepuffer:	7 M Harnstoff
	2 M Thioharnstoff
	4 % Chaps
	2 % Pharmalyte 3 – 10
Rehydratisierungslösung:	8 M Harnstoff
	0,2 % Chaps
	0,002 % Bromphenolblau
Äquilibrierungslösung:	50 mM Tris-HCl, pH 8,8
	6 M Harnstoff
	30 % Glycerol
	2 % SDS
	0,002 % Bromphenolblau

Daneben wurden für die zweite Dimension die unter "Diskontinuierliche SDS-PAGE" (2.5.4.1.) aufgeführten Lösungen verwendet.

2.5.6.2. Probenaufarbeitung

Eine Retina bzw. 6-8 Retinaexplantate wurden zunächst mit 20 µl SDS (1 %), 2 µl PMSF (10 mM) und 0,5 µl DTT (5,3 M) versetzt und für 5 min bei 95°C zur Inaktivierung der Proteasen und Denaturierung erhitzt. Nach erneuter Zugabe von 1 µl PMSF, sowie 5 µl MgCl₂ (10 mM) und 2x 1 µl Benzonase (zeitversetzt nach 15 min) erfolgte eine Inkubation der Proben für 30 min bei 37°C, um DNA und RNA mit Hilfe der Endonuklease zu zerstören. Anschließend wurden die Proben mit 170 µl Lysepuffer versetzt, mit einem Micropistill mechanisch homogenisiert und schließlich auf Eis sonifiziert (5 x 3 Stöße, 50 % Intensität). Dabei war eine Überwärmung der Probe zu vermeiden, um einem Zerfall des Harnstoffs und der Carbamoylierung der Proteine entgegenzuwirken. Es schloß sich eine Ultrazentrifugation (55.000 rpm, 30 min, 20°C) der Proben zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile an, bevor der Überstand einer Proteinbestimmung (s. 2.5.3.) unterzogen wurde.

2.5.6.3. Probenauftrag und Rehydratation eines IPG-Streifen

Die IPG-Streifen (pH 4-7, 18 cm) wurden mit 200 µg (analytische Gele) bzw. 1500 µg (präparative Gele) Protein beladen. Dazu wurde entsprechendes Probenvolumen mit Rehydratationslösung und unter Zusatz von jeweils 2 % DTT und Ampholinen auf 350 µl ergänzt, gevortext und in je eine Vertiefung des *DryStrip Reswelling Trays* überführt. Die dehydratisierten IPG-Streifen wurden dann mit der Gelseite nach unten, der Probenlösung zugewandt, in der jeweiligen Rinne ausgerichtet. Eventuell auftretende Luftblasen unter dem Gel wurden mit einer Pinzette entfernt und die Streifen zum Ausschluß von Luftsauerstoff und Auskristallisation des Harnstoffs mit *Cover Fluid* überschichtet. Die Quellung der IPG-Streifen und Aufnahme der Proteine erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

2.5.6.4. Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit der Multiphor II vollzogen, die dazu auf 18°C gekühlt wurde. Nach Benetzung der Kühlplatte mit Wasser, wurde der *DryStrip Tray* unter Vermeidung größerer Luftblasen auf der Kühlplatte befestigt und die Polung etabliert. Dieses sollte ebenso wie die folgende Befüllung des *DryStrip Trays* mit *Cover Fluid* und möglichst luftblasenfreier Auflegung des *DryStrip Aligners* auf selbige, eine gute Kühlung der Streifen während der Fokussierung gewährleisten. Die rehydratisierten IPG-Streifen wurden mit einer Pinzette dem *Reswelling Tray* entnommen, kurz zur Entfernung anhaftender Lösungsreste in Aqua dest. getaucht und dann mit ihrem saueren, spitzen Ende in Richtung Anode und der Gelseite nach oben in den Vertiefungen des *DryStrip Aligners* ausgerichtet. Danach wurden mit Aqua dest. befeuchtete Filterpapiere als Kontaktvermittler quer über die Enden der nebeneinander liegenden Streifen gelegt und mit Steckeletroden auf den Gelen fixiert. Nach Überschichtung der Streifen mit *Cover Fluid* zwecks Luftausschluß, konnte die Fokussierung nach folgendem Programm gestartet werden:

- | | |
|---------------|-------------------|
| 1. 150 V (1h) | 3. 600 V (1h) |
| 2. 300 V (1h) | 4. 800 V (30 min) |

5. 1300 V (15 min)	8. 2800 V (15 min)
6. 1800 V (15 min)	9. 3500 V (20 h)
7. 2300 V (15 min)	

Dieses Stufenprogramm mit mehreren Schritten bei geringen Spannungen diente zur Ausschleusung störender Salzionen vor der eigentlichen Fokussierung der Proteine bei hoher Spannung. Das Wandern des der Probe zugesetzten Bromphenolblau diente der Kontrolle des Spannungsfeldes und dokumentierte den Fortschritt der Fokussierung.

2.5.6.5. Gießen der Gele

Die Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension erfolgt mit 12,5 % SDS-Polyacrylamidgelen. Zur Herstellung der Gele wurde der Gelgießstand alternierend mit Glaskassetten und dünnen Plastikplatten bestückt, mit Plexiglasplatten plan aufgefüllt und schließlich mit einer weiteren großen Plexiglasscheibe und Klammern abgedichtet. Es wurden zumeist 6 Gele mit der Abmessung von 85 x 100 x 1 mm (L x B x T) unter Verwendung nachfolgend aufgeführter Mengen, gegossen:

Acrylamid	187,5 ml
Trenngelpuffer (4x)	112,5 ml
Aqua dest.	150,0 ml

Zum Start der Polymerisation wurden 300 µl Temed und 750 µl APS (20%) zugesetzt, vorsichtig verrührt und die Lösung zügig in den Gelgießstand überführt. Dabei wurden ca. 2 cm bis zum oberen Glasplattenrand frei gelassen und jedes Gel mit 1 ml Isopropanol überschichtet, das nach Beendigung der Polymerisation (ca. 1 h) durch gründliches Waschen mit Wasser wieder entfernt wurde. Der verbleibende Freiraum der Kassetten wurde mit Aqua dest. aufgefüllt und die Gele nach Abdichtung mit Haushaltsfolie bis zu 4 Tagen bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Auf das Gießen eines Sammelgelen konnte an dieser Stelle verzichtet werden, da eine Aufkonzentrierung der Probe durch den Streifen bzw. beim Übertritt der Proteine aus dem Streifen in das SDS-Gel erfolgte.

2.5.6.6. Äquilibrierung der fokussierten IPG-Streifen

Zur Vorbereitung der nachfolgenden SDS-PAGE wurden die fokussierten IPG-Streifen zwei Äquilibrierungsschritten à 15 min bei Raumtemperatur unterzogen. Jeweils 8 ml der Äquilibrierungslösung wurden dazu mit 80 µl β-Mercaptoethanol (1.Schritt) bzw. 200 mg Iodoacetamid (2. Schritt) versetzt, in die Vertiefungen des *Reswelling Trays* überführt und die IPG-Streifen darin unter leichter Bewegung inkubiert. Der 1. Äquilibrierungsschritt diente dabei der vollständigen Reduktion der Proteine und deren Absättigung mit SDS, zur Schaffung gleicher Ladungsdichten und für die Auftrennung benötigte negative Ladung. Im zweiten Schritt wurde überschüssiges Reduktionsmittel durch Iodoacetamid abgefangen und die Thiolgruppen der Proteine zur Vermeidung ihrer Reoxidation während der Elektrophorese alkyliert.

2.5.6.7. Kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2. Dimension)

Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden kurz in Laufpuffer gewaschen, horizontal auf den vorbereiteten SDS-Gelen positioniert und luftblasenfrei durch Zugabe von Agarose-Lösung (0,5 %) fixiert.

Es folgt die Befüllung der unteren Elektrophoresekammer mit Laufpuffer, Aktivierung der Umwälzpumpe und der Kühlung auf 10°C. Dann wurden die Gele mit einer Halterung in die Kammer überführt, der zweite, obere Puffertank aufgesetzt und ebenfalls mit Laufpuffer, der jedoch die doppelte Menge SDS (0,2 %) enthielt, befüllt. Anschließend wurde die Elektrophorese durch Anlegen eines elektrischen Stromes von 15 W Leistung für 30 min und folgender Erhöhung auf 100 W für ca. 4 h durchgeführt. Sobald die Bromphenolblaufront das Ende des Gels erreicht hatte wurde die Auftrennung beendet, die Gele den Kassetten entnommen und in mit Fixierlösung befüllte Kunststoffschalen überführt.

2.5.6.8. Färbung der Gele

Die Visualisierung der zweidimensional aufgetrennten Proteine erfolgte mit der Coomassie –Färbung nach Neuhoff (Neuhoff et al., 1988), modifiziert nach (Doherty et

al., 1998). Es handelt sich dabei um eine Endpunktfärbung mit kolloidal gelöstem Coomassie, die empfindlicher als die zuvor beschriebene klassische Coomassie-Färbung und zudem mit der späteren MALDI-MS-Analyse kompatibel ist.

Die Gele wurden zunächst über Nacht fixiert und nach Waschen mit Aqua dest. (3 x 30 min) für 1 h in der Inkubationslösung gehalten. Diese wurde gegen die Färbelösung ausgetauscht und die Gele darin bis 2 -5 Tage entwickelt. Die Gele wurden während des gesamten Färbeprozesses auf dem Schüttler unter gleichmäßiger Bedeckung mit Flüssigkeit gehalten.

Fixierlösung:	50 % Ethanol 2 % H ₃ PO ₄
Inkubationslösung:	34 % Methanol 2 % H ₃ PO ₄ 17 % (NH ₄) ₂ SO ₄
Färbelösung:	34 % Methanol 2 % H ₃ PO ₄ 17 % (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,066 % Coomassie G-250

Nach Aufnahme und Auswertung der Gele konnten diese entfärbt (s. Coomassie-Entfärbter 2.5.4.4.) und zur Darstellung der schwachen Proteinspots einer Silberfärbung (2.5.4.4.) unterzogen werden. Die weitere Lagerung der Gele erfolgte nach Coomassiefärbung in der Inkubationslösung bzw. Silberfärbung in 30 %-igem Ethanol bei 4°C in den Schalen oder nach Einschweißen in Autoklavierbeuteln.

2.5.6.9. Auswertung der 2D-Gele

Die gefärbten Gele wurden mit dem FX-Imager eingescannt und sowohl mit der 2D-Analysesoftware PDQuest 7.0, die einen qualitativen ("An-Aus-Regulation") und quantitativen Suchalgorithmus ("Hoch-Herunter-Regulation") bietet, als auch durch visuellen Vergleich ausgewertet. Dabei wurde die Expressionsänderung eines Proteins im

Vergleich zu der Kontrollgruppe als relevant eingestuft, wenn sie in mindestens 75 % der Fälle auftrat.

Interessante Proteine sowie prominente Spots im Fall der Kartierung wurden ausgestochen und der MALDI-MS-Analyse zugeführt.

2.5.6.10. Massenspektrometrische Proteinanalyse (MALDI-MS)

Moderne massenspektrometrische Methoden erlauben die Identifizierung von PAGE-getrennten Proteinen (König et al., 2002). Dazu werden die interessierenden Proteinspots aus dem Gel ausgestochen und die Proteine dann im Gel enzymatisch, üblicherweise tryptisch, verdaut. Dieser Schritt erleichtert zum einen die Extraktion des Analyten aus der Gelmatrix, verbessert aber auch die Aussagekräftigkeit der MS-Analyse. Die Molekulargewichte der Peptide können sehr genau bestimmt werden, und charakterisieren in ihrer Gesamtheit das Protein. Bioinformatische Suchalgorithmen erlauben die Abfrage von Datenbanken mit solchen MS-Daten. Das gilt auch für Peptidsequenzdaten, die durch Tandem-MS gewonnen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteinidentifizierungen in Zusammenarbeit mit der Proteomikgruppe der IZKF-Technologieplattform “Integrierte Funktionelle Genomik” (UKM, Münster) unter Leitung von Dr. Simone König durchgeführt. Dabei kamen sowohl die MALDI-TOF-Kartierung der Peptide als auch nano-MS/MS-Methoden der Peptidsequenzierung zum Einsatz. Teilaspekte dieser Arbeiten wurden bereits veröffentlicht (König et al., 2003).

2.6. Statistik

Die im Rahmen der Regenerationsstudien erhobenen quantitativen Daten über die Anzahl der auswachsenden Axone pro Retinaexplantat *in vitro*, waren als Stichproben aufzufassen und wurden der statistischen Analyse unterzogen. Neben der Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen und Varianzen wurden die Daten einem zweiseitigen Student's t-Test für unabhängige Stichproben unterworfen. Dabei werden zwei Mittelwerte m_1 und m_2 mit den Umfängen n_1 und n_2 verglichen, die voneinander unabhängig und annähernd normalverteilt und deren Varianzen s_1^2 und s_2^2 zufällig sein

müssen. Gemäß dieses Tests unterscheiden sich die Mittelwerte der Stichproben mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von α nur dann zufällig voneinander, wenn der für die Testgröße berechnete Wert t_b kleiner ist als der Tafelwert t_T der Student's t-Verteilung für α und der entsprechenden Freiheitsgrade. Der Test wurde mit Hilfe des Statistikprogramms Kyplot® Version 2.0 beta 13 (23 bit) für Windows (Koichi Yoshioka, 1997 – 2000), welches mit Hilfe eines ANOVA-Tests im Vorfeld die Normalverteilung der Daten prüft, unter Anwendung eines Signifikanzlevels α von 0,05 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Regeneration der Rattenretina

Zur Gewinnung regenerierenden Materials wurde das im Labor gut etablierte Modell der Retina-Organkultur verwendet, welches ein Auswachsen adulter RGZ *in vitro* unter sorgfältig gewählten Bedingungen (s. Material und Methoden) ermöglicht. Damit Axone innerhalb der ersten 48 h in Kultur aus dem Retinaexplantat auswachsen, bedarf es 5 Tage vor Explantation einer konditionierenden, das Neuritenwachstum stimulierenden Verletzung des Sehnervs (Bähr et al., 1988, Ford-Holevinski et al., 1986), hier in Form einer Quetschung vollzogen. Durch eine parallel dazu erfolgende Linsenverletzung (Fischer et al., 2000) kann eine deutliche Steigerung der Regenerationseffizienz erzielt werden, die erstmals eine rationale, nachfolgend beabsichtigte proteomische Untersuchung in Hinblick auf regenerationsassoziierte Veränderungen ermöglicht.

3.1.1. Quantifizierung und Charakterisierung der Regeneration der Rattenretina

Zur Standardisierung des für die weiteren Untersuchungen gewonnenen Materials, wurde das beschriebene Modell unter den aktuellen Laborbedingungen etabliert und die Regeneration quantifiziert.

Die durch Quetschung und Linsenverletzung vorbehandelte Retina zeigte 24 h nach Explantation ein massives Auswachsen adulter Ganglienzellaxone, das vorwiegend an der Explantatspitze, die der Papille der Retina entspricht, auftrat (Abb. 7, A). Dieses gilt als Charakteristikum für RGZ-Axone, die zum Ausgang des Sehnervs hin gerichtet sind. In Kombination mit der immunohistochemisch positiven Anfärbung der Fasern durch Neurofilament- und GAP-43-Antikörper, bzw. der negativen Detektion durch GFAP, einem Astrozytenmarker (getestet an 2 Kulturen), wurde die neuronale Identität der Fasern belegt.

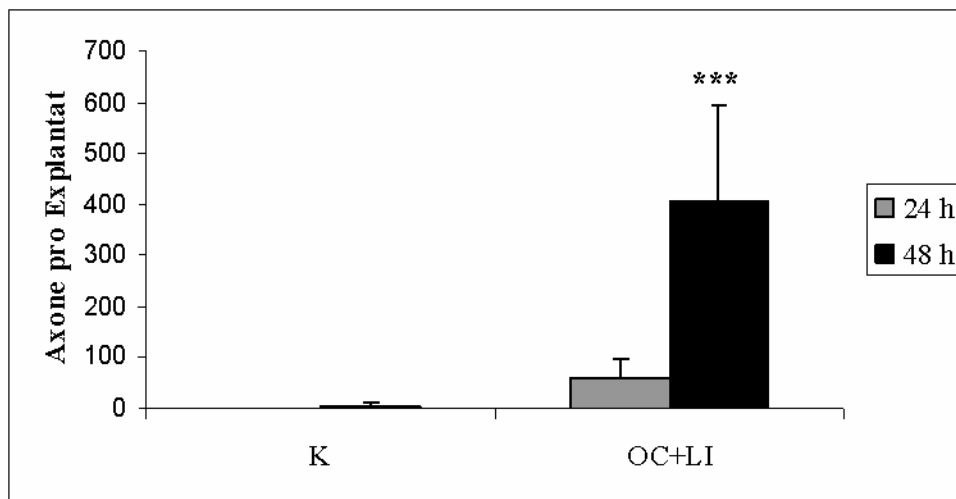
Die regenerierten Axone erzielten nach zweitägiger Kultivierung eine Länge von durchschnittlich 1,2 mm und zeigten einen hohen Faszikulierungs- und Verzweigungsgrad, der sich mit der Zunahme der regenerierten Axone erhöhte (Abb. 7, B, C). Dies erschwerte eine präzise Bestimmung bei der Quantifizierung der auswachsenden Fasern nach 24 und vor allem nach 48 h. Werte des letztgenannten

Zeitpunktes müssen daher als Schätzwerte verstanden werden, die jedoch unterhalb der tatsächlichen Anzahl neu gebildeter Axone lagen. Während die hier als Kontrolle dienende, unbehandelte Retina nach 48 h nur vereinzelte regenerierende Axone zeigte, konnte im Fall der vorbehandelten Retina ein dichtes Auswachsen von Fasern beobachtet werden, das sich hochsignifikant ($\alpha < 0.001$) von der Kontrolle unterschied (Abb. 6)

Im Verlauf der Kultivierung stieg die Anzahl der Neurite weiter an. Die Kultivierung wurde nach 48 h, d.h. zu einem Zeitpunkt hoher regenerativer Aktivität, beendet und bis dahin gut regenerierte Explantate als Material für die weitere Analyse gewonnen. Spätere Zeitpunkte wurden gemieden, um die Kontamination des regenerierten Materials durch Effekte der dann einsetzenden, parallelen Degenerationsvorgänge auszuschließen.

Das Modellsystem stellte sich somit als gut geeignet zur Gewinnung von Material starker und homogener Regeneration für die weiteren proteomischen Untersuchungen dar. Bemerkt sei schon an dieser Stelle, dass nicht alle retinalen Zellen, sondern nur die Ganglienzellen zur Regeneration beitragen.

Abb. 6:



	K	OC+LI
24 h	0	59 ± 37
48 h	5 ± 6	406 ± 190
Tiere	n = 4	n = 5

zu Abb. 6: Quantifizierung der Regeneration

Das Histogramm veranschaulicht die Resultate nach Bestimmung der Faserzahl pro Explantat einer unbehandelten (K) und durch offene Quetschung und Linsenverletzung vorbehandelten Retina (OC+LI) nach 24 bzw. 48 h in Kultur. Durch die Vorbehandlung konnte eine signifikant höhere Regeneration erzielt werden.

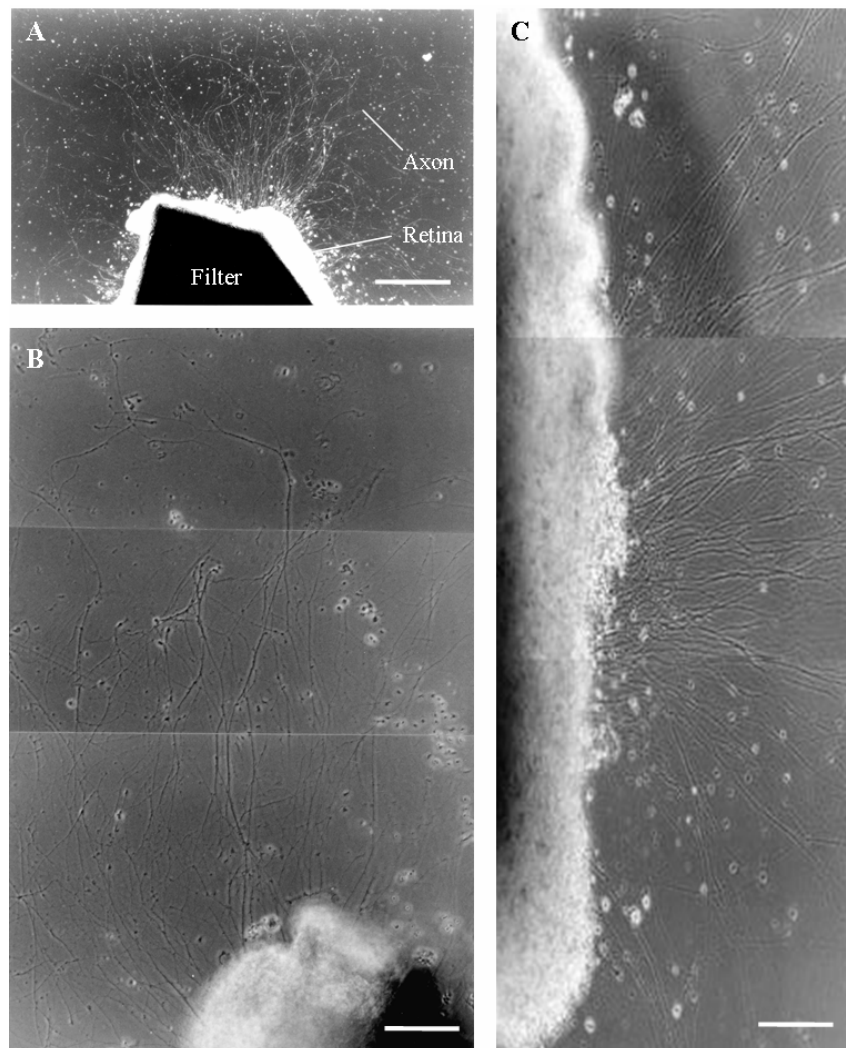


Abb. 7: Explantate der Rattenretina

Adulte Rattenretinae, die 5 Tage nach offener Quetschung und Linsenverletzung explantiert wurden, zeigten nach 24 bzw. 48 h in Kultur ein massives Auswachsen der Ganglienzellaxone (A, B). Neurite konnten bei kleiner Vergrößerung über das ganze Explantat, vorwiegend jedoch an der Explantatspitze, die der Papille der Retina entspricht, beobachtet werden (A, B) und erreichten nach 48 h eine Länge von ca. 1200 μm (B). Faszikulationen und Verzweigungen erschwerten die genaue Quantifizierung der regenerierenden Axone (C).

Maßstab: A) 400 μm , B + C) 100 μm

3.1.2. Einfluß der Vorbehandlung auf die Regeneration

Wie eingangs dargestellt, kann durch eine parallel zur Quetschung des Sehnervs erfolgende Verletzung der Linse eine drastische Steigerung der Regeneration der RGZ-Axone erzielt werden. In der folgenden 5-tägigen Prä-Explantationszeit finden zahlreiche, zum größten Teil nicht im Detail verstandene molekulare Prozesse wie die Aktivierung von Genen und der Aufbau wachstumsassoziierter Proteine und Lipide innerhalb der Zellen statt und versetzen sie in einen regenerationsfähigen Zustand.

Dieses kann durch 3 verschiedene Wirkprinzipien erzielt werden: Zum ersten kann durch eine *neuroprotektive* Wirkung die Geschwindigkeit der Apoptose vermindert und damit eine größere Anzahl regenerationsfähiger Zellen bereitgestellt werden. Zweitens können intrinsische Überlebensfaktoren der Zelle verstärkt bzw. freigesetzt werden, eine sogenannte *neurotrophe* Wirkung. Als drittes können *neuritogene* Effekte, die einen direkten Einfluß auf die Initialisierung der Regeneration und die Wachstumsgeschwindigkeit der Fasern haben, auftreten. Diese Wirkungen können additiv oder synergistisch sein.

Vor dem Hintergrund der nachfolgenden Proteomanalyse stellte sich die Frage, ob die Linsenverletzung selbst über die Aktivierung spezifischer Signalkaskaden solche regenerationsfördernde Effekte auf die RGZ ausübt, oder lediglich die durch die Quetschung initiierten Prozesse verstärkt. Es wurde daher eine Quantifizierung und Charakterisierung der Regeneration infolge der verschiedenen Vorbehandlungsmöglichkeiten mit folgenden Gruppen vorgenommen:

Unbehandelte, schein-operierte, jeweils 5 Tage vor Kultivierung durch Quetschung, Linsenverletzung oder der Kombination von beiden vorbehandelte Retinae wurden explantiert und kultiviert.

Während die Kontrollgruppen (unbehandelt und schein-operiert) kaum regenerierten initiierte die Vorbehandlung durch die Quetschung das Auswachsen zahlreicher Axone. Eine alleinige Linsenverletzung stellte sich ebenfalls als die Regenerationsfähigkeit erhöhende Vorbehandlung heraus und führte zu einem vergleichbar guten Auswachsen. Die Kombination dieser beiden konditionierenden Effekte führte zu einem drastischen Anstieg auswachsender Fasern. Der nach 48 h Kultivierung ermittelte Wert in dieser Gruppe war mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu den erstgenannten Gruppen und

damit hochsignifikant ($\alpha < 0,001$) verschieden (vgl. Abb. 9). Es handelt sich hierbei vermutlich um einen synergistischen Effekt, wobei ein additiver Effekt aufgrund der hohen Standardabweichung nicht ausgeschlossen werden kann.

Auffällige Unterschiede der Kulturen waren auch unter morphologischen Gesichtspunkten zu erkennen (Abb. 8). Während durch Quetschung vorbehandelte Retina zahlreiche dünne, zum Teil faszikulierte Axone zeigte (A), waren die nach Linsenverletzung regenerierten Fasern feiner, kürzer und wiesen einen geringeren Faszikulierungsgrad auf (B). Von besonderem Interesse war im letzten Fall das verstärkte Auftreten von Mikrogliazellen und Astrozyten (Abb. 8, B, Pfeile), welches eine starke Aktivierung der Glia offenbarte. Die nach kombinierter Vorbehandlung auswachsenden Fasern waren dagegen deutlich länger und bildeten aufgrund der höheren Anzahl viele dicke, faszikulierte Bündel aus (Abb. 8, C). Da die Ratten vor der Gewebentnahme nicht perfundiert wurden, zeigten sich nach Explantation zahlreiche Erythrozyten in der Kultur, die durch Extravasation aus den retinalen Gefäßen stammten (Abb. 8, A, Pfeile).

Das Experiment zeigte, dass die Linsenverletzung eigene regenerationsfördernde Effekte hervorruft, die mit denen nach Quetschung quantitativ vergleichbar sind und in Kombination synergistisch oder additiv auf die Regenerationseffizienz wirken.

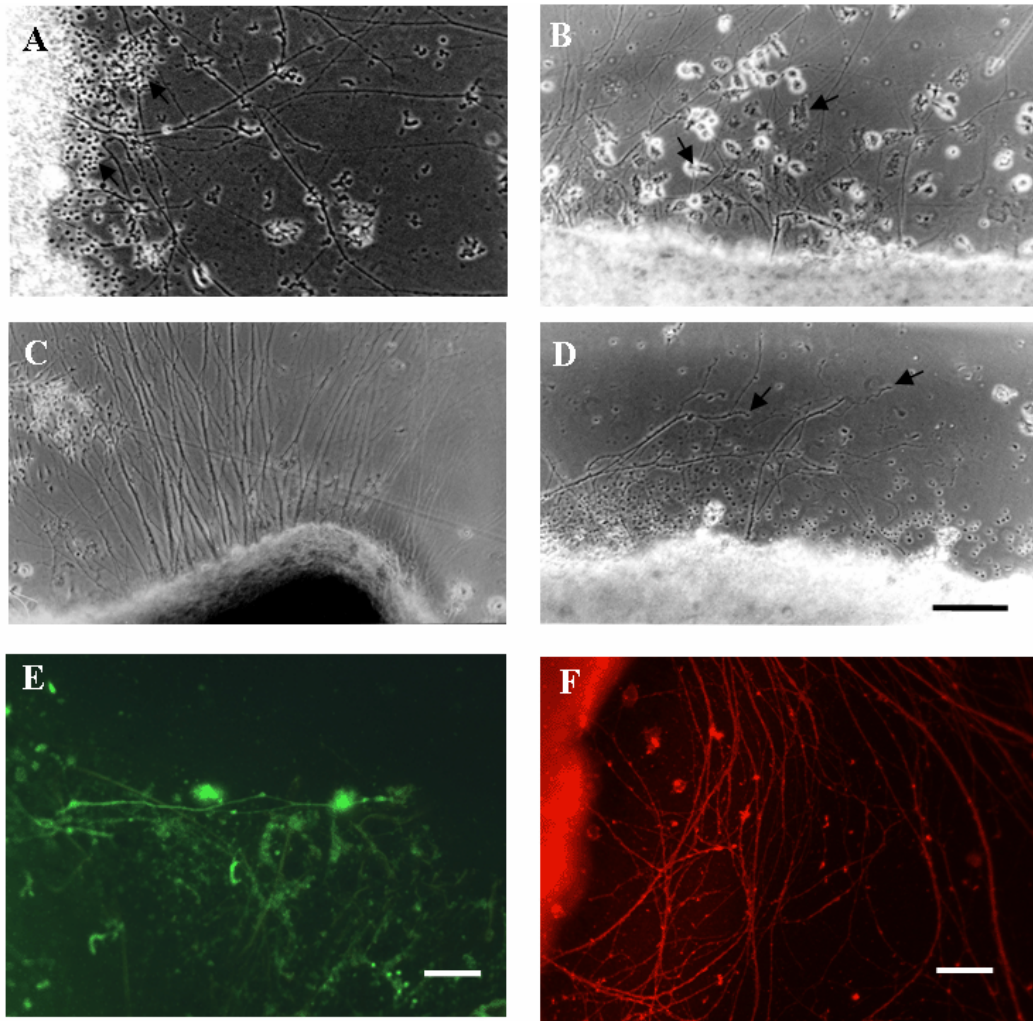


Abb. 8: Einflüsse der Vorbehandlung und des Substrats auf die Regeneration

Dargestellt sind Retinae, die 5 Tage vor Explantation vorbehandelt wurden, nach 48 h in Kultur.

Durch offene Quetschung vorbehandelte Retinae zeigten eine mäßige Regeneration dünner, zumeist einzeln auftretender Axone (A), die von Erythrozyten (Pfeile) begleitet waren. Retinae, die eine Linsenverletzung erfuhren, zeigten in Kultur ein vergleichbares Auswachsen der Ganglienzellneurite sowie ein verstärktes Auftreten von Mikrogliazellen (Pfeile). Die regenerierenden Axone waren feiner, kürzer und wiesen einen geringeren Faszikulierungsgrad auf (B).

Offene Quetschung und parallele Linsenverletzung führten zu einem massiven Auswachsen von stark faszikulierenden Fasern (C). Analoge Explantate auf PDL zeigten kurze, vorwiegend parallel zum Explantat verlaufende, stark faszulierte Fasern ohne Wachstumskegel (D, Pfeile). Ein Großteil der Fasern war in der Immunhistochemie GFAP-positiv und damit astrozytären Ursprungs (E). Wurde auf LM-2 explantiert, konnten faszikulierende, in Bündeln und bogenförmig auf das Explantat zurückwachsende Neurite beobachtet werden (immunhistochemische Färbung gegen Neurofilament, F).

Maßstab: A - D) 100 μm , E + F) 50 μm

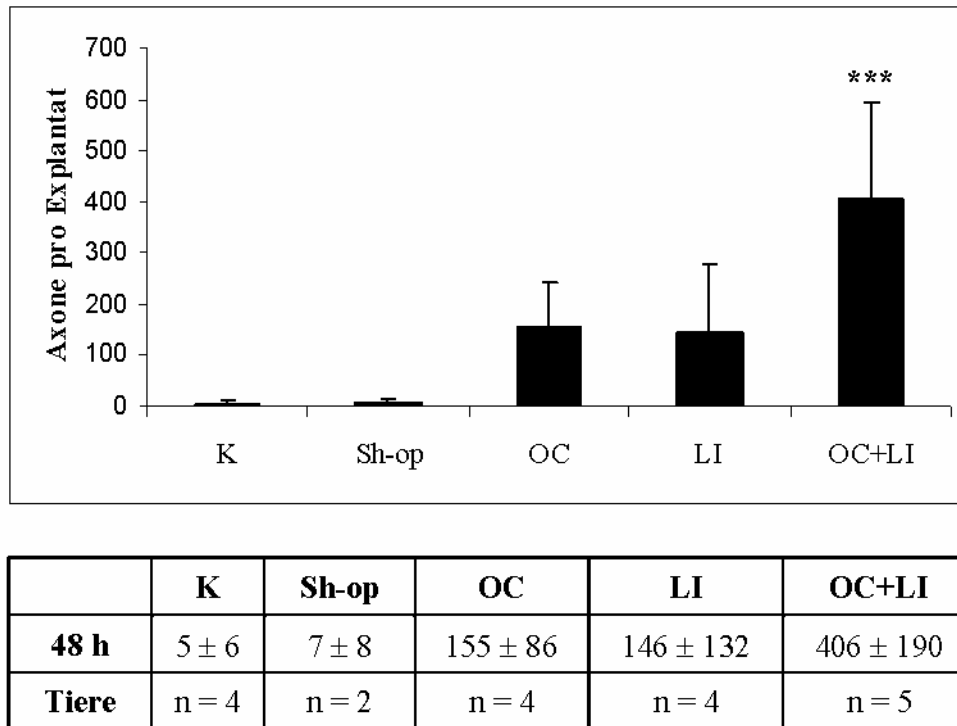


Abb. 9: Quantifizierung der Regeneration nach unterschiedlicher Vorbehandlung der Retina

Die alleinige Linsenverletzung (LI) führte nach 48 h in Kultur zu einem massiven Auswachsen von Fasern, welches mit dem nach offener Quetschung des Sehnerven (OC) vergleichbar war. Die Kombination beider Techniken (OC+LI) zeigte eine signifikante Zunahme der Faserzahl um mehr als das Doppelte an.

3.1.3. Einflüsse der Extrazellulärmatrix

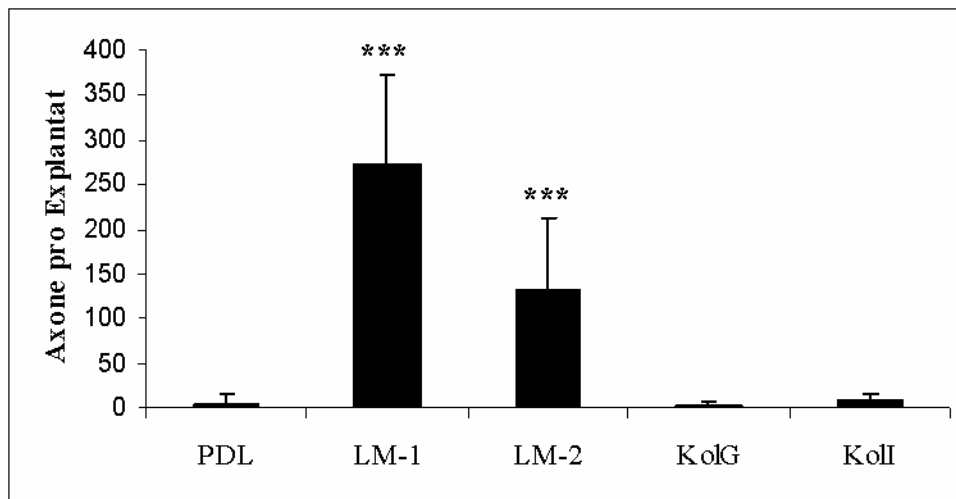
Neben der Erhöhung intrinsischer regenerationsfördernder Faktoren in den RGZ durch die konditionierende Vorbehandlung bzw. Freisetzung von neuroprotektiven, neurotrophen und neuritogenen Substanzen spielen externe Stimuli der Umgebung, in der das Axon auswächst, eine entscheidende Rolle für den Erfolg und das Ausmaß der Regeneration. Unterschiedliche Substrate kommunizieren dabei über verschiedene Rezeptoren und daran gekoppelte Signalwege, deren Aktivierung sich in der Proteinanalyse widerspiegeln sollte, mit der regenerierenden Zelle.

3.1.3.1. Einfluß der Extrazellulärmatrix auf die Regeneration

Zur Eingrenzung der beteiligten Signalwege und Austestung des bestgeeigneten

Substrates wurden Retinae nach kombinierter Vorbehandlung durch Quetschung und Linsenverletzung auf Poly-D-Lysin (PDL), Laminin-1 (LM-1), Laminin-2 (LM-2), Kollagen G (KolG) und Kollagen I (Koll) explantiert und kultiviert. Die Anzahl auswachsender Fasern wurde nach 48 h bestimmt (s. 2.3.4.). Die entsprechenden Durchschnittswerte sind in Abb. 10 dargestellt.

Unter den hier getesteten Substraten stellten sich die Laminine als regenerationspermissiv dar, wobei sich Laminin-1 als das am besten geeignete Substrat erwies und eine massive Regeneration von Axonen ermöglichte (Abb. 10). Das für das periphere Nervensystem charakteristische Laminin-2 (Merosin) ließ ebenfalls ein gutes, im Vergleich zu Laminin-1 jedoch hochsignifikant ($\alpha < 0,001$) schwächeres Auswachsen der Fasern zu. Nach Explantation auf Poly-D-Lysin, Kollagen G oder Kollagen I zeigten sich nur einzelne, auswachsende Fasern. Diese Substrate erwiesen sich somit als ungeeignet.



	PDL	LM-1	LM-2	KolG	Koll
48 h	5 ± 10	272 ± 102	132 ± 80	2 ± 5	8 ± 7
Tiere	n = 6	n = 4	n = 3	n = 3	n = 4

Abb. 10: Substratabhängigkeit der Regeneration

Das Histogramm stellt die Anzahl regenerierter Axone pro Explantat nach 48-stündiger Kultivierung der kombiniert vorbehandelten Retina auf verschiedenen Substraten dar.

LM-1 und -2 waren regenerationspermissiv, wobei LM-1 das am besten geeignete Substrat war. PDL, KolG und Koll erwiesen sich als für die Regeneration ungeeignete Substrate.

Neben diesen quantitativen konnten auch morphologische Unterschiede der Kulturen beobachtet werden. Auswachsende Fasern nach Explantation auf PDL, KolG oder Koll waren sehr kurz, dick und faszikulierten sehr stark. Sie verliefen vorwiegend parallel zum Explantat und zeigten kollabierende Wachstumskegel (Abb. 8, D). Ein Großteil der Fasern zeigte nach immunhistochemischer Färbungen ein positives Signal für GFAP und war damit astrozytären Ursprungs (Abb. 8, E). Nur vereinzelte, sich auch morphologisch von ersteren unterscheidende Fasern zeigten eine Anfärbung von Neurofilamenten und waren demnach Axone.

Die auf Laminin-1 und -2 auswachsenden Fasern konnten durch eine positive Färbung der Neurofilamente eindeutig als Axone identifiziert werden (Abb. 8, F), die von wenigen kurzen, GFAP-positiven und damit astrozytären Fortsätzen begleitet wurden. Während die regenerierten Axone auf Laminin-1 das bereits beschriebene typische Bild zahlreicher, langgestreckter, stark faszikulierender Fasern zeigten, wurden im Fall von Laminin-2 aufgrund der geringeren Faserzahl sowohl vereinzelte als auch faszikulierte Neuriten, die bogenförmig auf das Explantat zurückwuchsen, beobachtet (Abb. 8, F). Dieses differentielle Verhalten von Axonen und ihrer Interaktionen deutet auf eine unterschiedliche physiologische Beschaffenheit der regenerierenden Zellen hin, obgleich faszikulierende und einzeln wachsende Fasern morphologisch gleich waren.

Das Experiment unterstreicht die Bedeutung der externen Stimuli bzw. Umgebung, in der die Regeneration erfolgt. Laminin erwies sich in dem hier verwendeten Modell als obligatorisch für eine quantitative Regeneration, wobei eine höhere Präferenz zu Laminin-1 gezeigt werden konnte.

3.1.3.2. Einfluß der Extrazellulärmatrix auf die Länge und Wachstumsgeschwindigkeit der Fasern

Das zuvor beobachtete differentielle Verhalten der Axone bei der Regeneration auf Laminin-1 bzw. -2 könnte eine Folge neuritogener Effekte der Substrate sein, die nachfolgend näher untersucht werden sollten. Neben der Quantifizierung der auswachsenden Axone, das das häufigste, oft einzige, zur Bewertung der neuritogenen Effekte herangezogene Kriterium darstellt, bieten sich mit der Bestimmung der

Neuritenlänge und Wachstumsgeschwindigkeit weitere Parameter zur Charakterisierung dieser Effekte an. Da die Initialisierung der Neuritogenese und die Förderung der Axon-Elongation voneinander unabhängig sein können, würden hier beobachtete Unterschiede den Rückschluß auf andere Wirkungsmechanismen zulassen.

Es wurden daher die Faserlängen der auf Laminin-1 und -2 explantierten Retinae mit Hilfe eines Messokulars bestimmt (s. 2.3.5). Die bei längeren Fasern und insbesondere nach Explantation auf Laminin-2 auftretenden Windungen konnten nicht exakt vermessen werden, so dass die entsprechenden Daten als Näherungswerte gesehen werden müssen.

Die axonalen Faserlängen der beiden Versuchsgruppen waren zu den untersuchten Zeitpunkten annähernd gleich, wobei sich die nach 24 h erzielte Länge von ca. 600 μm (LM-1: $647 \pm 269 \mu\text{m}$, LM-2: $528 \pm 197 \mu\text{m}$) nach 48 h auf ca. 1200 μm (LM-1: $1216 \pm 411 \mu\text{m}$, LM-2: $1339 \pm 391 \mu\text{m}$) verdoppelt hatte (Abb. 11, A). Dies bedeutete eine über den Beobachtungszeitraum nahezu konstante Wachstumsgeschwindigkeit für beide Substrate, die nachfolgend durch Anlegen einer Ausgleichsgeraden durch die aufgetragenen Punkte (Abb. 11, B) und Berechnung ihrer Steigung ermittelt wurde. Die resultierenden Werte von 23,7 $\mu\text{m}/\text{h}$ für Laminin-1 und 33,8 $\mu\text{m}/\text{h}$ für Laminin-2 unterschieden sich um den Faktor 1,4, folglich nicht signifikant.

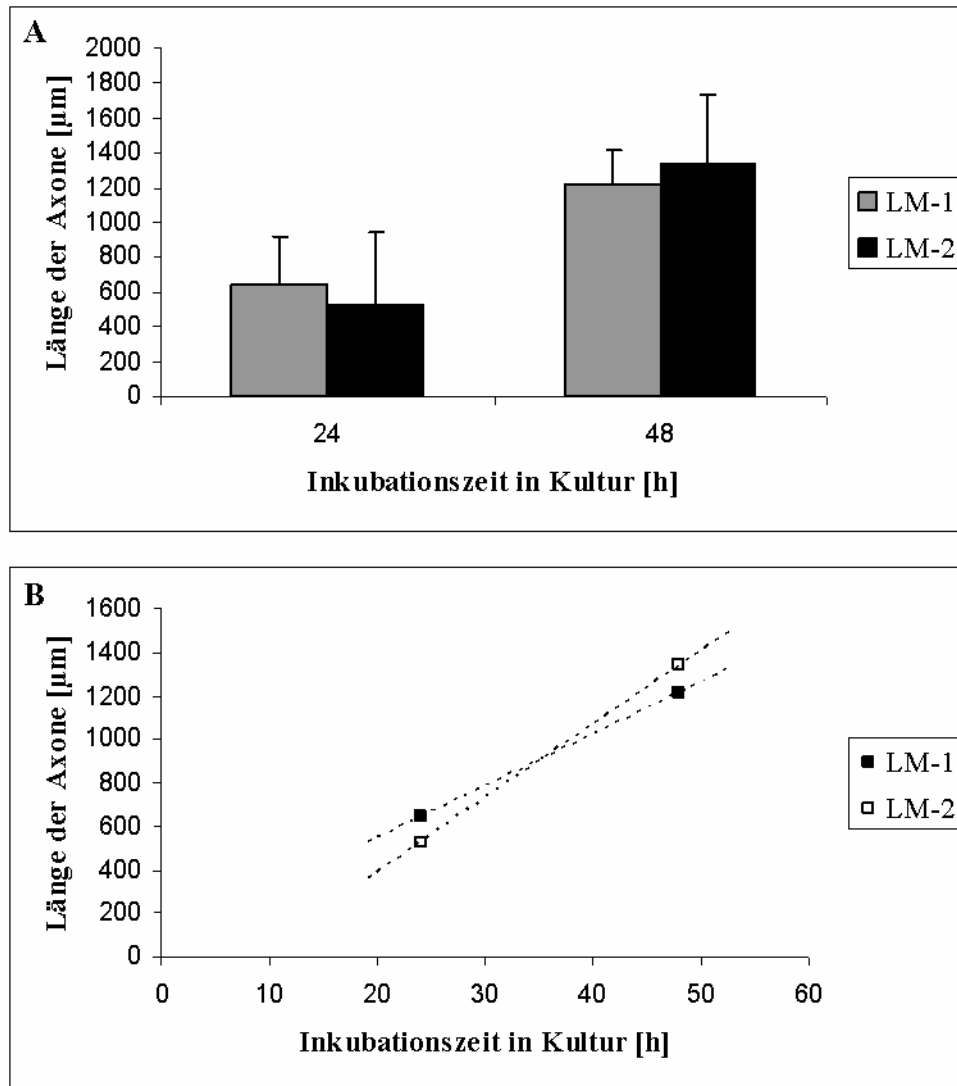


Abb. 11: Faserlänge und Regenerationsgeschwindigkeit der regenerierten Axone auf Laminin

A) Die Länge der regenerierten Fasern nahm nach 24 bzw. 48 h in Kultur zu, unterschied sich jedoch nicht signifikant zwischen der Explantation auf Laminin-1 und -2.

B) Über die Steigung der Ausgleichsgeraden wurde eine ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit für beide Gruppen bestimmt.

Im Gegensatz zu den signifikanten Unterschieden in der Anzahl der regenerierten Axone zwischen den auf Laminin-1 und -2 explantierten Retinae, waren die neuritogenen Effekte bezüglich der Förderung der axonalen Elongation und Wachstumsgeschwindigkeit annähernd gleich.

Die Analyse und Charakterisierung der Regeneration der Rattenretina offenbarte die Komplexität dieses Systems. Unterschiedliche Vorbehandlungen können über

verschiedene Signalwege den Regenerationsprozess aktivieren, welcher wiederum durch weitere Faktoren der neuronalen Umgebung, wie der Glia oder EZM moduliert wird. Diese Aspekte sollen daher bei der nachfolgenden Proteomanalyse besonders berücksichtigt werden.

3.2. Proteomanalyse der regenerierten Rattenretina

Die genauere Untersuchung der Regeneration der Rattenretina im Explantationsmodell konnte diverse Charakteristika und die Bedeutung verschiedener Einflussfaktoren auf die Regeneration zeigen. Um die beobachteten Effekte erklären und verstehen zu können, ist ein tieferes Verständnis der im Regenerationsgeschehen involvierten molekularen Mechanismen und Faktoren zwingend. Dieses wurde durch die nachfolgende Proteomanalyse des regenerierten Materials angestrebt. Ziel war es dabei, die im Zuge des Regenerationsgeschehens neu gebildeten, modifizierten oder regulierten Proteine zu identifizieren, um so beteiligte Signalwege bzw. potentielle Kandidatengene und Ansatzpunkte für eine Modulation der Prozesse und einer damit ermöglichten Therapie, aufzudecken.

Um der Komplexität des analysierten Systems gerecht zu werden, wurde bei der Proteomanalyse mittels Western Blot und Immunhistochemie sowohl nach bekannten, sowie mit Hilfe der 2D-Elektrophorese nach unbekanntem, regulierten Proteinen gesucht.

3.2.1. Expressionsanalyse bekannter Proteine der Rattenretina

Die regenerierte Rattenretina wurde zunächst auf die Expression bekannter Wachstumsfaktoren und regenerationsassoziierten Proteine, sowie ihrer damit einhergehenden möglichen Bedeutung für die Regenerationsfähigkeit bzw. Regeneration der RGZ, durch spezifische Detektion mit Hilfe von Antikörpern untersucht. Besondere Berücksichtigung erfuhren dabei auch die Expressionsunterschiede aufgrund der unterschiedlichen Vorbehandlungen, insbesondere des GFAP, als Marker der glialen Reaktion, und des wachstumsassoziierten GAP-43 als Indikator der intrinsischen Regenerationsfähigkeit.

Quantitative Veränderungen wurden dabei mit Hilfe des Western Blots, qualitative durch Immunhistochemie analysiert.

3.2.1.1. Western Blot-Analyse der Rattenretina

3.2.1.1.1. Einfluß der Regeneration und weiterer modulierender Effekte auf die Proteinexpression

Vor dem Hintergrund erster Vorversuche (hier nicht gezeigt) und der Vorbehandlungsabhängigkeit der Regeneration der Rattenretina (s. 3.1.2.) stellte sich die Frage, ob die Expression untersuchter Proteine durch letztere bzw. der sekundär auftretenden Inflammationsreaktion folgende physiologische Prozesse, durch die Explantation der Retina oder tatsächlich durch die Regeneration induziert bzw. reguliert wird.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Vorbehandlungen durch eine Quetschung oder eine Linsenverletzung unterschiedliche Signaltransduktionswege bzw. die Freisetzung neurotropher Faktoren initiieren.

Es wurden daher die nachfolgend aufgeführten, unterschiedlich vorbehandelten Retinahomogenate im Western Blot analysiert, um die Herkunft der möglichen Expressionsdifferenzen aufzudecken (Tab. 1).

Effekte	Bez.	Abk.	Probe	Untersuchter Aspekt
Explantation	1)	Retina	unbehandelte, direkt entnommene Retina	Basisexpression
	2)	Expl. Kontrolle	unbehandelte, explantierte Retina	Explantation, Kultivierung, Axotomie
	3)	Expl. Kontrolle inv	unbehandelte, invers explantierte Retina	Explantation
Vorbehandlung	4)	Expl.Sh-op+Rti	durch Schein-OP und Einstich vorbehandelte, explantierte Retina	Narkose, OP, Verletzung
	5)	Expl. OC	durch Quetschung vorbehandelte, explantierte Retina	Quetschung
	6)	Expl. LI	durch Linsenverletzung vorbehandelte, explantierte Retina	Linsenverletzung
Regeneration	7)	Expl. OC+LI	kombiniert vorbehandelte, explantierte, regenerierte Retina	kombinierte Vorbehandlung, Regeneration
	8)	Expl. OC+LI inv	kombiniert vorbehandelte, invers explantierte, nicht-regenerierte Retina	kombinierte Vorbehandlung, "Nicht-Regeneration"
	9)	OC+LI	kombiniert vorbehandelte, direkt entnommene Retina	kombinierte Vorbehandlung, keine <i>in vitro</i> -Inkubation
	10)	PosK	positive Kontrolle	

Tab. 1: Versuchsgruppen der Western Blot-Analyse

Die Retinae wurden vorbehandelt (s. Material und Methoden), nach 5 Tagen entnommen bzw. explantiert und 48 h kultiviert. Zur Vereinfachung wurde bei den nachfolgenden Erläuterungen die Gruppen (7) und (8) als "regeneriert" bzw. "nicht-regeneriert" bezeichnet. Als Positivkontrollen dienten Gehirn- und Linsenhomogenate neugeborener Ratten und soweit vorhanden rekombinante, kommerziell erworbene Faktoren (10-30 ng). Die Experimente wurden mit jeweils 3 Proben je Gruppe durchgeführt.

Es zeigten sich alle Möglichkeiten der Regulation bzw. ihrer Kombinationen (Abb. 12). So konnte für das gliale GFAP (50 kDa) eine Hochregulation infolge der Vorbehandlung, nicht jedoch ein Einfluß der Explantation oder Regeneration nachgewiesen werden. Bereits die Schein-OP (4), die alleinige Quetschung (5) und am stärksten die Linsenverletzung (6) erwiesen sich dabei als expressionsstimulierend. Die kombinierte Vorbehandlung (7 + 9) führte zu einer weiteren Erhöhung der Signalintensität, die bei inverser Explantation und Nicht-Regeneration (8) verstärkt wurde.

Beim wachstumsassoziierten Protein GAP-43 (46 kDa) stellte sich die Vorbehandlung durch die alleinige Quetschung (5) als stimulierend, durch die alleinige Linsenverletzung (6) jedoch als inhibierend für die Expression dar. Kombiniert vorbehandelte Retinae (10) zeigten eine verstärkte Expression, unabhängig von einer nachfolgenden Regeneration (7) oder Nicht-Regeneration (8). Die Vorbehandlung scheint daher einen Einfluß auf die GAP-43-Expression zu haben.

Die Expression des neurotrophen Faktors CNTF (18 kDa) stellte sich als vorbehandlungsinduziert heraus. Bereits der Einfluß der Schein-OP (4) führte zu einer Zunahme des Signals, das durch die Quetschung (5) und noch massiver durch die Linsenverletzung (6) verstärkt wurde. Bei regenerierten Retinae (7) konnte eine deutliche Abnahme des Signals beobachtet werden, während kombiniert vorbehandelte, nicht explantierte Retinae (10) und nicht-regenerierte Retinae (8) eine stärkere Expression zeigten. CNTF könnte somit bei der Regeneration verbraucht werden. Ob die Explantation einen Einfluss auf die Expression hat, konnte an dieser Stelle aufgrund der zu geringen Basisexpression nicht geklärt werden.

Das von Mikroglia- und Müllerzellen gebildete Neurotrophin bFGF kann in verschiedenen Molekülgrößen von 18 bis 25 kDa vorliegen. Während ein Einfluß der Explantation oder Quetschung nicht sichtbar wurde, führte die Vorbehandlung im Fall der Linsenverletzung (6) zum Auftreten der höhermolekularen, ca. 22 kDa großen Form, deren Bedeutung noch nicht geklärt ist. Die Kombination mit einer Quetschung (10) sowie Regeneration (7) oder Nicht-Regeneration (8) hatten keinen Einfluss auf die bFGF-Expression. Es handelt sich damit um ein spezifisches Phänomen der Linsenverletzung.

Die Hochregulation des γ -Kristallins (20 kDa) in den Retinahomogenaten erwies sich als vorbehandlungsinduziert. Geringe Effekte einer vorausgehenden Linsenverletzung (6) werden dabei durch eine kombinierte Vorbehandlung aus Quetschung und Linsenverletzung massiv verstärkt (7). Regenerierte (7) und nicht-regenerierte Proben (8) zeigten eine ähnliche Expression des γ -Kristallins. Die im Vergleich zur kombiniert vorbehandelten, direkt entnommenen Retina (10) deutliche Abnahme des Signals bei den zuletzt genannten Proben war vermutlich ein Resultat der Explantation.

Im Falle des Rhodopsins (hier 33 kDa) konnten Gehaltsschwankungen auf die Präparation und Explantation (1 – 3) zurückgeführt werden. Dabei zeigte sich, dass eine vorausgehende Verletzung der Retina, wie sie bei der Schein-OP (4) und Linsenverletzung (6) erfolgte, eine starke Abnahme des Rhodopsins wahrscheinlich infolge inflammatorischer und degenerativer Prozesse in den Photorezeptorzellen hervorruft. Kombiniert vorbehandelte, direkt entnommene (10) oder invers explantierte Retinae (8) zeigten ein stärkeres Signal als normal explantierte (7), die eine höhere mechanische Belastung erfuhren. Die beobachteten Unterschiede sind somit auf die Präparation und Explantation, nicht jedoch auf regenerative Vorgänge zurückzuführen.

Neben den genannten Proteinen wurden die Proben auf mehr als 15 weitere Faktoren getestet. Während für TGF β , NGF und NT-4 keine oder nur eine unterhalb des Detektionslimits liegende Expression (pos. Signal für Kontrolle) nachgewiesen wurde, konnte für α -Kristallin, β -Kristallin, TNF α , HSP-27, STAT-6, OX-42, Map-2, ED-1 und Neurofilament trotz mehrfacher Wiederholung der Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen der primären Antikörper keine spezifische, detektierbare Immunantwort in den Proben erzielt werden.

Die Untersuchung der Expression bekannter, regenerationsassoziierter Moleküle im Regenerationsmodell der Ratte zeigte eine sowohl regenerations- als auch vorbehandlungsabhängige Regulation für GFAP, GAP-43, CNTF, bFGF und γ -Kristallin. Gleichzeitig offenbarte sie, daß die Veränderungen des Proteingehaltes auch aus der Explantation und Präparation (γ -Kristallin, Rhodopsin) resultieren können.

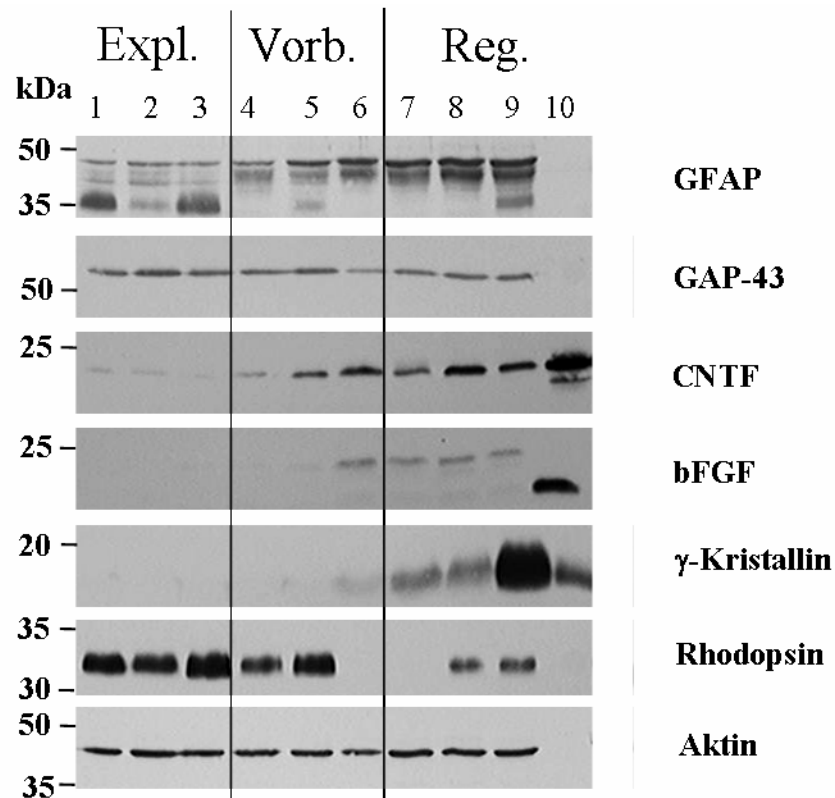


Abb. 12: Western Blots von Rattenretinae nach unterschiedlichen Vorbehandlungen

Die Herkunft beobachteter Expressionsunterschiede verschiedener Faktoren wurde durch den Vergleich unterschiedlich behandelter Retinahomogenate (30 µg/Spur) im Western Blot analysiert. Dargestellt sind die Signale für die jeweiligen Proteine in Abhängigkeit der Vorbehandlung der Proben: 1) Retina, 2) Expl. Kontrolle, 3) Expl. Kontrolle inv, 4) Expl. Sh-op+Rti, 5) Expl. OC, 6) Expl. LI, 7) Expl. OC+LI, 8) Expl. OC+LI inv, 9) OC+LI, 10) Positive Kontrolle

3.2.1.1.2. Detaillierte Analyse des GAP-43 und GFAP

Die Regulation von Proteinen erfolgt nicht nur über die veränderte Expression, sondern häufig auch über differentielle Aktivierung. Ein wichtiger Aspekt bei der Proteomanalyse der regenerationsinduzierten Effekte ist daher neben der Untersuchung der quantitativen Veränderungen auch die Untersuchung der posttranslationalen Modifikationen bzw. Aktivierungszustände der Proteine. Letzteres geschah an dieser Stelle anhand des hier näher analysierten GAP-43 und seiner phosphorylierten und damit aktiven Form (GAP-43P). Diese sollte sich im Western Blot durch 2 Banden von 48 und ca. 70 kDa darstellen (persönliche Auskunft Fa. Chemicon), wobei hier nur die höhermolekulare Form

beobachtet und analysiert wurde. Laut nachträglicher Mitteilung des Herstellers handelt es sich dabei jedoch vermutlich um ein anderes, fehldetektiertes Protein. Vergleichend wurde die gliale Reaktion durch Analyse der GFAP-Expression in den folgenden Gruppen betrachtet:

- 1) unbehandelte Kontrollretina
- 2) kombiniert vorbehandelte Retina (OC+LI)
- 3) kombiniert vorbehandelte, explantierte, gut regenerierte Retina (Expl. OC+Li reg +)
- 4) kombiniert vorbehandelte, auf PDL explantierte, schlecht regenerierte Retina (Expl. OC+Li reg -)
- 5) kombiniert vorbehandelte, invers explantierte, nicht regenerierte Retina (Expl. OC+Li inv)

Als positive Kontrolle wurde Gehirnhomogenat neugeborener Ratten (Nbrb) verwendet, und die Experimente mit jeweils 2 Proben je Gruppe durchgeführt.

GAP-43 war in allen untersuchten Zuständen nahezu gleichstark vorhanden (Abb. 13). Eine Ausnahme bildete die Gruppe nach Explantation auf PDL und deutlichen Abnahme des Signals (Abb. 13, 4). Dies kann sowohl eine Folge des fehlenden Laminins bzw. damit einhergehenden fehlenden Aktivierung der $\alpha_6\beta_1$ -Integrinrezeptor-gekoppelten Signalkaskade oder der schwachen Regeneration selbst sein.

Interessanterweise korrelierte die Expression der aktiven, phosphorylierten Form bzw. die von dem entsprechenden Antikörper detektierte Bande nicht damit. Das in der nativen Retina (1) nur sehr schwache Signal für "GAP-43P" wurde durch die kombinierte Vorbehandlung (2) massiv verstärkt und war in allen weiteren untersuchten Gruppen nahezu gleichstark (3-5). Die Aktivierung des GAP-43 bzw. die Expression des "GAP-43P" scheint damit nicht an die Anwesenheit von Laminin gekoppelt zu sein und durch die Vorbehandlung induziert zu werden.

Das in der nativen Retina (1) ebenfalls nur schwach exprimierte GFAP wurde infolge der durch die Vorbehandlung aktivierten Glia massiv hochreguliert (2). Explantierte, gut (3) und schwach (4) regenerierte Proben zeigten ein vergleichbares Signal, während dieses in den nicht-regenerierten Proben (5) erhöht war. Eine Modulation der GFAP-Expression

durch Korrespondenz zwischen den regenerierenden Axonen und ihrer glialen Umgebung ist somit möglich.

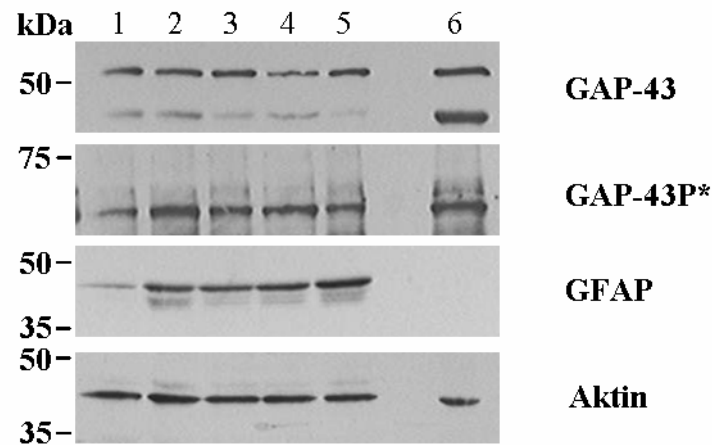


Abb. 13: Western Blot-Analyse des Aktivierungszustandes von GAP-43 und der glialen Reaktion

Rattenretinae unterschiedlicher Regenerationszustände zeigten eine nahezu gleichstarke Expression von GAP-43. Die phosphorylierte, aktive Form wurde ebenso wie GFAP durch die Vorbehandlung hochreguliert.

1) Retina, 2) OC+LI, 3) Expl. OC+LI reg +, 4) Expl. OC+LI reg – (auf PDL explantiert), 5) Expl. OC+LI inv, 6) Gehirnhomogenat neugeborener Ratten

*Laut nachträglicher Mitteilung des Herstellers ist das als GAP-43P erkannte Protein wahrscheinlich ein anderes, fehl-detektiertes Protein.

3.2.1.2. Immunhistochemische Detektion bekannter Proteine

Die Expression bekannter Proteine bzw. ihrer Veränderung ist häufig auf einzelne Zellpopulationen beschränkt und wird daher bei der Analyse der Gewebekomponenten im Western Blot nicht sichtbar. Zur Lokalisation und Detailbetrachtung einzelner Faktoren sowie zur Verifizierung der Ergebnisse des Western-Blots wurden die sich als reguliert dargestellten Proteine immunhistochemisch analysiert.

3.2.1.2.1. Einfluß der Regeneration

Zur immunhistochemischen Analyse der regenerationsbedingten Effekte wurden

Kryoschnitte der folgenden Gruppen angefertigt und mit den jeweiligen Antikörpern analysiert:

- A) unbehandelte Retina (Kontrolle)
- B) explantierte, unbehandelte, kaum regenerierte Retina (Expl. K)
- C) explantierte, kombiniert vorbehandelte, gut regenerierte Retina (Expl. OC+LI)
- D) invers explantierte, kombiniert vorbehandelte, nicht-regenerierte Retina (Expl. OC+LI inv)

Zunächst erfolgte die Untersuchung der glialen Reaktion durch Analyse der GFAP-Expression. Als weiterer glialer Marker wurde Bcl-2, dessen Expression in den retinalen Müllerzellen beschrieben wurde (Chen et al., 1994), hinzugezogen. Dieses Protoonkogen, sowie das hier ebenfalls untersuchte, streß-induzierte Hsp-27 wirken antiapoptotisch und geben Auskunft über den Vitalitäts- bzw. Degenerationszustand der RGZ (Abb. 14).

GFAP zeigte nach kombinierter Vorbehandlung und Regeneration eine deutliche Signalzunahme in den Fortsätzen und Endfüßchen der Müllerzellen sowie den Astrozyten der vitreo-retinalen Grenzschicht (Abb. 14, C, Pfeil u. -spitzen). Im Fall der Nicht-Regeneration offenbarte sich ein vergleichbar starkes Signal, jedoch starke strukturelle Veränderungen der Müllerzellen (D, Pfeil und Pfeilspitze). Die Färbungen bestätigten somit die Ergebnisse des Western Blots.

Die starken strukturellen Veränderungen der Müllerzellen bzw. Neuroglia innerhalb des Regenerationsgeschehens wurden durch die Färbung gegen Bcl-2 verifiziert. Die Explantation und damit assoziierte Prozesse (F) führten zu einer Abnahme und Verlagerung des Signals aus den Fortsätzen in die Zellsomata, die in der INL lokalisiert sind. Die kombinierte Vorbehandlung und Regeneration (G) resultierte in einer Signalzunahme für Bcl-2 in den Endfüßchen und Astrozyten der vitreo-retinalen Grenzschicht. Im Fall der Nicht-Regeneration (H) waren die Signale vorwiegend in den Fortsätzen und Somata der Müllerzellen lokalisiert.

Das stressinduzierte Hsp-27 zeigte eine Hochregulation in den RGZ und INL nach Explantation (J). Die Vorbehandlung führte zu einer weiteren Intensivierung, wobei das Signal nach Regeneration (K) stärker als nach Nicht-Regeneration (L) war. Glia-, insbesondere Müllerzellen scheinen daher auch in diesem Modell eine entsprechende Bedeutung für das Regenerationsgeschehen zu besitzen.

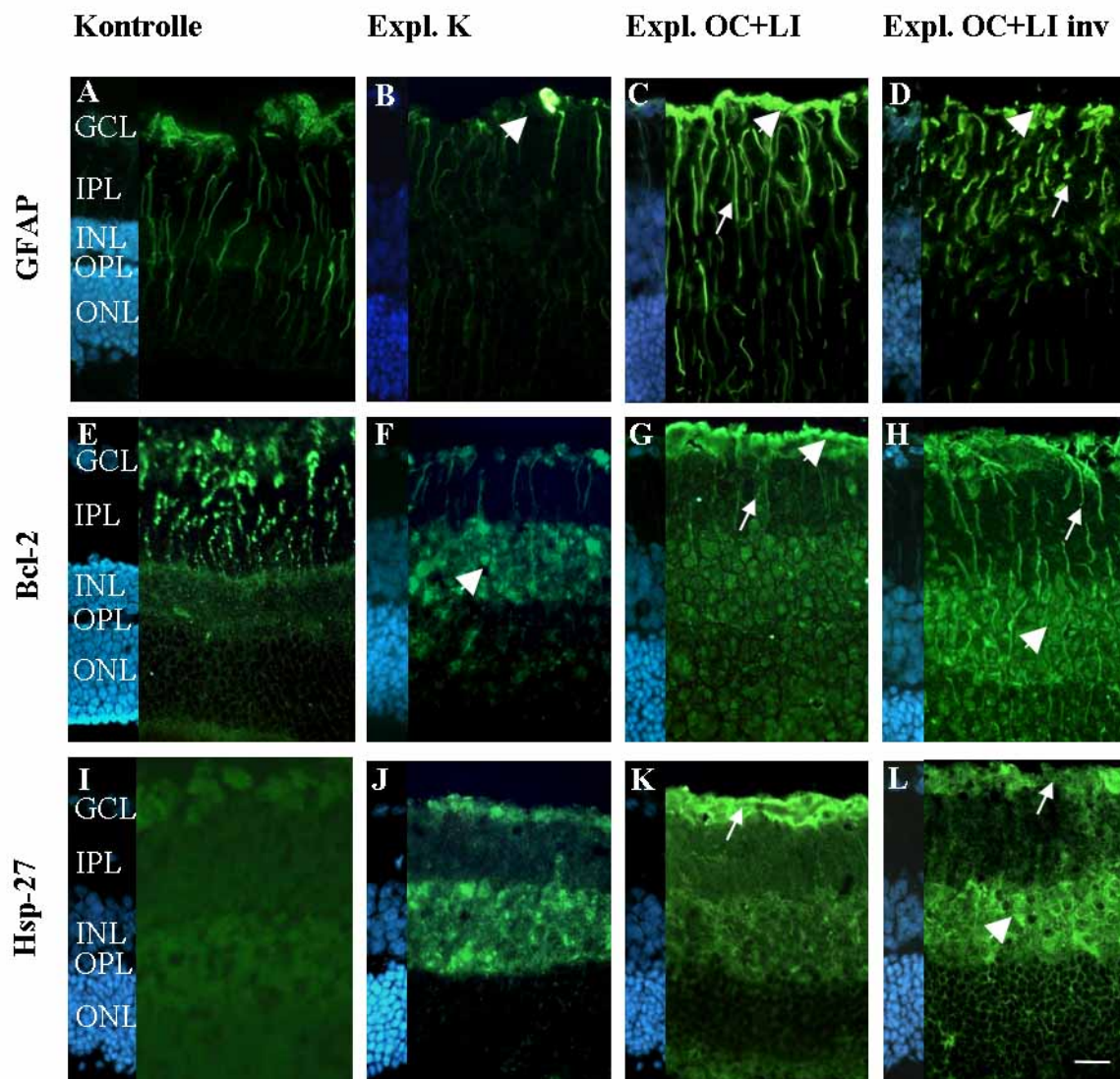


Abb. 14: Immunhistochemische Analyse glialer und streß-induzierter Proteine

Müllerzellen zeigten eine stärkere Expression von GFAP (A-D) und Bcl-2 (E-H) sowie strukturelle Veränderungen nach Vorbehandlung und Regeneration bzw. Nicht-Regeneration.

Im Fall der Regeneration zeigt sich ein Anstieg des GFAP- und Bcl-2- Signals in den Endfüßchen dieser Zellen sowie den Astrozyten der vitreo-retinalen Grenze (C, G, Pfeilspitzen).

Streßinduziertes Hsp-27 trat in den RGZ verstärkt nach Explantation, Regeneration bzw. Nicht-Regeneration auf (I-L).

Parallele Färbungen der Kerne mit Hoechst 33258 dienten der besseren Orientierung.

Maßstab: 20 µm

Abk.: GCL= Ganglienzellschicht, IPL= Innere plexiforme Schicht, INL= Innere nukleäre Schicht, OPL= Äußere plexiforme Schicht, ONL= Äußere nukleäre Schicht.

Die weitere Untersuchung galt dem wachstumsassoziierten GAP-43, sowie den neurotrophen Faktoren CNTF und bFGF (Abb. 15).

Die Ergebnisse des Western Blots konnten im Fall des GAP-43 immunhistochemisch bestätigt und lokalisiert werden (Abb. 15). Nach Vorbehandlung und Regeneration konnte eine Intensivierung des Signals in den RGZ sowie der dendritenreichen IPL (C) beobachtet werden, welches sich im Fall der Nicht-Regeneration bestehen blieb und relativ diffus in allen retinalen Schichten auftrat.

Auch die neurotrophen Faktoren CNTF und bFGF zeigten stärkere Signale nach Vorbehandlung und Regeneration, die sich im Fall des CNTFs in den RGZ, den Astrozyten der vitreo-retinalen Grenzsicht und der IPL (G, Pfeile u. Pfeilspitze), im Fall des bFGFs in den Fortsätzen und Endfüßchen der Müllerzellen (K, Pfeil und -spitze), darstellte. Bei "Nicht-Regeneration" blieb das Signal für CNTF nur in den RGZ erhalten (H, Pfeil) während sich bFGF in die Somata der Müllerzellen verlagerte (L, Pfeilspitze). Zeigte der Western Blot eine vergleichbare Expression für GAP-43 und bFGF, offenbarten die in der Immunhistochemie beobachteten Lokalisationsveränderungen ihre differentielle Regulation infolge Regeneration bzw. "Nicht-Regeneration".

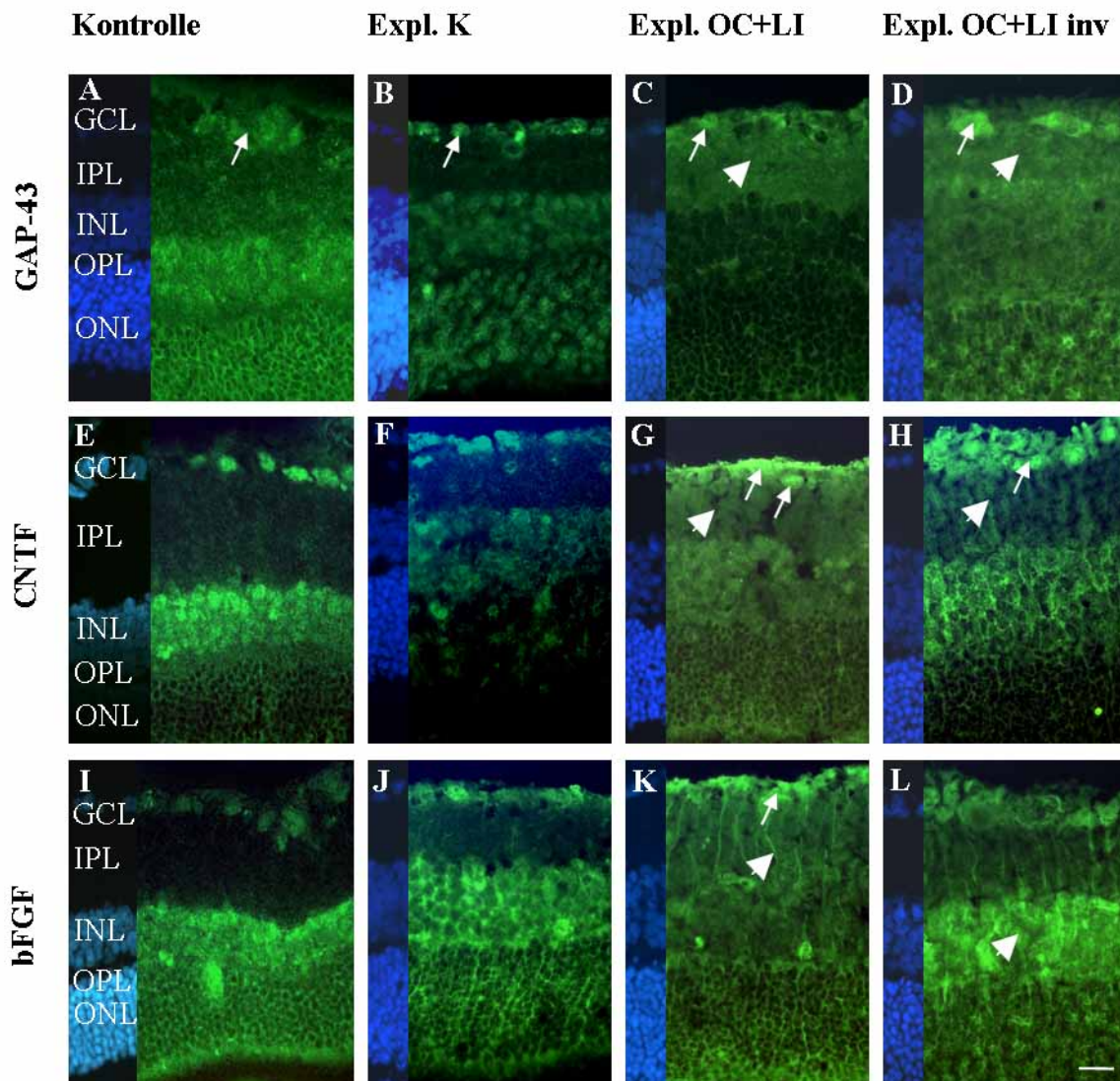


Abb. 15: Immunhistochemische Analyse wachstumsassoziierter und neurotropher Proteine

Nach Vorbehandlung und Regeneration zeigt sich eine deutliche Zunahme der Gap-43-Immunoaktivität in den Ganglienzellen und der dendritenreichen inneren plexiformen Schicht, die im Fall der anschließenden Nicht-Regeneration bestehen blieb (C, D, Pfeil u. Pfeilspitzen).

Der neurotrophe Faktor CNTF zeigte nach Vorbehandlung und Regeneration eine deutliche Signalzunahme in den RGZ, Astrozyten der vitreo-retinalen Grenzschicht und der IPL (G). Letztere konnte bei der Nicht-Regeneration nicht beobachtet werden (H, Pfeilspitze).

bFGF trat nach Regeneration vermehrt in den Fortsätzen und Endfüßchen der Müllerzellen (K, Pfeil und -spitzen), nach Nicht-Regeneration verstärkt in ihren Somata auf (L, Pfeilspitze).

Maßstab: 20 μ m, Abk.: s. Abb. 14

Zusätzlich wurde die Expression und Lokalisation der Kristalline, die sich im Western Blot mit Ausnahme des γ -Kristallins nicht darstellen ließen, analysiert (Abb. 16). Auch in der Immunhistochemie zeigten sich für α_B - und β_H -Kristallin nur schwache Signale, während γ -Kristallin gut nachweisbar war. Für alle hier untersuchten Kristalline konnte nach Vorbehandlung und Regeneration ein verstärktes Signal in der Ganglienzellschicht beobachtet werden (C, G, K, Pfeilspitzen), welches im Fall der Vorbehandlung und "Nicht-Regeneration" schwächer wurde (D, H, L, Pfeilspitzen). Sie schienen somit regenerationsassoziiert exprimiert zu werden.

Die Lokalisationsdifferenzen demonstrierten die Bedeutung einzelner Faktoren (z.B. GFAP, CNTF, bFGF, CNFT, GAP-43 oder γ -Kristallin) für die Regeneration, die aufgrund der gleichförmigen Expression im Western Blot nicht ersichtlich war. Diese Befunde stellten eine wertvolle Ergänzung zu den rein quantitativen Ergebnissen des Western Blots dar und unterstreichen die Notwendigkeit ergänzender Methoden bei der Untersuchung komplexer Proteinexpressionen.

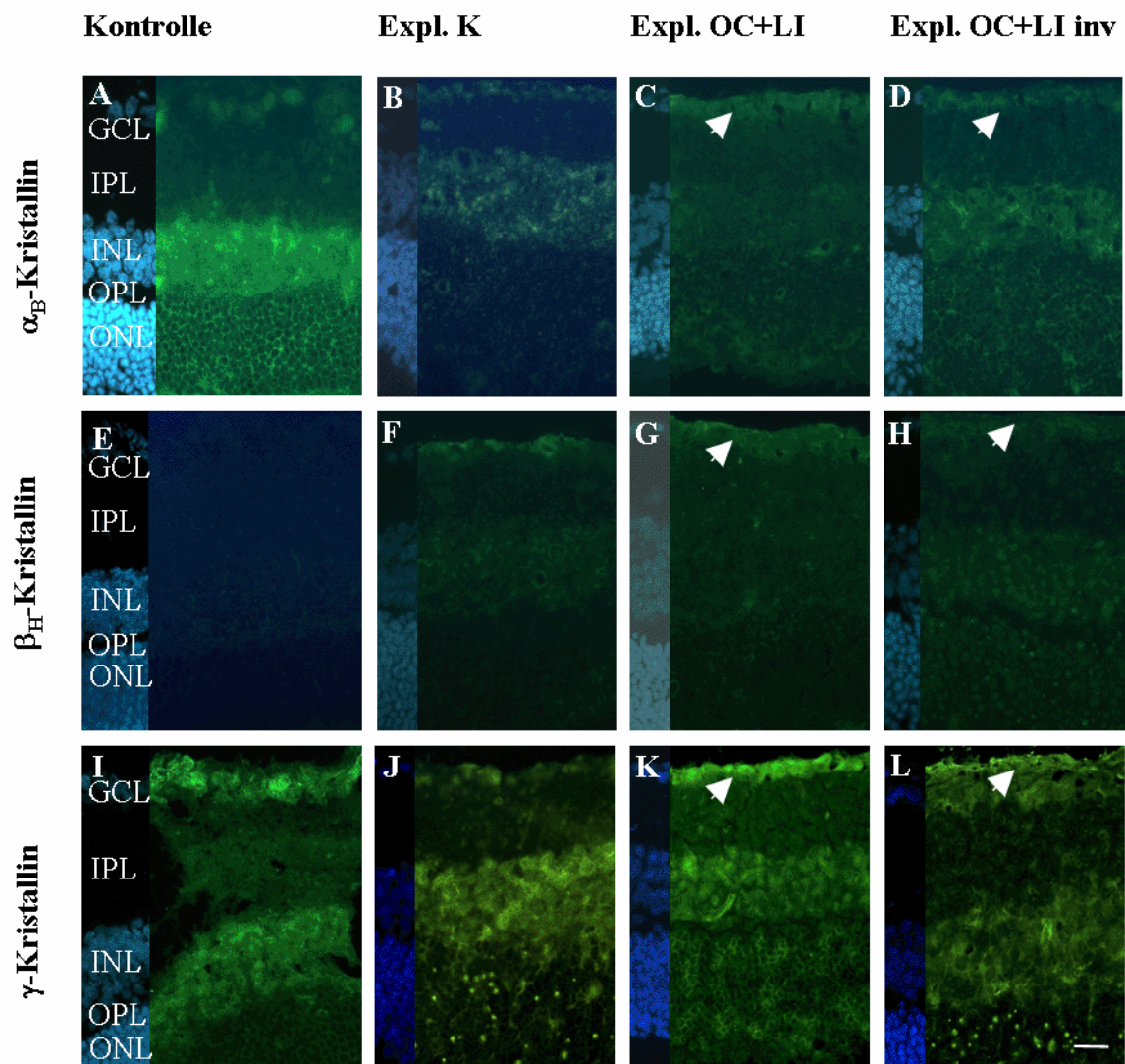


Abb. 16: Immunhistochemische Analyse der Kristalline

α_B -, β_H - und γ -Kristallin zeigten eine deutliche Signalzunahme in der Ganglienzellschicht nach Vorbehandlung und Regeneration (C, G, K). Das Signal nahm im Fall der anschließenden Nicht-Regeneration wieder ab (D, H, L).

Maßstab: 20 μ m, Abk.: s. Abb. 14

3.2.1.2.2. Einfluß der Vorbehandlung auf die GAP-43- und GFAP-Expression

Um die durch die einzelnen Vorbehandlungen erzielten Effekte auf die Proteinexpression besser zu erfassen wurden zusätzlich Kryoschnitte von Explantaten nach Quetschung oder Linsenverletzung angefertigt und exemplarisch für GAP-43 und GFAP untersucht.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expression und Lokalisation des GAP-43 in Abhängigkeit der jeweiligen Vorbehandlung. Während die Vorbehandlung durch Quetschung eine Anreicherung des GAP-43 in den RGZ sowie der IPL hervorrief, zog die Linsenverletzung eine Abnahme des GAP-43 in den RGZ unter ansonsten mit der Kontrolle vergleichbarer Expression in der INL und ONL nach sich. Die kombinierte Vorbehandlung zeigte eine der alleinigen Quetschung entsprechende Signalverteilung.

Die Expression des GFAPs in den Fortsätzen der Müllerzellen und Astrozyten der Gangliengzellschicht wurde durch eine Quetschung und verstärkt durch eine Linsenverletzung erhöht. Bei Kombination der beiden Vorbehandlungen zeigte sich eine Addition der einzelnen Effekte.

Diese Ergebnisse bestätigten die im Western Blot erhobenen Befunde und die Annahme der differentiellen regenerativen Wirkung der einzelnen Vorbehandlungen. Während beide Behandlungen zur Aktivierung der Glia und dadurch hervorgerufene Freisetzung bestimmter neurotropher Faktoren führten, rief nur die Quetschung eine Erhöhung des wachstumsassoziierten GAP-43 hervor. Der Mechanismus der Neuroprotektion bzw. –regeneration durch die Linsenverletzung muß demnach über andere Signalwege oder Modulation alternativer, regenerationskontrollierender Faktoren vermittelt werden.

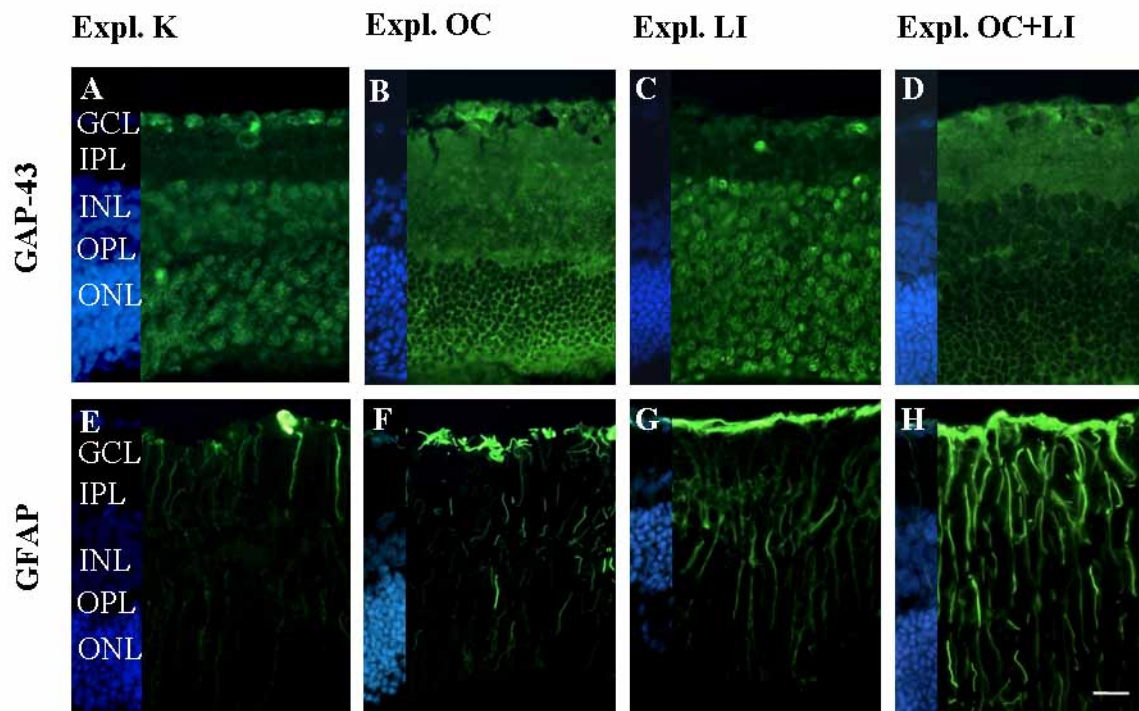


Abb. 17: Expression von GAP-43 und GFAP in Abhängigkeit der Vorbehandlung

Immunhistochemie zeigte eine differentielle Verteilung und Expression von GAP-43 und GFAP nach unterschiedlicher Vorbehandlung.

A-D) Kontrollretinae zeigten eine schwache Expression von GAP-43 in den Zellkernen (A). Nach Quetschung (B) war eine deutliche Zunahme des Signals in den RGZ, der IPL und OPL zu beobachten, das nach Linsenverletzung (C) fehlte. Kombiniert vorbehandelte und gut regenerierte Retinae (D) zeigten ebenfalls ein starkes Signal für GAP-43 in den RGZ und der IPL.

E-H) Quetschung (F) und noch massiver eine Linsenverletzung (G) verstärkten die GFAP-Expression in den glialen Endfüßchen der Müllerzellen und Astrozyten der vitreo-retinalen Grenzschicht. Die kombinierte Vorbehandlung (H) führte zu einer weiteren Intensivierung der GFAP-Expression.

Maßstab: 20 µm, Abk.: s. Abb. 14

3.2.2. Untersuchung differentiell exprimierter Proteine mittels 2D-PAGE

Parallel zu der Untersuchung von Expressionsveränderungen bekannter Proteine wurde die regenerierte Retina mit Hilfe der 2D-Elektrophorese auf bislang im Regenerationsgeschehen unbekannte, regulierte Proteine analysiert.

3.2.2.1. Etablierung und Optimierung der 2D-PAGE der Rattenretina

Zur Etablierung reproduzierbarer 2D-Gele der Retinahomogenate wurde folgender experimentellen Strategie nachgegangen:

Zur Gewinnung einer Übersicht erfolgte die Auftrennung der Retinahomogenate zunächst über den pH-Bereich von 3-10. Die Silberfärbung der Gele offenbarte eine unscharfe Trennung der Spots, flächige Überlagerungen in einzelnen Intervallen und insbesondere im sauren, mittleren und höhermolekularen Bereich auftretende Streifen. (Abb. 18, A) Zur Erhöhung der Auflösung wurden nachfolgend IPG-Streifen mit engerem pH-Intervall verwendet. Dabei wurde zunächst der saure pH-Bereich von 4-7 untersucht, der die gut löslichen und neu synthetisierten neurospezifischen Proteine (Larrivee and Grafstein, 1987) umfaßt. Dies sowie die Erhöhung der Fokussierungszeit von 60 auf 72 kWh führte zu einer deutlichen Verbesserung der Proteinauftrennung und Reduktion der Streifen. Schwache, zuvor verdeckte Spots wurden sichtbar, während sehr saure oder basische Proteine verloren gingen (B).

Durch Variation der Lysebedingungen und insbesondere dem Zusatz von Thioharnstoff zum Lysepuffer, konnte eine weitere Optimierung in Form einer verbesserten Löslichkeit und Auftrennung der Probe erzielt werden (C).

Die vorwiegend im sauren, höhermolekularen Bereich auftretenden Streifen, bei denen es sich vermutlich um gelöste DNA, RNA oder hydrophobe Proteine handelte, verhinderten eine Auswertung entsprechender Spotmuster in diesem Bereich. Zur Reduktion dieser Problematik wurden die Proteine der Probe unter Verwendung des "Clean Up Kits" (Amersham) gefällt und die Verunreinigungen abgetrennt. Als Resultat wurde eine deutliche Verminderung der Streifen, gleichzeitig jedoch auch ein beträchtlicher Verlust an Protein und Veränderungen des Spotmusters (Abb. 18, D, E, eingekreiste Bereiche)

beobachtet. Dieser Ansatz wurde daher nicht weiter verfolgt. Der alternative Einsatz von Benzonase, einer extrem resistenten DNA- und RNA-Endonuklease, während der Lyse, erwies sich als positiv (F).

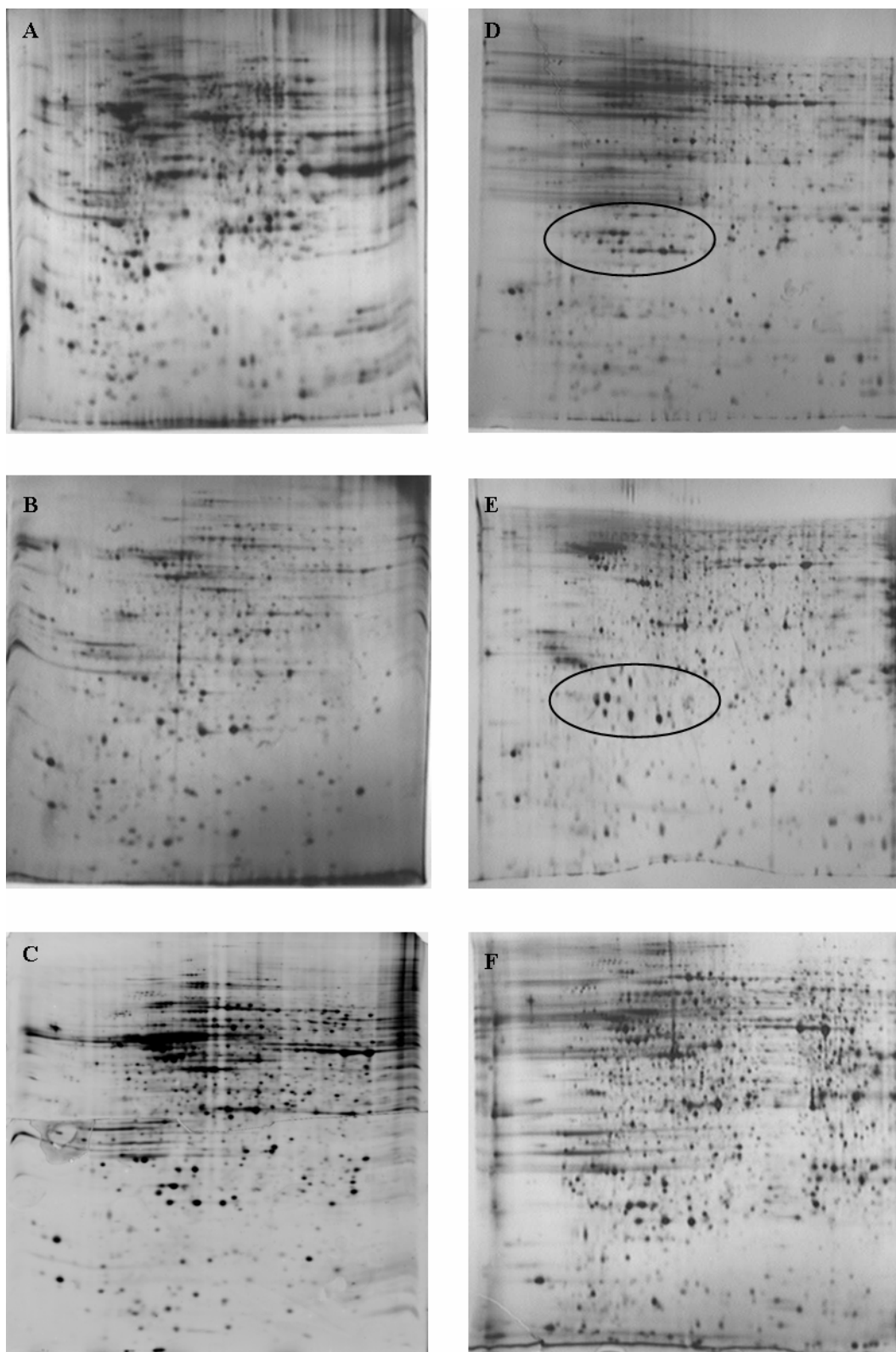
Weitere Optimierungsschritte wie der Auftrag der Probe mit Hilfe von Sample Cups oder der Einsatz eines neuen, besser solubilisierenden Detergenzes ASB-14 erwiesen sich als positiv für die zweidimensionale Auftrennung. Die Ansätze wurden aber an dieser Stelle nicht weiterverfolgt, da leichte Veränderungen des Proteinmusters mit ihnen einhergingen, und damit ein Vergleich innerhalb der bestehenden Gelserie nicht möglich war.

zu Abb. 18: Etablierung und Optimierung der 2D-Gele der Retinahomogenate

Silbergefärbte Gele zeigen die experimentelle Strategie zur Etablierung reproduzierbarer Gele mit guter Auflösung des Musters.

Die Auftrennung der Proteine wurde zunächst zur Übersicht mit IPG-Streifen pH 3-10 (A) vorgenommen. Die Verwendung von IPG-Streifen mit engeren pH-Gradienten von pH 4-7 und die Erhöhung der Fokussierungszeit (B) führten ebenso wie der Einsatz von S-Urea zum Lysepuffer (C) zu einer deutlichen Verbesserung der Gele. Die Lösung der Streifenproblematik im saueren, höhermolekularen Bereich durch den Einsatz des Clean Up Kits (amersham) (D, Kontrolle, E, nach Clean Up) führte u.a. zu Veränderungen des Proteinmusters (eingekreiste Bereiche) und wurde schließlich durch die Zugabe von Benzonase (F) erzielt.

Abb. 18:



Mit dem so erarbeiteten Protokoll konnten gut auflösende Gele produziert werden, die je nach Anfärbung mit kolloidalem Coomassie (s. Abb. 18) bzw. Silber 500 – 1000 separierte Proteinspots zeigten.

Erste Vergleiche der mit kolloidalem Coomassie gefärbten 2D-Gele von regenerierten und nicht-regenerierten Retinaexplantaten zeigten signifikante Unterschiede (s. Abb. 19). Zwei Spots wurden ausgestochen, verdaut und mit Hilfe der Massenspektrometrie als GFAP identifiziert. Die Technik der 2D-PAGE mit anschließender Massenspektrometrie erwies sich somit zur Analyse der Expressionsunterschiede und der hier untersuchten Fragestellung als geeignet.

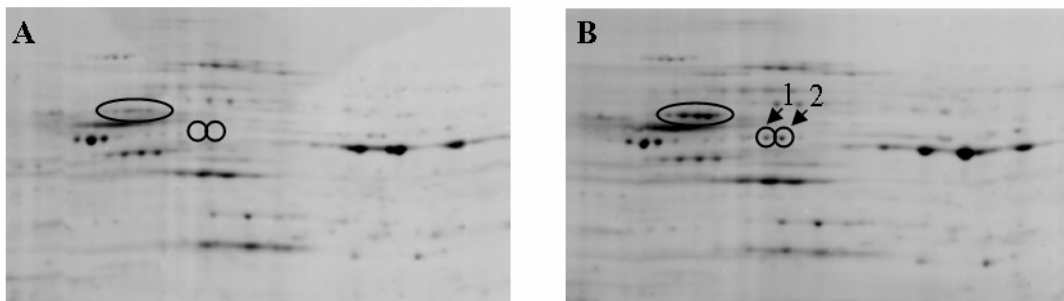


Abb. 19: Eignung der 2D-Elektrophorese zur Detektion und Identifizierung von Expressionsdifferenzen

2D-Gele von explantierten, nativen (A) und vorbehandelten, regenerierten Retinae (B) zeigten nach Anfärbung mit kolloidalem Coomassie signifikante Unterschiede, die ausgestochen und durch Massenspektrometrie als GFAP (Spot 1 + 2) identifiziert wurden.

3.2.2.2. Kartierung des Retinaproteoms der Ratte

Für nachfolgende vergleichende Analysen sollte eine Basis in Form einer Proteinkarte der Rattenretina geschaffen werden. Dazu wurden 32 prominente oder interessante Spots der zweidimensional aufgetrennten Retina u.a. im Rahmen des eines Kooperationsprojektes mit Dr. Simone König, IFG Münster, (s. 3.2.4.) exzidiert und durch massenspektrometrische Analyse (s. 2.5.6.10.) identifiziert.

Es wurden Proteine verschiedenster Größe und Funktion gefunden, die geeignete Lysebedingungen verifizieren und ein breites Spektrum des Retinaproteoms reflektieren. Darüber hinaus sichert dies die Erfassung möglicher Veränderungen in den

verschiedensten Funktionswegen der Zelle. Proteine, die am Energiestoffwechsel der Zellen beteiligt sind, stellten dabei aufgrund ihrer quantitativen Dominanz und der Bedeutung dieser Vorgänge für die Vitalität und Regenerationsfähigkeit der Zellen einen Hauptanteil dar (s. Tab. 2).

Durch Kennzeichnung der identifizierten Proteine auf dem Gel wurde eine Karte des zweidimensional getrennten Retinaproteoms für die nachfolgenden Untersuchungen, sowohl unter dem hier betrachteten Aspekt der Regeneration als auch weiterer im Labor verfolgter Fragestellungen, wie z.B. krankheitsbedingter Veränderungen (Glaukom, Retinitis pigmentosa), generiert (s. Abb. 20).

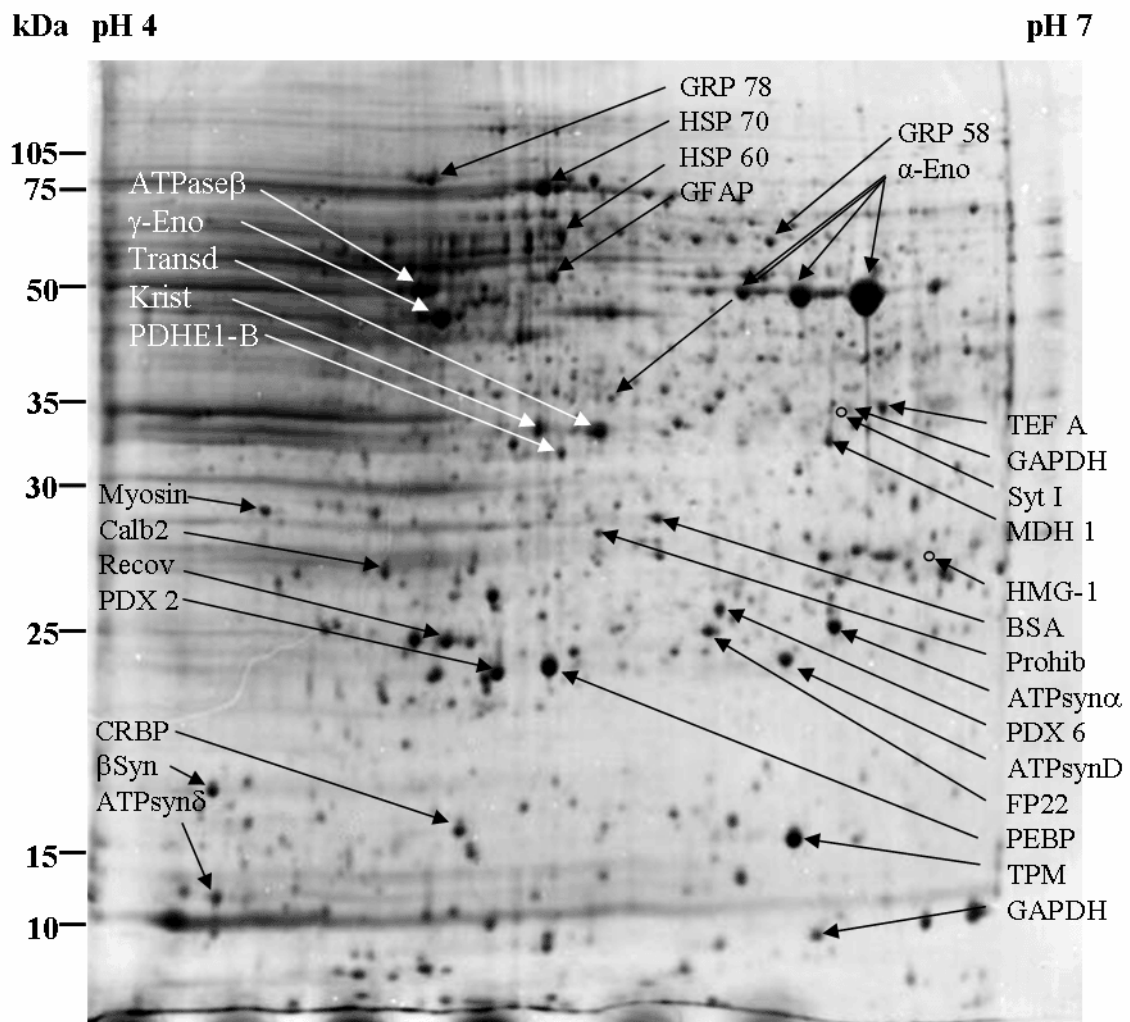


Abb. 20: 2D-PAGE-Karte einer regenerierten Rattenretina (Expl. OC+LI)

Dargestellt ist das Proteinmuster von vorbehandelten, regenerierten Rattenretinae (n = 3, 1300 μ g/Gel) nach zweidimensionaler Auftrennung und kolloidaler Coomassie-Färbung. 32 Proteine wurden durch Massenspektrometrie identifiziert und eingetragen.

Abk.	Protein	MW (kDa)	Funktion
<i>ATPsynα</i>	<i>ATP synthase α chain</i>	59	<i>Energ. Metab.</i>
ATPase β	ATP synthase β subunit	51	Energ. Metab.
ATPsyn δ	ATP synthase δ subunit	18	Energ. Metab.
<i>ATPsynD</i>	<i>ATP synthase subunit D</i>	19	<i>Energ. Metab.</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	70	
Calb2	Calbindin 2	31	Ca ²⁺ -Bindung
CRBP	Cellular retinol binding protein	16	Metabolismus
<i>α-Eno</i>	<i>α-Enolase I</i>	47	<i>Glykolyse</i>
γ -Eno	γ -Enolase	47	Glykolyse
FP22	Fertility protein SP22	20	
GAPDH	Glyceraldehyde-3- phosphatedehydrogenase	11 +34	Glykolyse
<i>GFAP</i>	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>	50	<i>Zytoskelett</i>
GRP 58	Glucose regulated protein 58 kDa	57	Chaperon
GRP 78	Glucose regulated protein 78 kDa	72	Chaperon
<i>HMG-1</i>	<i>High mobility group protein 1</i>	20	<i>Signaltransd.</i>
<i>HSP 60</i>	<i>Heat shock protein 60 kDa</i>	61	<i>Chaperon</i>
HSP 70	Heat shock protein 70 kDa protein 8	71	Chaperon
Krist	Kristallin	34	Chaperon
MDH	Malate dehydrogenase 1	37	Energ. Metab.
Myosin	Myosin	24	Zytoskelett
PDHE1-B	Pyruvate dehydrogenase E1 β -subunit	39	Energ. Metab.
<i>PEBP</i>	<i>Phosphatidylethanolamin binding protein</i>	21	<i>Signaltransd.</i>
<i>Prohib</i>	<i>Prohibitin</i>	30	<i>Proliferation</i>
PDX 2	Peroxiredoxin 2	22	Redox
PDX 6	Peroxiredoxin 6	25	Redox
<i>Recov</i>	<i>Recoverin</i>	23	<i>Vis. Perzeption</i>
<i>Syt I</i>	<i>Synaptotagmin I</i>	47	<i>Syn. Transmis</i>
β Syn	β -Synuclein	17	Syn. Transmis
TefA	Transcription elongation factor A	34	Transkription
Tpm	Tropomyosin	33	Zytoskelett
Transd	Transducin β chain A	37	Vis. Perzeption

Tab. 2: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine der regenerierten Rattenretina

Aufgelistet sind die den entsprechenden Abkürzungen zugeordneten Proteine sowie ihre Größe und Funktion. Kursiv dargestellte Proteine wurden sequenziert; fett gedruckte werden im Vergleich zur degenerierten Retina differentiell exprimiert.

3.2.2.3. Vergleichende Analyse der 2D-Gele

Um die im Zuge des Regenerationsgeschehens erfolgte veränderte Expression von neurotrophen und regenerationsassoziierten Proteinen zu ermitteln, wurden die 2D-Gele regenerierter (Expl. OC+LI) und nicht-regenerierter (Expl. OC+LI inv) Retinaexplantate mit der Analysesoftware PDQuest und durch optische Überprüfung verglichen. Die Experimente wurden mit jeweils 3 Proben je Gruppe durchgeführt.

Quantitativer Vergleich

Der quantitative Vergleich der Gele unter der Vorgabe der 3-fach stärkeren Expression resultierte in 33 differentiell exprimierten Spots, von denen 21 im Fall der regenerierten und 12 im Fall der nicht-regenerierten Retina verstärkt exprimiert wurden (s. Abb. 21). Erste Spots wurden ausgestochen und massenspektrometisch analysiert, wobei bis zum jetzigen Zeitpunkt in 2 Fällen eine Identifizierung möglich war. Synaptotagmin I, ein an synaptischen Transmission beteiligtes Protein, und das Signaltransduktions-involvierte High mobility group protein-1 wurden dabei in den nicht-regenerierten Retinahomogenaten als hochreguliert gefunden. Die in regenerierten Homogenaten verstärkt exprimierten und ausgestochenen Proteine konnten bis dato aufgrund der zu geringen Menge nicht identifiziert werden.

Qualitativer Vergleich

Die nachfolgend angestrebte qualitative Analyse im Sinne einer "an-aus"-Regulation oder Lokalisationsveränderung war unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht möglich. Durch die Analysesoftware wurden mehr als 300 Spots als reguliert ermittelt, was auf eine fehlerhafte Zuordnung infolge der individuellen Laufvariationen der einzelnen Gele zurückzuführen ist. Der qualitative Vergleich wurde daher soweit wie möglich durch optische Kontrolle vollzogen und mit den Daten des quantitativen Vergleichs abgeglichen.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese stellte sich somit als geeignet zur Identifizierung von quantitativen Expressionsunterschieden dar. Eine Identifizierung regenerationsassoziiierter Proteine gelang nur begrenzt, da die erwartungsgemäß schwache Expression dieser Faktoren eine Visualisierung und Identifizierung erschwerte.

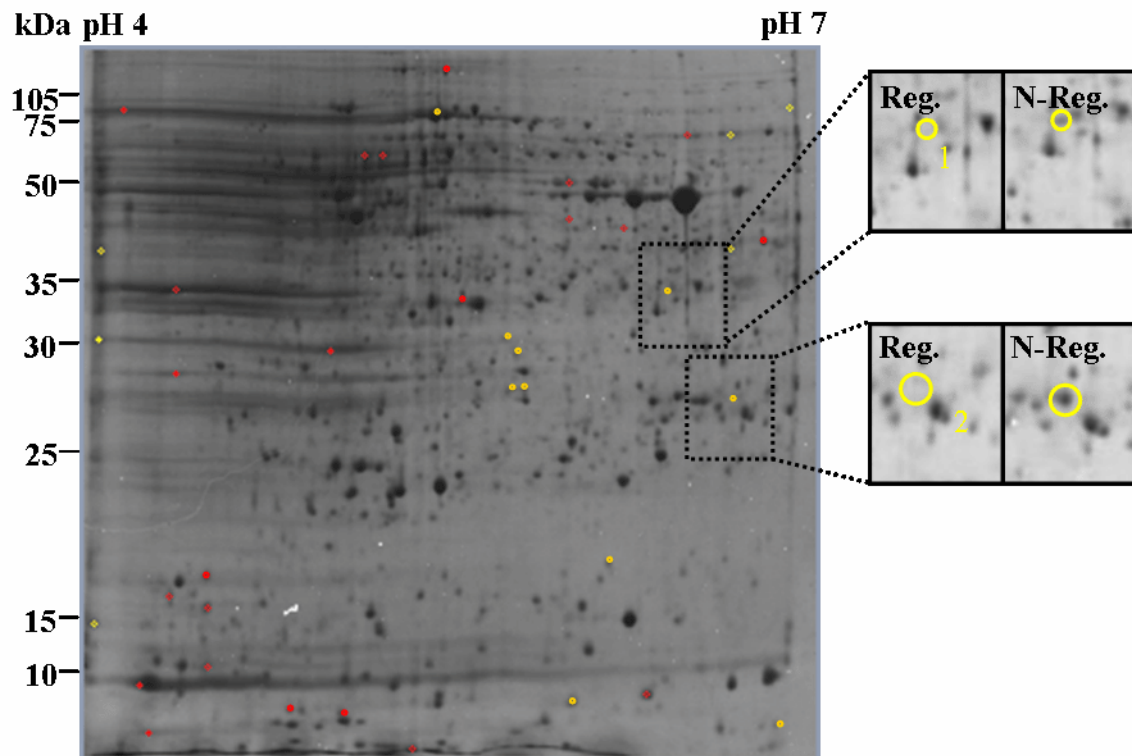


Abb. 21: 2D-Analyse regenerationsabhängiger Proteinexpressionsdifferenzen

Zweidimensional aufgetrennte regenerierte und nicht -regenerierte Rattenretinae (1300 µg/Gel) zeigten nach Anfärbung mit kolloidalem Coomassie 33 differentiell exprimierte Proteinspots, 21 Spots in Homogenaten regenerierter (rote Kreise) und 12 Spots in Homogenaten nicht-regenerierter Retina (gelbe Kreise). Erste Spots wurden ausgestochen und als Synaptotagmin I (1) und High mobility group protein-1 (2) identifiziert.

Reg. = Regeneration, N-Reg. = Nicht-Regeneration

3.2.2.4. Experimentelle Strategien zur Optimierung der Identifizierung differentiell exprimierter Proteine

Zur Lösung dieser Problematik wurden zwei neue Ansätze ausgetestet:

Zum einen wurde die Probe durch eine differenzielle Lyse mit Hilfe des "Sequentiell Extraction Kits" (BioRad) vorfraktioniert. Ziel war es dabei, Proteine ähnlicher Eigenschaften infolge sukzessiver Verstärkung der Lysebedingungen und Erhöhung des Detergenz-Zusatzes in einzelnen Fraktionen anzureichern und dadurch im Gel besser sichtbar zu machen. Da Proteine häufig in mehreren Fraktionen in unterschiedlichen

Anteilen auftraten, konnte der Anreicherungseffekt nicht im erwarteten Ausmaß erzielt werden. Zudem erhöhte sich die Varianz in der Probe bzw. Probenlyse durch die vorgeschalteten Schritte weiter, so daß dieser Ansatz zunächst nicht weiter verfolgt wurde.

Zum zweiten wurde im Zuge eines Kooperationsprojektes mit Dr. Simone König, IFG Münster, das Detergenz ALS (*acid-labile surfactant*) als Alternative zum SDS in der Probenaufarbeitung und 2D-PAGE ausgetestet. Dieses sollte zu einer leichteren und sichereren Identifizierung bei der anschließenden MALDI-Analyse führen. Mit vergleichenden ALS/SDS-2D-PAGE Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Peptid-Identifizierung der schwach exprimierten Proteine bei der massenspektrometrischen Analyse und Zuordnung durch den Einsatz von ALS signifikant erhöht wird. Entsprechende Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (König et al., 2003). Aufgrund fehlender kommerzieller Erwerbbarkeit der Substanz konnte dieser Lösungsweg zunächst nicht weiter beschrritten werden.

Als dritter Lösungsansatz wurde der Nachweis bestimmter Proteine mit Hilfe von Antikörpern vorgenommen. Dies erlaubt eine sehr sensitive Darstellung von Unterschieden bekannter Proteine, die im Rahmen der 2D-Analyse gegebenenfalls nicht sichtbar wurden. Aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit und Handhabung wurde dieser Ansatz im Western Blot der 1D-Gele weiterverfolgt.

Die Untersuchung der Expression bekannter, regenerationsassoziiierter Moleküle im regenerierenden Rattenmodell offenbarte die Multikausalität der bei verschiedenen Faktoren beobachteten Effekte: Veränderungen des Proteingehaltes konnten sowohl auf regenerative bzw. wahrscheinliche degenerative Prozesse, als auch auf die Explantation und Vorbehandlung zurückgeführt werden. Eine Proteomanalyse mit dem Ziel der Identifizierung regenerationsabhängig regulierter Faktoren stellt sich daher bei diesem Regenerationsmodell mit obligatorischer Vorbehandlung als äußerst schwierig dar. Mögliche beobachtete Effekte können nur durch zahlreiche Kontrollen als tatsächlich regenerationsabhängig reguliert identifiziert werden. Dies initiierte die Suche nach einem alternativen, weniger komplexen Regenerationsmodell, welches schließlich mit dem Affenmodell gefunden wurde.

3.3. Regeneration der Affenretina

Im Zuge der Kooperation mit dem Institut für Reproduktionsmedizin, UKM, Münster bot sich die Austestung von Retinae von Marmosettaffen (*Callithrix jacchus*) in dem Regenerationsmodell an. Es wurde daher die Explantatkultur für die Affenretina etabliert, verifiziert und charakterisiert.

3.3.1. Quantifizierung und Charakterisierung der Regeneration der Affenretina

Im Gegensatz zur Rattenretina wurde die Affenretina in keinster Weise *in vivo* vorbehandelt. Zur Etablierung des Explantationsmodells der Affenretina wurde auf die Kultivierungsbedingungen der Rattenretina zurückgegriffen, die sich auch für diese Spezies als geeignet und regenerationsförderlich erwiesen.

Entgegen der Erwartungen aus der Bibliographie zur Nervenregeneration resultierte ein spontanes, massives Auswachsen von Fasern der Affenretina (Abb. 22, A), das sich über die gesamte Breite des Explantates erstreckte (B). Die Fortsätze wurden bis zu 2000 μm lang und vernetzten sich mit zunehmender Anzahl stark (C). Dies erschwerte die exakte Quantifizierung der Fasern, so dass deren Anzahl zu den Kultivierungszeitpunkten von 72 und 96 h nur noch vorsichtig, eher unter der tatsächlichen Anzahl liegend, geschätzt wurden.

Bereits 16 h nach Explantation konnten erste auswachsende Fasern beobachtet werden, deren Anzahl nach 24 und 48 h in Kultur rasch und massiv zunahm (Abb. 23). Nach 72 bzw. 96 h flachte die Zunahme ab und ging in eine Sättigung über. Im weiteren Verlauf der Experimente wurde die Kultur daher nach 96 h, einem Zeitpunkt hoher regenerativer Aktivität, beendet und das Material für die nachfolgende proteomische Analyse gewonnen.

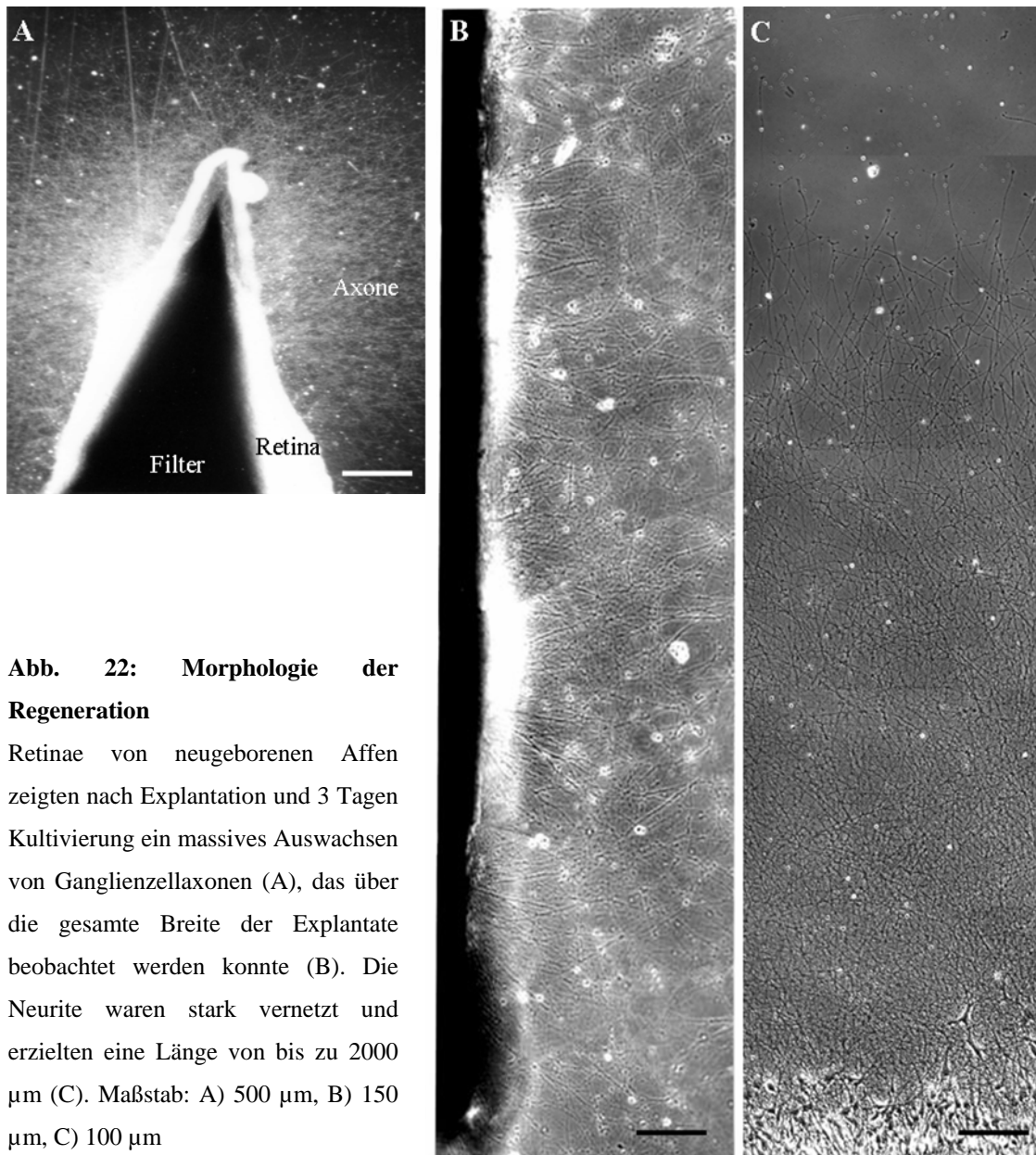
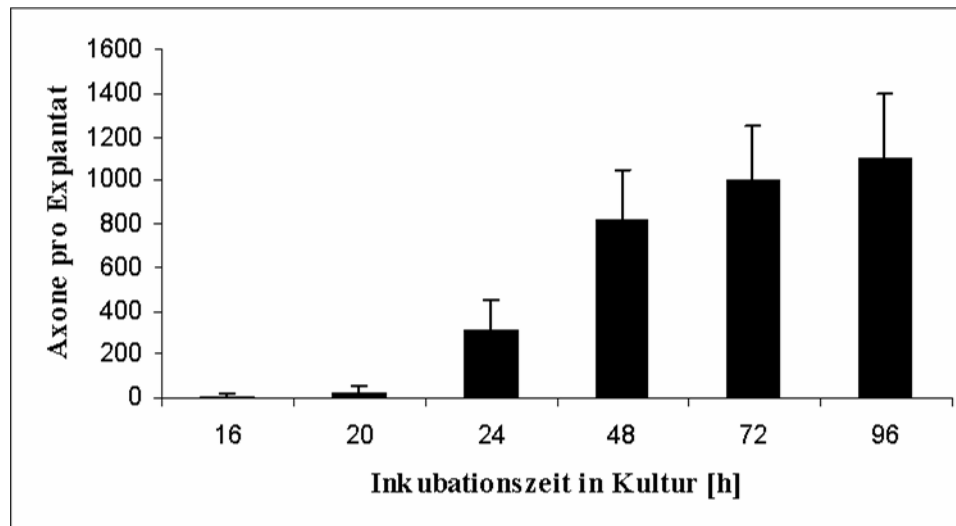


Abb. 22: Morphologie der Regeneration

Retinae von neugeborenen Affen zeigten nach Explantation und 3 Tagen Kultivierung ein massives Auswachsen von Ganglienzellaxonen (A), das über die gesamte Breite der Explantate beobachtet werden konnte (B). Die Neurite waren stark vernetzt und erzielten eine Länge von bis zu 2000 μm (C). Maßstab: A) 500 μm , B) 150 μm , C) 100 μm



	16 h	20 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Axone pro Explantat	8 ± 7	28 ± 31	313 ± 139	817 ± 232	1000 ± 250	1100 ± 300
Tiere	n = 3	n = 3	n = 4	n = 4	n = 2	n = 2

Abb. 23: Quantifizierung der Regeneration der Affenretina

Das Histogramm zeigt die Faserzahl pro Explantat einer neugeborenen Affenretina (P0). Bereits nach 16 h konnten erste auswachsende Axone beobachtet werden, deren Anzahl im Verlauf der weiteren Kultivierung massiv zunahm und nach 96 h eine Plateauphase erreichte.

3.3.2. Nachweis der neuronalen Herkunft der auswachsenden Fasern

Die aus dem Explantat regenerierten Fasern waren dünn und wiesen die typische Morphologie von Axonen auf. Zur Absicherung der neuronalen Herkunft der auswachsenden Fortsätze wurden an verschiedenen Kulturen immunhistochemische Färbungen gegen das astrozytäre GFAP, sowie gegen die neurospezifischen Marker Neurofilament und GAP-43 durchgeführt. Während die Detektion von GFAP negativ war, wurden für die neuronalen Marker in allen Fasern starke Signale nachgewiesen und diese damit ausnahmslos als Neurone sicher identifiziert (Abb. 24). Das wachstumsassoziierte GAP-43 konnte dabei insbesondere in den Transportvesikeln und den Wachstumskegeln der Axone nachgewiesen werden (Abb. 24, D).

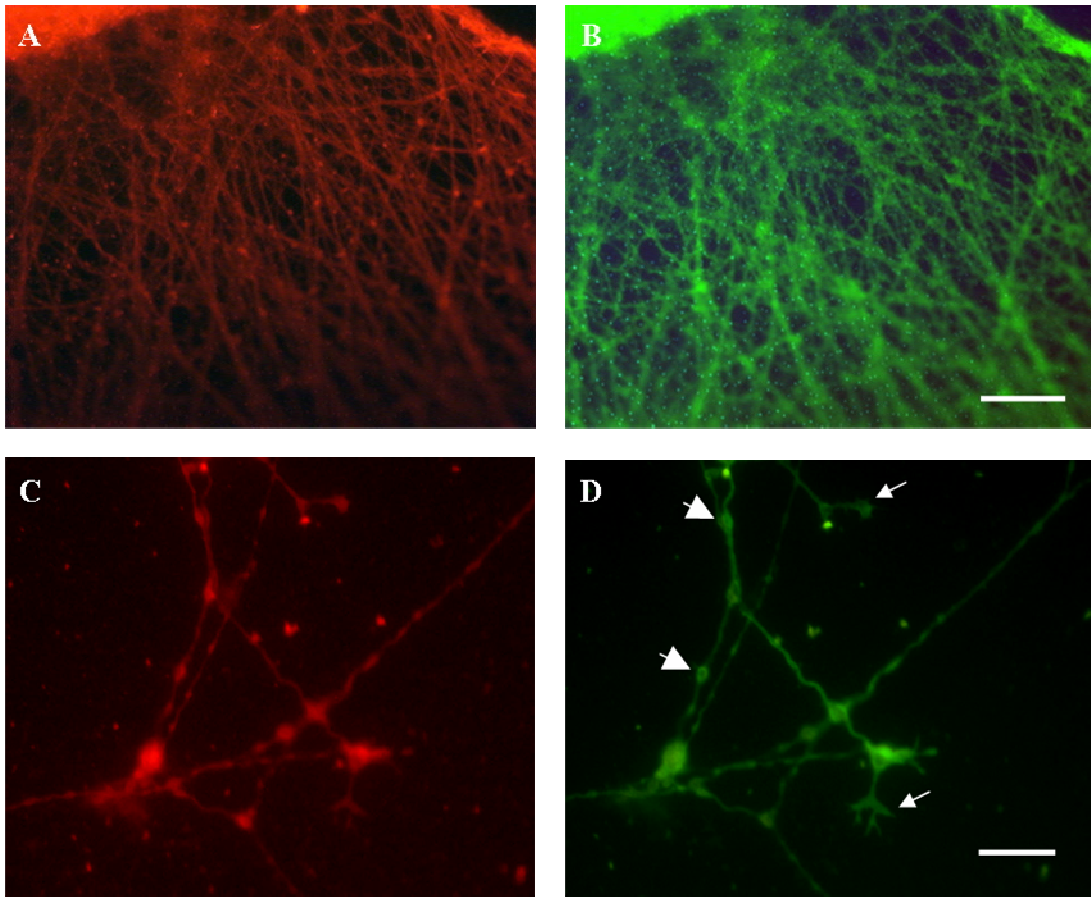


Abb. 24: Identität der auswachsenden Fasern

Auswachsende Fasern der Retinaexplantate neugeborener Affen zeigten in der Immunhistochemie eine positive Anfärbung durch neurospezifische Neurofilament- (A, C) und GAP-43-Antikörper (B, D). Die Detailaufnahmen offenbarten ein verstärktes Signal für GAP-43 in den Wachstumskegeln (D, Pfeile) und den Transportvesikeln der Axone (D, Pfeilspitzen).

Maßstab: A + B) 40 μm , C + D) 10 μm

3.3.3. Charakterisierung der regenerierenden Ganglienzellen

Ein weiteres Ziel in der Charakterisierung der Regeneration der Affenretina war die Identifizierung der regenerierenden Ganglienzellen. Diese wurden durch Applikation kleiner DiI-Farbstoffkristalle an die Neuritenenden retrograd angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Von den beiden Hauptklassen der RGZ, Parasol- und Midget-Zellen (Leventhal et al., 1981, Watanabe and Rodieck, 1989), ließen sich hier nur erstere darstellen und identifizieren (Abb. 25). Die Midget-Zellen, die vorwiegend um den Punkt des schärfsten

Sehens, der Fovea, lokalisiert sind, sowie die selteneren Giant-Parasolzellen, konnten als zur Regeneration beitragende Zellen in laborinternen, parallelen Versuchen nachgewiesen werden (persönliche Auskunft Prof. Thanos).

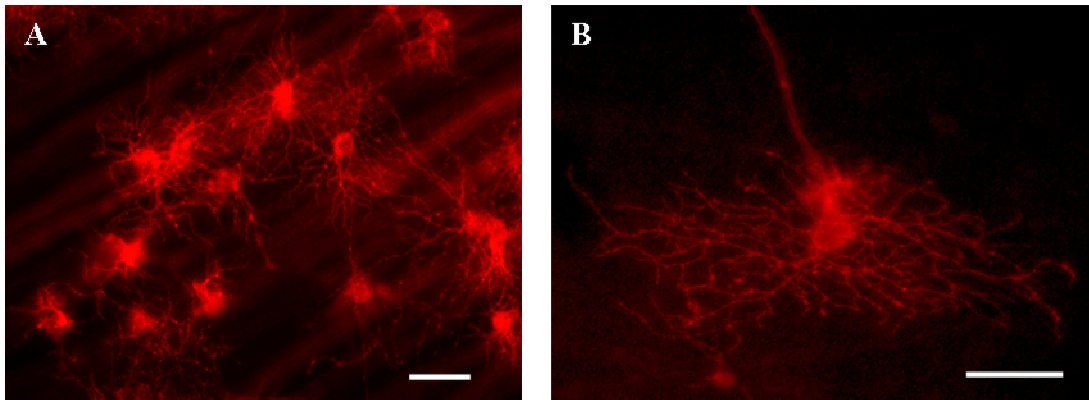


Abb. 25: Zelluläre Zuordnung der auswachsenden Fasern

Retrograde Färbung regenerierter Fasern mit DiI zeigte, daß die auswachsenden Axone den Ganglienzellen zugeordnet werden können.

A) Übersicht mehrerer Parasolzellen, B) einzelne Parasolzelle

Maßstab: 50 μ m

3.3.4. Substratabhängigkeit der Regeneration

Auch in dem Modell der Affenretina sollte der Einfluß der Extrazellulärmatrix auf die Regeneration untersucht und ein regenerationspermissives Substrat gefunden werden. Retinae neugeborener Affen wurden dazu auf Poly-D-Lysin (PDL), Laminin-1 (LM-1), Laminin-2 (LM-2), Kollagen G (KolG) und Kollagen I (KolI) explantiert und kultiviert. Regenerierte Axone wurden nach 48 h Kultivierung quantifiziert und die entsprechenden Durchschnittswerte in Abb. 26 dargestellt.

Ein quantitatives Auswachsen von Fasern konnte ausschließlich auf Laminin-1 (685 ± 287 Axone pro Explantat) beobachtet werden, während auf Laminin-2 (12 ± 16 Axone pro Explantat) und Kollagen I (4 ± 2 Axone pro Explantat, s.a. Abb. 27, A, C, D) nur einzelne, auf Poly-D-Lysin und Kollagen G dagegen keine Fasern auswachsen.

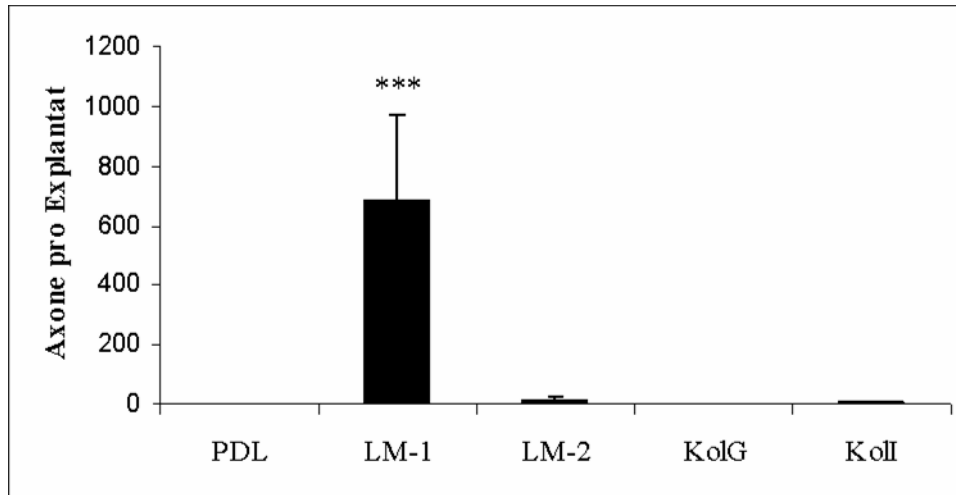


Abb. 26: Substratabhängigkeit der Regeneration

Das Histogramm stellt die Anzahl regenerierter Axone pro Explantat (P0) nach 48-stündiger Kultivierung auf verschiedenen Substraten dar.

Die auf Laminin-1 regenerierten Fasern zeigten in der Immunhistochemie eine starke Expression des $\alpha_6\beta_1$ -Integrinrezeptors, der für die Interaktion von Laminin-1 und Neuronen spezifisch ist (Abb. 27, B).

Neben wenigen dünnen, langen Axonen war die überwiegende Anzahl der auf Laminin-2 und Kollagen I auswachsenden Fasern kurz, dick und immunhistochemisch positiv für GFAP, folglich astrozytär (Abb. 27, D, F).

Die Affenretina zeigte somit eine höhere Substratspezifität als die Ratte und sprach selektiv auf Laminin-1 an.

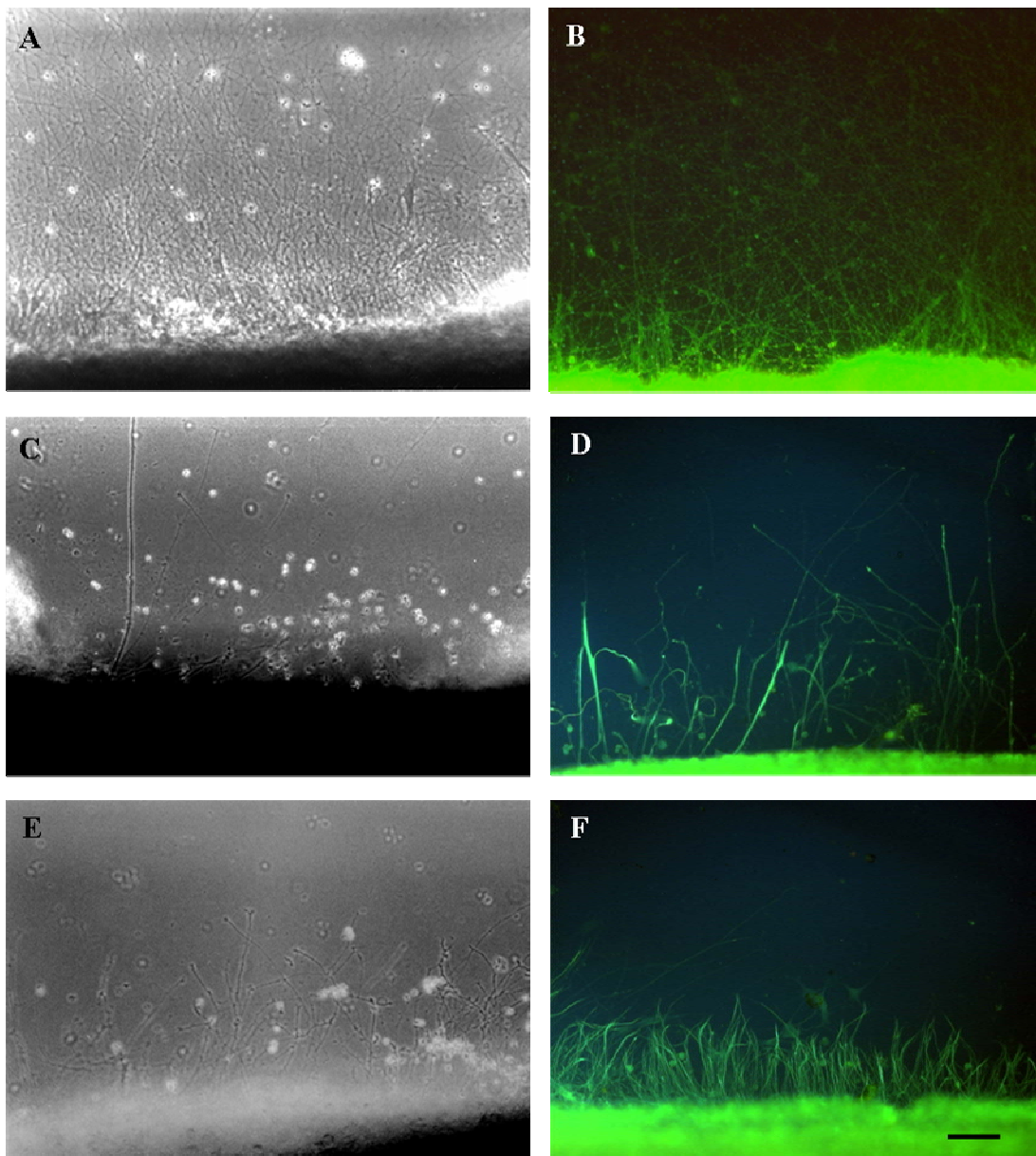


Abb. 27: Substratabhängigkeit der Fasermorphologie

Retinae neugeborener Affen zeigten nach Explantation auf LM-1 und 48 h Kultivierung eine massive Anzahl regenerierender Axone (A), die immunhistochemisch positiv für den $\alpha_6\beta_1$ -Integrinrezeptor waren (B). Auf LM-2 (C, D) und Koll (E, F) regenerierten nur vereinzelte Neurite. Die überwiegende Anzahl der darauf auswachsenden Fasern war GFAP-positiv und damit astrozytär (D, F).

Maßstab: 50 μm

3.3.5. Altersabhängigkeit der Regeneration

Es wurden uns Retinae von Affen unterschiedlichen Alters zur Verfügung gestellt, die eine differentielle Regeneration zeigten. Diese sollte nachfolgend analysiert und quantifiziert werden.

Es wurden dazu Retinae von neugeborenen (P0), 2 und 6 Monate (2 bzw. 6 M), sowie 4 und 10 Jahre (4 bzw. 10 J) alten Affen explantiert und kultiviert.

Der Vergleich der Retinae neugeborener und adulter Affen offenbarte deutliche Unterschiede in der Regenerationseffizienz (Abb. 28). Die juvenile Retina zeigte ein deutlich massiveres und infolgedessen stärker vernetztes Auswachsen von Neuriten (Abb. 28, A, C). Diese wuchsen bereits 16 h nach Explantation aus, nahmen im Verlauf der Kultivierung massiv zu und erzielten nach 96 h Werte von über 1000 Axonen pro Explantat (Abb. 29). Adulte Retinae zeigten im Gegensatz dazu erst nach 48-stündiger Kultivierung erste auswachsende Neurone (12 ± 30 Axone pro Explantat), deren Anzahl im Verlauf der weiteren Kultivierung zunahm (72 h: 44 ± 65 bzw. 96 h: 99 ± 111 Axone pro Explantat) und nach 120 h (120 ± 131 Axone pro Explantat) maximal war (Abb. 29, A). Bei weiterer Kultivierung stagnierte die Anzahl der Neurone (128 ± 158 Axone pro Explantat nach 144 h) und degenerative Prozesse setzten ein. Material für die Proteomanalyse dieser Gruppe wurde daher immer nach 5 Kulturtagen (120 h) zum Zeitpunkt der maximalen Regeneration gewonnen.

Der Vergleich der verschieden alten Retinae nach 96 h in Kultur ließ eine deutliche Altersabhängigkeit der Regenerationsfähigkeit erkennen (Abb. 29, B). Sie verhielt sich umgekehrt proportional, d.h. mit zunehmendem Alter der Affen konnten weniger Axone regenerieren. Die Anzahl der regenerierten Axone der Retina eines neugeborenen Affen (1100 ± 300 Axone pro Explantat) unterschied sich dabei signifikant von der eines 2 oder 6 Monate (575 ± 217 bzw. 121 ± 68 Axone pro Explantat) bzw. 4 oder 10 Jahre alten Affen (105 ± 101 bzw. 108 ± 97 Axone pro Explantat). Juvenile Retinae zeigten mit zunehmender Alterung eine sukzessive Abnahme der regenerierten Fasern, während sich ausgereifte Retinae (6 Monate bis 10 Jahre) trotz großer Altersdifferenzen nicht in ihrem Regenerationsausmaß unterschieden. Da die Anzahl der RGZ mit fortschreitendem Alter relativ konstant bleibt (Kim et al., 1996), lässt dies den Schluß auf eine Modulation der Regenerationsfähigkeit aufgrund postnataler Reifungsvorgänge der Retina zu.

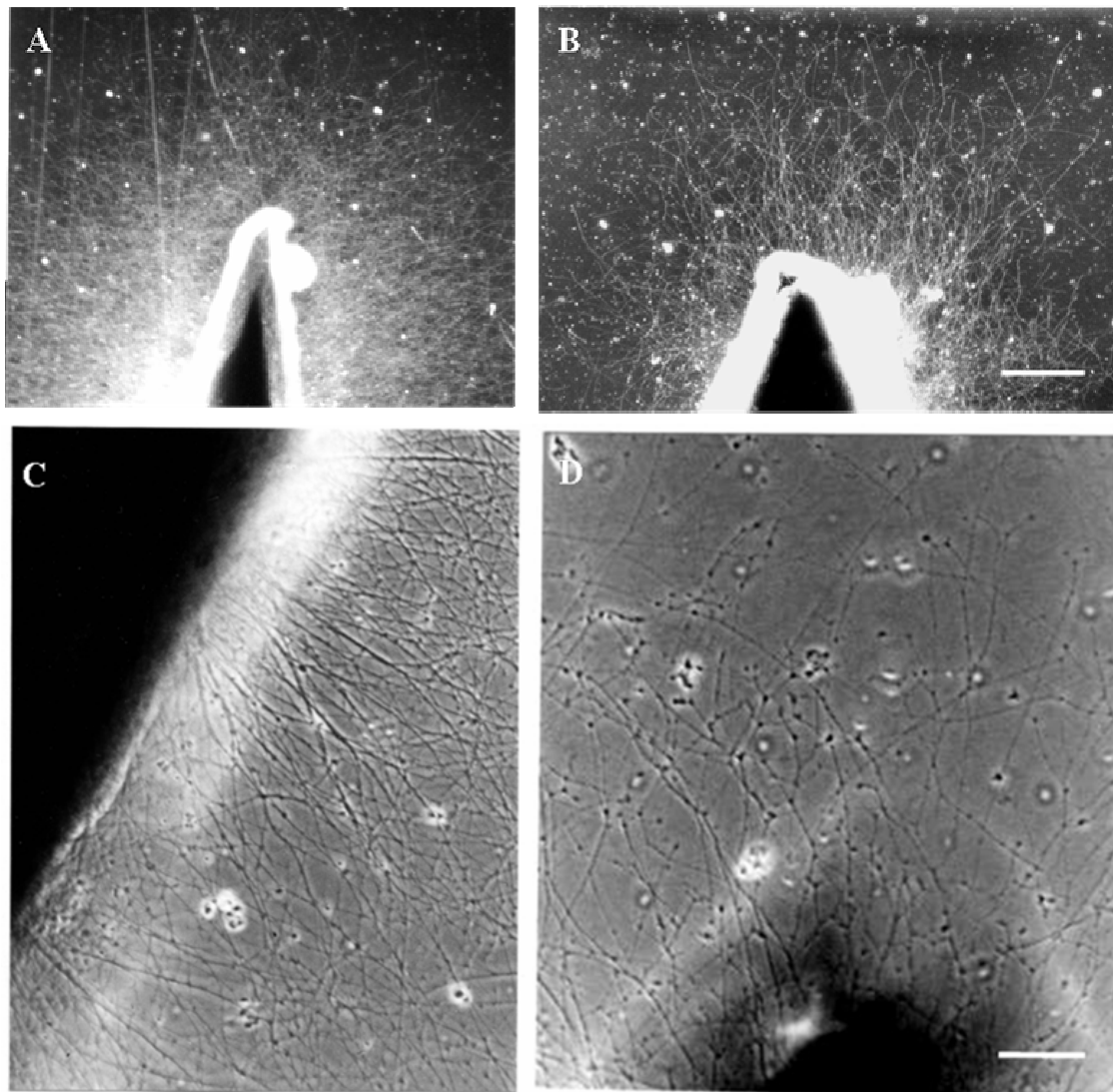


Abb. 28: Altersabhängigkeit der Regeneration

Retinae von neugeborenen Affen (A, C) zeigten im Vergleich zu denen adulter Tiere (B, D) ein massiveres, stärker vernetztes Auswachsen von Axonen.

Maßstab: A + B) 500 μm , C + D) 150 μm

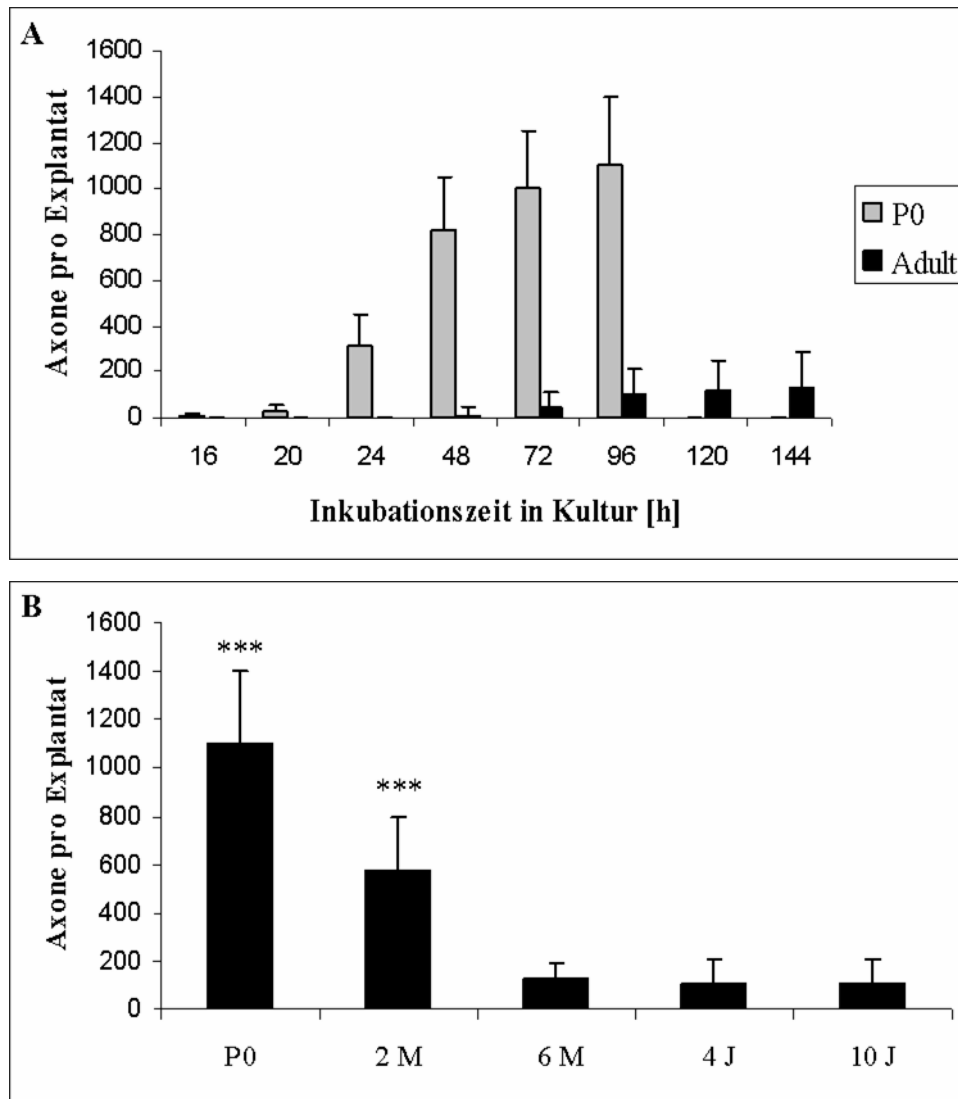


Abb. 29: Quantifizierung der Regeneration in Abhängigkeit vom Alter

A) Retinae von neugeborenen und adulten Affen zeigten nach Explantation große Unterschiede im Beginn und Ausmaß der Regeneration.

B) Die Quantifizierung der auswachsenden Fasern von Retinae unterschiedlichen Alters nach 96 h in Kultur demonstrierte eine altersabhängige Abnahme der Regenerationsfähigkeit.

P0: neugeboren, 2 M: 2 Monate alt, 6 M: 6 Monate alt, 4 J: 4 Jahre alt, 10 J: 10 Jahre alt

3.3.6. Einfluß des Alters auf die Regenerationsgeschwindigkeit und Faserlänge

Der beobachtete Einfluß des Alters auf die Quantität der Regeneration warf die Frage nach einem möglichen Einfluß auf die Art des Auswachsens der Fasern auf. Nachfolgend wurden daher altersbedingte Effekte auf die Länge der auswachsenden Fasern (Abb. 30, A) und Regenerationsgeschwindigkeit (Abb.30, B) an explantierten Retinae neugeborener (P0) und adulter Affen untersucht.

In beiden Altersgruppen erzielten die Axone eine ähnliche Länge von ca. 1600 μm (P0: 1670 ± 281 , Adult: $1585 \pm 514 \mu\text{m}$), die im Fall der neugeborenen Retina nach 72 h, im Fall der adulten Retina zeitversetzt nach 144 h maximal war (Abb. 30, A).

Die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit der Fasern, die aus der Steigung der Ausgleichsgeraden der aufgetragenen Werte resultierte, unterschied sich deutlich um den Faktor 1,8 und stellte sich für die juvenilen mit 26,6 $\mu\text{m/h}$ und für die adulten mit 14,6 $\mu\text{m/h}$ dar (Abb. 30, B). Während die Regenerationsgeschwindigkeit bei der juvenilen Retina über dem Zeitraum von 24 bis 72 h in Kultur konstant war, konnte bei der adulten Retina eine maximale Geschwindigkeit von 23,9 $\mu\text{m/h}$ aufgrund der verzögert einsetzenden Regeneration erst nach 72 bis 96 h beobachtet werden.

Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen ergaben sich zudem für den Beginn der Regeneration, der hier als der Zeitpunkt, an dem die ersten Wachstumskegel aus dem Explantat hervortraten, definiert wurde. Dieser ergab sich als extrapoliertes Schnittpunkt der jeweiligen Ausgleichsgeraden mit der Zeitachse (Abzisse) und betrug für die juvenile Retina 9 h, für die adulte Retina 27 h nach Explantation.

Neben dem massiven Einfluß des Alters auf die Quantität der Regeneration (s. 3.3.5.) wird demnach die Qualität der Regeneration nicht beeinflusst. Beide Altersgruppen erzielten ähnliche Faserlängen und maximale Regenerationsgeschwindigkeiten, so dass unabhängig vom Reifezustand der Retina dasselbe Regenerationsprogramm abzulaufen scheint. Wie der verzögerte Regenerationsbeginn und das Erreichen der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit der adulten Retina belegt, ist dessen Initiierung im fortgeschrittenen Alter jedoch schwieriger.

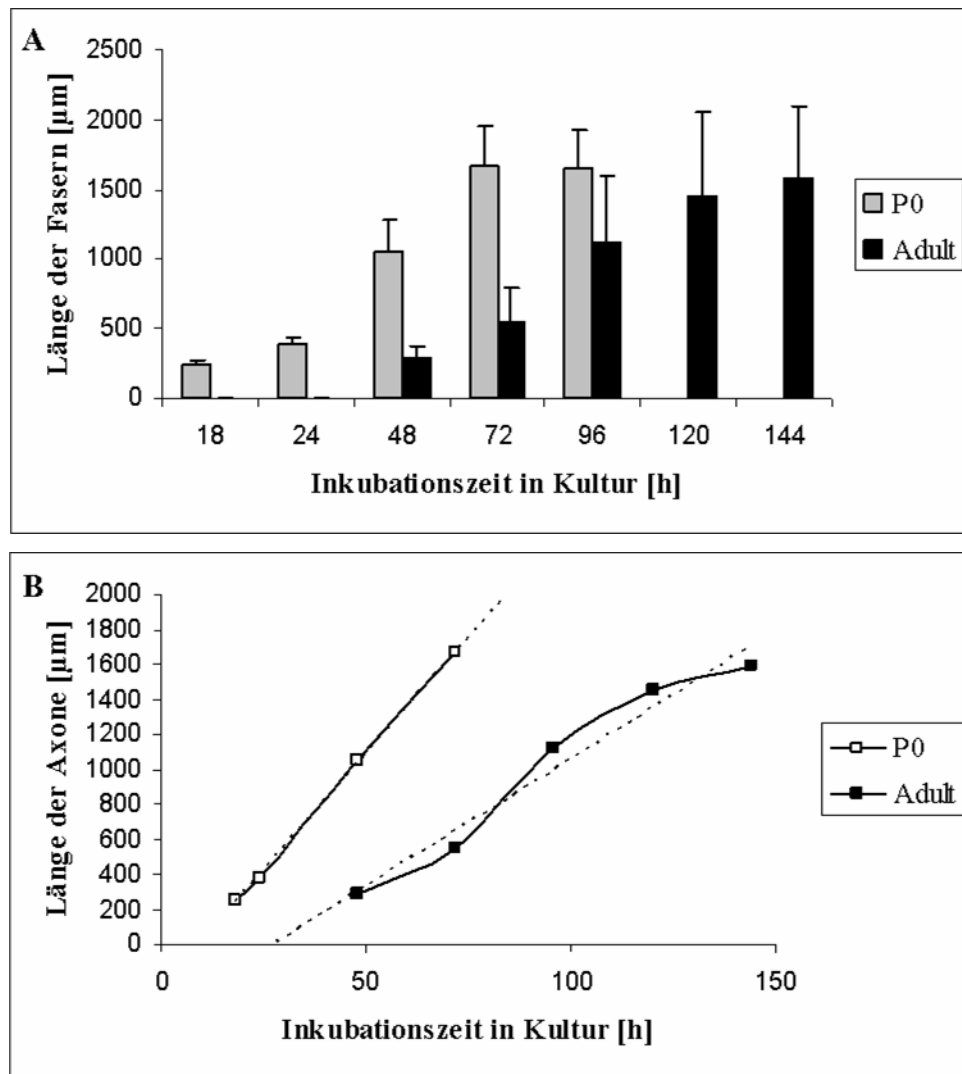


Abb. 30: Länge und Wachstumsgeschwindigkeit regenerierender Fasern in Abhängigkeit vom Alter

A) In beiden Altersgruppen erzielten die Axone eine Länge von ca. 1500 µm, im Fall der neugeborenen Retina nach 96 h, im Fall der adulten Retina zeitversetzt nach 144 h.

B) Axone aus neugeborenen Retinae wuchsen durchschnittlich 26,6 µm/h und waren damit 1,8-fach schneller als Axone adulter Retinae (14,6 µm/h).

3.4. Proteomanalyse der regenerierten Affenretina

Das Regenerationsmodell der Affenretina stellte sich bei der vorangegangenen Etablierung und Charakterisierung als gut geeignet zur Gewinnung von stark und reproduzierbar regeneriertem Material heraus. Es war dem Rattenmodell aus Gründen der fehlenden Vorbehandlung, des größeren Regenerationsausmaßes und der höheren Substratspezifität überlegen. Die Suche nach regenerationsassoziierten Veränderungen mit Hilfe der Proteomanalyse wurde daher nachfolgend auf dieses System fokussiert.

3.4.1. Expressionsanalyse bekannter Proteine der Affenretina

Auch im Modell der regenerierenden Affenretina wurde im Zuge der Proteomanalyse zunächst die Expression bekannter Proteine untersucht. Da ein Vergleich zu dem Modell der regenerierenden Rattenretina angestrebt wurde, kamen dort verwendete Antikörper, sofern sie auch die Proteine des Affen detektierten, zum Einsatz.

3.4.1.1. Western Blot-Analyse der Affenretina

3.4.1.1.1. Regenerationsabhängige Proteinexpression

Affenretinae verschiedenen Alters zeigten deutliche Unterschiede im Ausmaß ihrer Regeneration (s. 3.3.5.). Daher wurden zur Untersuchung einer möglichen regenerationsabhängigen Expression bekannter Proteine folgende Gruppen adulter und neugeborener Retinae im Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper analysiert:

- 1 + 5) unbehandelte Retina
- 2 + 6) explantierte, gut regenerierte Retina
- 3 + 7) auf PDL explantierte, schlecht regenerierte Retina
- 4 + 8) invers explantierte, degenerierte Retina

Als Positivkontrollen dienten jeweils 15 µg Gehirn- und Linsenhomogenat neugeborener Affen. Parallel zu jedem Western Blot wurden auch hier entsprechende Negativkontrollen

durchgeführt, bei denen auf eine Inkubation mit dem Erstantikörper verzichtet wurde. Die mit den verschiedenen Antikörpern erzielten Signale sind in Abbildung 31 dargestellt. Dabei waren die für die jeweiligen Proteine beobachteten Effekte bei den juvenilen Proben häufig deutlicher ausgeprägt, was auf die stärkere Regeneration bzw. den höheren prozentualen Anteil der regenerierenden Ganglienzellen innerhalb der Retina zurückzuführen ist.

Die Detektion des glialen Intermediärfilaments GFAP zeigte neben einer altersbedingten Zunahme in der nativen Retina eine explantations- und regenerationsabhängige Hochregulation des Proteins. So konnte ein deutlich stärkeres Signal bei den explantierten, gut regenerierten Proben im Vergleich zu der nativen Retina oder der explantierten, schlecht regenerierten bzw. invers explantierten, nicht-regenerierten Retina beobachtet werden. Diese Befunde deuten auf eine regenerationsassoziierte differentielle Aktivierung der retinalen Glia hin.

Das wachstumsassoziierte GAP-43 stellte sich als 46 und 55 kDa-Bande dar und zeigt eine nahezu gleichförmige, im Fall der juvenilen Proben leicht verstärkte Expression bei den regenerierten Proben. In der invers explantierten, nicht-regenerierten Retina war dagegen eine deutliche Abnahme des Signals zu verzeichnen. Diese regenerationsbedingten Unterschiede wurden bei der Betrachtung der aktiven, phosphorylierten Form des GAP-43 bzw. des von dem entsprechenden Antikörper detektierten Proteins (s.a. 3.2.1.2.2.) noch deutlicher. Diese konnte in den unbehandelten und regenerierenden Retinae, nicht jedoch oder nur sehr schwach in den invers explantierten, nicht-regenerierten bzw. juvenilen, schlecht regenerierten Proben nachgewiesen werden.

Für α_B -Kristallin wurde eine im Vergleich zur nativen Retina verstärkte Expression bei den explantierten und regenerierten Proben, sowie eine Abnahme bei den invers explantierten, nicht-regenerierten Proben beobachtet. Darüber hinaus zeigte sich eine altersbedingte Zunahme des Signals.

Die Detektion des Rhodopsins war nur für die adulte Retina und die regenerierten Explantate positiv, und weist damit eine deutliche Präparationsabhängigkeit auf.

Neugeborene Retinae, die einen loseren Zellverbund aufweisen und daher beim präparationsbedingten Kontakt mit dem Filter mehr Photorezeptorzellen inklusive Rhodopsin verlieren, zeigten kein Signal.

Es konnte somit eine deutliche regenerationsabhängige Expression für GFAP, GAP-43 und seine phosphorylierte Form sowie α_B -Kristallin im Modell der regenerierenden Affenretina nachgewiesen werden. Treten hier auch aufgrund der fehlenden Vorbehandlung nicht so viele Nebeneffekte wie beim Regenerationsmodell der Ratte auf, sieht man doch anhand der teilweise explantations- oder präparationsbedingten Variationen beim α_B -Kristallin bzw. Rhodopsin, daß auch in diesem Modell Seiteneffekte die Proteinexpression modulieren können und daher bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

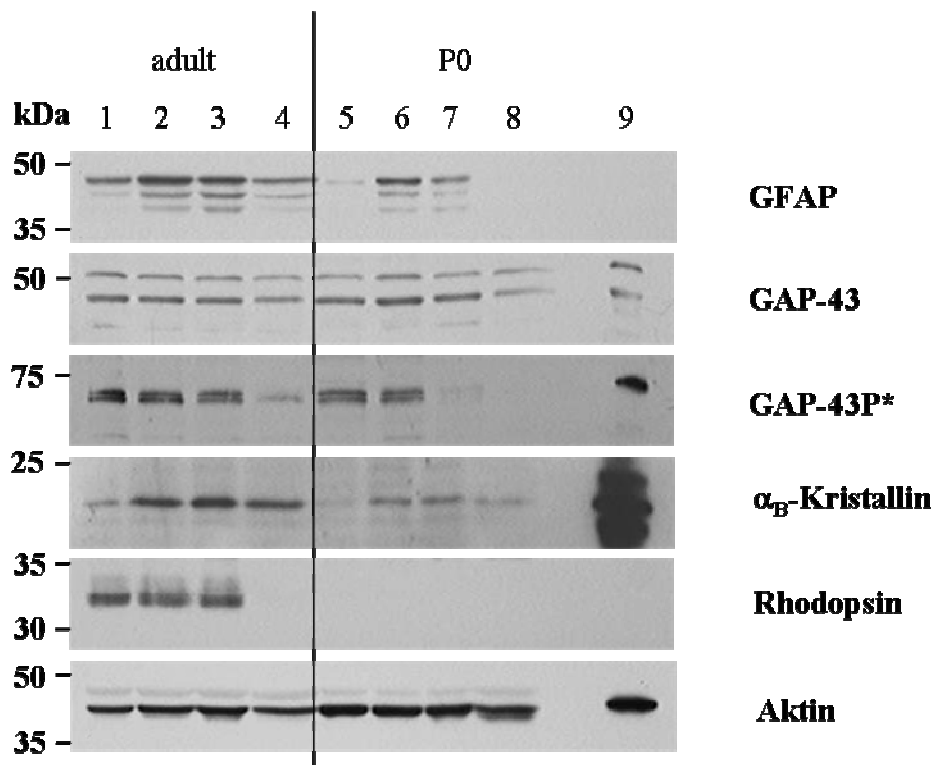


Abb. 31: Western Blot-Analyse regenerationsabhängiger Proteinexpression

GFAP (50 kDa) wurde in Abhängigkeit des Alters und der Regeneration verstärkt exprimiert. Ebenso zeigte sich für GAP-43 (48 u. 52 kDa) und seine phosphorylierte Form (GAP-43P*) eine regenerationsabhängig verstärkte Expression.

Eine Hochregulation des α_B -Kristallins (23 kDa) konnte bei den explantierten und regenerierten Proben beobachtet werden, während ein Signal für Rhodopsin (33 kDa) nur bei der adulten Retina bzw. den adulten regenerierten Explantaten auftrat.

1 + 5) Retina, 2 + 6) explantierte, gut regenerierte Retina, 3 + 7) auf PDL explantierte, schwach regenerierte Retina, 4 + 8) invers explantierte, nicht-regenerierte Retina, 9) Gehirn- u. Linsenhomogenat neugeborener Affen

3.4.1.1.2. Altersabhängige Proteinexpression

Retinae verschiedenen Alters zeigten ein qualitativ und quantitativ unterschiedliches Regenerationsverhalten (s. 3.3.5. u. 3.3.6.), welches möglicherweise auf den unterschiedlichen Reifezustand und einer damit einhergehenden differentiellen Proteinausstattung zurückgeführt werden kann. An dieser Stelle wurde daher mit Hilfe des Western Blots überprüft, ob eine differentielle Beschaffenheit der Glia oder

Ausstattung mit GAP-43 bzw. seiner Aktivierung mit dem beobachteten Phänomen korreliert.

Retinahomogenate von Affen unterschiedlichen Alters (P0, P30, 3 Jahre, 10 Jahre, 25 Jahre (*M. fascicularis*)) offenbarten eine altersbedingte Zunahme der Expression des glialen Markerproteins GFAP, dem die Abnahme des Regenerationsausmaßes mit zunehmendem Alter entgegensteht (Abb. 32).

Das regenerationsassoziierte Protein GAP-43 bzw. seine phosphorylierte und damit aktive Form wurden dagegen bei allen Alterszuständen nahezu gleichermaßen exprimiert.

Ohne das Auftreten anderer wachstumsassoziiierter Proteine hier untersucht zu haben, läßt dies doch den Schluß zu, dass das Regenerationspotential, soweit es sich auf GAP-43 zurückführen lässt, zeitlebens prinzipiell bestehen bleibt. Die altersbedingte Abnahme der Regeneration muß folglich dem Verlust bzw. der Modulation anderer, z.T. unbekannter intrinsischer Faktoren oder der veränderten glialen Umgebung zugeordnet werden.

Schwächere Signale bei dem 25-jährigen Makakenaffen sind vermutlich auf speziesabhängige, unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Antikörper zurückzuführen.

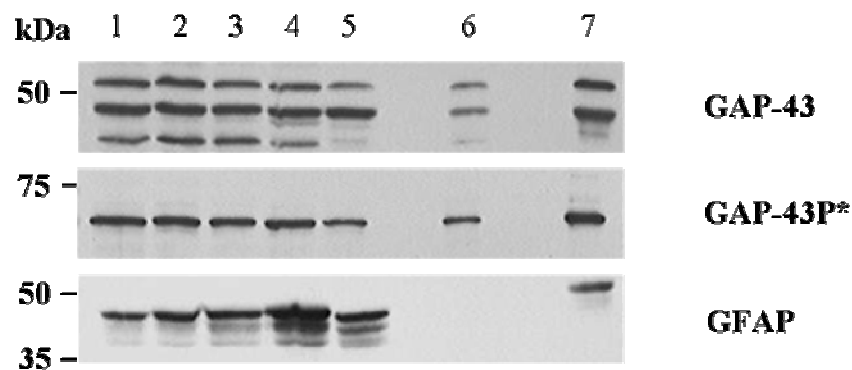


Abb. 32: Altersabhängige Proteinexpression

Western Blot-Analyse von Retinahomogenaten verschieden alter Affen zeigten eine nahezu konstante Expression für das regenerationsassoziierte GAP-43 und seine phosphorylierte Form (GAP-43P), während sie für GFAP mit dem Alter zunahm.

Schwächere Signale bei dem 25-jährigen Makakenaffen (6) sind auf speziesabhängige, unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Antikörper zurückzuführen.

1) P0, 2) P 30, 3) 3 Jahre, 4) 10 Jahre, 5) 25 Jahre (*M. fascicularis*), 6) Rattenretina, 7) Gehirnhomogenat neugeborener Affen

3.4.1.2. Immunhistochemische Analyse der Affenretina

Zur Verifizierung der mit Hilfe der Western Blot- und 2D-PAGE-Analyse erzielten Ergebnisse wurden Affenretinae in unterschiedlichen Alters- und Regenerationszuständen immunhistochemisch untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von β - und γ -Kristallinen, die sich in anderen Arbeiten (Ahmann, 2003, Fischer, 2000) regenerationsrelevant erwiesen hatten, untersucht.

In der juvenilen Retina zeigten sich nur die Astrozyten innerhalb der Ganglienzellschicht als GFAP-positiv (Abb. 33, A), während im adulten Zustand (B) Müller-Zellen bzw. ihre Fortsätze eine starke Färbung in der inneren und äußeren plexiformen Schicht zeigten. Die explantierten Retinae wiesen eine deutliche Zunahme der GFAP-Immunoreaktivität in den Astrozyten der Ganglienzellschicht auf (C, D, Pfeilspitzen). Im Fall der Explantation und Regeneration konnten zusätzlich GFAP-positive Müller Zellen und ihre Fortsätze, die alle retinalen Schichten bis hin zur den äußeren Segmenten der Photorezeptorzellen (ONL) durchzogen, beobachtet werden (C, Pfeil). Diese fehlten bei den inversen, nicht-regenerierten Explantaten.

Diese Beobachtungen bestätigten die bei der Western Blot-Analyse erzielten Ergebnisse der alters- und regenerationsabhängigen Zunahme des GFAP und ließen eine Rückführung bzw. Lokalisation des Effekts auf die Müller-Zellen zu.

Das regenerationsrelevante Phosphoprotein GAP-43 stellte sich in der juvenilen und adulten Retina in der den Ganglienzellen aufliegenden Nervenfaserschicht und inneren plexiformen Schicht, die beide stark von den Dendriten bzw. Axonen der Ganglienzellen durchzogen sind, gleich stark dar. Die Kerne der Ganglienzellen zeigten dabei keine oder nur sehr schwache Färbungen (E, F). Weiter zeigte sich in der juvenilen Retina eine schwache Anfärbung der äußeren plexiformen Schicht, die von den Fortsätzen der Bipolarzellen gebildet wird. Nach Explantation und Regeneration konnte dagegen neben zytoplasmatischer auch eine deutliche nukleäre Färbung der RGZ, IPL und ONL nachgewiesen werden (G, Pfeile). Diese stellte sich im Fall der inversen Explantation und dadurch bedingter Degeneration bzw. Apoptose der RGZ nur noch schwach dar (H).

Die Western Blot-Ergebnisse der altersunabhängigen GAP-43-Expression bzw.

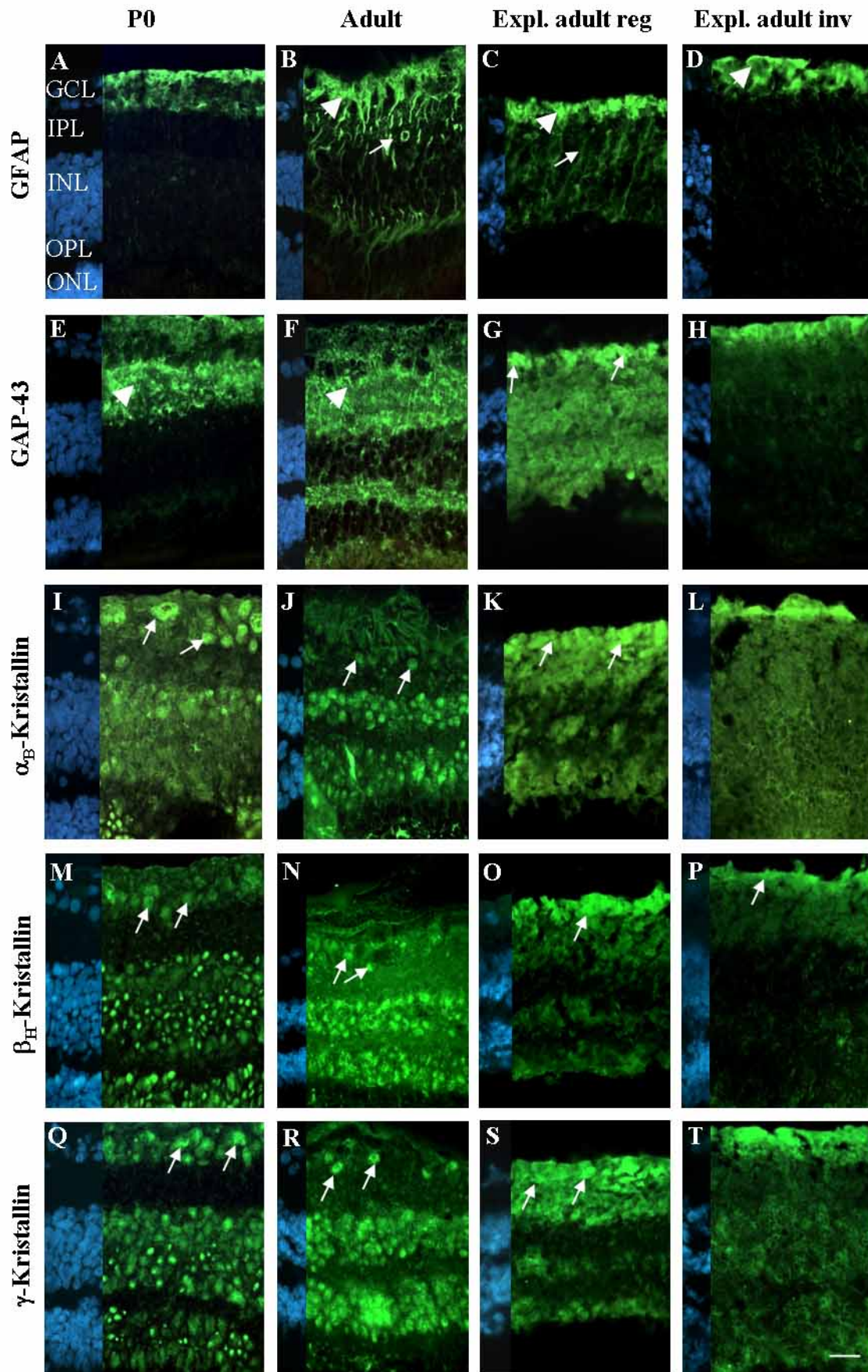
Hochregulation im Fall der Regeneration konnten somit bestätigt werden. Darüber hinaus zeigte sich eine Zellkernlokalisierung des Proteins während der Regeneration.

Die bei der Western Blot-Analyse gemachten Beobachtungen der alters- und regenerationsabhängigen Regulation des α_B -Kristallins bestätigten sich ebenfalls in der Immunhistochemie. Die Ganglienzellkerne der juvenilen Retina zeigten eine deutlich stärkere Färbung im Vergleich zu denen der adulten (I, J, Pfeile). Nach Explantation und Regeneration der adulten Retina konnte eine signifikante Zunahme der α_B -Kristallin-Immunoreaktivität beobachtet werden. Gleichzeitig offenbarte sich eine Translokation des Proteins in die IPL, OPL und Außensegmente der Photorezeptorzellen, während die Zellkerne der INL und ONL kein Signal mehr zeigten (K, Pfeile). Im Fall der invers explantierten, nicht-regenerierten Retina konnte lediglich eine unspezifische Färbung der Nervenfaserschicht beobachtet werden (L).

Die Immunhistochemische Analyse juveniler und adulter Retina mit β_H - und γ -Antikörpern resultierte in dem Nachweis dieser Proteine in den RGZ sowie der inneren und äußeren nukleären Schicht. Während die Immunoreaktivität in den RGZ vergleichbar war, zeigte die INL der juvenilen Retina insbesondere im Fall des β_H -Kristallins eine im Vergleich zur adulten Retina schwächere, in der Literatur bekannte, auffällig punktförmige Färbung (Xi et al., 2003). Explantation und Regeneration der Retina führte zu einer deutlichen Zunahme der β_H - und γ -Kristalline in der Nervenfaserschicht, den Ganglienzellen und der IPL (O, S). Wie auch im Fall der invers explantierten, nicht-regenerierten Retina, die lediglich eine diffuse Färbung der NFL aufwies (P, T), stellte sich in der INL und ONL keine Immunreaktivität mehr dar.

Die Expression der β_H - und γ -Kristalline erwies sich demnach in Bezug auf die RGZ als altersunabhängig, jedoch sehr wohl regenerationsassoziiert. Ihre massiven wachstumsabhängigen Veränderungen lassen auf eine entscheidende Bedeutung dieser Prozesse beim Affenmodell, wie es in der Literatur bereits für andere Regenerationsmodelle beschrieben ist (Ahmann, 2003, Fischer, 2000) rückschließen.

Abb. 33:



zu Abb. 33: Immunohistochemische Analyse regenerationsassoziierter Proteine

Dargestellt sind Querschnitte der Affenretina in unterschiedlichen Alters- und Regenerationszuständen nach immunhistochemischer Anfärbung. Schmale Streifen am linken Rand der Bilder zeigen eine nukleäre Färbung der entsprechenden Schnitte.

Die GFAP-Färbung ließ eine alters- und regenerationsbedingte Aktivierung und strukturelle Veränderung der Müllerzellen erkennen (A-D, Pfeil). Färbungen gegen GAP-43 zeigten eine regenerationsinduzierte Immunreaktivität in den Ganglienzellen (G, Pfeile) und der inneren und äußeren nukleären Schicht. Die Analyse der Kristallin-Expression offenbarte eine altersabhängige Abnahme des α_B -Kristallins in den Ganglienzellen (I, J, Pfeile). Bei allen untersuchten Kristallinen konnte im Fall der Regeneration eine Zunahme der Immunreaktivität in der Ganglienzellschicht und der inneren plexiformen Schicht (K, O, S, Pfeile) beobachtet werden.

Maßstab: 20 μm , Abk.: s. Abb. 14

3.4.2. Untersuchung differentiell exprimierter Proteine mittels 2D-PAGE

Auch im Modell der regenerierten Affenretina wurde parallel zu der Untersuchung von Expressionsveränderungen bekannter Proteine die Analyse unbekannter, regulierter Proteine mit Hilfe der 2D-PAGE vorgenommen.

3.4.2.1. Kartierung des Retinaproteoms des Affen

Um eine Basis für die nachfolgenden qualitativen und quantitativen Untersuchungen der Affenretina zu schaffen, wurde auch bei diesem Modell zunächst eine Kartierung des Retinaproteoms vorgenommen.

Zur Auftrennung der Affenretina mittels 2D-PAGE wurde dabei auf die entsprechenden Protokolle der Rattenretina zurückgegriffen, die sich als übertragbar erwiesen. Ebenso wurde aus den bereits erwähnten Gründen der Technik und besseren Vergleichbarkeit der pH-Bereich von 4 bis 7 gewählt.

Analytische Gele (300 μg Protein) zeigten nach Anfärbung mit kolloidalem Coomassie oder Silber ca. 1000 bzw. bis zu 5000 verschiedene Spots von 10 bis ca.100 kDa, die nahezu gleichmäßig über den gewählten pH-Bereich verteilt waren. Nachfolgend wurden präparative Gele (1500 μg Protein) gefahren, mit kolloidalem Coomassie gefärbt und zur

Gewinnung der Spots für die Kartierung verwendet. Quantitative, gut separierte und über den gesamten Gelbereich verteilte Spots wurden exzidiert, verdaut und mit MALDI bzw. ESI analysiert. 23 Proteine verschiedener Größe und Funktion konnten identifiziert und zur Generierung der Retinaproteomkarte verwendet werden (Abb. 34, 35, Tab. 2)

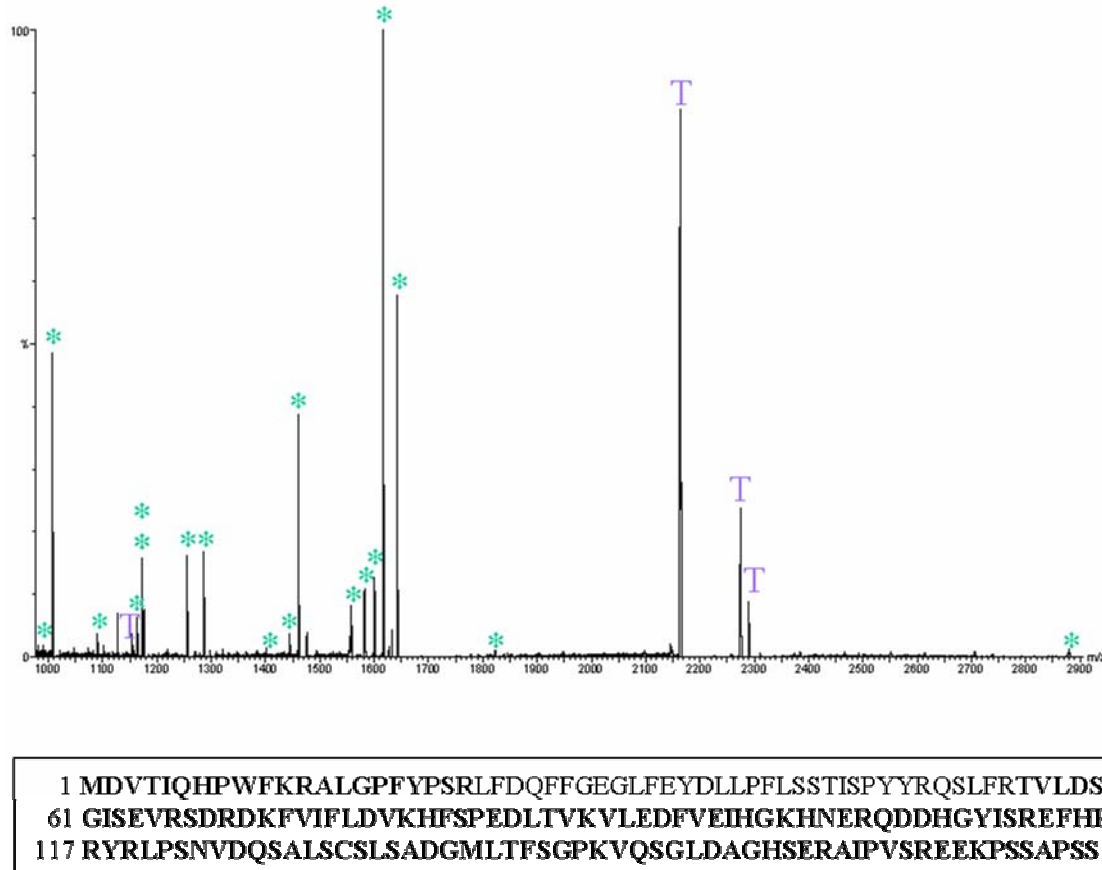


Abb. 34: MALDI-Spektrum und Proteinsequenz des α -Kristallins

Als Beispiel für die Analyse der Proteine ist die Identifizierung des α -Kristallins dargestellt.

Das nach tryptischem Verdau und MALDI-MS-Analyse resultierende Spektrum weist charakteristische Peaks (Sternchen) für die Identifizierung von α -Kristallin A chain (NCBI gi 71457, rat, 19,8 kDa) auf. Die Peptidsequenz zeigt 81 % Sequenzhomologie zu dem Protein der Ratte (fett gedruckt).

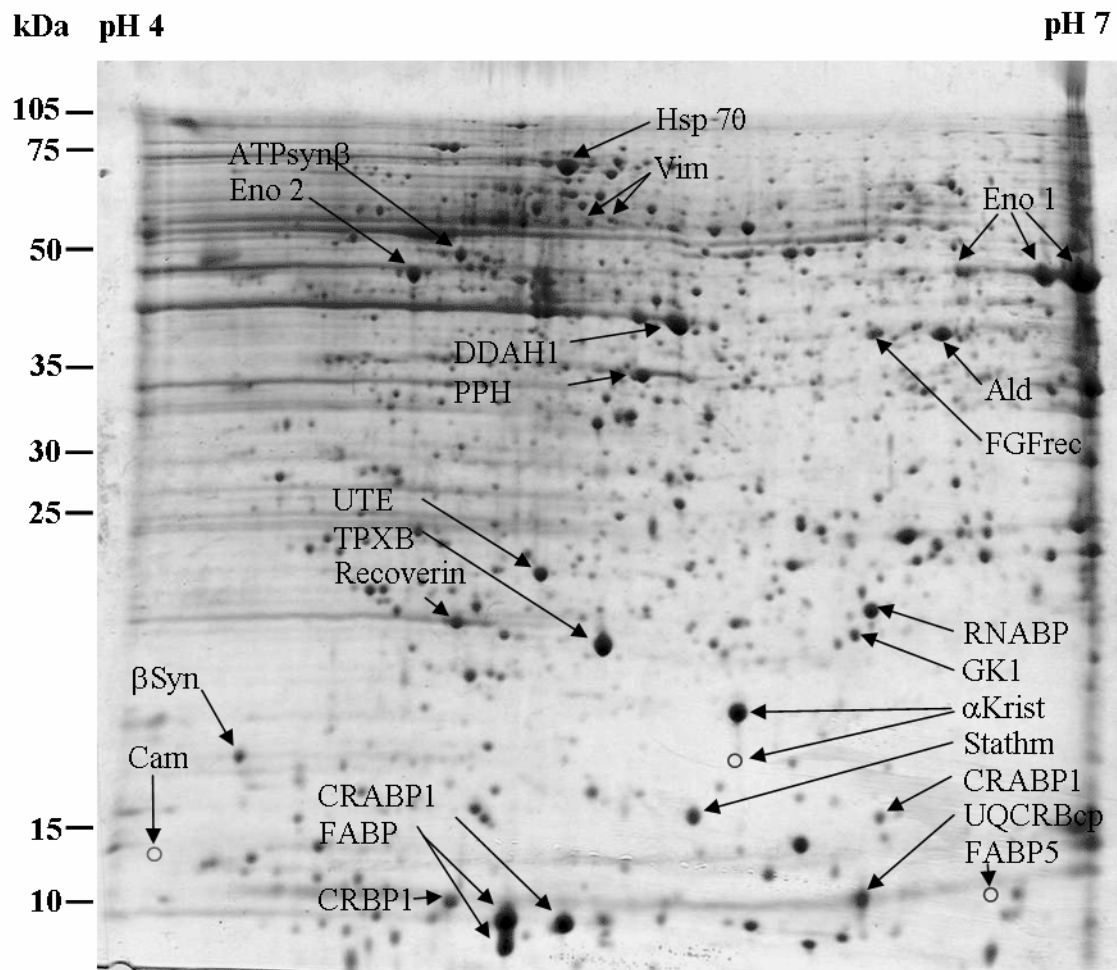


Abb. 35: 2D-PAGE-Karte der juvenilen Affenretina

Dargestellt ist das Proteinmuster juveniler Affenretinae ($n = 2$, $1500 \mu\text{g}/\text{Gel}$) nach zweidimensionaler Auftrennung und Anfärbung mit kolloidalem Coomassie. 29 Spots wurden mit MALDI-MS analysiert und eingetragen.

Abk.	Protein	MW (kDa)	Funktion
αKrist	α-Kristallin A chain	17 + 20	Chaperon
Ald	Aldolase c	40	Glykolyse
ATPsyn β	ATP synthase β chain	50	Energ Metab
β Syn	β -Synuclein	17	Syn Transmis
Cam	Calmodulin	17	Ca-Bindung
CRABP1	cellular Retinoic acid binding protein 1	15	Signaltransd.
CRBP1	Retinol binding protein 1	16	Signaltransd.
DDAH1	Dimethylarginine dimethylaminohydroxylase 1	31	Signaltransd.
Eno1	Enolase 1	47	Glykolyse
Eno2	Enolase 2	47	Glykolyse
FABP	Fatty-acid binding protein	15	Signaltransd.
FABP5	Fatty-acid binding protein 5	15	Signaltransd.
FGFrec	FGF receptor 1 isoform 6	33	Signaltransd.
GK1	Guanylate kinase	22	Signaltransd.
Hsp 70	Heat-shock cognate protein 70	70	Chaperon
PPH	Pyrophosphate phospho-hydrolase	33	Signaltransd.
Recov	Recoverin	23	Vis. Perzeption
RNABP	RNA binding protein regulatory subunit	18	Expression
Stathm	Stathmin	17	Signaltransd.
TPXB	Thioredoxin peroxidase B chain A	21	Redox
UQCRBcp	Ubiquinol-cytochrom c reductase compl	14	Energ.Metab.
UTE	Ubiquitin thiolesterase	29	Proteinabbau
Vim	Vimentin	54	Zytoskelett

Tab. 3: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine der juvenilen Affenretina

Aufgelistet sind die den entsprechenden Abkürzungen zugeordneten Proteine, sowie deren Größen und Funktion. Alle Proteine wurden sequenziert. Fett dargestellte werden alters- oder regenerationsabhängig differentiell exprimiert.

3.4.2.2. Analyse differentiell exprimierter Proteine

3.4.2.3. Altersabhängige Proteinexpression

Die eingangs geschilderten Versuche zeigten eine starke Altersabhängigkeit der Proteinexpression (s. 3.4.1.1.2.) und möglicherweise daraus resultierender Regenerationseffizienz (s. 3.3.5.) der Affenretinae. Zur besseren Erfassung dieser Proteindifferenzen wurden juvenile und adulte, native Retinae (3 pro Gruppe)

zweidimensional aufgetrennt und analysiert. Dabei wurde eine Hochregulation durch einen quantitativen, sowie eine Neusynthese oder ausschließliche Bildung durch einen qualitativen Vergleich untersucht. Beides erfolgte mit Hilfe der Bildanalysesoftware PDQuest und optischer Kontrolle.

Quantitativer Vergleich

Beim quantitativen Vergleich der Gele wurden diejenigen Spots als reguliert eingestuft, die in allen Gelen gefunden und mindestens 4-fach stärker bzw. schwächer exprimiert wurden. Es konnten insgesamt 95 altersabhängig regulierte Spots, davon 61 im juvenilen und 34 im adulten Stadium stärker exprimierte, ermittelt werden (Abb. 36). Erste, in ausreichender Menge vorliegende Spots wurden ausgestochen, zur MALDI-Analyse gegeben und identifiziert. So konnten 3 in der juvenilen Retina als hochreguliert ermittelte Spots als α -Kristallin und FABPs identifiziert werden. Im Fall der adulten Retina wurde eine CRABP-1 als stärker exprimiert identifiziert. Die Bedeutung dieser Proteine für die Regenerationseffizienz ist noch nicht geklärt und wird in der Diskussion näher beleuchtet.

Qualitativer Vergleich

Aufgrund individueller Laufunterschiede der Gele war eine qualitative Auswertung der Gele mit dem Software-Programm nicht möglich. Als fehlend bzw. neu gebildet eingestufte Spots erwiesen sich bei der optischen Kontrolle häufig als falsch zugeordnet bzw. nicht erkannt und konnten daher nicht gewertet werden. Qualitative Unterschiede wurden daher auch hier soweit möglich durch optische Kontrolle ermittelt und in die quantitative Auswertung miteinbezogen.

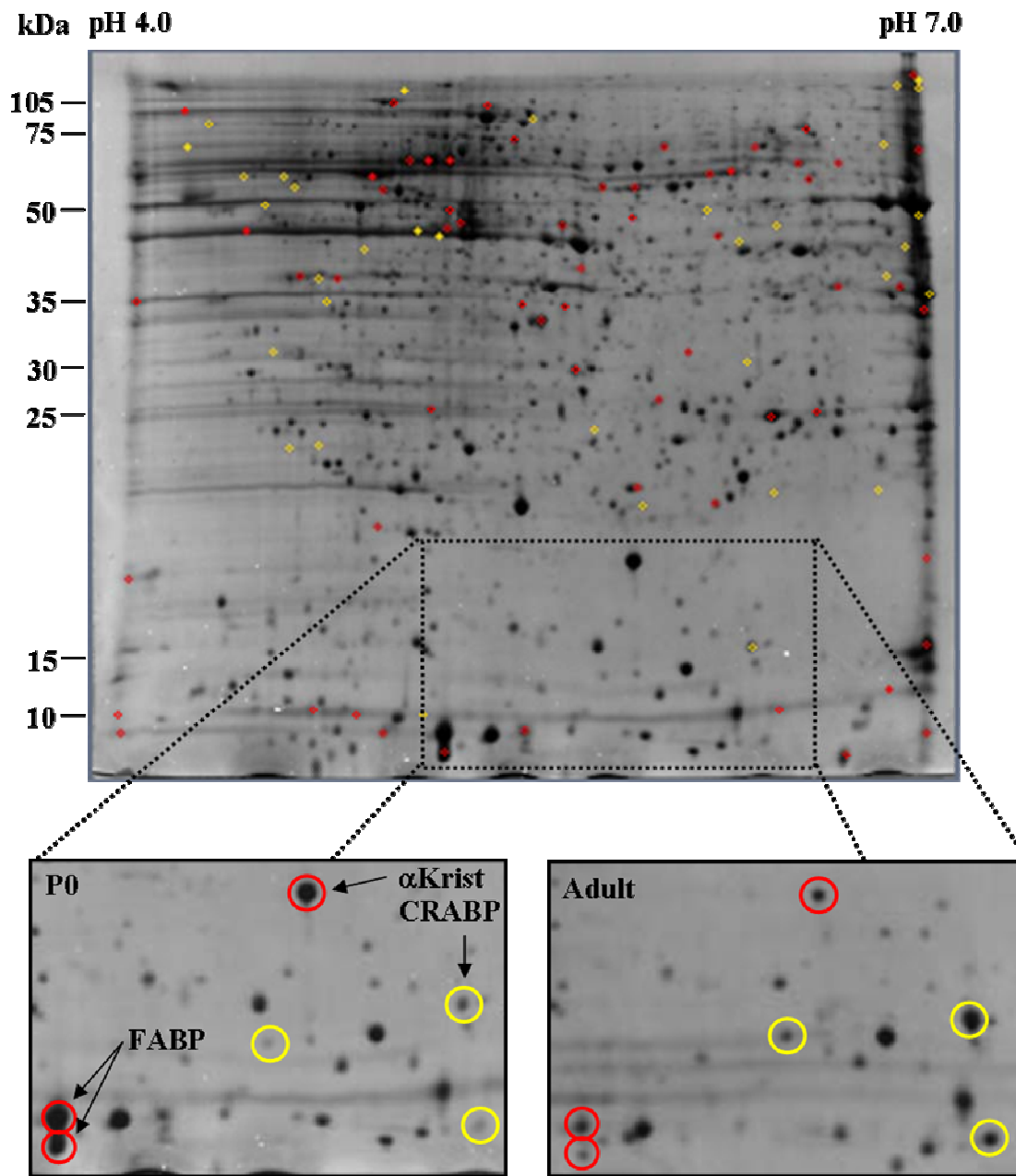


Abb. 36: Altersabhängige Proteinexpression der Affenretina

2D-Gele neugeborener und adulter Retinae zeigten nach Anfärbung mit kolloidalem Coomassie und quantitativer Auswertung mit PDQuest altersabhängige Expressionsunterschiede. Unter dem Kriterium der 4-fach stärkeren Expression konnten 61 Spots für die juvenile (rote Kreise) und 34 Spots für die adulte Retina (gelbe Kreise) gefunden und z.T. identifiziert werden.

CRABP- Cellular retinoic acid binding protein, FABP – Fatty acid binding protein, α Krist - α -Kristallin

3.4.2.3.1. Regenerationsabhängige Proteinexpression

Zur Untersuchung regenerationsabhängig exprimierter Proteine wurden explantierte, regenerierte und invers explantierte und daher nicht-regenerierte, adulte und juvenile Retinae (jeweils 2 pro Gruppe) mit Hilfe der 2D-PAGE aufgetrennt und analysiert. Auch hier erfolgte eine quantitative und qualitative Auswertung mit PDQuest und optischer Kontrolle.

Quantitativer Vergleich

Der quantitative Vergleich der Gele erfolgte auch hier unter dem Kriterium der 4-fach differentiellen Regulation und Detektion in allen Gelen und resultierte in 37 Spots. Dabei wurden 20 Spots im Fall der regenerierten und 17 Spots im Fall der nicht-regenerierten Retina als verstärkt exprimiert identifiziert (Abb. 37). Nach Ausstechen, MALDI-MS-Analyse und Sequenzierung konnten 3 in der regenerierten Retina hochregulierte Spots als Calmodulin, α -Kristallin und Fatty-acid binding protein identifiziert werden. Die mögliche Bedeutung dieser Proteine im Regenerationsprozeß ist noch nicht geklärt und wird an späterer Stelle diskutiert.

Qualitativer Vergleich

Der qualitative Vergleich der Gele resultierte in ca. 150 "an-aus"-regulierten Spots (Abb. 38). Obgleich in diesem Fall eine bessere Zuordnung der Spots aufgrund der höheren Konformität der Gele mit dem Software-Programm möglich war, ist für eine reliable Aussage und zur statistischen Absicherung ein Erstellen und Analysieren weiterer Gele notwendig. Dies sowie die Verbesserung der Reproduzierbarkeit ist Ziel laufender Versuche.

Die Weiterentwicklung der 2D-Technik in Form der DIGE-Technologie bietet einen weiteren, vielversprechenden Lösungsansatz und wurde im Rahmen eines Vorversuches ausgetestet.

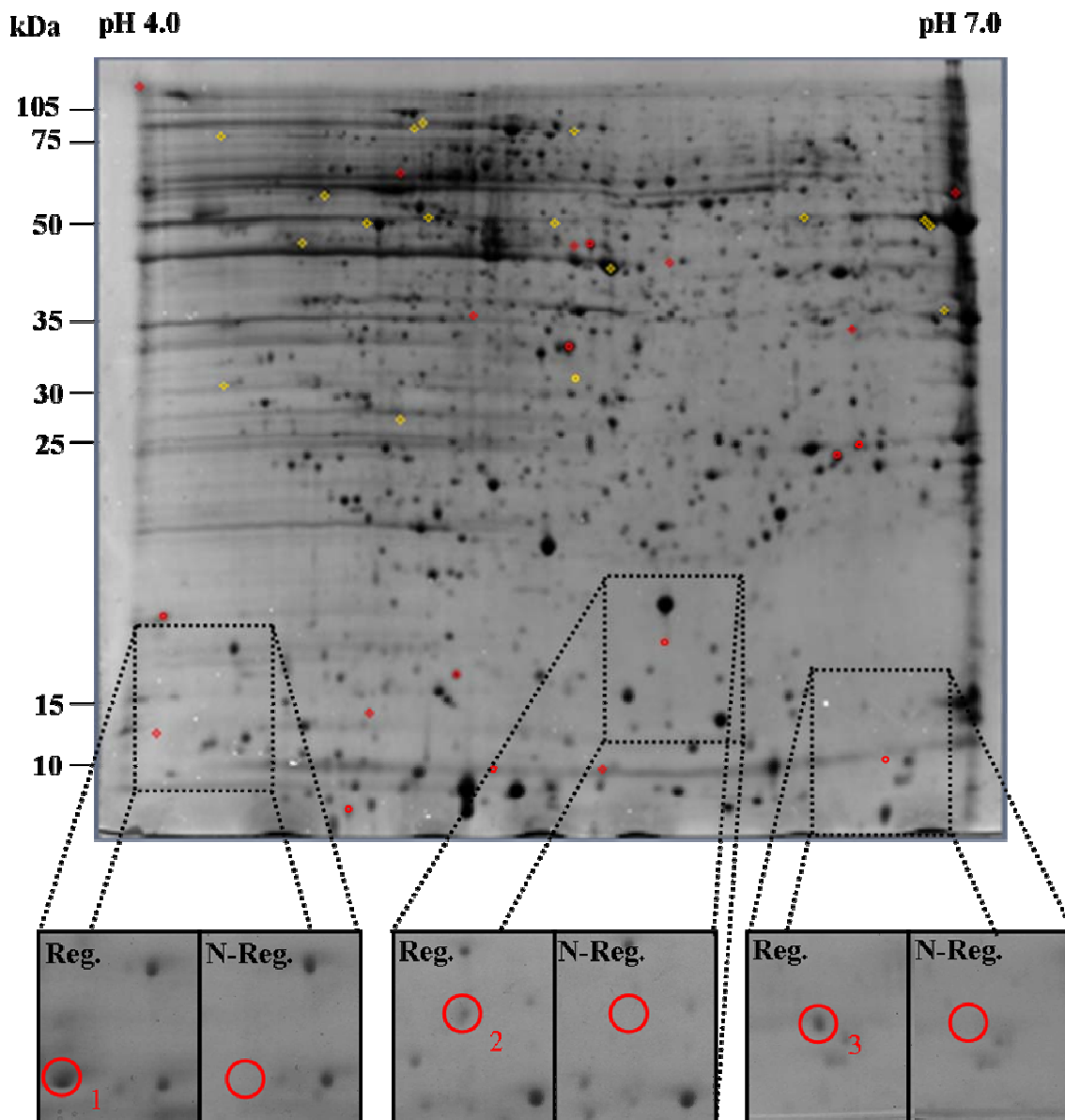


Abb. 37: Quantitative 2D-Analyse regenerationsabhängiger Proteinexpression der Affenretina

Der quantitative Vergleich von zweidimensional aufgetrennten regenerierten und degenerierten Retinae mit PDQuest ergab 37 differentiell exprimierte Spots, 20 Spots in Homogenaten der regenerierten (rote Kreise) und 17 Spots in Homogenaten degenerierten (gelbe Kreise) Retina. Erste Spots wurden ausgestochen und als Calmodulin (1), α -Kristallin (2) und Fatty-acid binding protein-5 (3) identifiziert.

Reg.= Regeneration, N-Reg.= Nicht-Regeneration

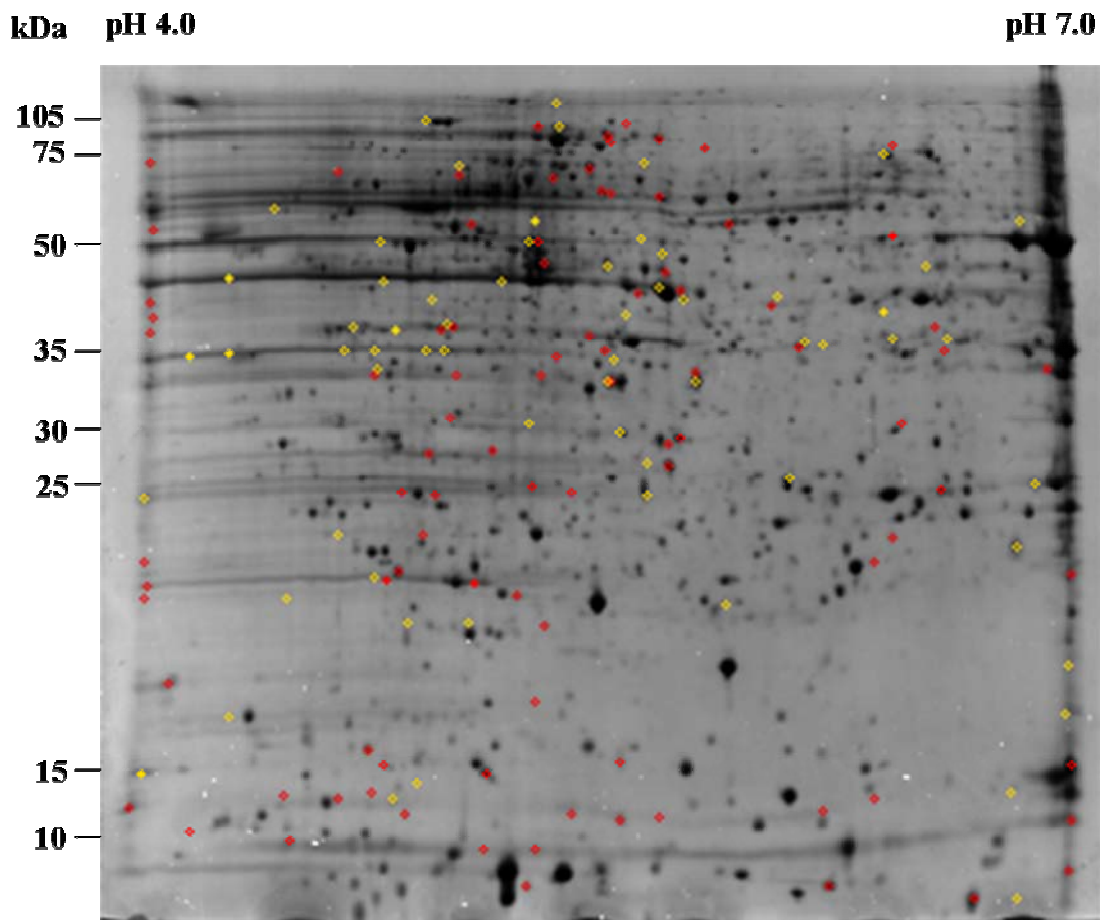


Abb. 38: Qualitative 2D-Analyse regenerationsabhängiger Proteinexpression der Affenretina

Die qualitative Analyse der 2D-Gele von regenerierten und nicht-regenerierten Retinahomogenaten resultierte in 155 "an-aus"-regulierten Spots: 92 Spots bei Regeneration (rote Kreise) und 63 Spots bei Nicht-Regeneration (gelbe Kreise).

3.4.2.4. 2D-DIGE-Analyse

Bei der 2D-DIGE-Technik (*two-dimensional difference gel electrophoresis*) werden verschiedene in Masse und Ladung abgegliche CyDye-Fluoreszenzfarbstoffe über kovalente Bindungen an Proteine einer bestimmten Probe gebunden. Die Möglichkeit der unterschiedlichen spektralen Anregung erlaubt nachfolgend eine Vermischung und Analyse von bis zu 3 verschiedenen, markierten Proteinmischungen in einem 2D-Gel. Dies erlaubt den direkten Vergleich von behandelter und unbehandelter Probe, sowie den Einsatz eines internen Standards, wodurch das Problem der Variationen zwischen den einzelnen Gelen weitgehend gelöst wird. Die mit 2D-DIGE erzeugten Gele werden mit Hilfe des Fluoreszenzimagers Typhoon 9400 gescannt und mit der DeCyder-Software analysiert.

Die simultane Analyse einer regenerierten und einer nicht-regenerierten, adulten Affenretina mit Hilfe der 2D-DIGE-Technik und Einsatz von IPG-Streifen pH 3-10 ergab 32 regulierte Spots, die sich in ihrer Quantität um mindestens den Faktor 1,5 unterschieden (Abb. 39). Es wurden jeweils 16 Spots bei der regenerierten Retina (blau) und der nicht-regenerierten Retina (rot) als stärker exprimiert ermittelt. Diese Technik stellt daher einen guten Ansatzpunkt für die weitere zweidimensionale Proteomanalyse dar.

Die 2D-Analysen der Retinahomogenate ergaben somit eine alters- und regenerationsabhängige Regulation der Proteinexpression, deren Beitrag zu der differentiellen Regenerationseffizienz bzw. dem Prozeß durch die weitere Identifizierung der entsprechenden Proteine bzw. ihre extern gesteuerte Regulation (Überexpression, Antikörper-Blockade) geklärt werden muß.

pH 4.0

pH 7.0

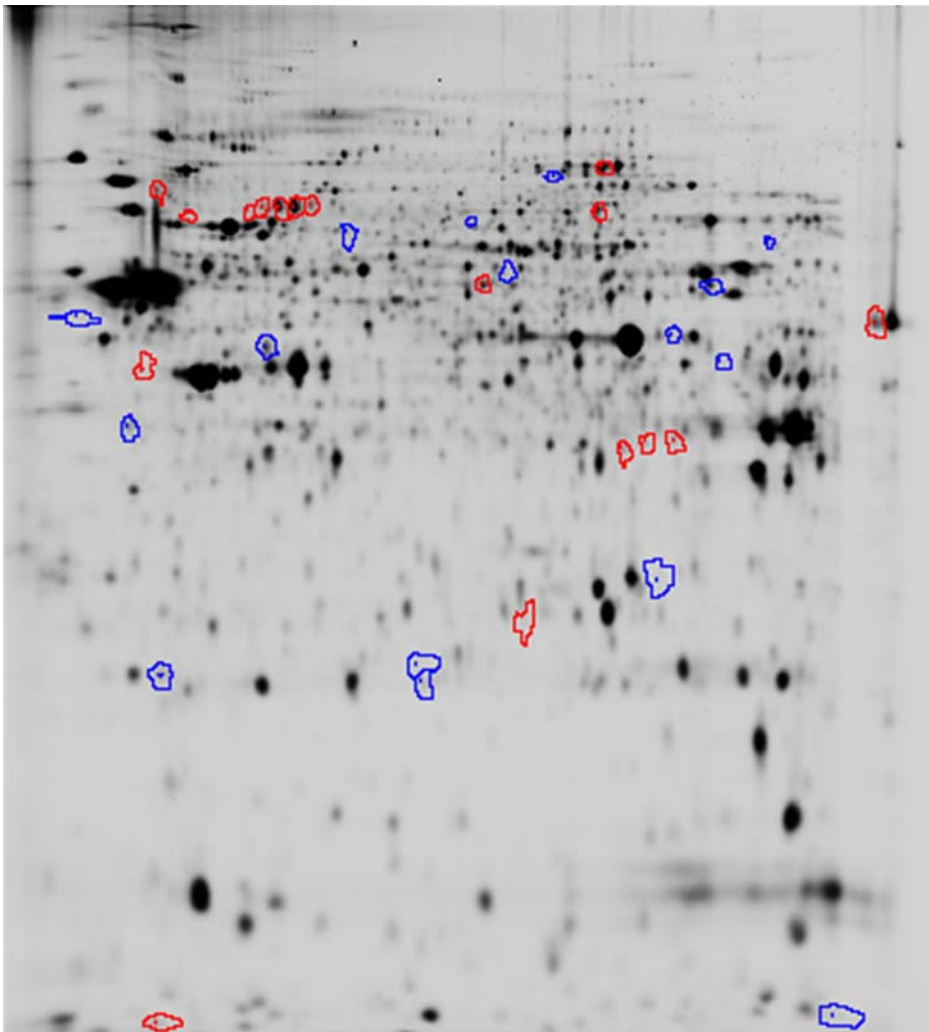


Abb. 39: 2D-DIGE-Analyse der regenerierten Affenretina

Die 2D-DIGE-Analyse einer regenerierten und einer nicht-regenerierten, adulten Affenretina (IPG-Streifen pH 3-10, 50 µg Protein/Probe) ergab 32 regulierte Spots. Jeweils 16 Spots wurden im Fall der Regeneration (rot) bzw. Nicht-Regeneration (blau) stärker exprimiert.

4. Diskussion

4.1. Regeneration retinaler Ganglienzellen von Ratte und Affe

Im Gegensatz zu Fischen und Amphibien, die nach Durchtrennung des Sehnervs eine spontane Regeneration zeigen (Sperry, 1944), können Retinae der Säugetiere nur unter bestimmten experimentellen Bedingungen *in vivo* und *in vitro* zum Auswachsen gebracht werden (Heiduschka and Thanos, 2000). Dabei existieren unter den Mammalien jedoch speziesspezifische Differenzen in der Regenerationsfähigkeit, wie die hier durchgeführten Studien an den Modellen der Ratte und des Affen belegen konnten. Mit dem eingangs vorgestellten *in vitro*-Modell der Retinaexplantatkultur (Bähr et al., 1988) ließ sich die Regeneration der retinalen Ganglienzellen unter definierten Bedingungen untersuchen. Rattenretinae zeigen nach Explantation und Kultivierung nur vereinzelte regenerierende Fasern (Ford-Holevinski et al., 1986), deren Anzahl durch eine konditionierende Vorbehandlung in Form einer Traumatisierung des ON (Bähr et al., 1988, Ford-Holevinski et al., 1986) und weiter durch eine simultane Verletzung der Linse (Fischer et al., 2000, Leon et al., 2000) verbessert werden. Auch die alleinige Linsenverletzung kann die RGZ in einen regenerationsfähigen Zustand versetzen, obgleich ihre Axone zuvor nicht verletzt wurden, d.h. keine Notwendigkeit zur Regeneration besteht (Leon et al., 2000, diese Arbeit). Wie in dieser Arbeit gezeigt, führt sie zu einem mit dem nach Quetschung vergleichbaren Auswachsen *in vitro* von ca. 1 % der RGZ. Die Kombination einer Linsen- und Optikusverletzung führt zu einem synergistischen Effekt und Steigerung der Regenerationsrate auf ca. 3 %.

Während bekannt ist, daß RGZ der Primaten 6 Wochen nach einer traumatischen Verletzung des ON oder der Retina atrophieren und partiell einen apoptotischen, zu einem Verlust von bis zu 55 % der RGZ führenden Zelltod erleiden (Levkovitch-Verbin et al., 2001, Quigley et al., 1977, Quigley et al., 1995), liegen zu ihrer Regeneration bislang keine Daten vor. Im Gegensatz zur Ratte zeigte die Retina des Affen ein spontanes Auswachsen zahlreicher Fasern im Explantationsmodell, die durch Anfärbung von Neurofilament und GAP-43 als Neurite identifiziert werden konnten. Die große Anzahl von 1000 (P0) bzw. 100 Axonen (Adult) relativiert sich in Bezug zu der ebenfalls erhöhten Anzahl der RGZ von ca. 1,5 Mio beim Affen zu 100000 bei der Ratte.

Nichtsdestotrotz zeigte die Affenretina mit 0,08 % (Adult) bzw. 0,8 % (P0) regenerierenden RGZ eine 2- bzw. 20-fach höhere spontane Regenerationsfähigkeit als die der Ratte. Scheint diese auch in Relation zu 3 % bei der Ratte nach Vorbehandlung oder gar 30 – 60 % spontaner Regeneration bei Fröschen und Amphibien gering (Humphrey and Beazley, 1985, Stelzner and Strauss, 1986), handelt es sich doch um eine der stärksten, bisher beobachteten spontanen Regenerationen der Mammalia-Retina.

Adulte Affenretinae regenerieren erst nach 48 h in Kultur, zeigen damit aber immer noch eine schnellere spontane Regeneration als Retinae der Ratte, Maus und des Hühnchens (Bähr et al., 1989, Meyer et al., 1994, Vanselow et al., 1991), die erst 4 – 5 Tage nach Explantation auswachsen. Die genannten Spezies können durch eine 5 – 8 Tage vor Explantation erfolgende konditionierende Quetschung oder Axotomie des ON in einen regenerationsfähigen Zustand und zu direktem Auswachsen nach ca. 8 -12 h in Kultur gebracht werden. Ein ähnlicher konditionierender Effekt durch die im Zuge der Präparation erfolgende Axotomie der Retina des Affen ist hier jedoch aufgrund des relativ schnellen Auswachsens eher unwahrscheinlich und die beobachtete Regeneration daher spontan.

Die Regeneration der Affenretina erwies sich als stark altersabhängig mit einer Abnahme der Anzahl regenerierender RGZ vom neugeborenen zum adulten Stadium um den Faktor 10. Während juvenile Retinae eine sukzessive Reduktion der Anzahl regenerierender Neurite zeigten, unterschieden sich Retinae von 6 Monaten bis 10 Jahren kaum. Da die Anzahl der RGZ des Affen mit fortschreitendem Alter relativ konstant bleibt (Kim et al., 1996), ist diese inverse Korrelation vermutlich auf postnatale Reifungsvorgänge der Retina zurückzuführen, die einen großen Anteil der neuronalen Differenzierung, Synaptogenese und Myelinisierung der Neurone umfassen. Degenerationsuntersuchungen an der Retina nach Hemisphärektomie offenbarten ein maximales Sterben des RGZ des Affen während der ersten 4 – 6 Lebensmonate, das von 8 Monaten bis zum adulten Stadium nur noch abgeschwächt auftrat (Herbin et al., 1999). Die dort beobachtete kritische Periode für die Empfindlichkeit der RGZ gegenüber einer Läsion zwischen 6 und 8 Monaten konnte auch in dieser Studie in Bezug auf die Regenerationsfähigkeit beobachtet werden. Sie geht vermutlich mit dem Abschluß bestimmter Reifungsvorgänge und Verlust eines reaktiven Zustandes einher.

Gleiche Neuritenlängen und maximale Wachstumsgeschwindigkeiten bei der Regeneration juveniler und adulter Retinae zeigten, dass das absolvierte

Regenerationsprogramm prinzipiell gleich ist. Der verzögerte Beginn und das schwächere Ausmaß der Regeneration bei adulten Retinae lassen jedoch den Rückschluß auf eine schwierigere, wenngleich prinzipiell mögliche Aktivierung dieses Programms nach Ausdifferenzierung der Retina zu. Ursachen dafür können die im Zuge der Reifung veränderte intrinsische Regenerationsfähigkeit bzw. Proteinausstattung der Neurone oder auch der benachbarten Gliazellen sein, die später unter entsprechenden Aspekten diskutiert werden.

Regenerierende Ganglienzellentypen

Die visuellen Bahnen und Retina des Neue Welt-Affen *C. jacchus* zeigen starke Ähnlichkeit zu denen der Alte Welt-Affen oder des Menschen und weisen 2 Hauptklassen von Ganglienzellen auf. Diese werden als Midget- oder P β - und Parasol- bzw. P α -Zellen bezeichnet und besitzen unterschiedliche Morphologie und Funktion (Ghosh et al., 1996, Grünert and Ghosh, 1999, Watanabe and Fukuda, 2002). Midgetzellen sind vorwiegend in der fovealen Region lokalisiert und zeigen buschige Dendritenbäume mit schmalen Dendritenfeld. Sie sind für die Vermittlung des Farben-Sehens zuständig und projizieren in die parvozellulären Schichten des *Corpus geniculatum laterale*. Parasolzellen besitzen dagegen größere Somata und buschige Dendritenbäume mit weitem Dendritenfeld. Sie projizieren in die magnozellanulären Schichten des *Corpus geniculatum laterale* und vermitteln Informationen über Kontrast- und räumliches Sehen. Beide Zelltypen konnten durch retrograde Färbung mit DiI über die regenerierenden Axone *in vitro* angefärbt werden. Wie bei Ratte (Thanos and Mey, 1995), Hühnchen (Vanselow et al., 1991) und Katze (Watanabe et al., 1993) ist die axonale Regeneration beim Affen somit nicht auf bestimmte Ganglienzelltypen beschränkt.

Extrazellulärmatrix

Laminine sind große, kreuzförmige Glykoproteine der EZM, die in verschiedenen Isoformen auftreten. Sie setzen sich aus je einer α -, β - und γ -Kette zusammen und korrespondieren über verschiedene Integrinrezeptoren, beispielsweise $\alpha_6\beta_1$ bei Laminin-1 oder $\alpha_7\beta_1$ bei Laminin-2, mit Neuronen (Colognato and Yurchenco, 2000). Laminine sind Komponenten der Basalmembran und kleiden die visuellen Bahnen während der Embryonalentwicklung aus, wo sie eine wichtige Rolle für das Auswachsen, die Navigation und die Differenzierung der Neurone spielen. Obgleich retinale Neurone ihre

Responsivität zu Laminin im Zuge der Reifung scheinbar verlieren (Cohen et al., 1986), können RGZ adulter Ratten (Ford-Holevinski et al., 1986), Mäuse (Bates and Meyer, 1997) und Hühnchen (Vanselow et al., 1991) diese Fähigkeit wiedererlangen und auf Laminin-1 ($\alpha_1\beta_1\gamma_1$) *in vitro* Axone regenerieren. Hier dargestellte Experimente zeigten, daß durch Quetschung und Linsenverletzung vorbehandelte, adulte RGZ der Ratte darüber hinaus die Fähigkeit besitzen, auf Laminin-2 ($\alpha_2\beta_1\gamma_1$) zu binden und auszuwachsen, welches in der Basalmembran peripherer Nerven und parallel zu bestimmten Entwicklungsabschnitten in der Retina und ON exprimiert wird. Dieser Effekt ist vermutlich auf die konditionierende Linsenverletzung und dem daraus resultierenden, differentiellen intrinsischen Potential, möglicherweise einer veränderten Integrinrezeptorexpression, zurückzuführen (Lorber et al., 2002). Die hier beobachtete geringere Anzahl regenerierender Axone, der verzögerte Beginn des Auswachsens sowie das Zurückwachsen der Axone zum Explantat offenbarten schwächere neuritogene Effekte des Laminin-2 im Vergleich zu Laminin-1. Ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten und Längen der regenerierenden Fasern zeigten jedoch, daß das absolvierte Regenerationsprogramm auf beiden EZMs prinzipiell gleich ist. Die beobachteten Differenzen zwischen Laminin-1 und -2 scheinen daher auf die Neuritogenese der RGZ, im Sinne der Initiierung, nicht aber der Modulation, beschränkt zu sein und müssen somit zum Teil als neuroprotektiv denn ausschließlich neuritogen eingestuft werden. Fehlt der regenerationsfähigen Zelle die entsprechende positive Rückmeldung der Umgebung bzw. des Wachstumskegels, kann das Regenerationsprogramm verzögert, nicht gestartet oder nicht länger aufrecht gehalten werden. Parallel verlaufende apoptotische Prozesse nehmen zu und führen zum Absterben der RGZ, wodurch eine geringere Zellpopulation zur Regeneration zur Verfügung steht.

Diese Annahme wird auch durch die Untersuchungen beim Affen gestützt. Im Gegensatz zu embryonalen bzw. postnatalen und adulten RGZ des Hühnchens und der Ratte, die auf Laminin-2 auswachsen (Cohen and Johnson, 1991), regenerierten juvenile und adulte RGZ des Affen nur auf Laminin-1 und offenbarten somit speziesspezifische Differenzen. Affenretinae verschiedenen Alters zeigten dabei eine Expression des $\alpha_6\beta_1$ -Integrinrezeptors in ihren auswachsenden Neuriten, ähnliche Wachstumsgeschwindigkeiten und Faserlängen, d.h. eine vergleichbare Regeneration, wobei die Anzahl der regenerierenden RGZ bei adulten Affen drastisch vermindert ist.

Ursache dafür können intrinsische Unterschiede zwischen embryonalen bzw. postnatalen und adulten RGZ sein (Bates and Meyer, 1997), wie beispielsweise die verminderte Expression oder Responsivität von Integrinrezeptoren. Werden diese Defizite über eine Gentransfer-vermittelte Expression ausgeglichen (Condic, 2001) bzw. durch entsprechende Stimuli gesteigert (Ivins et al., 2000), kann bei Ratten eine verstärkte Regeneration beobachtet werden. Laminin fördert somit scheinbar das Überleben postnataler und adulter RGZ ohne jedoch die Regenerationsfähigkeit adulter Neurone wiederherzustellen. Diese Befunde sowie die Beobachtungen bei der Regeneration der Ratte und des Affen bestätigen die Annahme, daß Laminin sowohl neuroprotektive als auch neuritogene Effekte besitzt und diese über verschiedene Mechanismen vermittelt werden. Das Ansprechen retinaler Ganglienzellen auf Laminin als Wachstumssubstrat ist jedoch u.a. vom intrinsischen und speziesspezifischen Potential abhängig.

Die selektive Regeneration beider Spezies auf Laminin unterstreicht zudem die Bedeutung der durch $\alpha_6\beta_1$ - bzw. $\alpha_7\beta_1$ -Integrinrezeptoren aktivierten Signalkaskaden für die Regeneration.

4.2. Einfluß der intrinsischen Fähigkeit auf die Regeneration

Intrinsische Faktoren, die mit dem neuronalen Auswachsen während der Embryonalentwicklung verknüpft sind, haben vermutlich auch eine wichtige Funktion für die Regeneration adulter Neurone (Chong et al., 1996, Neumann and Woolf, 1999). Einige dieser Faktoren sind axonal transportierte Proteine, deren Assoziation mit regenerativen Vorgängen beobachtet werden konnte (Benowitz and Lewis, 1983, Bisby, 1980, Skene and Willard, 1981). Ein Hauptvertreter dieser Gruppe ist GAP-43, das im *Cortex* verschiedener Vertebraten wie Katze, Rind, Mensch und Affe (McIntosh and Parkinson, 1990) und diversen anatomischen Regionen des Rattengehirns (Benowitz et al., 1988, Jacobson et al., 1986) nachgewiesen wurde. Obwohl die genaue Funktion von GAP-43 noch nicht geklärt ist, offenbarte seine Identifizierung in den Membranen axonaler Wachstumskegel (Skene et al., 1986) und Involvierung in der Formierung des optischen Traktes (Reh et al., 1993, Zhang et al., 2000, Zhu and Julien, 1999) neben einer allgemeinen Funktion für die Regeneration, eine bedeutende Rolle für die synaptische Plastizität (Casoli et al., 2003). In vielen Spezies, so auch in der Ratte, kommt es im Zuge

der postnatalen Reifung zur Abnahme der GAP-43-Expression in den RGZ (Benowitz and Routtenberg, 1997). Eine Reexpression des Proteins kann nach Axotomie (Bormann et al., 1998, Doster et al., 1991, Meyer et al., 1994), Ischämie (Ju et al., 2002), im Transplantationsparadigma am optischen Nerv (Ng et al., 1995, Wouters et al., 1998) oder nach Behandlung mit den neurotrophen Faktoren CNTF (Jo et al., 1999) und BDNF (Klocker et al., 2001) beobachtet werden und geht häufig, aber nicht zwingend (Doster et al., 1991, Kim and Jahng, 2004) mit einer erfolgreichen Regeneration einher. ZNS-Neurone, die regenerieren, zeigen jedoch eine erhöhte GAP-43-Expression (Anderson et al., 1998, Schaden et al., 1994) und primäre sensorische Neurone embryonaler Hühnchen verlieren ihre Fähigkeit nach Kultivierung auf Poly-L-Lysin Axone auszubilden, wenn sie mit zu GAP-43 mRNA komplementären *Anti-Sense*-Oligonukleotiden behandelt werden (Aigner and Caroni, 1993). Auf der anderen Seite induziert die Überexpression von GAP-43 zwar ein verlängertes Auswachsen und Aussprossen, führt aber letztendlich zum Tod adulter muriner Motoneurone (Harding et al., 1999), der durch einen "Überdosierungseffekt" erklärt wird.

Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob die differentielle Expression wachstumsassoziierter Proteine wie GAP-43 ursächlich für die unterschiedliche Regenerationsfähigkeit der RGZ der Ratte und des Affen ist. GAP-43 wird in den RGZ der Ratte während der Entwicklung und postnatal exprimiert, dann jedoch bis zum vollständigen Fehlen im adulten Stadium herunterreguliert (Benowitz and Routtenberg, 1997). In Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten kann eine nennenswerte axonale Regeneration adulter RGZ der Ratte erst nach einer konditionierenden, die GAP-43-Expression stimulierenden Verletzung in Form einer Quetschung des ON und Linsenverletzung beobachtet werden. Die Retina des Affen zeigt im Gegensatz dazu eine konstitutive, altersunabhängige Expression von GAP-43 und spontane Regeneration. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der konstitutiven GAP-43 Expression und korrelierenden spontanen Regeneration der Hühnchenretina (Vanselow et al., 1991) und verletzter DRG Neurone adulter Ratten (Andersen and Schreyer, 1999). Sie unterstützt die 1989 von Skene erhobene "GAP-Hypothese" der Expression von GAP-43 und weiterer wachstumsassoziierter Proteine als Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration.

Die Expression von GAP-43 scheint jedoch nicht allein hinreichend für die Regenerationsfähigkeit zu sein, da die Überexpression von GAP-43 in axotomierten Purkinje-Zellen zwar zu vermehrtem Aussprossen, nicht jedoch zu einer längeren axonalen Regeneration führt (Buffo et al., 1997). Neuere Experimente lassen vermuten, daß die Co-Expression weiterer Gene für den Ablauf des vollständigen Regenerationsprogramms notwendig ist (Becker et al., 1998, Strata et al., 1999). Neben GAP-43 sind weitere wachstumsassoziierte Proteine wie CAP-23, MARCKS, SCG10 oder Neurogranin bekannt. Diese weisen strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu GAP-43 auf und können dessen Funktion innerhalb des Regenerationsprogramms modulieren, ergänzen oder teilweise kompensieren (Benowitz and Routtenberg, 1997, Bomze et al., 2001, Frey et al., 2000, Mason et al., 2002, Wiederkehr et al., 1997). Ein weiterer Vertreter dieser Gruppe könnte ein Protein sein, welches hier mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte, aktive Form des GAP-43 im Western Blot bei ca. 70 kDa detektiert wurde. Laut nachträglicher Mitteilung des kommerziellen Anbieters handelt es sich dabei um eine Fehldetektion. Aufgrund der besonderen biochemischen Charakteristika des GAP-43, wie der sehr saure isoelektrische Punkt, besondere hydrophile Eigenschaften und v.a. das anomale Laufverhalten in der SDS-PAGE (Benowitz and Routtenberg, 1997), könnte es sich dabei um eine alternative Form des GAP-43 oder ein, wie schon früher beobachtetes, "GAP-43-ähnliches" Protein (McIntosh et al., 1989) handeln. Eine Identifizierung dieses Proteins mit MALDI-MS ist erstrebenswert, da seine Expression in den untersuchten Proben eng mit der Regeneration korreliert. Das Protein wird in der adulten Rattenretina erst infolge der konditionierenden Vorbehandlung, in der Affenretina jedoch bereits im nativen Zustand stark exprimiert und liefert damit einen weiteren Hinweis auf die differentielle Proteinausstattung der RGZ beider Spezies als Ursache für die unterschiedliche Regenerationsfähigkeit.

In diesem Zusammenhang wird häufig auch ein altersabhängiger Verlust des intrinsischen Potentials als Ursache für die reduzierte Regenerationsfähigkeit adulter Neurone diskutiert (Chen et al., 1995). So zeigt sich beispielsweise eine altersabhängige Abnahme der Bcl-2-Expression (Goldberg et al., 2002) und veränderte Reaktion juveniler und adulter RGZ auf cAMP (Cai et al., 2001). Im Einklang mit früheren Arbeiten (Argiro and Johnson, 1982, Davies, 1989) zeigten auch die RGZ des Affen in dieser Arbeit mit zunehmendem Alter und Reifungsgrad eine verminderte Fähigkeit Neurone aus retinalen

Explantaten zu regenerieren. Während GAP-43 mRNA im *Cortex* von Makakenaffen postnatal abnimmt (Oishi et al., 1998), konnte hier eine nahezu konstante Expression von GAP-43 und dem "GAP-43-ähnlichen Protein" in Affenretinae verschiedenen Alters beobachtet werden, die mit der altersabhängigen Abnahme der Regeneration nicht korreliert. Neben weiteren, hier nicht betrachteten intrinsischen Faktoren, spielen daher vermutlich auch andere Faktoren, wie der Reifezustand der retinalen Umgebung, insbesondere der Glia, eine bedeutende Rolle für die Regenerationsfähigkeit.

Die 2D-Analyse der Affenretina zeigte, daß bei juvenilen Retinae im Vergleich zu adulten verstärkt exprimierte Proteine teilweise auch in regenerierten Explantaten hochreguliert waren. So wurden Fragmente des α -Kristallins und Subtypen des *Fatty-acid binding protein* in beiden Fällen vermehrt produziert. Es erhob sich daher die Frage, inwiefern die Regeneration adulter Neurone eine Rekapitulation entwicklungsabhängiger Wachstumsvorgänge darstellt. Experimente mit GAP-43 Promotorelementen in transfizierten Zebrafischen offenbarten, daß aktivierte Signalkaskaden nach ZNS-Verletzung und bei der Entwicklung verschieden sind (Udvardia et al., 2001). Weiter zeigte die Untersuchung von axotomierten DRG-Neuronen mit cDNA *microarrays* eine Reexpression vieler, jedoch nicht aller, mit der entwicklungsabhängigen Regeneration assoziierten Gene. Daneben führte die axonale Verletzung auch zur Expression von Genen, die keinen offensichtlichen Bezug zu entwicklungsabhängig exprimierten Genen haben. Diese Befunde weisen darauf hin, daß es sich bei der axonalen Regeneration nicht einfach um eine Reaktivierung des entwicklungsabhängigen Wachstumsprogramms handelt. Vielmehr zeigt sich ein alternatives Genexpressionsprogramm, welches wie auch hier beobachtet nur partiell mit dem während der Reifungsvorgänge aktiven Programm überlappt (Bulsara et al., 2002).

4.3. Regenerationsstimulierende Wirkung der Linsenverletzung

4.3.1. Welche Effekte hat die Linsenverletzung?

Nach einer Axotomie oder Quetschung des Sehnerven können adulte RGZ nicht in den distalen ON regenerieren, werden innerhalb von 2 Wochen apoptotisch und degenerieren

(Berkelaar et al., 1994, Mey and Thanos, 1993). Eine Regeneration in den ON kann nach intravitrealer Implantation eines peripheren Nervensegmentes (Berry et al., 1996), Inaktivierung der Rho-GTPase (Lehmann et al., 1999), intraokularer Administration von trophischen Faktoren (Cui et al., 1999), Einführung aktivierter Makrophagen in den ON (Lazarov-Spiegler et al., 1998) oder intraokular (Yin et al., 2003) sowie nach intravitrealem Trauma der Linse bzw. Linsenkapsel (Fischer et al., 2001, Fischer et al., 2000, Leon et al., 2000) beobachtet werden. Letztere führte auch in Kombination mit der Quetschung des ON und Explantation der Retina *in vitro* zu einer deutlichen Zunahme der regenerierenden Fasern (Fischer et al., 2000), die hier bestätigt wurde. Die Linsenverletzung ruft dabei eigene, von einer Quetschung unabhängige neuroprotektive und –regenerative Effekte *in vivo* (Leon et al., 2000) und *in vitro* (Lorber et al., 2002, diese Arbeit) hervor. Durch Linsenverletzung vorbehandelte Retinae zeigten in dieser Studie nach Explantation *in vitro* ein spontanes, quantitativ mit dem nach Quetschung vergleichbares Auswachsen. Die regenerierten Fasern waren jedoch feiner, kürzer und wiesen einen geringeren Faszikulierungsgrad auf. Obgleich ihre Axone zuvor nicht verletzt wurden, d.h. keine Notwendigkeit zur Regeneration bestand, wurden die RGZ durch die Linsenverletzung in einen regenerationsfähigen Zustand versetzt. Dieser unterscheidet sich von dem nach Quetschung, wie die bio- und immunhistochemischen Untersuchungen der Proben belegten. So zeigte sich neben einer Aktivierung der Glia mit Hochregulation von GFAP und bFGF eine im Vergleich zur Quetschung unterschiedliche Expression und Verteilung von GAP-43. Während eine Quetschung eine rasche, transiente Hochregulation dieses Proteins v.a. in den RGZ und der IPL hervorruft, trat diese bei der Linsenverletzung nicht auf. Andere Arbeiten zeigten, daß diese erst verzögert nach mehreren Tagen oder Wochen beobachtet werden kann (Leon et al., 2000). Des Weiteren ermöglicht eine Linsenverletzung adulten, dissoziierten RGZ ein Auswachsen auf Laminin-2 *in vitro*, welches ohne diese Vorbehandlung nicht möglich ist (Lorber et al., 2002). Diese Beobachtungen weisen auf eine Veränderung des intrinsischen Potentials der RGZ infolge der Linsenverletzung hin. Ihre regenerationsfördernden Effekte werden dabei vermutlich über Signalkaskaden vermittelt, die sich von denen nach Quetschung unterscheiden, und in Kombination mit ihnen synergistisch wirken.

4.3.2. Wodurch werden die Effekte der Linsenverletzung vermittelt?

Der Mechanismus durch den eine Linsenverletzung axonale Regeneration *in vivo* und Neuritenwachstum explantierter Retinae oder dissoziierter RGZ *in vitro* vermittelt, ist noch nicht geklärt.

Makrophagen und Glia

Eine Verletzung der Linse führt zu einer starken Makrophagen-Infiltration des Auges (Leon et al., 2000). Diese können entweder direkt über die Sekretion von Faktoren (Rappolee and Werb, 1992, Yin et al., 2003) oder indirekt durch Aktivierung der retinalen Glia die neuronale Regeneration stimulieren (Giulian et al., 1994, Yoshida et al., 1995).

Aktivierte Gliazellen stellen sich durch die auch hier beobachtete verstärkte Expression von GFAP dar. Dabei handelt es sich um ein gliales, zellspezifisches Intermediärfilamentprotein, dessen verstärkte Expression häufig als Indikator der glialen Reaktion auf neuronale Verletzungen verwendet wird (Hatten et al., 1991). Während GFAP in der Mammalia-Retina konstitutiv in den Astrozyten der optischen Faserschicht exprimiert wird, kann seine Hochregulation nach einer Verletzung im oculo-retinalen Bereich vorwiegend in den Müllerzellen beobachtet werden (Bignami and Dahl, 1979). So zeigte sich auch hier in den Western Blot-Analysen eine verstärkte Expression von GFAP nach Verletzung der Linse. Diese war stärker als die durch eine Quetschung des ON initiierte Expression (Chen and Weber, 2002) und unterschied sich deutlich von der infolge der Explantation oder einer lokalen Verletzung der Retina (Cao et al., 2001, Kuhrt et al., 2004) beobachteten Hochregulation. Die Kombination von Quetschung und Linsenverletzung resultierte in einer weiteren Erhöhung des GFAP. Immunhistochemisch konnten diese Effekte im Fall der Quetschung in den Astrozyten, im Fall der Linsenverletzung darüber hinaus in den Endfüßen und Fortsätzen der Müllerzellen lokalisiert werden. Die Kombination der beiden Vorbehandlungen führte zu einer Intensivierung des Signals, v.a. in den Fortsätzen der Müllerzellen. Diese Befunde bestätigten im Wesentlichen die entsprechenden Beobachtungen *in vivo* (Leon et al., 2000) und zeigten die Involvierung der retinalen Glia, insbesondere der Müllerzellen an der Signalvermittlung der Linsenverletzung. Reaktive Astrozyten und Müllerzellen gehen mit einer Astroglie einher, die mit der Inhibierung axonalen Wachstums und Degeneration der Neurone assoziiert ist (Ridet et al., 1997). In zahlreichen Experimenten

konnten jedoch auch neuroprotektive und regenerationsfördernde Effekte der aktivierten Glia beobachtet werden. So sezernieren aktivierte Astrozyten neurotrophe Faktoren und regenerationsfördernde Moleküle der EZM wie Laminin (Cai et al., 2001, Tardy, 2002). In weiteren Studien zeigten sie eine verstärkte Expression von Neurotrophin mRNA im Bereich axonaler Sprossung des verletzten Hippocampus (Guthrie et al., 1997) und eine bedeutende Rolle für das Überleben neuronaler Zellen (Cui et al., 2001, Zhao et al., 2003). Diese und die hier erhobenen Daten lassen den Rückschluß auf eine mögliche, indirekte Vermittlung der regenerationsfördernden Eigenschaften der Linsenverletzung über die Aktivierung der retinalen Glia zu.

Neurotrophe Faktoren

Aktivierte Müllerzellen zeigen eine verstärkte Expression und Freisetzung von verschiedenen neurotrophen Faktoren, wie z.B. CNTF (Chun et al., 2000, Ju et al., 1999) und bFGF (Casson et al., 2004).

CNTF fördert das Überleben und die Regeneration von RGZ in Kultur (Becker et al., 2000, Lehwalder et al., 1989). *In vivo* führt seine intravitreale Applikation zu erhöhtem Überleben retinaler Ganglienzellen nach Axotomie oder Ischämie (Mey and Thanos, 1993, Yip and So, 2000) und stärkeren Reperation in ein PNS-Transplantat (Cho et al., 1999b, Cui et al., 1999). Dieses cytosolische, in Astrozyten und Müllerzellen lokalisierte Protein wird in adulten Retinae infolge verschiedenster Stressstimuli hochreguliert (Cao et al., 1997, Ju et al., 1999, Liu et al., 1998) und nach Trauma in den Extrazellulärraum freigesetzt (Friedman et al., 1992, Sendtner et al., 1992). So zeigten auch die vorliegenden Western Blot-Befunde sowohl nach Linsenverletzung als auch nach Quetschung eine starke Hochregulation des CNTF. Diese konnte durch eine entsprechende Kontrollgruppe signifikant von der durch Narkotika, mechanischem Streß (Peterson et al., 2000) oder punktförmiger Verletzung der Retina möglichen CNTF-Expression (Cao et al., 2001) unterschieden werden. Eine Zunahme und Freisetzung dieses Faktors in die IPL wurde bei den regenerierten Proben beobachtet, während er in der IPL der degenerierten Proben nicht nachweisbar war. Obgleich seine Expression mit der Regeneration korreliert, scheint CNTF nicht für die Vermittlung der neuritogenen Wirkung der Linsenverletzung maßgeblich zu sein. So führte die Applikation von Antikörpern gegen CNTF *in vivo* (Leon et al., 2000) oder gp 130, einer Komponente des CNTF und LIF Rezeptors, dessen Effekte dadurch blockiert werden, *in vitro* nicht zu einer Inhibierung der

regenerationsfördernden Effekte der Linsenverletzung (Lorber et al., 2002).

Ein weiterer neurotropher Faktor zur Vermittlung der neuritogenen Wirkung ist bFGF, welcher das Überleben und die Regeneration retinaler GZ *in vivo* (Sapieha et al., 2003, Sievers et al., 1987) und *in vitro* (Bähr et al., 1989, Liu et al., 1998, McFarlane et al., 1995) fördert. Analog CNTF wird bFGF mRNA infolge verschiedener traumatischer Verletzungen des Auges hochreguliert (Faktorovich et al., 1992, Wen et al., 1995) und ist ebenfalls in Astrozyten und Müllerzellen lokalisiert. Komplementär zu dem zytosolischen CNTF wird bFGF jedoch in den Nuklei dieser Zellen, sowie unter Stressbedingungen im Zytoplasma der RGZ, in dem CNTF abwesend ist, detektiert (Walsh et al., 2001). Ebenso wie die differentielle Expression der entsprechenden Rezeptoren CNTFR α und FGFR1 in Photorezeptorzellen deutet dies auf unterschiedliche Wirkmechanismen der beiden Faktoren hin (Valter et al., 2003). Beide Neurotrophine zeigen zudem unterschiedliche Effekte auf die Expression von GAP-43. Während CNTF-stimuliertes, neuronales Auswachsen mit einer Hochregulation von GAP-43 mRNA und Protein einhergeht (Cho et al., 1999a), führt die Applikation von bFGF an den traumatisierten Sehnervstumpf zu einer Zunahme der GAP-43 mRNA, aber zur Reduktion des Proteins (Soto et al., 2003). Dieses Phänomen wurde auch in den vorliegenden Western Blots nach Hochregulation des bFGF beobachtet, die sich im Gegensatz zum CNTF nur im Fall der Linsenverletzung, nicht jedoch nach Quetschung zeigte. Immunhistochemische Aufnahmen unterschieden sich ebenso von denen des CNTF und offenbarten den Transport des bFGF in die Endfüßchen der Müllerzellen und Aufnahme in die RGZ im Fall der Regeneration, im Vergleich zur Lokalisation in den Somata der Müllerzellen unter degenerativen Bedingungen. Der differentielle Wirkmechanismus und die selektive Hochregulation nach Linsenverletzung lassen die Vermutung zu, daß bFGF ein wichtiger Faktor in der Vermittlung der neuritogenen Effekte der Linsenverletzung ist. Obgleich die Applikation von Antikörpern gegen bFGF nicht zu einer Verminderung dieser Effekte führte, kann seine Beteiligung nicht ausgeschlossen werden, räumten die Autoren doch selber ein, daß eine gesicherte Blockade des Faktors aufgrund von Diffusion, Degradation und Unkenntnis der effektiven Konzentration des Antikörpers nicht gewährleistet war (Leon et al., 2000).

Die Gruppe um Berry konnte durch Blockade der trk- und gp130-Rezeptoren klassische neurotrophe Faktoren wie NGF, BDNF, NT-4, NT-3 bzw. CNTF und LIF als Vermittler

der neuritogenen Wirkung der Linsenverletzung ausschließen (Lorber et al., 2002). Eine Involvierung weiterer, bisher noch nicht identifizierter neurotropher Faktoren (Taylor and Bampton, 2004) ist jedoch ebenso wie die von Komponenten der Linse selbst denkbar.

Kristalline

Beobachtungen, daß isolierte RGZ bei Cokultivierung mit verletzten Linsen ein neuronales Auswachsen zeigten (Lorber et al., 2002), führten zu der Annahme der direkten Wirkung freigesetzter, lentogener Faktoren. Neben antioxidativ wirkendem Glutathion und Ascorbinsäure enthält die Linse hauptsächlich Kristalline (s. Einleitung). Diese zeigen nach intravitrealer Applikation sowohl *in vivo* als auch *in vitro* neuroprotektive und –regenerative Effekte auf RGZ der Ratte (Fischer, 2000). Ebenso reagieren Organkulturen des Rückenmarks und isolierte Motoneurone des Hühnchens *in vitro* nach Zugabe einzelner Kristalline mit einer verstärkten Neuritenbildung und Elongation (Ahmann, 2003). Immunhistochemische Untersuchungen zeigten eine erhöhte Signalintensität aller Kristalline in retinalen Ganglienzellen der regenerierten Retinae, wobei die hier beobachtete Hochregulation des γ -Kristallins im Western Blot u.a. auf die Verletzung der Linse zurückgeführt werden konnte. Eine Freisetzung der Kristalline durch diese Behandlung, ihre Diffusion und Aufnahme in die RGZ scheint daher möglich, obgleich bislang kein spezifischer Rezeptor zur Internalisierung oder Aktivierung entsprechender Signalkaskaden gefunden wurde. Alternativ ist eine Hochregulation der endogenen Kristallinexpression der RGZ infolge der Linsenverletzung bzw. dadurch freigesetzter Faktoren denkbar. Auch eine indirekte Wirkung der Kristalline über Interaktionen mit Gliazellen, wie sie z.B. bei der Aktivierung von Mikrogliazellen durch α -Kristalline beobachtet wurde (Bhat and Sharma, 1999), kann unter dem neuritogenen Aspekt nicht ausgeschlossen werden, ist jedoch vor dem Hintergrund der hier in der Immunhistochemie gezeigten Lokalisation in den Neuronen und der beschriebenen Effekte auf isolierte RGZ (Lorber et al., 2002) und Motoneurone (Ahmann, 2003) eher unwahrscheinlich.

Die Kristalline scheinen somit neben anderen Faktoren wie bFGF eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der neuritogenen Wirkung der Linsenverletzung zu spielen. Weitere Untersuchungen zur Klärung einer möglichen Aufnahme in die Neurone und ihrer Bindungspartner würden ebenso wie die Identifizierung alternativer, durch die

Linsenverletzung aktivierte Proteine und Signalwege Aufschluß über den Mechanismus der neuritogen Linsenverletzung geben.

4.4. Einfluß der Glia auf die Regeneration

Ein wichtiger Aspekt bei der neuronalen Regeneration sind die Effekte der benachbarten Gliazellen. Ihre Rolle im Regenerationsgeschehen wird kontrovers diskutiert, da sie in Form der glialen Narbe eine Regeneration nach Verletzung inhibieren, gleichzeitig jedoch auch eine Vielzahl neuroprotektiver und regenerationsfördernder Faktoren produzieren.

Gliazellen stellen den häufigsten Zelltyp im ZNS dar und spielen eine entscheidende Rolle bei dessen Entwicklung und Homöostase. In der Retina der Vertebraten sind die Astrozyten nur in der Nervenfaserschicht lokalisiert, während die dominierenden retinalen Gliazellen, die Müllerzellen, ihre Somata in der INL verankert haben und mit ihren Fortsätzen alle Schichten der Retina vertikal durchziehen. Diese Zellen kommunizieren über Ionenkanäle, Neurotransmitterrezeptoren und verschiedene Transportsysteme mit den einzelnen Kompartimenten der Retina. Müllerzellen spielen dabei eine wichtige Rolle für die Modulation der neuronalen Aktivität und Aufrechterhaltung der retinalen Homöostase durch Regulation der intra- und extrazellulären Konzentrationen von Calcium, Kalium, Glutamat und GABA. Ebenso kontrollieren sie den retinalen pH-Wert und dienen als unterstützende metabolische Energiequelle für die Neurone (Newman and Reichenbach, 1996, zur Übersicht).

Gliazellen exprimieren GFAP als Teil ihres Zytoskeletts und zeigen eine verstärkte Produktion dieses Intermediärfilaments nach Aktivierung oder Reifung. Im Gegensatz zu Astrozyten, die GFAP konstitutiv exprimieren, zeigen Müllerzellen keine signifikante Expression von GFAP unter physiologischen Bedingungen. Diese wird jedoch infolge einer Vielzahl pathologischer Veränderungen der Retina, wie der altersabhängigen oder induzierten Degeneration, Ischämie, Hypoxie, vererbare retinale Dystrophie oder Glaukom, sowie nach Verletzung der Retina oder des optischen Nerven induziert bzw. hochreguliert (Garcia and Vecino, 2003, zur Übersicht).

Aktiviert, verstärkt GFAP exprimierende Gliazellen besitzen einen hypertrophen Phänotyp und sezernieren neurotrophe Faktoren wie z.B. NGF, bFGF, CNTF oder IGF, und regenerationsfördernde Moleküle der EZM, z.B. Laminin (Garcia and Vecino, 2003, Tardy, 2002). Auf der anderen Seite führt eine Verletzung des ZNS zur reaktiven Gliose und Ausbildung einer glialen Narbe, die neuronales Auswachsen und axonale Regeneration inhibiert (Fawcett and Asher, 1999). In verschiedenen Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, daß eine Blockade der astrozytären Reaktivität zu verbessertem neuronalen Überleben und axonaler Regeneration führt. So zeigte sich in Neuronen-Astrozyten-Cokulturen nach Verminderung bzw. Inhibierung der astrozytären GFAP-Synthese durch *Antisense*-Oligonukleotid-Behandlung oder *Gen-knock out* (Lefrancois et al., 1997, Menet et al., 2000) eine Reduktion der glialen Hypertrophie sowie ein stärkeres Überleben und axonales Auswachsen der Neurone. Die Gruppe um Tardy (1997 u. 2002) postulierte daher die Induktion eines funktionellen Shifts der astroglialen Funktion von regenerationsfördernder zu inhibierender Art infolge einer erhöhten GFAP-Expression.

Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit eine parallele Erhöhung der Regeneration und GFAP-Synthese beobachtet werden. Im Regenerationsmodell der Ratte wurde durch die jeweilige Vorbehandlung in Form von Quetschung oder Linsenverletzung sowie verstärkt durch ihre Kombination eine quantitative Regeneration erzielt. Parallel zu der erhöhten Anzahl regenerierender Fasern zeigte sich im Western Blot der Proben eine Zunahme der GFAP-Expression, die immunhistochemisch bestätigt und in den Müllerzellen lokalisiert werden konnte. Die Zunahme von GFAP bzw. Aktivierung der Gliazellen geht somit nicht mit einer Inhibierung oder Verminderung der Regeneration einher. Kombiniert vorbehandelte, invers explantierte und infolgedessen nicht-regenerierte Retinae zeigten jedoch eine im Vergleich zu den regenerierten Gruppen erhöhte GFAP-Expression. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, daß die Aktivierung der Müllerzellen auf die inflammatorischen Effekte der Vorbehandlung, nicht jedoch auf die Regeneration der retinalen Ganglienzellen zurückzuführen ist. Die Analyse nach Vorbehandlung entweder direkt entnommener, schwach bzw. stark regenerierter und nicht-regenerierter Retinae im Western Blot offenbarte vergleichbare GFAP-Mengen und bestätigte die Hypothese.

Interessanterweise konnte jedoch auch bei der Untersuchung der spontanen Regeneration des Affen ohne vorausgehende Traumatisierung der Retina eine Korrelation der Regeneration und GFAP-Expression beobachtet werden. Gut regenerierte Retinae

neugeborener und adulter Affen zeigten im Western Blot eine Induktion bzw. Hochregulation des GFAP, die bei schwächer regenerierten oder invers explantierten Retinae wesentlich geringer war. Die auch durch Immunhistochemie bestätigte Aktivierung der Müllerzellen resultierte in diesem Modell somit nicht aus der präparativen Axotomie oder Explantation, sondern war eindeutig regenerationsassoziiert. Gliazellen können unter physiologischen Bedingungen durch neuronale Signale zur Produktion neurotropher Faktoren angeregt werden. So induzierte beispielsweise der von Neuronen produzierte gliale Wachstumsfaktor GGF (*glial growth factor*) in nicht-neuronalen Zellen die Synthese von Neurotrophin-3 (NT-3), welches das Überleben und Auswachsen benachbarter Neurone fördert (Verdi et al., 1996). Eine Aktivierung der Müllerzellen und eine damit verbundene Expression regenerationsfördernder Faktoren und Substrate durch die regenerierenden Neurone ist daher denkbar.

Während diese regenerationsassoziierte GFAP-Expression im Regenerationsmodell der Ratte möglicherweise durch die starken Effekte der Vorbehandlung überlagert werden, können auch speziespezifische Differenzen Ursache für die unterschiedlichen Beobachtungen sein. Da für die astrogliale Architektur im cerebralen *Cortex* adulter Säugetiere unterschiedliche Nagetier- und Primaten-Typen beschrieben wurden (Colombo et al., 2000), sind auch funktionelle Unterschiede der Gliazellen in den verschiedenen Spezies nicht auszuschließen. Eine erhöhte GFAP-Expression bzw. Aktivierung der Müllerzellen steht somit nicht im Widerspruch zur Regeneration, sondern scheint vielmehr durch sie initiiert zu werden.

Astrozyten und Müllerzellen zeigen auch mit zunehmender Reifung eine erhöhte GFAP-Produktion. So konnte hier in der Retina des Affen, wie bereits bei Mäusen, Ratten oder Menschen gezeigt, ein gradueller Anstieg der GFAP-Expression mit zunehmendem Alter beobachtet werden (Eng et al., 2000, Nichols et al., 1993). Die vermehrte GFAP-Synthese und Aktivierung der Müllerzellen ist dabei auf die Reifung der Gliazellen und altersbedingte, retinale Degeneration zurückzuführen (DiLoreto et al., 1995). Im Zuge der Müllerzellgliose werden durch abgestorbene Zellen frei gewordene Hohlräume narbig ausgefüllt, wobei die resultierende "Gliale Narbe" bzw. veränderte retinale Umgebung neuronales Auswachsen inhibiert. Dem vermehrten GFAP kommt dabei vermutlich eine, wie auch in anderen Arbeiten beobachtete strukturgebende Rolle zu (Nawashiro et al., 1998).

Müllerzellen verlieren mit zunehmender Reifung ihre neuroprotektiven und

regenerationsfördernde Effekte und zeigen signifikante Veränderungen ihrer Proteinexpression (Hauck et al., 2003, Sievers et al., 1995). Neben einer verminderten Synthese regenerationsfördernder Moleküle wie z.B. Laminin, NCAM oder Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) kann eine Zunahme inhibierender Faktoren wie Chondroitinsulfatproteoglykan (CSPG) oder Tenascin beobachtet werden (Tardy, 2002, zur Übersicht). Diese reifungsbedingten Veränderungen der glialen Eigenschaften sind neben dem bereits beschriebenen altersabhängigen Verlust des intrinsischen Regenerationspotentials der Neurone und der differenzierten retinalen Umgebung eine grundlegende Ursache für die altersabhängige Reduktion der neuronalen Regeneration. Diese wie auch die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Befunde unterstreichen die enorme Bedeutung der Glia für den Regenerationsprozeß. Ihre Aktivierung und verstärkte GFAP-Expression ist dabei sowohl mit zunehmender Regeneration als auch abnehmender Regenerationsfähigkeit der RGZ zu beobachten. Eine gesteigerte GFAP-Expression ist daher lediglich als biologischer Marker für reaktive Müllerzellen anzusehen, gibt jedoch keine Auskunft über die regenerationsfördernde oder –inhibierende Art ihrer aktivierten Stoffwechselwege.

4.5. Einfluß der Kristalline auf die Regeneration

Die auch in dieser Arbeit bestätigte neurotrophe Wirkung der Linsenverletzung auf axotomierte retinale Ganglienzellen der adulten Ratte wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet (Leon et al., 2000, Lorber et al., 2002, Yin et al., 2003). Diese postulierten eine Vermittlung der neuroprotektiven und neuritogenen Effekte der Linsenverletzung über die Aktivierung von Makrophagen. Nach Fischer (2000) geht jedoch zumindest ein Teil der neurotrophen Wirkung auf die Kristalline der Linse zurück, deren regenerationsfördernde Wirkung an neuronalen Zell- und Gewebekulturen des Hühnchens belegt werden konnte (Ahmann, 2003). Im Zuge der hier untersuchten Effekte der Vorbehandlung auf die Regeneration der Rattenretina konnte im Western Blot der regenerierten Retina eine Expression von γ -Kristallin nach Linsenverletzung beobachtet werden. Die verstärkte Expression des γ -Kristallins nach Kombination der Linsenverletzung mit einer Quetschung des optischen Nerven zeigte, daß diese Veränderungen nicht nur auf eine mögliche Aufnahme des exogenen, infolge der

Linsenverletzung freigesetzten Kristallins zurückzuführen sind. Vielmehr zeigte sich eine veränderte endogene Kristallinexpression in der Retina, deren Korrelation und Bedeutung für die Regeneration der RGZ durch die immunhistochemische Analyse der Retina weiter untersucht wurde.

Alle 3 Hauptgruppen der Kristalline, wenn auch im Fall des β -Kristallins relativ schwach, konnten hier erstmals in den nukleären Schichten, so auch den Ganglienzellen der Retina nachgewiesen werden. Kürzlich veröffentlichte Beobachtungen der Lokalisation der Kristalline in der Mausretina bestätigten diese Befunde (Xi et al., 2003). Sowohl α - als auch die β - und γ -Kristalline zeigten nach Vorbehandlung und Regeneration eine stärkere Expression in der RGZ- und optischen Faserschicht als nach Vorbehandlung und Nicht-Regeneration. Obgleich im Western Blot auch eine massive Hochregulation des γ -Kristallins nach Vorbehandlung ohne anschließende *in vitro*-Regeneration beobachtet werden konnte, deuteten diese Befunde auf eine regenerationsassoziierte Expression der Kristalline hin. Diese Effekte konnten bei der nachfolgenden Analyse der spontan regenerierenden Affenretina bestätigt und damit von möglichen Einflüssen der Vorbehandlung abgegrenzt werden.

Wurde bei Primaten im optischen System bislang nur α_B -Kristallin im *Corpus geniculatum laterale* und dem Trabekelnetzwerk nachgewiesen (Prasad et al., 2002, Tamm et al., 1996) konnte in dieser Arbeit erstmals die Expression und Verteilung der 3 Hauptkristallingruppen in der Retina gezeigt werden. Analog zu der Nagetierretina von Ratte (diese Arbeit) und Maus (Xi et al., 2003) zeigte sich auch beim Affen eine Expression der Kristalline in den nukleären Schichten, v.a. den Ganglienzellen der Retina. Der Vergleich neugeborener und adulter Affenretina offenbarte eine altersabhängige, kürzlich ebenfalls bei Ratten beobachtete Reduktion des α_B -Kristallins (Kapphahn et al., 2003), während β - und γ -Kristalline keine Veränderungen ihres Gehaltes zeigten. Folglich ist diese Abnahme nicht auf einen altersabhängigen Verlust der Photorezeptor- oder Ganglienzellen zurückzuführen und deutet auf eine unterschiedliche Funktion der α - und der zu einer gemeinsamen Familie zählenden β - und γ -Kristalline hin (s. Einleitung).

Gleichwohl zeigte sich für alle 3 Kristalline eine signifikante Zunahme in der Retina nach Explantation und Regeneration, die für die α -Kristalline im Western Blot und der 2D-Analyse bestätigt werden konnte. Verschiedene Arbeitsgruppen publizierten kürzlich die

Hochregulation der Kristalline infolge degenerativer Veränderungen, wie einer durch Mutation oder intensive Lichtbestrahlung ausgelösten Degeneration der Photorezeptorzellen (Cavusoglu et al., 2003, Sakaguchi et al., 2003). Diese konnte auch hier in den invers explantierten und daher vermutlich partiell degenerierten Retinae beobachtet werden, war jedoch deutlich schwächer als nach Regeneration. Die verstärkte Expression der Kristalline in den explantierten, regenerierten Retinae ist daher nicht als reine Stressantwort oder auf auch dort ablaufende degenerative Prozesse zurückzuführen, sondern regenerationsassoziiert. Einen weiteren Hinweis dafür lieferte die verstärkte Expression in den Zellkernen der regenerierten RGZ sowie ihre Translokation in die von den axonalen und dendritischen Fortsätzen der Ganglienzellen gebildeten optischen Faserschicht bzw. innere plexiforme Schicht. Die Zellkerne der im Explantationsmodell nicht regenerierenden Photorezeptor (ONL)-, Müller-, Horizontal-, Bipolar- und Amakrinen Zellen (INL) zeigten dagegen einen Verlust der Kristallinexpression, der ebenfalls in der nicht-regenerierten Retina beobachtet werden konnte. Auch bei diesen Zellen konnte eine Translokation der Kristalline in die zytoplasmatischen Kompartimente, ROS, OPL und IPL beobachtet werden, wo sie möglicherweise die Regeneration der RGZ unterstützen.

Kristalline galten lange Zeit als exklusive und strukturgebende Proteine der Linse. Im Zuge ihres extralenticulären Nachweises und zahlreicher Untersuchungen der letzten Jahre wurden jedoch ihre protektiven Funktionen als Chaperone oder Streß-responsive Proteine bekannt.

α -Kristalline

α -Kristalline wurden mittlerweile in zahlreichen Geweben wie Herz, Lunge, Muskel, Thymus, Niere, ZNS und so auch der Retina identifiziert. Sie gehören zu den *small heat shock proteins* (sHSPs) und verhindern als molekulare Chaperone die Aggregation partiell denaturierter Proteine (Graw, 1997). Neben ihrer daraus folgenden möglichen Bedeutung für die Zellproliferation und genomische Stabilität, scheinen sie auch protektive Funktionen zu haben. So konnte ihre verstärkte Expression bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen (Messing et al., 1998, van Noort et al., 2000), sowie nach Degeneration der retinalen Photorezeptorzellen (Cavusoglu et al., 2003, Sakaguchi et al., 2003) beobachtet werden. Der genaue Mechanismus über den α_A - und α_B -Kristalline

diese Effekte vermitteln ist bislang jedoch noch unklar. Die differentielle *in vivo*-Phosphorylierung der α_A - und α_B -Kristalline (Kantorow and Piatigorsky, 1998), ihre Involvierung in Signaltransduktionswegen (Hoover et al., 2000, Kantorow and Piatigorsky, 1994), sowie ihre Bindung an Membranen und Intermediärfilamente (Boyle and Takemoto, 1996, Cobb and Petrash, 2002, Djabali et al., 1999) lassen ebenso wie die hier beobachtete differentielle Expression und Lokalisation den Rückschluß auf verschiedene Funktionen zu.

Für die Vermittlung ihrer neuroprotektiven und –regenerativen Wirkung sind daher mehrere Wege denkbar. Zum einen besitzen α -Kristalline eine antiapoptotische Wirkung. So können α_A - und α_B -Kristalline eine Staurosporin-induzierte Apoptose durch direkte Bindung an Bax und Bcl-X und daraus resultierender Unterdrückung der Caspase-3-Aktivierung verhindern (Mao et al., 2004).

Des Weiteren weisen beide Kristallin-Untereinheiten eine Konsensussequenz von DNA-bindenden Proteinen auf und konnten *in vitro* an ss- und ds-DNA binden (Pietrowski et al., 1994, Singh et al., 1998). Im Einklang mit der hier beobachteten verstärkten nukleären Expression des α_B -Kristallins in regenerierten RGZ ist daher eine Funktion als Transkriptionsfaktor und damit verbundener Expression neurotropher Gene denkbar.

Nicht zuletzt könnte auch die Funktion der α -Kristalline als molekulare Chaperone für die Regeneration der Neurone von Bedeutung sein. Die zu den sHsps zählenden α_B -Kristalline unterscheiden sich von anderen Chaperonfamilien wie Hsp 60 und 70 durch ihre hohe Bindungsaffinität zu nicht-nativen Proteinen und ihre ATP-freie Reaktion. So konnte auch hier neben der für andere sHsps üblichen und in Zellkulturen ebenfalls für α_B -Kristalline beschriebenen Anreicherung in den Nuklei unter Stressbedingungen (Klemenz et al., 1991) eine Translokation in die zytoplasmatischen, von ganglionären Axonen und Dendriten gebildeten optischen Faserschicht und IPL beobachtet werden. Da α_B -Kristallin direkt mit dem Intermediärfilamentnetzwerk des Zytoplasmas interagiert, insbesondere bei dessen Remodulation infolge Krankheit (z.B. Alexander's Disease) (Messing and Brenner, 2003), Streß oder Mitose (Djabali et al., 1999), liegt ihre Interaktion am axonalen Transport wachstumsassoziierter Proteine (*GAPs*) nahe. Diese *GAPs*, so z.B. GAP-43, dessen verstärkte Expression in den RGZ, der optischen Faserschicht und der IPL mit der des α -Kristallins korreliert, werden in den Ganglienzellsomata synthetisiert und durch Bindung an axonale Intermediärfilamente zu

ihrem Wirkort, den Wachstumskegeln transportiert. α_B -Kristallin könnte in diesem Zusammenhang als Chaperon die korrekte Ent- und Rückfaltung der axonal transportierten Proteine sichern, sowie die mögliche Bildung von Intermediärfilament- und Proteinaggregaten verhindern. Die altersabhängige Reduktion der Chaperon-Funktion korreliert mit der abnehmenden Regenerationsfähigkeit der RGZ und liefert damit weitere Hinweise auf die Bedeutung dieser Funktion des α -Kristallins für die Regeneration.

Unabhängig vom Mechanismus ihrer Wirkung liefern die hier beobachtete regenerationsassoziierte Expression ebenso wie die *in vivo*- und *in vitro*-Experimente regenerierender RGZ und Motoneurone (Ahmann, 2003, Fischer, 2000) deutliche Hinweise auf neuroprotektive und –regenerative Effekte der α -Kristalline.

β/γ -Kristalline

Im Gegensatz zu den α -Kristallinen ist über die zelluläre Funktion der β - und γ -Kristalline bis heute wenig bekannt. Ihre extralenticuläre Expression wurde in der Iris und Retina der Maus (Head et al., 1995, Jones et al., 1999, Xi et al., 2003), sowie in der Retina der Ratte und des Affen (diese Arbeit) nachgewiesen. Sie gehören einer gemeinsamen Superfamilie an und zeichnen sich demnach durch eine ausgeprägte Sequenzhomologie sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene aus (Graw, 1997, Wistow, 1993). Ihre Sekundär- und Tertiärstruktur bilden sogenannte *Greek-Key*-Motive, die sich durch eine charakteristische, antiparallele β -Faltblattstruktur und die Fähigkeit Ca^{2+} -Ionen zu binden auszeichnet (Graw, 1997, Rajini et al., 2001). Diese strukturellen Eigenschaften und ihre hohe intrinsische Stabilität gleichen denen mikrobieller Stressproteine (Jaenicke and Slingsby, 2001), und legen eine den α -Kristallinen oder anderen sHsps ähnliche zellprotektive Funktion für die β - und γ -Kristalline nahe. So konnte eine transiente Erhöhung des γ -Kristallins in der Retina von Mäusen an den postnatalen Tagen 16 bis 18, an denen die Tiere erstmals ihre Augen öffnen, beobachtet werden (Jones et al., 1999). Da einfallendes Licht ein Stressfaktor für Photorezeptorzellen ist und nachweislich in bestimmten Dosen zu deren Apoptose führen kann (Wong et al., 1994), könnte die auch in den regenerierten RGZ beobachtete Hochregulation des γ -Kristallins ähnlich wie bei den sHsps eine Art Schutzmechanismus der Zelle darstellen.

Weitere Hinweise für eine derartige Funktion ergeben sich aus der Verlagerung der β -Kristalline von perinukleären zu zytoplasmatischen Regionen neuronaler Zellen *in vitro*

nach temporärer Hitzeschockbehandlung (Coop et al., 1998). Diese Translokation und parallele verstärkte Expression der β - und γ -Kristalline wurde auch hier im Fall der regenerierten Retina beobachtet. Sie könnten in der optischen Faserschicht und IPL durch die Bindung überschüssiger, in das Zytoplasma einströmender Ca^{2+} -Ionen neuroprotektiv wirken. Ebenso ist eine Stabilisierung anderer, möglicherweise regenerationsassoziiierter Proteine aufgrund ihrer β -Faltblattstruktur möglich.

Ein weiterer Ansatz ergibt sich aus dem hohen Thiol- und Glutathiongehalt der β - und γ -Kristalline. Infolge von Streß verstärkt auftretende intrazelluläre Radikale und oxygenierte Substanzen tragen vermutlich zur Auslösung des programmierten Zelltods bei (Greenlund et al., 1995). So führte der Entzug von Glutathion bei Nervenzellen vermutlich durch die Verschiebung des intrazellulären Redoxgleichgewichtes und daraus resultierender erhöhter Anzahl freier Radikale *in vitro* zur Apoptose (Nicole et al., 1998, Ratan et al., 1994). Eine Funktion der β - und γ -Kristalline als antioxidativ wirksame Proteine oder Glutathionspeicher ist daher denkbar und steht im Einklang mit der hier beobachteten Hochregulation in den regenerierten RGZ.

Weitere Experimente wie etwa die Untersuchung der Neuroprotektion und –regeneration nach Überexpression oder Blockade der Kristalline sind notwendig, um ihre Rolle für die Regeneration genauer zu charakterisieren. Darüber hinaus würde die Identifizierung ihrer Interaktionspartner, z.B. durch Co-Immunpräzipitation oder dem *Two-Hybrid-System* zur Aufklärung ihrer Wirkmechanismen hilfreich sein und einen tieferen Einblick in das Regenerationsgeschehen ermöglichen.

4.6. Proteomanalyse der regenerierten Retina

4.6.1. 2D-Analyse

Um das komplexe Netzwerk physiologischer Vorgänge wie der Regeneration zu verstehen, ist die Analyse des Genoms eines Organismus nicht ausreichend. Kodieren nur etwa 3 % des menschlichen Genoms für Proteine, können aus 1 Gen bis zu 20 verschiedene Proteine hervorgehen. Ursache für diese Diversifizierung ist das alternative Splicing der unreifen mRNA, das mRNA-Editing und die posttranslationale

Modifizierung des primär gebildeten Proteins. Zwischen Genexpression, Proteinkonzentration und Proteinaktivität besteht daher oft keine direkte Korrelation. Menge, Zusammensetzung und Aktivität der Proteine einer Zelle sind variabel und werden durch zahlreiche Faktoren wie z.B. Alter, Differenzierungsgrad oder Stress beeinflusst. Jedem Genom können in Abhängigkeit der physiologischen Bedingungen unterschiedliche Proteome zugeordnet sein, so daß sich der Schwerpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen wie auch in dieser Arbeit zunehmend auf das Proteom konzentriert.

Die klassischen auch hier eingesetzten Methoden des Western Blots zur semiquantitativen Analyse bzw. der Immunhistochemie zur Lokalisationsbestimmung stellen erste, gute Optionen dazu dar. Neben ihrer Begrenzung durch die verfügbaren Antikörper, Fehldetektionen, unspezifische Bindungen oder Unterschreitung der Detektionsgrenze ist jedoch v.a. ihre Limitation auf die Untersuchung bekannter Proteine nachteilig. Die eingangs vorgestellte 2D-Gelelektrophorese bietet durch die hoch auflösende, parallele Darstellung von bis zu 10000 Komponenten einer Zelle eine wertvolle Ergänzung dazu an. So ist durch die Auftrennung von Milligrammmengen Protein die Detektion neuer, im untersuchten Aspekt bislang unbekannter Proteine sowie deren Aktivierung oder Modifizierung durch posttranslationale Veränderungen möglich.

Diese Vorteile wurden in vielen Bereichen der Medizin, so auch der ZNS-Forschung zur Untersuchung von verschiedenen physiologischen Zuständen, wie etwa nach M. Alzheimer oder Schizophrenie (Edgar et al., 1999), genutzt. Im retinotectalen System konnten so die veränderte Expression und der Transport von Proteinen im optischen Nerven transgener, myelindefekter Mäuse (Jensen and Celis, 1998), nach Axotomie retinaler Ganglienzellen der Ratte (Wodarczyk et al., 1997) oder nach Regeneration beim Goldfisch (Hall and Schechter, 1991) beobachtet werden. Proteomische Untersuchungen der Retina wurden parallel zu dieser Arbeit auch von anderen Gruppen gestartet und zeigten altersabhängige und lichtinduzierte Expressionsveränderungen (Kappahn et al., 2003, Sakaguchi et al., 2003).

Grundvoraussetzung für die Proteomanalyse ist die komplette Lyse und Solubilisierung der Probe bzw. Proteine. Dies gestaltete sich bei der hier bearbeiteten Retina, die

aufgrund der großen Anzahl von Photorezeptorzellen reich an Zellkernen und Membranen, d.h. DNA, Lipiden, und hydrophoben Proteinen ist, als sehr schwierig. Durch den Einsatz verschiedener Detergentien (SDS, CHAPS, ASB-14), Thioharnstoff und Benzonase konnte eine gute Solubilisierung und Auftrennung erzielt werden. Partielle Rest-Streifen bzw. -Schmier und die Abwesenheit hochmolekularer Proteine stehen im Einklang mit der beschriebenen schlechten Einquellung, vermindertem Transfer auf die 2. Dimension und schlechten Separation hydrophober Proteine durch die 2D-E (Wilkins et al., 1998).

Die nachfolgend geplante differentielle Analyse der Gele mit Hilfe der Software PDQuest gestaltete sich aufgrund weiterer, bekannter Nachteile der 2D-Elektrophorese Methodik als schwierig. Zum ersten zeigt die klassische 2D-PAGE eine begrenzte Dynamik, d.h. schwach exprimierte Proteine können nicht gleichzeitig neben stark exprimierten Proteinen dargestellt werden. Um erstere sichtbar zu machen müssten größere Proteinmengen aufgetragen werden. Dieses ist jedoch häufig wie auch hier aufgrund der begrenzten Ladungskapazität der Streifen und Verfügbarkeit des Probenmaterials nicht möglich. Gleichzeitig birgt es die Gefahr der Überlagerung schwacher durch stark exprimierte Proteine in sich (Celis et al., 1995), die auch hier durch die Identifizierung mehrerer Proteine eines Spots bei der MALDI-MS Analyse beobachtet wurde. Gegenwärtige Färbetechniken erlauben zudem nur eine begrenzte Visualisierung schwacher Proteinspots und erfordern Mindestmengen von 100 bzw. 20 ng Protein zur Anfärbung mit Coomassie bzw. kolloidalem Coomassie. Geringere Proteinmengen von 2-5 ng können mit Hilfe einer Silberfärbung wie auch in dieser Arbeit dargestellt werden. Aufgrund des dynamischen Charakters und häufigen Interferenz dieser Färbung mit einer MALDI-MS-Analyse ist eine nachfolgende quantitative Auswertung bzw. Identifizierung der Proteine jedoch nur begrenzt möglich. Neue, MALDI-MS-kompatible Fluoreszenzfarbstoffe, die fortlaufend entwickelt werden und in ihrer Sensitivität die Silberfärbung übertreffen, bieten eine Verbesserung dieser Problematik, konnten sich jedoch bislang in der Laborroutine nur begrenzt etablieren. Da die Identifizierung der Proteine mit MALDI-MS eine gewisse Proteinmenge erfordert, scheint es zudem sinnvoller die Auftragsmenge schwach exprimierter Proteine durch die Vorfraktionierung der Probe zu erhöhen. Erste Versuche dieser Art durch fraktionierte Lyse erwiesen sich hier bei den Rattenproben als ungeeignet. Klassische Verfahren der Chromatographie und

neue Techniken wie die *Free-flow*-Elektrophorese (FFE) zeigen gute Erfolge (Zischka et al., 2003), konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht ausgetestet werden.

Ein zweiter, die Auswertung gravierend erschwerender Faktor ist die fehlende Automatisierbarkeit und mangelnde Reproduzierbarkeit der Technik. Diese wird durch Chargenvariationen der IPG-Streifen, der Varianz der selbstgegossenen Gele der 2. Dimension, individuelle Proteomunterschiede sowie Limitation und biologische und technische Varianz des Materials weiter eingeschränkt. Trotz soweit möglich konstanter Rahmenbedingungen (identische Puffer, Probenaufarbeitung, Elektrophoreseparameter) zeigten sich Gel zu Gel-Variationen des Proteinmusters, die eine korrekte Zuordnung durch die Software erschwerten und ein hohes Maß an manueller Editierung erforderten. Letzteres sowie die Erstellung von Replikatgruppen und unterstützender optischer Auswertung ermöglichten die quantitative Analyse. Diese führte in beiden Modellen zur Aufdeckung mehrerer differentiell exprimierter Proteine, die teilweise identifiziert werden konnten. Eine qualitative Auswertung im Sinne einer Identifizierung von Translokationen eines Proteins infolge posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierung oder Glykosylierung war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Einen Lösungsansatz zur Erhöhung der Reproduzier- und Vergleichbarkeit der 2D-Gele stellt die neu entwickelte Technologie 2D-DIGE dar (Tonge et al., 2001). Dabei werden unterschiedliche, mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Proben in einem Gel aufgetrennt und die resultierenden Spotmuster nach differentieller Fluoreszenzanregung verglichen. Die fehlenden Gel zu Gel-Variationen beim direkten Vergleich sowie die Kontrolle des Proteinauftrages durch einen internen Standard ermöglichen eine verbesserte, zuverlässige Auswertung mit Hilfe der entsprechenden Software. Eine erste Austestung dieser Technik mit Proben der Affenretina zeigte vielversprechende Ergebnisse und soll weitergeführt werden.

Trotz der beschriebenen Nachteile bietet die 2D-PAGE wie keine andere Technik durch die simultane Darstellung einer Vielzahl von Proteinen die Untersuchung komplexer physiologischer Vorgänge an. Die Automatisierung und Weiterentwicklungen der Technik (2D-DIGE), Probengewinnung (Lasermikrodissektion) und Aufarbeitung (neue Detergentien, Vorfraktionierung durch HPLC oder FFE) lassen auf eine Verringerung der Limitationen hoffen und machen die 2D-PAGE zur Methode der Wahl bei der Analyse

komplexer Proteingemische. Die Identifizierung der im Zuge des Regenerationsgeschehens neu gebildeten, modifizierten oder regulierten Proteine und assoziierten Signalwege führt zu einem tieferen Verständnis der involvierten molekularen Mechanismen und Faktoren. Die dadurch mögliche Aufdeckung von Kandidatengen und Ansatzpunkten für eine Modulation der Prozesse bzw. Therapie und macht den Einsatz der 2D-PAGE in diesem Gebiet unverzichtbar. Im Zusammenspiel mit der Genomanalyse, mRNA-Messungen und klassischen biochemischen Analysen ist sie ein wichtiges Instrument für die umfassende Funktionsanalyse und wird auch in der Regenerationsforschung weiter an Bedeutung gewinnen.

4.6.2. Eignung der Modellsysteme

Als Modellsystem zur Untersuchung regenerationsassoziiierter Proteomveränderungen dienten in dieser Arbeit zunächst die Retinaexplantatkulturen der Ratte. Im Vergleich zu *in vivo*-Modellen wie der Transplantation eines peripheren Nervens (z.B. Ischias) (Vidal-Sanz et al., 1987) oder Readaptation des durchtrennten Sehnerven (Fischer et al., 2001) bietet das hier verwendete *in vitro*-Modell der Retinaorgankultur zahlreiche Vorteile (Bähr et al., 1988, Thanos et al., 1989).

So gewährleisten konstante Kulturbedingungen wie das chemisch definierte Medium, die sauerstoffreiche Atmosphäre (55 % O₂), konstante Temperatur, die chemisch definierte Extrazellulärmatrix (Laminin-1) und luftdurchlässige Petripermschalen eine optimale, reproduzierbare Regeneration ohne entsprechende modulierende Einflüsse des Immunsystems. Neben der direkten Kontrolle, morphologischen Charakterisierung und Quantifizierung der Regeneration ist die selektive Gewinnung stark regenerierten Materials für die nachfolgenden Analysen möglich.

Wie eingangs dargestellt wird die Regeneration durch zahlreiche Faktoren, so z.B. durch die Glia, das Immunsystem, neurotrophe Faktoren und die Extrazellulärmatrix beeinflusst. Die Verwendung der ganzen Retina zur Proteomanalyse ermöglicht die Erfassung aller Effekte, einschließlich der benachbarter Glia- und weiterer retinaler Zellen bzw. Faktoren. Dieser Ansatz schien daher für die ersten Untersuchungen der Regeneration retinaler Ganglienzellen in dieser Arbeit am besten geeignet zu sein. Gleichzeitig kommt es jedoch auch zur Vermischung bzw. Überlagerung und Verlust von

regenerativen Effekten einzelner Zelltypen, z.B. der RGZ, in dem Gesamthomogenat der Retina. Eine Vorfraktionierung im Sinne einer Zellseparation gestaltet sich aufgrund der unterschiedlichen zelltypischen Charakteristika und engen Vernetzung der retinalen Zellen als sehr schwierig und würde die Varianz des Probenmaterials drastisch erhöhen. Seit kurzem besteht jedoch der Zugang zu einem Mikrodissektionsgerät (Palm) mit dessen Hilfe die gezielte Gewinnung einzelner Zellpopulationen der Retina nach Regeneration möglich ist. Wenngleich sich dieses Verfahren als sehr arbeits- und zeitintensiv erweist, ist die Analyse des so gewonnenen Materials oder einer neu etablierten Zelllinie retinaler Ganglienzellen ein viel versprechender Ansatz für weitere, nachfolgende Analysen.

Axotomierte RGZ der Ratte oder Maus zeigen eine sehr begrenzte, spontane Regenerationsfähigkeit, die durch eine 5 Tage vor Explantation erfolgende, konditionierende Quetschung des Sehnerven deutlich gesteigert werden kann (Bähr et al., 1988, Ford-Holevinski et al., 1986). Kürzlich, wie auch hier bestätigt, zeigte sich, daß eine parallele Verletzung der Linse zu einer weiteren, drastischen Erhöhung der Regeneration der RGZ in einem bis dahin noch nicht beobachteten Ausmaß führt (Fischer et al., 2000, Leon et al., 2000). Dadurch war es nun erstmals möglich stark regeneriertes Material für eine rationale Proteomanalyse zu gewinnen.

Diese kombinierte, konditionierende Vorbehandlung bringt jedoch zahlreiche Eigeneffekte und damit Nachteile für eine erfolgreiche Analyse regenerationsassoziiierter Proteomveränderungen mit sich. Zunächst erfordert der operative Eingriff die Narkotisierung der Tiere, die hier durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin und Xylazin (s. Material und Methoden) erfolgte. Letzteres agiert als Agonist für α_2 -adrenerge Rezeptoren und kann bei Einsatz als Anästhetikum zur Aktivierung des *ras*-MAPK-Signaltransduktionsweges und Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT-3 führen (Peterson et al., 2000). Ebenso rufen die Traumatisierung und Verletzung der Retina zahlreiche subzelluläre und biochemische Veränderungen, wie z.B. die Hochregulation von bFGF, CNTF, GFAP und *cfos* hervor (Wen et al., 1995, Yoshida et al., 1995). Die nachfolgende Inflammation führt zur Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen des vasoretinalen Systems (Fischer et al., 2001, Leon et al., 2000, Yin et al., 2003). Parallel kann eine Aktivierung der axonalen und retinalen Glia mit entsprechender Hypertrophie, Gliose und veränderter Proteinexpression sowie die

Entwicklung eines Katarakts infolge der Linsenverletzung beobachtet werden.

Die konditionierende Quetschung des Sehnerven versetzt die RGZ in einen reaktiven, apoptotischen Zustand, der zur verzögerten Degeneration und Verlust der RGZ führt (Villegas-Perez et al., 1993). Gleichzeitig ist es jedoch einigen RGZ möglich Axone in den optischen Nerv zu regenerieren und die Läsionsstelle zu überwinden (Leon et al., 2000, Richardson et al., 1982). Regenerierte und degenerierte Axone des proximalen Sehnervs werden dann im Zuge der Entnahme der Retina erneut axotomiert. Durch Präparation und Explantation erfährt die Retina zusätzlich mechanischen Streß, bevor sie dann 48 h unter hohen O₂-Konzentrationen kultiviert wird und partiell regeneriert. Bei der anschließenden proteomischen Untersuchung beobachtete Effekte sind daher multikausal und können nicht ausschließlicly auf die Regeneration zurückgeführt werden. Diesem Aspekt wurde durch die Generierung zahlreicher Kontrollgruppen bei der Western Blot-Analyse Rechnung getragen. Tatsächlich konnte so der veränderte Gehalt einiger Proteine, wie z.B. des Rhodopsins und γ -Kristallins auf Effekte der Präparation und Explantation, nicht jedoch auf die Regeneration zurückgeführt werden.

Eine echte Kontrollgruppe für den Fall der Regeneration versus Nicht-Regeneration zu finden, gestaltete sich unter den gegebenen Modellbedingungen als schwierig. Die durch Quetschung und Linsenverletzung vorbehandelten, nach 5 Tagen direkt entnommenen Retinae zeigen Effekte der *in vivo*-Regeneration. Ebenso vorbehandelte, anschließend explantierte Retinae, hier als "regeneriert" bezeichnet, weisen zusätzlich mögliche Veränderungen aufgrund der *in vitro*-Regeneration bzw. "Inkubation" auf. Die "nicht-regenerierte" Kontrollgruppe dagegen offenbart Mischeffekte, da sie während der "Prä-Explantationszeit" nach kombinierter Vorbehandlung *in vivo* regeneriert, anschließend nach inverser Explantation *in vitro* jedoch aufgrund des fehlenden Kontaktes zu Laminin nicht weiter bzw. erneut regeneriert, vermutlich gar partiell degeneriert. Alle Gruppen erfahren demnach durch die Vorbehandlung und 5-tägige *in vivo*-Regeneration eine Aktivierung des Regenerationsprogramms und Hochregulation der regenerationsassoziierten Proteinexpression. Da überlebende Ganglienzellen auch noch 6 Wochen nach Axotomie bei entsprechender experimenteller Möglichkeit (Explantation, Transplantation) unverzüglich axonales Wachstum zeigen (Thanos et al., 1989) scheint diese für längere Zeit, so auch hier während der nachfolgenden *in vitro*-Inkubation partiell bestehen zu bleiben. Im Einklang damit zeigten alle 3 Gruppen eine vergleichbare

Expression des wachstumsassoziierten GAP-43 im Western Blot.

RGZ, die in ein Ischiasnervtransplantat regenerieren, zeigen nach einer 2. Axotomie ihrer regenerierten Axone keine verstärkte Degeneration (Schütz et al., 2003). Auch die hier im Zuge der Entnahme und Explantation der vorbehandelten Retina erfolgende 2. Axotomie führte nicht zur erhöhten Degeneration bzw. Nicht-Regeneration der RGZ, sofern sie eine regenerationspermissive Umgebung vorfinden und erneut Axone ausbilden können. So zeigte sich eine vergleichbare GFAP-Expression der u.a. durch degenerative Prozesse aktivierten Müllerzellen bei direkt entnommenen und den explantierten, "regenerierten" Proben im Western Blot. Fehlt den RGZ jedoch die Möglichkeit zur erneuten Regeneration aufgrund der inversen Explantation kommt es vermutlich teilweise zur Degeneration der RGZ und daher hier beobachteten stärkeren GFAP-Expression. Unterschiede in der Proteinexpression der "regenerierten" und "nicht-regenerierten" Gruppen sind somit zum einen auf Veränderungen infolge der *in vitro*-Regeneration, zum anderen auf mögliche degenerative bzw. apoptotische Vorgänge zurückzuführen. Das Regenerationsmodell der vorbehandelten Rattenretina ist daher sowohl zur Beobachtung von regenerativen als auch v.a. apoptotischen bzw. degenerativen Proteomveränderungen geeignet. So konnten bei der visuellen Auswertung der Gele mehr hochregulierte Proteine nach "Nicht-Regeneration" (18 Spots) als nach Regeneration (10 Spots) beobachtet werden. Während die Menge der in der differentiellen 2D-Analyse unter Regeneration stärker exprimierten Proteine zu schwach für ihre Identifizierung war, gelang es 2, unter nicht-regenerativen Bedingungen hochregulierte Proteine, HMG-1 und Synaptotagmin I, zu identifizieren. Da das Überleben der RGZ nach Trauma oder Verletzung durch Blockade der Apoptose die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration ist, hat dieses Tiermodell durchaus seine Bedeutung für die Regenerationsforschung. Die beschriebenen Mischeffekte und die fehlende Kontrolle der Vorgänge während der 5-tägigen *in vivo*-Präexplantationszeit erhöhen die natürliche, biologischen Proben anhaftende Varianz und erfordern eine verstärkte Reproduktion der erzielten Daten. Regulierte Proteine müssen daher identifiziert und ihre Bedeutung für das Überleben und die Regeneration der Neurone durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Das Genom der Ratte ist zu einem großen Teil sequenziert. Dies ermöglicht zum einen die Verifizierung der Ergebnisse auf DNA-Ebene über Microarrays, zum anderen die Identifizierung regulierter Proteine nach MALDI-MS durch direkten Sequenz- bzw.

Spektrenvergleich mit den zahlreichen Datenbankeinträge (SwissProt: Ratte – 10476 Einträge).

Die beschriebene Problematik der Mischeffekte initiierte die Suche nach einem alternativen, weniger komplexen Regenerationsmodell, welches schließlich bei der Retina des Neue Welt-Affen *Callithrix jacchus* gefunden wurde. Dieses Tiermodell wies im Vergleich zu dem bis dahin verwendeten Rattenmodell entscheidende Vorteile auf. So zeigte sich, wie bereits beschrieben, eine starke, spontane Regeneration der Retina nach Explantation, die im Gegensatz zur Ratte keine Vorbehandlung zur Stimulation der Regenerationsfähigkeit benötigte. Beobachtete Proteinexpressionsdifferenzen können daher vorrangig der Regeneration, sowie partiell der Explantation und Kultivierung zugeordnet werden. Die Regeneration *in vitro* unter definierten Bedingungen und Ausschluß des Immunsystems ermöglicht die Gewinnung von relativ homogenem, regenerativem Material und erhöht die Wahrscheinlichkeit des Auffindens signifikanter, regenerationsassoziiertes Expressionsveränderungen mit der Proteomanalyse. So konnten hier in der differentiellen 2D-Analyse 3 unter regenerativen Bedingungen stärker exprimierte Proteine, Calmodulin, α -Kristallin und FABP identifiziert werden.

Durch die Verwendung von Kadaveraugen waren zudem keine zusätzlichen Tierversuche notwendig und die weitere Verwendung der Kadaver der Affen ethisch begrüßenswert. Ferner bot sich mit den Marmosettaffen eine Spezies mit höherer phylogenetischer Relation zum Menschen und daraus resultierender höherer klinischer Relevanz der erhobenen Daten. Auf der anderen Seite unterscheiden sich die Krallenaffen jedoch deutlich von gewöhnlich zum Einsatz kommenden Labortieren wie Ratte und Maus. Ihre alternativen Proteinsequenzen bzw. -strukturen erschweren bzw. verhindern teilweise die Detektion durch kommerzielle Antikörper und Identifizierung nach MALDI-MS.

Das Genom von *C. jacchus* ist bislang nur partiell sequenziert worden, so daß für diese Spezies vergleichsweise wenig Datenbankeinträge vorliegen. Werden bei SwissProt nur 282 Sequenzen für *Callithrix* gelistet, liegen für *Homo sapiens* 46903 bzw. für die Ratte 10476 Einträge vor. Beim Abgleich der Sequenzen bzw. Spektren nach MALDI-MS muß daher auf entsprechende Einträge von Mensch und Säugetieren zurückgegriffen werden, deren Homologie sich jedoch in den meisten Fällen als hinreichend groß für die Identifizierung erwies. Erschwert wurde die Bestimmung durch zahlreiche Modifikationen der Proteine, v.a. durch Met-Oxidationen und O-Methylierungen der

Glutaminsäurereste, die teilweise infolge der Probenvorbereitung und Elektrophorese auftreten (Haebel et al., 1998). Nichtsdestotrotz überwiegen die Vorteile dieses Tiermodells und machen es neben einer Zelllinie zum Regenerationsmodell der Wahl.

4.6.3. 2D-Kartierung der Retina

Um verschiedene physiologische Zustände miteinander vergleichen zu können, ist derzeit die Kartierung des Proteoms verschiedener Zellen und Gewebe ein Schwerpunkt wissenschaftlicher Forschung. Im Bereich des optischen Systems wurde parallel zu dieser Arbeit die Kartierung der Photorezeptorzellproteine (Matsumoto and Komori, 2000), sowie kürzlich der retinalen Müllerzellen (Hauck et al., 2003) und Mausretina (Cavusoglu et al., 2003) vorgenommen. In dieser Arbeit wurde erstmals die regenerierte Retina von Ratte und Affe proteomisch untersucht und kartiert.

Die in 2D-Gelen aufgetrennten Proteine wurden durch Peptidkartierung mit MALDI-MS und –sequenzierung mit nanoHPLC-MS/MS in der Proteomikgruppe der Technologieplattform "Integrierte Funktionelle Genomik" des IZKF Münster identifiziert. Während die MALDI-MS-Analyse des Peptidpools aufgrund statistischer Fehlzuordnungen (Homologien, Modifikationen, Kontaminanten) empfänglich für falsch-positive Ergebnisse ist, kann durch MS-Sequenzierung das Protein anhand einzelner fragmentierter Sequenzabschnitte eindeutig zugeordnet werden. Obwohl wünschenswert, ist eine Sequenzierung jedoch nicht immer möglich, da die Methode um etwa eine Größenordnung unempfindlicher ist als die Peptidkartierung.

Die Lokalisation der identifizierten Proteine umfasst ein breites Spektrum, d.h. Nukleus, Zytoplasma, Mitochondrium und Membran und belegt somit die umfassende Lyse und Erfassung des Retinaproteoms.

Hier identifizierte Proteine der Rattenretina konnten größtenteils den Funktionen Metabolismus (35 %) und Expression (26 %) zugeordnet werden. Dies ist nicht überraschend, weist die Retina, insbesondere die Photorezeptorzellen durch die konstante Erneuerung der Membranscheiben (La Cour, 2003) doch eine der höchsten metabolischen Umsatzraten des Körpers auf. So konnten neben zahlreichen Untereinheiten der ATP-Synthase diverse, an glykolytischen Prozessen beteiligte Proteine (α - u. γ -Enolase,

GAPDH, Malat- und Pyruvatdehydrogenase) identifiziert werden. *Heat shock proteins* (Hsps) und Stressproteine wie die hier gefundenen Hsp 60, Hsp 70 und Kristallin, sind als molekulare Chaperone in die Proteinsynthese, -faltung, Transport- und Translokationsprozesse involviert. Sie spielen daher eine Rolle für die normale ZNS-Entwicklung und Funktion, werden jedoch durch eine Vielzahl von Stressfaktoren, wie oxidativem Streß, Ischämie oder Hyperthermie, sowie nach traumatischer Verletzung des ZNS und während neurodegenerativer Erkrankungen (Birnbauer, 1995, Brown, 1994) verstärkt exprimiert. Aufgrund der traumatischen Vorbehandlung der Retina, ihrer partiellen Neurodegeneration *in vitro* sowie der hohen O₂-Konzentrationen in Kultur war ihre starke Präsenz zu erwarten. Die ständige Proteinsynthese im retinalen Gewebe führt zu einer starken Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, die neurotoxisch sind (Winkler et al., 1999). Die hier identifizierten Schutzproteine Peroxiredoxin und Thioredoxin sind in die Reduktion dieser reaktiven Produkte involviert, wobei letzteres eine protektive Funktion bei der Degeneration von Photorezeptorzellen *in vitro* zeigte (Tanito et al., 2002). Nichtsdestotrotz konnten wie erhofft Proteine der Signaltransduktion (6 %, HMG-1, PEBP) und neuronaler Funktionen (16 %), wie Ca²⁺-Bindung (Calbindin 2), Synaptische Transmission (Synaptotagmin, β -Synuclein) und visueller Perzeption (Recoverin, Transducin) detektiert werden. Diese wurden im Fall des HMG-1 und Synaptotagmin differentiell reguliert.

Die 2D-Proteomkarte der Affenretina zeigte ein im Vergleich zur Ratte ähnliches, jedoch nicht direkt vergleichbares oder gar identisches Muster. Ursache dafür sind interspeziesspezifische Variationen der Genexpression, die insbesondere im ZNS zu beobachten und auf evolutionäre Veränderungen zurückzuführen sind (Enard et al., 2002). Während die Retina der Ratte auf eine Hell-Dunkel-Perzeption ausgerichtet ist, weisen höhere Organismen wie Primaten zusätzlich ein Farbdifferenzierungsvermögen und dadurch bedingt eine signifikant differentielle Proteinexpression auf.

Nichtsdestotrotz wurden jedoch auch in diesem Modell bereits bei der Ratte identifizierte Moleküle nachgewiesen, die konservierte Funktionen wie Metabolismus (Enolase 1 u. 2, ATP Synthase β), Expression (Hsp 70), Zellschutz (Thioredoxinperoxidase B) oder neuronale Aktivität (β -Synuclein, Recoverin, CRBP) ausüben. Selbst diese Proteine, insbesondere die Isoformen der Enolase 1, zeigten jedoch eine alternative Lokalisation, die auf interspeziesspezifische Variationen der Aminosäuresequenz und Modifizierungen

zurückzuführen ist. Neben der starken Präsenz metabolischer (22 %) und expressionsassoziierter Proteine (17 %) konnten in diesem Modell vorwiegend Faktoren mit Signaltransduktions (39 %)- und neuronaler Funktion (13 %) identifiziert werden. So konnten DDAH1 und Guanylatkinase, die an der Regulation NO- bzw. GMP-vermittelter Signalwege beteiligt sind, und die in Phototransduktionsprozesse involvierte Proteine Recoverin und CRABP1 bzw. CRBP1 detektiert werden. Letzteres zeigte ebenso wie α -Kristallin und die in Signaltransduktions- und Transportprozesse involvierten FABPs eine differentielle Regulation in Abhängigkeit vom Alter oder Regenerationszustand.

Die hier generierten Proteomkarten der Ratten- und Affenretina dienen als Grundlage für die nachfolgenden differentiellen Expressionsstudien, sowohl unter dem hier betrachteten Aspekt der Regeneration als auch weiterer, klinischer Fragestellungen, wie z.B. Glaukom oder Retinitis pigmentosa.

4.6.4. Bedeutung regulierter Spots für das Regenerationsgeschehen

4.6.4.1. Differentiell exprimierte Proteine der Rattenretina

Auf der Grundlage der Proteomkarte der Retina wurde nachfolgend die Analyse differentiell exprimierter Spots vorgenommen. Im Regenerationsmodell der Rattenretina konnten 2 nach Nicht-Regeneration bzw. Degeneration verstärkt exprimierte Proteine, Synaptotagmin I und HMG-1, identifiziert werden.

Synaptotamin I

Synaptotagmine sind vesikuläre Membranproteine, von denen bislang 11 verschiedene Isoformen in Ratte und Maus beschrieben wurden. Das neuronenspezifische Synaptotagmin I (Syt I) konnte v.a. in Wachstumskegeln, einschließlich ihrer Lamellipodien und Filopodien, distalen Enden der Neurite und in den Somata neuronaler Zellen, wie z.B. DRG Neuronen des Hühnchens, nachgewiesen werden (Mikoshiya et al., 1999). Nach seiner Aktivierung durch die Bindung von Ca^{2+} reguliert es die Neurotransmitterfreisetzung in Neuronen (Südhof and Rizo, 1996) und ist dabei direkt in den vesikulären Fusionsschritt involviert (Fukuda and Mikoshiya, 1997). Seine entwicklungsabhängige Expression (Hering and Kroger, 1996) und Lokalisation (Greenlee et al., 1996) deutet auf eine Beteiligung an der Morphogenese und

Synaptogenese der Vertebratenretina hin. Darüberhinaus wird diesem Protein eine Rolle in neuronalen Wachstumsprozessen zugeordnet. Wachstumskegel gelten als Vorläufer präsynaptischer Endigungen. Das Auswachsen von Neuriten ist durch die Expansion ihrer Zelloberfläche durch Fusion sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran gekennzeichnet (Futerman and Banker, 1996). Da neuronales Auswachsen optimale Ca^{2+} -Konzentrationen erfordert (Kater and Mills, 1991) und Synaptotagmin I in Wachstumskegeln angereichert ist (Ide, 1996, Igarashi et al., 1996), liegt eine Beteiligung an neuronalen Wachstumsprozessen nahe. So führte die Blockade seiner Ca^{2+} -bindenden Domäne zu einer Inhibierung neuronalen Auswachsens, nicht jedoch der Neuritogenese kultivierter DRG Neurone des Hühnchens (Mikoshiha et al., 1999). Die *Differential Display*-Analyse hippocampaler und kortikaler Neurone zeigte eine verstärkte Expression eines der Synaptotagmin-Familie zugeordneten Genfragmentes nach Degeneration (Babity et al., 1997). Ferner konnte in Ganglienzellen des *S. cervicale* nach dezentrischer Axotomie zunächst eine Abnahme infolge degenerativer Prozesse, dann jedoch eine Zunahme von Proteinen der synaptischen Vesikel, u.a. Synaptotagmin in den Nervenfaserbündeln beobachtet werden (Hou and Dahlstrom, 2000).

Im Einklang damit konnte hier bei der 2D-Analyse der Rattenretina eine Hochregulation des Synaptotagmin I im Fall der "nicht-regenerierten" Rattenretina beobachtet werden. Obgleich die genaue Bedeutung dieses Phänomens bislang nicht verstanden ist, unterstützt die Beobachtung die postulierte Beteiligung dieses Proteins an neuronalen Wachstumsprozessen. Wie beschrieben erfolgt durch die Vorbehandlung der Rattenretina eine Aktivierung des Regenerationsprogramms der RGZ und eine dadurch vermittelte Hochregulation regenerationsassoziiierter Proteine, wie GAP-43 und möglicherweise auch Synaptotagmin I. Kommt es infolge der Präparation und inversen Explantation dann zur Durchtrennung der *in vivo* regenerierten Axone und fehlenden Möglichkeit Wachstumskegel auszubilden, ist kein "Verbrauch" und daher eine starke Präsenz dieser Proteine in den Zellsomata möglich. Um diese Spekulation zu verifizieren und die Bedeutung des Synaptotagmin I für die De- bzw. Regeneration zu erfassen, sind weitere Untersuchungen, z.B. im Affenmodell, notwendig. Untersuchungen seiner Lokalisation und Expression während unterschiedlicher Zustände wie Regeneration oder Nicht-Regeneration bzw. Degeneration, sowie nach Blockade oder Überexpression könnte zum besseren Verständnis seiner Funktion bei diesen Prozessen führen.

HMG-1

High-mobility-group (HMG) Proteine sind chromosomale, "Nicht-Histon" Proteine, die in allen Zellkernen von Säugetieren entdeckt wurden. Das hier differentiell exprimierte HMG-1 ist hochkonserviert (99 % Identität unter allen Säugern) und führt nach schwach affiner Bindung an die DNA zu deren Distorsion. Seine biologische Relevanz wurde *in vivo* an *knock-out*-Mäusen gezeigt, die postnatal nur 24 h überlebten (Calogero et al., 1999). Lokalisationsstudien in verschiedenen Geweben zeigten eine höhere Expression von HMG-1 im Zytosol und in Kernen von Lymphgewebe und Testes im Vergleich zu Leber und Gehirn (Mosevitsky et al., 1989). Diese korrelierte invers mit dem Differenzierungsgrad und Alter der Zellen (Seyedin et al., 1981). Konnte HMG-1, im ZNS auch Amphoterin, P30 oder SPP-1 genannt, in prä- und perinatalem Gehirn nachgewiesen werden (Merenmies et al., 1991), ist seine Expression im adulten Stadium stark vermindert und auf Regionen mit kontinuierlicher Neuritogenese beschränkt (Guazzi et al., 2003). Eine Reexpression der mRNA konnte nach kortikaler Verletzung bei Mäusen beobachtet werden (Kobori et al., 2002).

Ogleich HMG-1 lose an Chromatin gebunden ist, wird es von nekrotischen, nicht jedoch apoptotischen Zellen freigesetzt und führt dann einerseits zur Aktivierung und Rekrutierung inflammatorischer Zellen, andererseits zur Geweberegeneration durch die verstärkte Migration bzw. Proliferation von Muskelzellen und gefäßassoziierten Stammzellen (Mesoangioblasten). Neben dieser passiven Freisetzung als Signal für traumatischen Zelltod kann HMG-1 von aktivierten Makrophagen und Monozyten nach einer Vielzahl von Stimuli, wie z.B. LPS, TNF α oder IL-1 β auch aktiv als Zytokin sekretiert werden. (Müller et al., 2004, für Übersicht). Additiv zu dieser Rolle als Modulator der Inflammationsreaktion zeigt HMG-1 auch antiapoptotische und neuritogene Effekte. Es inhibiert den durch das proapoptotische, zur Bcl-2 Familie zählende Bak induzierten Zelltod von Hefen und schützt Mammalia-Zellen vor UV-, CD95-, TRAIL-, Caspase-8 –und Bax-induzierter Apoptose (Brezniceanu et al., 2003). Durch Bindung an den transmembranären, durch viele Liganden aktivierbaren "*receptor for advanced glycation end products*" (RAGE) vermittelt er im Zusammenspiel mit S100B neuroprotektive und neuritogene Effekte. Dabei konnte eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF kappa B und die Hochregulation des antiapoptotischen Bcl-2 beobachtet werden (Huttunen et al., 2000). *Anti-sense*-Experimente zeigten, daß nur HMG-1, nicht jedoch RAGE für das Auswachsen und die Differenzierung von

neuronalen Fortsätzen notwendig ist (Sajithlal et al., 2002). HMG-1 scheint daher neben RAGE mit weiteren Molekülen zur Vermittlung der beschriebenen Effekte zu interagieren. Denkbar ist dabei die für HMG-1 beschriebene Aktivierung von Makrophagen, die bereits im Zuge der Linsenverletzung zur Vermittlung der regenerationsfördernden Effekte diskutiert wurden. Die hier beobachtete Hochregulation des Proteins in den "nicht-regenerierten" Retinae ist vermutlich auf ein stärkeres Ausmaß nekrotischer Prozesse im Vergleich zur regenerierten Retina zurückzuführen. Aktiv von stimulierten Makrophagen und Monozyten sezerniertes HMG-1 erfährt eine Acetylierung, welche die Translokation vom Nukleus in sekretorische Lysosome ermöglicht. Es zeigt somit molekulare Differenzen und könnte bei einer weiteren Analyse von dem durch nekrotische Zellen freigesetztem HMG-1 unterschieden werden (Erlandsson Harris and Andersson, 2004). Nichtsdestotrotz ist HMG-1 ein potentieller Kandidat zur Vermittlung der regenerationsfördernden Effekte der Vorbehandlung der Rattenretina. Neben seiner Bedeutung als Zielstruktur für die Krebstherapie (Lotze and DeMarco, 2003) stellt HMG-1 bzw. dadurch aktivierte Signalwege interessante Ansatzpunkte für die Erforschung des Überlebens und der Regeneration von Neuronen dar.

4.6.4.2. Differentiell exprimierte Proteine der Affenretina

Die in dieser Arbeit beobachtete unterschiedliche Regenerationsfähigkeit juveniler und adulter Affen ist möglicherweise wie bereits diskutiert auf eine unterschiedliche Proteinausstattung der Retinae zurückzuführen. Die comparative Analyse der 2D-Gele von Affenretinae unterschiedlichen Alters offenbarte zahlreiche differentiell exprimierte Proteine. Interessanterweise konnten in der juvenilen Retina 3, auch im Fall der Regeneration verstärkt exprimierte Proteine, α -Kristallin und FABPs, identifiziert werden. In der adulten Retina konnte ein hochreguliertes Protein als CRABP-1 bestimmt werden.

CRABP-1

Cellular retinoic acid binding protein (CRABP) spielt eine Rolle für den Metabolismus und Transport der u.a. an neuronalen Differenzierungs- und Regenerationsvorgängen beteiligten Retinsäure (Mey, 2001). Wurde daher zunächst neben seiner Involvierung in Phototransduktionsprozesse eine Beteiligung am Aufbau der dorso-ventralen Asymmetrie

des Auges angenommen (McCaffrey et al., 1993), konnten neuere Untersuchungen eine späte, in der Endphase der Polarisierungsvorgänge beginnende Expression des CRABP-1 beobachten (Mey et al., 2001). Ebenso wie die spatiotemporale Expression in neuronalem und mesenchymalem Gewebe zu Beginn der Organogenese (Means and Gudas, 1997) deutet dies auf eine Rolle des CRABP-1 bei zellulären Differenzierungsprozessen hin. Seine Expression in spezifischen Neuronenpopulationen des Gehirns adulter, transgener Mäuse wurde auf eine möglicherweise hohe Metabolisierung von Retinsäure im reifen Gehirn, insbesondere Neuronen zurückgeführt (Zhou and Wei, 2001). Im Gegensatz zur Lokalisation in amakrinen und bipolaren Zellen von Nagetieren, Huhn, Katze oder Kuh konnte CRABP-1 in der Human- und Primatenretina im Zytoplasma der Müllerzellen nachgewiesen werden (Milam et al., 1990).

Ob die hier beobachtete verstärkte Expression von CRABP-1 in der adulten Retina auf eine stärkere Metabolisierung der Retinsäure oder aber auf die altersbedingte Aktivierung und Veränderung der Müllerzellen zurückgeführt werden kann, bedarf es weiterer Untersuchungen. Eine Relevanz von CRABP-1 für die Regenerationsfähigkeit der Retina ist jedoch möglich, zählen CRABPs doch zur Familie der hier bei Regeneration als hochreguliert beobachteten FABPs.

FABP

Epithelial fatty acid-binding protein (E-FABP, FABP 5) gehört zur Familie ca. 15 kDa großer, zytoplasmatischer FABPs (Bernlohr et al., 1997, für Übersicht). Mitglieder dieser Familie können in verschiedenen Zelltypen, so auch neuronalen und glialen Zellen des ZNS nachgewiesen werden (Liu et al., 1997, Owada et al., 1996). Obgleich ihre Fähigkeit zur Bindung von Fettsäuren schon lange bekannt ist, konnte ihre genaue Funktion bislang nicht bestimmt werden. Neben der Bindung und dem Transport von Fettsäuren zu intrazellulären Zielstrukturen oder Förderung ihrer Aufnahme bzw. Abgabe durch die Plasmamembran ist auch eine Bedeutung als Cofaktor bei Fettsäuren- oder Acyl-CoA-umsetzenden Reaktionen möglich. Ferner können sie durch den Transport von Lipiden zum Zellkern die Genexpression modulieren und dadurch Mitose und Zellwachstum beeinflussen (Coe and Bernlohr, 1998, für Übersicht).

E-FABP mRNA und Protein wird in neuronalen Zellen während der Entwicklung, Differenzierung und Migration verstärkt exprimiert (Liu et al., 2000, Liu et al., 1997). Ebenso konnte eine Hochregulation nach PNS-Regeneration bei Ratten (De Leon et al.,

1996) und NGF-induzierter Neuritenbildung bei PC12-Zellen beobachtet werden (Allen et al., 2000). Bei letzterem Modell führte die Blockade von E-FABP durch *Anti-sense*-Oligonukleotide zu einer Abnahme und Verkürzung der Neurite. Bei RGZ konnte eine Induktion des E-FABP in Abhängigkeit ihrer Differenzierung sowie entwicklungs- und regenerationsassoziiertes Axonbildung beobachtet werden (Allen et al., 2001). Die in dieser Arbeit demonstrierte verstärkte Expression des E-FABP bestätigt diese Befunde und offenbart ihre Relevanz auch für höher entwickelte Organismen wie Primaten.

Eine erfolgreiche Neuritenbildung sich entwickelnder oder regenerierender Neurone erfordert die Synthese und Mobilisierung wachstumsassoziiertes Proteine und metabolischer Substrate, wie z.B. Membranlipide. Die parallele starke Vergrößerung der Plasmamembran erfordert die koordinierte Synthese und Bereitstellung von Phospholipiden durch das glatte ER der Zellsomata oder Wachstumskegel (Deitch and Banker, 1993, Futerman and Banker, 1996). Dieses besitzt eine Vielzahl von Enzymen, die Acetate und langkettige freie Fettsäuren (FFS) in Phospholipide umwandeln. Neben den durch Abbau oder Phospholipidmetabolismus freigesetzten FFS gibt es Hinweise, daß weitere FFS von extrazellulären Quellen benötigt werden (Robinson et al., 1992). Der Influx der hydrophoben Fettsäuren durch die Plasmamembran und das hydrophile Zytoplasma ist jedoch energetisch ungünstig. FABPs wie FABP 5 können die Aufnahme freier Fettsäuren durch die Plasmamembran begünstigen (Atshaves et al., 1998) und nach Bindung zu ihren zellulären Zielstrukturen transportieren (Glatz et al., 1997). Ferner konnte gezeigt werden, daß FABPs auch die mikrosomale Phosphorsäuresynthese stimulieren (Jolly et al., 1997).

Neben ihrer Beteiligung an der Bereitstellung von Fettsäuren als Substrat für die Membransynthese könnten FABPs auch eine Rolle in Signaltransduktionswegen langkettiger FFS wie Arachidon- oder Docosahexaensäure spielen (Coe and Bernlohr, 1998). Die spatiotemporalen Expressionsmuster der FABPs deuten eher auf eine Funktion zur Schaffung der metabolischen Rahmenbedingungen der Regeneration, denn für den Prozess selbst hin (Allen et al., 2001). Die weitere Untersuchung ihrer genauen Wirkmechanismen könnten jedoch zu einem tieferen Verständnis regenerationsassoziiertes Vorgänge führen.

α_A -Kristallin

Während der Western Blot und die Immunhistochemie eine im Zuge der Regeneration verstärkte Expression von α_B -Kristallin offenbarten, konnte ein weiterer, bei der 2D-Analyse differentiell regulierter Spot als α_A -Kristallin identifiziert werden.

Dabei handelt es sich um ein ca. 20 kDa großes Polypeptid, das mit dem homologen α_B -Kristallin multimere Komplexe von bis zu 800 kDa formiert (s. Einleitung). Seine bereits beschriebene Chaperon-Aktivität wird durch verschiedene hydrophobe und ionische Domänen, sowie auch der N- und C-Termini vermittelt (Derham and Harding, 1999, Takemoto et al., 1993). *In vitro*-Studien chemisch modifizierter α_A -Kristalline zeigten, daß die Veränderung der intrinsischen Ladung, Hydrophobizität oder Verkürzung der N- o. C-Termini zu einer Inhibierung der Chaperon-Funktion führen (Bera et al., 2002, Derham and Harding, 2002, Smulders et al., 1995). Solche Veränderungen erfolgen *in vivo* aufgrund von posttranslationalen Modifikationen (PTM), die für die Kristalline der Linse (Derham and Harding, 1999) und der Retina (Kapphahn et al., 2003) beschrieben wurden. Diese Deamidierung, Acetylierung, Met-Oxidation, Phosphorylierung oder die Verkürzung der Termini umfassenden Modifizierungen nehmen mit dem Alter zu (Kamei et al., 1997, Ueda et al., 2002), wobei ihre Konsequenz für das Überleben der RGZ noch nicht geklärt ist. Solche Veränderungen bedingen die auch hier beobachtete Auftrennung von α_A -Kristallin in verschiedene Spots. Wie bereits für die Rattenretina beschrieben (Kapphahn et al., 2003), konnte auch in der 2D-Analyse der Affenretina eine altersabhängige Abnahme des α_A -Kristallins beobachtet werden. Diese führt vermutlich zusammen mit der verminderten Chaperonaktivität zu einer Zunahme stress-induzierter Proteinaggregationen und könnte mechanistisch mit der Abnahme des Sehvermögens in späteren Lebensabschnitten verbunden sein (Kapphahn et al., 2003).

Von besonderem Interesse war ein weiterer α_A -Kristallinspot mit geringerem Molekulargewicht, der im Fall der Regeneration hochreguliert wurde. Dieser stellt eine N-acetylierte Variante des α_A -Kristallins dar, die sich von dem Hauptspot signifikant durch 2 Aminosäuren sowie einen relevanten Hauptpeak im MALDI-Spektrum unterscheidet. Es könnte sich dabei um eine ähnliche Form wie das bei Nagetieren beobachtete, durch alternatives mRNA-Splicing hervorgerufene α_{Ains} -Kristallin handeln (King and Piatigorsky, 1984).

Während α_B -Kristallin bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen verstärkt exprimiert wird (Messing et al., 1998, van Noort et al., 2000), ist für α_A -Kristallin eine Abnahme bei der Degeneration von Photorezeptorzellen beschrieben (Maeda et al., 1999). Eine Bedeutung der α -Kristalline für die Regeneration wurde bereits beim Rattenmodell beobachtet und dort diskutiert. Da das hier identifizierte α_A -Kristallin posttranslationale Modifikationen und daher eine verminderte Chaperonfunktion aufweist, scheinen die diskutierten, alternativen Funktionen eine höhere Relevanz für seine neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekte zu haben. Die weitere Untersuchung der Kristalline und ihrer Interaktionspartner bzw. Funktion stellt damit ein wichtiges Ziel innerhalb der Regenerationsforschung dar und ist Gegenstand aktueller Arbeiten.

Calmodulin

Calmodulin (CaM) ist ein hochkonserviertes und weit verbreitetes Ca^{2+} -bindendes Protein, das in einer Vielzahl von Zellen, so auch Neuronen exprimiert wird. In der Retina adulter Ratten konnte nach *in situ*-Hybridisierung das stärkste Signal für Calmodulin mRNA in der Ganglienzellschicht und INL nachgewiesen werden (Kovacs and Gulya, 2003). Es besitzt 2 globuläre Domänen, die jeweils 2 Ca^{2+} -bindende "EF-hand"-Motive besitzen und über eine zentrale Helix verbunden sind. Diese weist hydrophobe Bindungsstellen auf, über die Calmodulin direkt an eine Vielzahl von Zielstrukturen binden kann. Seine Bedeutung für die Funktion von Neuronen ist seit langem bekannt und wird sowohl durch die Regulation der Ca^{2+} -Konzentration als auch direkt vermittelt (Haeseleer et al., 2002).

Steigerungen der Ca^{2+} -Konzentrationen, wie etwa durch Influx nach Depolarisation der Neurone, führen zur Freisetzung von Neurotransmittern. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung von *ras* und der Ca^{2+} -abhängigen, Typ-1 Adenylatcyclase, die über MAP-Kinasen bzw. cAMP eine höhere Responsivität von Neuronen gegenüber Wachstumsfaktoren hervorruft (Goldberg and Barres, 2000). Erhöhte Level cyclischer Nukleotide wie cAMP oder cGMP erwiesen sich als essentiell für die Regeneration retinaler Ganglienzellen der Ratte (Li et al., 2003) und minderten die inhibierende Wirkung repulsiver Faktoren bei der Regeneration (Song et al., 1998).

Des Weiteren werden viele Aspekte der neuronalen Aktivität, wie etwa die schnelle Modulation von Kanalfunktionen innerhalb von Millisekunden (Levitan, 1999), ebenso wie auch Langzeitveränderungen der Genexpression durch Variation der zytosolischen

Ca²⁺-Konzentration kontrolliert (Berridge, 1998).

Neben der Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kann Calmodulin auch durch direkte Interaktion mit entsprechenden Zielstrukturen regenerationsfördernde Effekte ausüben. So ist bekannt, dass Calmodulin eng in die Regulation des wachstumsassoziierten GAP-43 involviert ist (Benowitz and Routtenberg, 1997) und an ein ähnliches, gehirnspezifisches Protein, CAP-23/NAP-22 bindet (Matsubara et al., 2004). Im Komplex mit der Calmodulin-abhängigen Protein Kinase Kinase (CaMKK) fördert es über die Aktivierung des PKB-Signalweges das Überleben von neuronalen Zellen (Matsubara et al., 2004). Gleichwohl reguliert Calmodulin jedoch auch die Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMK II), die in die Exozytose-vermittelte Apoptose von retinalen Ganglienzellen involviert ist (Laabich et al., 2000), und die als Zielstruktur für neurodegenerative Erkrankungen geltende DAPK (*death-associated protein kinase*) (Schumacher et al., 2004).

Die hier beobachtete Hochregulation des Calmodulins in der regenerierten Retina deutet auf eine neuroprotektive bzw. regenerationsfördernde Wirkung in diesem Modell hin. Weitere Untersuchungen zur Aufdeckung der involvierten Signalwege sind jedoch für ein Verständnis der genauen Wirkung notwendig.

4.6.5. Schlussbetrachtung

Die zweidimensionale Gelelektrophorese erwies sich zur Aufdeckung regenerationsassoziiierter Proteomveränderungen als geeignet. Mit ihrer Hilfe konnten mehrere interessante, regenerationsassoziierte Proteine identifiziert werden, deren genaue Bedeutung für die Regeneration durch weitere Untersuchungen geklärt werden muß. Weiterentwicklungen wie 2D-DIGE können das Problem der Reproduzierbarkeit vermindern und qualitative Auswertungen, d.h. die Erfassung von posttranslationalen Modifizierungen der Proteine, ermöglichen. Zusammen mit Vorfraktionierungen der Probe zur Anreicherung schwach exprimierter Proteine können nachfolgende Untersuchungen so zur Identifizierung weiterer Kandidatengene führen. In Kombination mit dem neu etablierten Regenerationsmodell der Affenretina bietet sich damit eine vielversprechende Option um zukünftig ein tieferes Verständnis der in das Regenerationsgeschehen involvierten molekularen Faktoren und Mechanismen zu erlangen.

5. Zusammenfassung

Die axonale Regeneration im ZNS ist ein äußerst komplexer Vorgang, der unter natürlichen Bedingungen nicht stattfindet, gleichwohl jedoch prinzipiell möglich ist. So unterliegen axotomierte RGZ der adulten Ratte einem progressiven Degenerationsprozeß, können jedoch nach entsprechender Vorbehandlung und experimentellen Bedingungen partiell regenerieren. Ziel der Regenerationsforschung ist es daher, durch gezielte Modulation bzw. Applikation von Wirkstoffen das Fortschreiten des Zelltodes aufzuhalten und die Neurone zur axonalen Regeneration zu stimulieren. Im Rahmen dieser Dissertation sollten regenerationsassoziierte Proteinexpressionsveränderungen untersucht werden, um ein tieferes Verständnis der molekularen Mechanismen zu erlangen und neue Ansatzpunkte zur gezielten Stimulation der Regeneration zu finden.

Dazu wurden zunächst Untersuchungen am etablierten Regenerationsmodell der Rattenretina vorgenommen, bei der eine parallel zur konditionierenden Quetschung des ON gesetzte Linsenverletzung zur verstärkten Regeneration führt. Durch morphologische, biochemische und immunhistochemische Analysen konnte gezeigt werden, dass die regenerationsstimulierende Wirkung der Linsenverletzung über andere Signalkaskaden vermittelt wird, als die nach Quetschung. Neben der von anderen Gruppen postulierten Aktivierung von Makrophagen, konnten hier der neurotrophe Faktor bFGF und die α -, β -, und γ -Kristalline als mögliche Vermittler dieser Effekte bestimmt werden.

Neben diesem vorbehandlungsabhängigen Modell der Rattenretina wurde ein spontan regenerierendes System in Form der Affenretina gefunden, etabliert und charakterisiert. Dieses zeigte eine im Vergleich zur Rattenretina höhere Substratspezifität und erlaubte die Untersuchung altersspezifischer Regenerationsvorgänge.

Biochemische und immunhistochemische Untersuchungen offenbarten speziesübergreifende Proteomveränderungen infolge axonaler Regenerationsprozesse. So konnten in beiden Modellen die verstärkte Expression eines GAP-43-ähnlichen Proteins in regenerierten Zuständen nachgewiesen werden. Die parallele verstärkte Expression von GFAP demonstrierte eine speziesübergreifende, entscheidende Rolle der Glia für das

Regenerationsgeschehen und stand nicht im Widerspruch zu einer erfolgreichen Regeneration. Darüberhinaus zeigten Kristalline in beiden Modellen eine Veränderung ihrer Expression und Lokalisation im Zuge der Regeneration, die ihre fundamentale Bedeutung für diese Prozesse nahelegen.

Zur erweiterten Beobachtung der differentiellen Proteinexpression wurde die Technik der 2D-PAGE etabliert und die hochaufgelöste Darstellung des Retinaproteoms optimiert. In Kombination mit MALDI-MS wurde eine Kartierung des Retinaproteoms der Ratte und des Affen vorgenommen. Es wurden 32 (Rattenretina) bzw. 23 Proteine (Affenretina) unterschiedlicher Funktion und Lokalisation identifiziert und Proteomkarten der Retinae beider Spezies als Basis für weitere, nachfolgende Untersuchungen unter variablen Aspekten generiert.

Die proteomische Analyse regenerierter und nicht-regenerierter Retinae offenbarte die differentielle Regulation verschiedener Proteine. Bei dem Modell der Rattenretina konnten zwei unter nicht-regenerativen Bedingungen verstärkt exprimierte Proteine als Synaptotagmin I und HMG-1 identifiziert werden. Komparative Analysen der 2D-Gele des Affen offenbarten die alters- und regenerationsabhängige Expression mehrerer Proteine, die als Calmodulin, α_A -Kristallin, FABPs und CRABP bestimmt wurden.

Aufgrund der bislang bekannten Funktionen dieser Proteine stellen sie interessante Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen dar.

Diese Arbeit konnte damit zahlreiche in das Regenerationsgeschehen involvierte Faktoren und daran gekoppelte Signalwege offendecken. Durch die weitere funktionelle Untersuchung dieser Kandidaten, insbesondere der Kristalline, muß ihre Bedeutung für die Regeneration geklärt werden. Die generierten Karten der Retinaproteome von Ratte und Affe stellen die Basis für weitere differentielle Analysen unter variablen Aspekten dar. Durch die Etablierung des neuen Regenerationsmodells der Affenretina und der 2D-PAGE bestehen nun ausgezeichnete Möglichkeiten ein besseres Verständnis regenerationsassoziiierter Prozesse und weitere Ansatzpunkte zu ihrer Stimulation zu finden.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahmann, P., *In vitro* Studie zur neurotrophen Wirkung des Augenlinsen-Proteins BetaH-Kristallin auf Motoneurone des embryonalen Hühnchens (*Gallus gallus*), Dissertation, Universitätsbibliothek Bremen 2003.
2. Aigner, L. and Caroni, P., Depletion of 43-kD growth-associated protein in primary sensory neurons leads to diminished formation and spreading of growth cones, *J Cell Biol* 1993, 123, 417-429.
3. Allen, G. W., Liu, J., Kirby, M. A., and De Leon, M., Induction and axonal localization of epithelial/epidermal fatty acid-binding protein in retinal ganglion cells are associated with axon development and regeneration, *J Neurosci Res* 2001, 66, 396-405.
4. Allen, G. W., Liu, J. W., and De Leon, M., Depletion of a fatty acid-binding protein impairs neurite outgrowth in PC12 cells, *Brain Res Mol Brain Res* 2000, 76, 315-324.
5. Andersen, L. and Schreyer, D., Constitutive expression of GAP-43 correlates with rapid, but not slow regrowth of injured dorsal root axons in the adult rat, *Exp Neurol* 1999, 155, 157-164.
6. Anderson, P., Campbell, G., Zhang, Y., and Liebermann, A., Cellular and molecular correlates of the regeneration of adult mammalian CNS axons into peripheral nerve grafts, *Prog Brain Res* 1998, 117, 211-232.
7. Ard, M. D., Bunge, M. B., Wood, P. M., Schachner, M., and Bunge, R. P., Retinal neurite growth on astrocytes is not modified by extracellular matrix, anti-L1 antibody, or oligodendrocytes, *Glia* 1991, 4, 70-82.
8. Argiro, V. and Johnson, M. I., Patterns and kinetics of neurite extension from sympathetic neurons in culture are age dependent, *J Neurosci* 1982, 2, 503-512.
9. Atshaves, B. P., Foxworth, W. B., Frolov, A., Roths, J. B., Kier, A. B., Oetama, B. K., Piedrahita, J. A., and Schroeder, F., Cellular differentiation and I-FABP protein expression modulate fatty acid uptake and diffusion, *Am J Physiol* 1998, 274, C633-644.
10. Babity, J. M., Armstrong, J. N., Plumier, J. C., Currie, R. W., and Robertson, H. A., A novel seizure-induced synaptotagmin gene identified by differential display, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94, 2638-2641.
11. Bähr, M., Vanselow, J., and Thanos, S., Ability of adult rat ganglion cells to regrow axons *in vitro* can be influenced by fibroblast growth factor and gangliosides, *Neurosci Lett* 1989, 96, 197-201.
12. Bähr, M., Vanselow, J., and Thanos, S., *In vitro* regeneration of adult rat ganglion

- cell axons from retinal explants, *Exp Brain Res* 1988, 73, 393-401.
13. Bates, C. A. and Meyer, R. L., The neurite-promoting effect of laminin is mediated by different mechanisms in embryonic and adult regenerating mouse optic axons in vitro, *Developmental Biology* 1997, 181, 91-101.
 14. Becker, T., Anliker, B., Becker, C. G., Taylor, J., Schachner, M., Meyer, R. L., and Bartsch, U., Tenascin-R inhibits regrowth of optic fibers in vitro and persists in the optic nerve of mice after injury, *Glia* 2000, 29, 330-346.
 15. Becker, T., Bernhardt, R., Reinhard, E., Wullmann, m., Tongiorgi, E., and Schachner, M., Readiness of zebrafish brain neurons to regenerate a spinal axon correlates with differential expression of specific cell recognition molecules, *J Neurosci* 1998, 18, 5789-5803.
 16. Benfey, M. and Aguayo, A. J., Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts, *Nature* 1982, 296, 150-152.
 17. Benowitz, L., Apostolides, P., Perrone-Bizzozero, N., Finklestein, S., and Zwiers, H., Anatomical distribution of the growth-associated protein GAP-43/B-50 in the adult rat brain, *J Neurosci* 1988, 8, 339-352.
 18. Benowitz, L. and Routtenberg, A., GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity, *Trends Neurosci* 1997, 20, 84-91.
 19. Benowitz, L. I., Goldberg, D. E., and Irwin, N., Inosine stimulates axon growth in vitro and in the adult CNS, *Prog Brain Res* 2002, 137, 389-399.
 20. Benowitz, L. I., Jing, Y., Tabibiazar, R., Jo, S. A., Petrusch, B., Stuermer, C. A., Rosenberg, P. A., and Irwin, N., Axon outgrowth is regulated by an intracellular purine-sensitive mechanism in retinal ganglion cells, *J Biol Chem* 1998, 273, 29626-29634.
 21. Benowitz, L. I. and Lewis, E. R., Increased transport of 44,000- to 49,000-dalton acidic proteins during regeneration of the goldfish optic nerve: a two-dimensional gel analysis, *J Neurosci* 1983, 3, 2153-2163.
 22. Bera, S., Thampi, P., Cho, W. J., and Abraham, E. C., A positive charge preservation at position 116 of alpha A-crystallin is critical for its structural and functional integrity, *Biochemistry* 2002, 41, 12421-12426.
 23. Berkelaar, M., Clarke, D., Wang, Y., Bray, G., and Aguayo, A., Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats, *J Neurosci* 1994, 14, 4368-4374.
 24. Bernlohr, D. A., Simpson, M. A., Hertzler, A. V., and Banaszak, L. J., Intracellular lipid-binding proteins and their genes, *Annu Rev Nutr* 1997, 17, 277-303.
 25. Berridge, M. J., Neuronal calcium signaling, *Neuron* 1998, 21, 13-26.

26. Berry, M., Carlile, J., and Hunter, A., Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve, *J Neurocytol* 1996, 25, 147-170.
27. Bhat, N. R. and Sharma, K. K., Microglial activation by the small heat shock protein, alpha-crystallin, *Neuroreport* 1999, 10, 2869-2873.
28. Bhat, S. P. and Nagineni, C. N., alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues, *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 158, 319-325.
29. Bignami, A. and Dahl, D., The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein, *Exp Eye Res* 1979, 28, 63-69.
30. Birnbaum, G., Stress proteins: their role in the normal central nervous system and in disease states, especially multiple sclerosis, *Springer Semin Immunopathol* 1995, 17, 107-118.
31. Bisby, M. A., Changes in the composition of labeled protein transported in motor axons during their regeneration, *J Neurobiol* 1980, 11, 435-445.
32. Blinzinger, K. and Kreutzberg, G., Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells, *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1968, 85, 145-157.
33. Bomze, H., Bulsara, K., Bermans, J., Caroni, P., and Skene, J., Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons, *Nat Neurosci* 2001, 4, 38-43.
34. Bormann, P., Zumsteg, V. M., Roth, L. W., and Reinhard, E., Target contact regulates GAP-43 and alpha-tubulin mRNA levels in regenerating retinal ganglion cells, *J Neurosci Res* 1998, 52, 405-419.
35. Bornstein, M. B., Reconstituted rattail collagen used as substrate for tissue cultures on coverslips in Maximow slides and roller tubes, *Lab Invest* 1958, 7, 134-137.
36. Bornstein, P. and Sage, H., Structurally distinct collagen types, *Annu Rev Biochem* 1980, 49, 957-1003.
37. Boyle, D. L. and Takemoto, L., EM immunolocalization of alpha-crystallins: association with the plasma membrane from normal and cataractous human lenses, *Curr Eye Res* 1996, 15, 577-582.
38. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 1976, 72, 248-254.

39. Brezniceanu, M. L., Volp, K., Bosser, S., Solbach, C., Lichter, P., Joos, S., and Zornig, M., HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma, *Faseb J* 2003, 17, 1295-1297.
40. Brown, I. R., Induction of heat shock genes in mammalian brain by hyperthermia and tissue injury, *Heat Shock Proteins in the Nervous System* 1994, Mayer, J. and Brown, I. eds), 31-53.
41. Buffo, A., Holtmaat, A., Savio, T., Verbeek, J., Oberdick, J., Oestreicher, A., Gispen, W., Verhaagen, J., Rossi, F., and Strata, p., Targeted overexpression of the neurite growth-associated protein B-50/GAP-43 in cerebellar Purkinje cells induces sprouting after axotomy but not axon regeneration into growth-permissive transplants, *J Neurosci* 1997, 17, 8778-8791.
42. Bulsara, K. R., Iskandar, B. J., Villavicencio, A. T., and Skene, J. H., A new millenium for spinal cord regeneration: growth-associated genes, *Spine* 2002, 27, 1946-1949.
43. Cai, D., Qiu, J., Cao, Z., McAtee, M., Bregman, B. S., and Filbin, M. T., Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate, *J Neurosci* 2001, 21, 4731-4739.
44. Cajal, R. y., Degeneration and Regeneration of the Nervous System, in DeFelipe J. and Jones E. G. (Hrsg.), 1991:"Cajals degeneration and regeneration of the nervous system", Oxford University Press, New York 1928.
45. Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtlander, T., Ferrier, P., Ferrari, S., and Bianchi, M. E., The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice, *Nat Genet* 1999, 22, 276-280.
46. Canning, D. R., Hoke, A., Malemud, C. J., and Silver, J., A potent inhibitor of neurite outgrowth that predominates in the extracellular matrix of reactive astrocytes, *Int J Dev Neurosci* 1996, 14, 153-175.
47. Cao, W., Li, F., Steinberg, R. H., and Lavail, M. M., Development of normal and injury-induced gene expression of aFGF, bFGF, CNTF, BDNF, GFAP and IGF-I in the rat retina, *Experimental Eye Research* 2001, 72, 591-604.
48. Cao, W., Wen, R., Li, F., Lavail, M. M., and Steinberg, R. H., Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina, *Exp Eye Res* 1997, 65, 241-248.
49. Caroni, P. and Schwab, M. E., Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter, *Neuron* 1988a, 1, 85-96.
50. Caroni, P. and Schwab, M. E., Two membrane protein fractions from rat central

- myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading, *J Cell Biol* 1988b, 106, 1281-1288.
51. Casoli, T., Stefano, G. D., Fattoretti, P., Solazzi, M., Delfino, A., Biagini, G., and Bertoni-Freddari, C., GAP-43 mRNA detection by in situ hybridization, direct and indirect in situ RT-PCR in hippocampal and cerebellar tissue sections of adult rat brain, *Micron* 2003, 34, 415-422.
 52. Casson, R. J., Chidlow, G., Wood, J. P., Vidal-Sanz, M., and Osborne, N. N., The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, 45, 685-693.
 53. Castren, E., Ohga, Y., Berzaghi, M. P., Tzimagiorgis, G., Thoenen, H., and Lindholm, D., bcl-2 messenger RNA is localized in neurons of the developing and adult rat brain, *Neuroscience* 1994, 61, 165-177.
 54. Cavusoglu, N., Thierse, D., Mohand-Said, S., Chalmel, F., Poch, O., Van-Dorselaer, A., Sahel, J. A., and Leveillard, T., Differential Proteomic Analysis of the Mouse Retina: The Induction of Crystallin Proteins by Retinal Degeneration in the rd1 Mouse, *Mol Cell Proteomics* 2003, 2, 494-505.
 55. Celis, J. E., Rasmussen, H. H., Gromov, P., Olsen, E., Madsen, P., Leffers, H., Honore, B., Dejgaard, K., Vorum, H., Kristensen, D. B., and et al., The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1995): mapping components of signal transduction pathways, *Electrophoresis* 1995, 16, 2177-2240.
 56. Chen, D., Jhaveri, S., and Schneider, G., Intrinsic changes in developing retinal neurons result in regenerative failure of their axons, *PNAS* 1995, 92, 7287-7291.
 57. Chen, D. F., Schneider, G. E., Martinou, J. C., and Tonegawa, S., Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS, *Nature* 1997, 385, 434-439.
 58. Chen, H. and Weber, A. J., Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase by Muller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor, *Glia* 2002, 38, 115-125.
 59. Chen, M. S., Huber, A. B., van der Haar, M. E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A. A., Christ, F., and Schwab, M. E., Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1, *Nature* 2000, 403, 434-439.
 60. Cho, K. S., Chan, P. M., So, K. F., Yip, H. K., and Chung, S. K., Ciliary neurotrophic factor promotes the regrowth capacity but not the survival of intraorbitally axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters, *Neuroscience* 1999a, 94, 623-628.
 61. Cho, K. S., Xiao, Y. M., So, K. F., Diao, Y. C., and Chung, S. K., Synergistic effect of optic and peripheral nerve grafts on sprouting of axon-like processes of

- axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters, *Neurosci Lett* 1999b, 265, 175-178.
62. Chong, M. S., Woolf, C. J., Turmaine, M., Emson, P. C., and Anderson, P. N., Intrinsic versus extrinsic factors in determining the regeneration of the central processes of rat dorsal root ganglion neurons: the influence of a peripheral nerve graft, *J Comp Neurol* 1996, 370, 97-104.
63. Chun, M. H., Ju, W. K., Kim, K. Y., Lee, M. Y., Hofmann, H. D., Kirsch, M., and Oh, S. J., Upregulation of ciliary neurotrophic factor in reactive Muller cells in the rat retina following optic nerve transection, *Brain Res* 2000, 868, 358-362.
64. Cobb, B. A. and Petrash, J. M., alpha-Crystallin chaperone-like activity and membrane binding in age-related cataracts, *Biochemistry* 2002, 41, 483-490.
65. Coe, N. R. and Bernlohr, D. A., Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins, *Biochim Biophys Acta* 1998, 1391, 287-306.
66. Cohen, J. J., Burne, J., Winter, J., and Bartlett, P., Retinal ganglion cells loose response to laminin with maturation, *Nature* 1986, 322, 465-467.
67. Cohen, J. J. and Johnson, A., Differential effects of laminin and merosin on neurite outgrowth by developing retinal ganglion cells, *J Cell Sci Suppl* 1991, 15, 1-7.
68. Cohen, J. J., Nurcombe, V., Jeffrey, P., and Edgar, D., Developmental loss of functional laminin receptors on retinal ganglion cells is regulated by their target tissue, the optic tectum, *Development* 1989, 107, 381-387.
69. Colognato, H. and Yurchenco, P. D., Form and function: the laminin family of heterotrimers, *Dev Dyn* 2000, 218, 213-234.
70. Colombo, J. A., Fuchs, E., Hartig, W., Marotte, L. R., and Puissant, V., "Rodent-like" and "primate-like" types of astroglial architecture in the adult cerebral cortex of mammals: a comparative study, *Anat Embryol (Berl)* 2000, 201, 111-120.
71. Condic, M. L., Adult neuronal regeneration induced by transgenic integrin expression, *J Neurosci* 2001, 21, 4782-4788.
72. Coop, A., Wiesmann, K. E., and Crabbe, M. J., Translocation of beta crystallin in neural cells in response to stress, *FEBS Lett* 1998, 431, 319-321.
73. Crabb, J. W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K. A., Sakaguchi, H., Kamei, M., Hasan, A., Yan, L., Rayborn, M. E., Salomon, R. G., and Hollyfield, J. G., Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99, 14682-14687.
74. Crutcher, K. A. and Marfurt, C. F., Nonregenerative axonal growth within the

- mature mammalian brain: ultrastructural identification of sympathohippocampal sprouts, *J Neurosci* 1988, 8, 2289-2302.
75. Cui, Q., Lu, Q., So, K. F., and Yip, H. K., CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40, 760-766.
76. Cui, W., Allen, N. D., Skynner, M., Gusterson, B., and Clark, A. J., Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain, *Glia* 2001, 34, 272-282.
77. Davies, A. M., Intrinsic differences in the growth rate of early nerve fibres related to target distance, *Nature* 1989, 337, 553-555.
78. De Leon, M., Welcher, A. A., Nahin, R. H., Liu, Y., Ruda, M. A., Shooter, E. M., and Molina, C. A., Fatty acid binding protein is induced in neurons of the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury, *J Neurosci Res* 1996, 44, 283-292.
79. Deitch, J. S. and Banker, G. A., An electron microscopic analysis of hippocampal neurons developing in culture: early stages in the emergence of polarity, *J Neurosci* 1993, 13, 4301-4315.
80. Derham, B. K. and Harding, J. J., Alpha-crystallin as a molecular chaperone, *Prog Retin Eye Res* 1999, 18, 463-509.
81. Derham, B. K. and Harding, J. J., Effects of modifications of alpha-crystallin on its chaperone and other properties, *Biochem J* 2002, 364, 711-717.
82. DiLoreto, D., Jr., Ison, J. R., Bowen, G. P., Cox, C., and del Cerro, M., A functional analysis of the age-related degeneration in the Fischer 344 rat, *Curr Eye Res* 1995, 14, 303-310.
83. Djabali, K., Piron, G., de Nechaud, B., and Portier, M. M., alphaB-crystallin interacts with cytoplasmic intermediate filament bundles during mitosis, *Exp Cell Res* 1999, 253, 649-662.
84. Doherty, N. S., Littman, B. H., Reilly, K., Swindell, A. C., Buss, J. M., and Anderson, N. L., Analysis of changes in acute-phase plasma proteins in an acute inflammatory response and in rheumatoid arthritis using two-dimensional gel electrophoresis, *Electrophoresis* 1998, 19, 355-363.
85. Doster, S., Lozano, A., Aguayo, A., and Willard, M., Expression of the growth-associated protein GAP-43 in adult rat retinal ganglion cells following axon injury, *Neuron* 1991, 6, 635-647.
86. Edgar, P. F., Schonberger, S. J., Dean, B., Faull, R. L., Kydd, R., and Cooper, G. J., A comparative proteome analysis of hippocampal tissue from schizophrenic and Alzheimer's disease individuals, *Mol Psychiatry* 1999, 4, 173-178.

87. Enard, W., Khaitovich, P., Klose, J., Zollner, S., Heissig, F., Giavalisco, P., Nieselt-Struwe, K., Muchmore, E., Varki, A., Ravid, R., Doxiadis, G. M., Bontrop, R. E., and Paabo, S., Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns, *Science* 2002, 296, 340-343.
88. Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., and Lee, Y. L., Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000), *Neurochem Res* 2000, 25, 1439-1451.
89. Erlandsson Harris, H. and Andersson, U., Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator, *Eur J Immunol* 2004, 34, 1503-1512.
90. Faktorovich, E. G., Steinberg, R. H., Yasumura, D., Matthes, M. T., and LaVail, M. M., Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat, *J Neurosci* 1992, 12, 3554-3567.
91. Fawcett, J. W. and Asher, R. A., The glial scar and central nervous system repair, *Brain Res Bull* 1999, 49, 377-391.
92. Fischer, D., *Protektiver Einfluss von beta- und gamma-Kristallinen auf das neuronale Überleben und die axonale Regeneration im adulten Zentralen Nervensystem (Dissertation)*, Tectum Verlag Marburg 2000.
93. Fischer, D., He, Z., and Benowitz, L. I., Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state, *J Neurosci* 2004, 24, 1646-1651.
94. Fischer, D., Heiduschka, P., and Thanos, S., Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats, *Exp Neurol* 2001, 172, 257-272.
95. Fischer, D., Pavlidis, M., and Thanos, S., Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41, 3943-3954.
96. Fishman, M. C., GAP-43: putting constraints on neuronal plasticity, *Perspect Dev Neurobiol* 1996, 4, 193-198.
97. FitzGerald, P. G. and Graham, D., Ultrastructural localization of alpha A-crystallin to the bovine lens fiber cell cytoskeleton, *Curr Eye Res* 1991, 10, 417-436.
98. Ford-Holevinski, T. S., Hopkins, J. M., McCoy, J. P., and Agranoff, B. W., Laminin supports neurite outgrowth from explants of axotomized adult rat retinal neurons, *Brain Res* 1986, 393, 121-126.
99. Frey, D., Laux, T., Xu, L., Schneider, C., and Caroni, P., Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity, *J Cell Biol* 2000, 149, 1443-1453.

100. Friedman, B. and Aguayo, A. J., Injured neurons in the olfactory bulb of the adult rat grow axons along grafts of peripheral nerve, *J Neurosci* 1985, 5, 1616-1625.
101. Friedman, B., Scherer, S. S., Rudge, J. S., Helgren, M., Morrissey, D., McClain, J., Wang, D. Y., Wiegand, S. J., Furth, M. E., Lindsay, R. M., and et al., Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo, *Neuron* 1992, 9, 295-305.
102. Fukuda, M. and Mikoshiba, K., The function of inositol high polyphosphate binding proteins, *Bioessays* 1997, 19, 593-603.
103. Fukuda, Y., A three-group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies, *Brain Res* 1977, 119, 327-334.
104. Futerman, A. H. and Banker, G. A., The economics of neurite outgrowth--the addition of new membrane to growing axons, *Trends Neurosci* 1996, 19, 144-149.
105. Garcia, M. and Vecino, E., Role of Muller glia in neuroprotection and regeneration in the retina, *Histol Histopathol* 2003, 18, 1205-1218.
106. Garcia-Valenzuela, E., Gorczyca, W., Darzynkiewicz, Z., and Sharma, S., Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy, *J Neurobiol* 1994, 25, 431-438.
107. Ghosh, K. K., Goodchild, A. K., Sefton, A. E., and Martin, P. R., Morphology of retinal ganglion cells in a new world monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*, *J Comp Neurol* 1996, 366, 76-92.
108. Gianola, S. and Rossi, F., GAP-43 overexpression in adult mouse Purkinje cells overrides myelin-derived inhibition of neurite growth, *Eur J Neurosci* 2004, 19, 819-830.
109. Giulian, D., Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival, *Glia* 1993, 7, 102-110.
110. Giulian, D., Corpuz, M., Chapman, S., Mansouri, M., and Robertson, C., Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system, *J Neurosci Res* 1993, 36, 681-693.
111. Giulian, D., Li, J., Leara, B., and Keenen, C., Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture, *Neurochem Int* 1994, 25, 227-233.
112. Glatz, J. F., Luiken, J. J., van Nieuwenhoven, F. A., and Van der Vusse, G. J., Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997, 57, 3-9.
113. Godement, P., Vanselow, J., Thanos, S., and Bonhoeffer, F., A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their

- processes in fixed tissue, *Development* 1987, 101, 697-713.
114. Goldberg, J. L. and Barres, B. A., The Relationship between Neuronal Survival and Regeneration, *Annual Review of Neuroscience* 2000, 23, 579-612.
115. Goldberg, J. L., Espinosa, J. S., Xu, Y., Davidson, N., Kovacs, G. T., and Barres, B. A., Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity, *Neuron* 2002, 33, 689-702.
116. Görg, A., Postel, W., and Gunther, S., The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis* 1988, 9, 531-546.
117. GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T., and Strittmatter, S. M., Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein, *Nature* 2000, 403, 439-444.
118. Graw, J., The crystallins: genes, proteins and diseases, *Biol Chem* 1997, 378, 1331-1348.
119. Greenlee, M. H., Swanson, J. J., Simon, J. J., Elmquist, J. K., Jacobson, C. D., and Sakaguchi, D. S., Postnatal development and the differential expression of presynaptic terminal-associated proteins in the developing retina of the Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*, *Brain Res Dev Brain Res* 1996, 96, 159-172.
120. Greenlund, L. J., Deckwerth, T. L., and Johnson, E. M., Jr., Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death, *Neuron* 1995, 14, 303-315.
121. Grünert, U. and Ghosh, K., Midget and parasol ganglion cells of the primate retina express the [agr]1 subunit of the glycine receptor, *Visual Neuroscience* 1999, Volume 16, pp957-966.
122. Guazzi, S., Strangio, A., Franzi, A. T., and Bianchi, M. E., HMGB1, an architectural chromatin protein and extracellular signalling factor, has a spatially and temporally restricted expression pattern in mouse brain, *Gene Expr Patterns* 2003, 3, 29-33.
123. Guthrie, K. M., Woods, A. G., Nguyen, T., and Gall, C. M., Astroglial ciliary neurotrophic factor mRNA expression is increased in fields of axonal sprouting in deafferented hippocampus, *J Comp Neurol* 1997, 386, 137-148.
124. Haebel, S., Albrecht, T., Sparbier, K., Walden, P., Korner, R., and Steup, M., Electrophoresis-related protein modification: alkylation of carboxy residues revealed by mass spectrometry, *Electrophoresis* 1998, 19, 679-686.
125. Haeseleer, F., Imanishi, Y., Sokal, I., Filipek, S., and Palczewski, K., Calcium-binding proteins: intracellular sensors from the calmodulin superfamily, *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 290, 615-623.

126. Halfter, W. and Deiss, S., Axon growth in embryonic chick and quail retinal whole mounts in vitro, *Dev Biol* 1984, 102, 344-355.
127. Hall, C. M. and Schechter, N., Expression of neuronal intermediate filament proteins ON1 and ON2 during goldfish optic nerve regeneration: effect of tectal ablation, *Neuroscience* 1991, 41, 695-701.
128. Hall, D., Neugebauer, K., and Reichardt, L., Embryonic neural retinal cell response to extracellular matrix proteins: developmental changes and effects of the cell substratum attachment antibody (CSAT), *J. Cell Biol.* 1987, 104, 623-634.
129. Hanson, M. G., Jr., Shen, S., Wiemelt, A. P., McMorris, F. A., and Barres, B. A., Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro, *J Neurosci* 1998, 18, 7361-7371.
130. Harding, D., Greensmith, L., Mason, M., Anderson, P., and Vrbová, G., Overexpression of GAP-43 induces prolonged sprouting and causes death of adult motoneurons, *Eur J Neurosci* 1999, 11, 2237-2242.
131. Hatten, M. E., Liem, R. K., Shelanski, M. L., and Mason, C. A., Astroglia in CNS injury, *Glia* 1991, 4, 233-243.
132. Hauck, S. M., Suppmann, S., and Ueffing, M., Proteomic profiling of primary retinal Muller glia cells reveals a shift in expression patterns upon adaptation to in vitro conditions, *Glia* 2003, 44, 251-263.
133. Head, M. W., Sedowofia, K., and Clayton, R. M., Beta B2-crystallin in the mammalian retina, *Exp Eye Res* 1995, 61, 423-428.
134. Heiduschka, P. and Thanos, S., Restoration of the retinofugal pathway, *Prog Retin Eye Res* 2000, 19, 577-606.
135. Herbin, M., Boire, D., Theoret, H., and Ptito, M., Transneuronal degeneration of retinal ganglion cells in early hemispherectomized monkeys, *Neuroreport* 1999, 10, 1447-1452.
136. Hering, H. and Kroger, S., Formation of synaptic specializations in the inner plexiform layer of the developing chick retina, *J Comp Neurol* 1996, 375, 393-405.
137. Hoover, H. E., Thuerauf, D. J., Martindale, J. J., and Glembotski, C. C., alpha B-crystallin gene induction and phosphorylation by MKK6-activated p38. A potential role for alpha B-crystallin as a target of the p38 branch of the cardiac stress response, *J Biol Chem* 2000, 275, 23825-23833.
138. Hou, X. E. and Dahlstrom, A., Synaptic vesicle proteins and neuronal plasticity in adrenergic neurons, *Neurochem Res* 2000, 25, 1275-1300.
139. Humphrey, M. F. and Beazley, L. D., Retinal ganglion cell death during optic

- nerve regeneration in the frog *Hyla moorei*, *J Comp Neurol* 1985, 236, 382-402.
140. Huttunen, H. J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A. L., Donato, R., and Rauvala, H., Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation, *J Biol Chem* 2000, 275, 40096-40105.
141. Ide, C., Peripheral nerve regeneration, *Neurosci Res* 1996, 25, 101-121.
142. Igarashi, M., Kozaki, S., Terakawa, S., Kawano, S., Ide, C., and Komiya, Y., Growth cone collapse and inhibition of neurite growth by Botulinum neurotoxin C1: a t-SNARE is involved in axonal growth, *J Cell Biol* 1996, 134, 205-215.
143. Ivins, J. K., Yurchenco, P. D., and Lander, A. D., Regulation of neurite outgrowth by integrin activation, *J Neurosci* 2000, 20, 6551-6560.
144. Jacobson, B. S. and Branton, D., Plasma membrane: rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads, *Science* 1977, 195, 302-304.
145. Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C., Programmed cell death in animal development, *Cell* 1997, 88, 347-354.
146. Jacobson, R., Virag, I., and Skene, J., A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS, *J Neurosci* 1986, 6, 1843-1855.
147. Jaenicke, R. and Slingsby, C., Lens crystallins and their microbial homologs: structure, stability, and function, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2001, 36, 435-499.
148. Jensen, N. A. and Celis, J. E., Proteomic changes associated with degeneration of myelin-forming cells in the central nervous system of c-myc transgenic mice, *Electrophoresis* 1998, 19, 2014-2020.
149. Jo, S. A., Wang, E., and Benowitz, L. I., Ciliary neurotrophic factor is an axogenesis factor for retinal ganglion cells, *Neuroscience* 1999, 89, 579-591.
150. Jolly, C. A., Hubbell, T., Behnke, W. D., and Schroeder, F., Fatty acid binding protein: stimulation of microsomal phosphatidic acid formation, *Arch Biochem Biophys* 1997, 341, 112-121.
151. Jones, S. E., Jomary, C., Grist, J., Makwana, J., and Neal, M. J., Retinal expression of gamma-crystallins in the mouse, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40, 3017-3020.
152. Ju, W., Gwon, J., Park, S., Kim, K., Jung-Il, M., Lee, M., Oh, S., and Chun, M., Growth-associated protein 43 is up-regulated in the ganglion cells of the ischemic rat retina, *Neuroreport* 2002, 13, 861-865.

153. Ju, W. K., Lee, M. Y., Hofmann, H. D., Kirsch, M., and Chun, M. H., Expression of CNTF in Muller cells of the rat retina after pressure-induced ischemia, *Neuroreport* 1999, 10, 419-422.
154. Kamei, A., Iwase, H., and Masuda, K., Cleavage of amino acid residue(s) from the N-terminal region of alpha A- and alpha B-crystallins in human crystalline lens during aging, *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 231, 373-378.
155. Kamradt, M. C., Chen, F., and Cryns, V. L., The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation, *J Biol Chem* 2001, 276, 16059-16063.
156. Kantorow, M. and Piatigorsky, J., Alpha-crystallin/small heat shock protein has autokinase activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91, 3112-3116.
157. Kantorow, M. and Piatigorsky, J., Phosphorylations of alpha A- and alpha B-crystallin, *Int J Biol Macromol* 1998, 22, 307-314.
158. Kappahn, R. J., Ethen, C. M., Peters, E. A., Higgins, L., and Ferrington, D. A., Modified alphaA crystallin in the retina: altered expression and truncation with aging., *Biochemistry* 2003, 42, 15310-15325.
159. Kater, S. B. and Mills, L. R., Regulation of growth cone behavior by calcium, *J Neurosci* 1991, 11, 891-899.
160. Keirstead, S. A., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Aguayo, A. J., Levesque, M., and So, K. F., Responses to light of retinal neurons regenerating axons into peripheral nerve grafts in the rat, *Brain Res* 1985, 359, 402-406.
161. Kim, C. B. Y., Tom, B. W., and Spear, P. D., Effects of aging on the densities, numbers, and sizes of retinal ganglion cells in rhesus monkey, *Neurobiology of Aging* 1996, 17, 431-438.
162. Kim, D. H. and Jahng, T. A., Continuous brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion after methylprednisolone treatment in severe spinal cord injury, *J Korean Med Sci* 2004, 19, 113-122.
163. King, C. R. and Piatigorsky, J., Alternative splicing of alpha A-crystallin RNA. Structural and quantitative analyses of the mRNAs for the alpha A2- and alpha Ains-crystallin polypeptides, *J Biol Chem* 1984, 259, 1822-1826.
164. Klemenz, R., Frohli, E., Steiger, R. H., Schafer, R., and Aoyama, A., Alpha B-crystallin is a small heat shock protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88, 3652-3656.
165. Klocker, N., Jung, M., Stuermer, C. A., and Bahr, M., BDNF increases the number of axotomized rat retinal ganglion cells expressing GAP-43, L1, and TAG-1 mRNA--a supportive role for nitric oxide?, *Neurobiol Dis* 2001, 8, 103-

- 113.
166. Klose, J., Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals, *Humangenetik* 1975, 26, 231-243.
167. Kobori, N., Clifton, G. L., and Dash, P., Altered expression of novel genes in the cerebral cortex following experimental brain injury, *Brain Res Mol Brain Res* 2002, 104, 148-158.
168. König, S., Grote, J., and Zeller, M., Detection and identification of proteins by mass spectrometry, *Analyzing gene expression*, Chapt. 5.3., Lorkowski S., Cullen P, Eds., 1st Ed., Wiley-VCH Weinheim 2002, I, 638-668.
169. König, S., Schmidt, O., Rose, K., Thanos, S., Besselmann, M., and Zeller, M., Sodium dodecyl sulfate versus acid-labile surfactant gel electrophoresis: comparative proteomic studies on rat retina and mouse brain, *Electrophoresis* 2003, 24, 751-756.
170. Kovacs, B. and Gulya, K., Calmodulin gene expression in the neural retina of the adult rat, *Life Sci* 2003, 73, 3213-3224.
171. Kuhrt, H., Walski, M., Reichenbach, A., and Albrecht, J., Rabbit retinal organ culture as an in-vitro model of hepatic retinopathy, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004.
172. Kyhse-Andersen, J., Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods* 1984, 10, 203-209.
173. La Cour, M., The retinal pigment epithelium, *Physiology of the eye* 2003, (P. L. Kaufmann, A. Alm, Ed.), 348-357.
174. Laabich, A., Li, G., and Cooper, N. G., Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II containing a nuclear localizing signal is altered in retinal neurons exposed to N-methyl-D-aspartate, *Brain Res Mol Brain Res* 2000, 76, 253-265.
175. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 1970, 227, 680-685.
176. Larrivee, D. C. and Grafstein, B., In vivo phosphorylation of axonal proteins in goldfish optic nerve during regeneration, *J Neurochem* 1987, 48, 279-283.
177. Lazarov-Spiegler, O., Solomon, A. S., and Schwartz, M., Peripheral nerve-stimulated macrophages simulate a peripheral nerve-like regenerative response in rat transected optic nerve, *Glia* 1998, 24, 329-337.
178. Lefrancois, T., Fages, C., Peschanski, M., and Tardy, M., Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary

- acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures, *J Neurosci* 1997, 17, 4121-4128.
179. Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G., and McKerracher, L., Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration, *J Neurosci* 1999, 19, 7537-7547.
180. Lehwald, D., Jeffrey, P. L., and Unsicker, K., Survival of purified embryonic chick retinal ganglion cells in the presence of neurotrophic factors, *J Neurosci Res* 1989, 24, 329-337.
181. Leon, S., Yin, Y., Nguyen, J., Irwin, N., and Benowitz, L. I., Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve, *J Neurosci* 2000, 20, 4615-4626.
182. Letourneau, P. C., Cell-substratum adhesion of neurite growth cones, and its role in neurite elongation, *Exp Cell Res* 1979, 124, 127-138.
183. Leventhal, A. G., Rodieck, R. W., and Dreher, B., Retinal ganglion cell classes in the Old World monkey: morphology and central projections., *Science* 1981, 213, 1139-1142.
184. Levitan, I. B., It is calmodulin after all! Mediator of the calcium modulation of multiple ion channels, *Neuron* 1999, 22, 645-648.
185. Levkovitch-Verbin, H., Quigley, H. A., Kerrigan-Baumrind, L. A., D'Anna, S. A., Kerrigan, D., and Pease, M. E., Optic nerve transection in monkeys may result in secondary degeneration of retinal ganglion cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, 42, 975-982.
186. Li, Y., Irwin, N., Yin, Y., Lanser, M., and Benowitz, L. I., Axon regeneration in goldfish and rat retinal ganglion cells: differential responsiveness to carbohydrates and cAMP, *J Neurosci* 2003, 23, 7830-7838.
187. Liu, C., Peng, M., Laties, A. M., and Wen, R., Preconditioning with bright light evokes a protective response against light damage in the rat retina, *J Neurosci* 1998, 18, 1337-1344.
188. Liu, Y., Longo, L. D., and De Leon, M., In situ and immunocytochemical localization of E-FABP mRNA and protein during neuronal migration and differentiation in the rat brain, *Brain Res* 2000, 852, 16-27.
189. Liu, Y., Molina, C. A., Welcher, A. A., Longo, L. D., and De Leon, M., Expression of DA11, a neuronal-injury-induced fatty acid binding protein, coincides with axon growth and neuronal differentiation during central nervous system development, *J Neurosci Res* 1997, 48, 551-562.
190. Lorber, B., Berry, M., Logan, A., and Tonge, D., Effect of lens lesion on neurite outgrowth of retinal ganglion cells in vitro, *Mol Cell Neurosci* 2002, 21, 301-311.

191. Lotze, M. T. and DeMarco, R. A., Dealing with death: HMGB1 as a novel target for cancer therapy, *Curr Opin Investig Drugs* 2003, 4, 1405-1409.
192. Maeda, A., Ohguro, H., Maeda, T., Nakagawa, T., and Kuroki, Y., Low expression of alphaA-crystallins and rhodopsin kinase of photoreceptors in retinal dystrophy rat, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999, 40, 2788-2794.
193. Magabo, K. S., Horwitz, J., Piatigorsky, J., and Kantorow, M., Expression of betaB(2)-crystallin mRNA and protein in retina, brain, and testis, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41, 3056-3060.
194. Mandal, K. and Lerman, S., Stability of normal and aging lens gamma crystallins, *Ophthalmic Res* 1993, 25, 295-301.
195. Mansour-Robaey, S., Clarke, D., Wang, Y., Bray, G., and Aguayo, A., Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells, *PNAS* 1994, 91, 1632-1636.
196. Mao, Y. W., Liu, J. P., Xiang, H., and Li, D. W., Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis, *Cell Death Differ* 2004, 11, 512-526.
197. Mason, M., Liebermann, A., Grenningloh, G., and Anderson, P., Transcriptional upregulation of SCG10 and CAP-23 is correlated with regeneration of the axons of peripheral and central neurons *in vivo*, *Mol Cell Neurosci* 2002, 20, 595-615.
198. Matsubara, M., Nakatsu, T., Kato, H., and Taniguchi, H., Crystal structure of a myristoylated CAP-23/NAP-22 N-terminal domain complexed with Ca(2+)/calmodulin, *Embo J* 2004, 23, 712-718.
199. Matsumoto, H. and Komori, N., Ocular proteomics: cataloging photoreceptor proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, *Methods Enzymol* 2000, 316, 492-511.
200. McCaffrery, P., Posch, K. C., Napoli, J. L., Gudas, L., and Drager, U. C., Changing patterns of the retinoic acid system in the developing retina, *Dev Biol* 1993, 158, 390-399.
201. McFarlane, S., McNeill, L., and Holt, C. E., FGF signaling and target recognition in the developing *Xenopus* visual system, *Neuron* 1995, 15, 1017-1028.
202. McIntosh, H. and Parkinson, D., GAP-43 in adult visual cortex, *Brain Res* 1990, 518, 324-328.
203. McIntosh, H., Parkinson, D., Meiri, K., Daw, N., and Willard, M., A GAP-43 like protein in cat visual cortex, *Vis Neurosci* 1989, 2, 583-591.
204. McKerracher, L., David, S., Jackson, D. L., Kottis, V., Dunn, R. J., and Braun, P.

- E., Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth, *Neuron* 1994, 13, 805-811.
205. Means, A. L. and Gudas, L. J., The CRABP I gene contains two separable, redundant regulatory regions active in neural tissues in transgenic mouse embryos, *Dev Dyn* 1997, 209, 59-69.
206. Menet, V., Gimenez, Y. R. M., Sandillon, F., and Privat, A., GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth, *Glia* 2000, 31, 267-272.
207. Merenmies, J., Pihlaskari, R., Laitinen, J., Wartiovaara, J., and Rauvala, H., 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane, *J Biol Chem* 1991, 266, 16722-16729.
208. Messing, A. and Brenner, M., GFAP: functional implications gleaned from studies of genetically engineered mice, *Glia* 2003, 43, 87-90.
209. Messing, A., Head, M. W., Galles, K., Galbreath, E. J., Goldman, J. E., and Brenner, M., Fatal encephalopathy with astrocyte inclusions in GFAP transgenic mice, *Am J Pathol* 1998, 152, 391-398.
210. Mey, J., Retinoic acid as a regulator of cytokine signaling after nerve injury, *Z Naturforsch [C]* 2001, 56, 163-176.
211. Mey, J., McCaffery, P., and Klemeit, M., Sources and sink of retinoic acid in the embryonic chick retina: distribution of aldehyde dehydrogenase activities, CRABP-I, and sites of retinoic acid inactivation, *Brain Res Dev Brain Res* 2001, 127, 135-148.
212. Mey, J. and Thanos, S., Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo, *Brain Res* 1993, 602, 304-317.
213. Mey, J. and Thanos, S., Ontogenetic changes in the regenerative ability of chick retinal ganglion cells as revealed by organ explants, *Cell Tissue Res* 1991, 264, 347-355.
214. Meyer, R. L., Miotke, J. A., and Benowitz, L. I., Injury induced expression of growth-associated protein-43 in adult mouse retinal ganglion cells in vitro, *Neuroscience* 1994, 63, 591-602.
215. Meyer-Franke, A., Kaplan, M. R., Pfrieder, F. W., and Barres, B. A., Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture, *Neuron* 1995, 15, 805-819.
216. Mikoshiba, K., Fukuda, M., Ibata, K., Kabayama, H., and Mizutani, A., Role of synaptotagmin, a Ca²⁺ and inositol polyphosphate binding protein, in

- neurotransmitter release and neurite outgrowth, *Chem Phys Lipids* 1999, 98, 59-67.
217. Milam, A. H., De Leeuw, A. M., Gaur, V. P., and Saari, J. C., Immunolocalization of cellular retinoic acid binding protein to Muller cells and/or a subpopulation of GABA-positive amacrine cells in retinas of different species, *J Comp Neurol* 1990, 296, 123-129.
218. Moore, S. and Thanos, S., The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration, *Prog Neurobiol* 1996, 48, 441-460.
219. Mosevitsky, M. I., Novitskaya, V. A., Iogannsen, M. G., and Zabezhinsky, M. A., Tissue specificity of nucleo-cytoplasmic distribution of HMG1 and HMG2 proteins and their probable functions, *Eur J Biochem* 1989, 185, 303-310.
220. Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F. S., Crocker, P. R., and Filbin, M. T., A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration, *Neuron* 1994, 13, 757-767.
221. Müller, S., Ronfani, L., and Bianchi, M. E., Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function, *J Intern Med* 2004, 255, 332-343.
222. Nagata, K., Takei, N., Nakajima, K., Saito, H., and Kohsaka, S., Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain, *J Neurosci Res* 1993, 34, 357-363.
223. Nawashiro, H., Messing, A., Azzam, N., and Brenner, M., Mice lacking GFAP are hypersensitive to traumatic cerebrospinal injury, *Neuroreport* 1998, 9, 1691-1696.
224. Needham, L. K., Tennekoon, G. I., and McKhann, G. M., Selective growth of rat Schwann cells in neuron- and serum-free primary culture, *J Neurosci* 1987, 7, 1-9.
225. Neugebauer, K. and Reichardt, L., Cell-surface regulation of beta 1-integrin activity on developing retinal neurons, *Neuron* 1991, 350, 68-71.
226. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, *Electrophoresis* 1988, 9, 255-262.
227. Neumann, S. and Woolf, C. J., Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury, *Neuron* 1999, 23, 83-91.
228. Newman, E. and Reichenbach, A., The Muller cell: a functional element of the retina, *Trends in Neurosciences* 1996, 19, 307-312.
229. Ng, T. F., So, K. F., and Chung, S. K., Influence of peripheral nerve grafts on the

- expression of GAP-43 in regenerating retinal ganglion cells in adult hamsters, *J Neurocytol* 1995, 24, 487-496.
230. Nichols, N. R., Day, J. R., Laping, N. J., Johnson, S. A., and Finch, C. E., GFAP mRNA increases with age in rat and human brain, *Neurobiol Aging* 1993, 14, 421-429.
231. Nicole, A., Santiard-Baron, D., and Ceballos-Picot, I., Direct evidence for glutathione as mediator of apoptosis in neuronal cells, *Biomed Pharmacother* 1998, 52, 349-355.
232. Northmore, D. P., Neural activity in the regenerating optic nerve of the goldfish, *J Physiol* 1987, 391, 299-312.
233. O'Farrell, P. H., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J Biol Chem* 1975, 250, 4007-4021.
234. Oishi, T., Higo, N., Umino, Y., Matsuda, K., and Hayashi, M., Development of GAP-43 mRNA in the macaque cerebral cortex, *Brain Res Dev Brain Res* 1998, 109, 87-97.
235. Oppenheim, R. W., Cell Death During Development of the Nervous System, *Annual Review of Neuroscience* 1991, 14, 453-501.
236. Owada, Y., Yoshimoto, T., and Kondo, H., Increased expression of the mRNA for brain- and skin-type but not heart-type fatty acid binding proteins following kainic acid systemic administration in the hippocampal glia of adult rats, *Brain Res Mol Brain Res* 1996, 42, 156-160.
237. Pavlidis, M., Stupp, T., Naskar, R., Cengiz, C., and Thanos, S., Retinal ganglion cells resistant to advanced glaucoma: a postmortem study of human retinas with the carbocyanine dye DiI, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, 44, 5196-5205.
238. Peterson, W. M., Wang, Q., Tzekova, R., and Wiegand, S. J., Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia, *J Neurosci* 2000, 20, 4081-4090.
239. Pfrieger, F. W. and Barres, B. A., New views on synapse-glia interactions, *Curr Opin Neurobiol* 1996, 6, 615-621.
240. Pietrowski, D., Durante, M. J., Liebstein, A., Schmitt-John, T., Werner, T., and Graw, J., Alpha-crystallins are involved in specific interactions with the murine gamma D/E/F-crystallin-encoding gene, *Gene* 1994, 144, 171-178.
241. Piontek, J., Regnier-Vigouroux, A., and Brandt, R., Contact with astroglial membranes induces axonal and dendritic growth of human CNS model neurons and affects the distribution of the growth-associated proteins MAP1B and GAP43, *J Neurosci Res* 2002, 67, 471-483.

242. Plunet, W., Kwon, B. K., and Tetzlaff, W., Promoting axonal regeneration in the central nervous system by enhancing the cell body response to axotomy, *J Neurosci Res* 2002, 68, 1-6.
243. Prasad, S. S., Schnerch, A., Lam, D. Y., To, E., Jim, J., Kaufman, P. L., and Matsubara, J. A., Immunohistochemical investigations of neurofilament M' and alphabeta-crystallin in the magnocellular layers of the primate lateral geniculate nucleus, *Brain Res Mol Brain Res* 2002, 109, 216-220.
244. Purves, D., *Body and Brain: A Trophic Theory of Neural Connections*, Harvard University Press, Cambridge, MA 1988.
245. Quigley, H. A., Davis, E. B., and Anderson, D. R., Descending optic nerve degeneration in primates, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977, 16, 841-849.
246. Quigley, H. A., Nickells, R. W., Kerrigan, L. A., Pease, M. E., Thibault, D. J., and Zack, D. J., Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995, 36, 774-786.
247. Rabchevsky, A. G. and Streit, W. J., Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth, *J Neurosci Res* 1997, 47, 34-48.
248. Rajini, B., Shridas, P., Sundari, C. S., Muralidhar, D., Chandani, S., Thomas, F., and Sharma, Y., Calcium binding properties of gamma-crystallin: calcium ion binds at the Greek key beta gamma-crystallin fold, *J Biol Chem* 2001, 276, 38464-38471.
249. Rappolee, D. A. and Werb, Z., Macrophage-derived growth factors, *Curr Top Microbiol Immunol* 1992, 181, 87-140.
250. Ratan, R. R., Murphy, T. H., and Baraban, J. M., Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons, *J Neurochem* 1994, 62, 376-379.
251. Reh, T. A., Tetzlaff, W., Ertlmaier, A., and Zwiers, H., Developmental study of the expression of B50/GAP-43 in rat retina, *J Neurobiol* 1993, 24, 949-958.
252. Richardson, P. M., Issa, V. M., and Shemie, S., Regeneration and retrograde degeneration of axons in the rat optic nerve, *J Neurocytol* 1982, 11, 949-966.
253. Ridet, J. L., Malhotra, S. K., Privat, A., and Gage, F. H., Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function, *Trends Neurosci* 1997, 20, 570-577.
254. Robinson, P. J., Noronha, J., DeGeorge, J. J., Freed, L. M., Nariai, T., and Rapoport, S. I., A quantitative method for measuring regional in vivo fatty-acid incorporation into and turnover within brain phospholipids: review and critical analysis, *Brain Res Brain Res Rev* 1992, 17, 187-214.

255. Sajithlal, G., Huttunen, H., Rauvala, H., and Munch, G., Receptor for advanced glycation end products plays a more important role in cellular survival than in neurite outgrowth during retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells, *J Biol Chem* 2002, 277, 6888-6897.
256. Sakaguchi, H., Miyagi, M., Darrow, R. M., Crabb, J. S., Hollyfield, J. G., Organisciak, D. T., and Crabb, J. W., Intense light exposure changes the crystallin content in retina, *Exp Eye Res* 2003, 76, 131-133.
257. Sapienza, P. S., Peltier, M., Rendahl, K. G., Manning, W. C., and Di Polo, A., Fibroblast growth factor-2 gene delivery stimulates axon growth by adult retinal ganglion cells after acute optic nerve injury, *Mol Cell Neurosci* 2003, 24, 656-672.
258. Savio, T. and Schwab, M. E., Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87, 4130-4133.
259. Savio, T. and Schwab, M. E., Rat CNS white matter, but not gray matter, is nonpermissive for neuronal cell adhesion and fiber outgrowth, *J Neurosci* 1989, 9, 1126-1133.
260. Schaden, H., Stürmer, C., and Bähr, M., GAP-43 immunoreactivity and axon regeneration in retinal ganglion cells of the rat, *J Neurobiol* 1994, 25, 1570-1578.
261. Schnitzer, J. and Scherer, J., Microglial cell responses in the rabbit retina following transection of the optic nerve, *J Comp Neurol* 1990, 302, 779-791.
262. Schumacher, A. M., Schavocky, J. P., Velentza, A. V., Mirzoeva, S., and Watterson, D. M., A calmodulin-regulated protein kinase linked to neuron survival is a substrate for the calmodulin-regulated death-associated protein kinase, *Biochemistry* 2004, 43, 8116-8124.
263. Schütz, E., Rose, K., and Thanos, S., Regeneration of ganglion cell axons into a peripheral nerve graft alters retinal expression of glial markers and decreases vulnerability to re-axotomy, *Restor Neurol Neurosci* 2003, 21, 11-18.
264. Schwab, M. E. and Caroni, P., Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro, *J Neurosci* 1988, 8, 2381-2393.
265. Schwab, M. E. and Thoenen, H., Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors, *J Neurosci* 1985, 5, 2415-2423.
266. Sendtner, M., Stockli, K. A., and Thoenen, H., Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration, *J Cell Biol* 1992, 118, 139-148.
267. Seyedin, S. M., Pehrson, J. R., and Cole, R. D., Loss of chromosomal high

- mobility group proteins HMG1 and HMG2 when mouse neuroblastoma and Friend erythroleukemia cells become committed to differentiation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, 78, 5988-5992.
268. Shen, S., Wiemelt, A. P., McMorris, F. A., and Barres, B. A., Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy, *Neuron* 1999, 23, 285-295.
269. Sievers, J., Bamberger, C., Debus, O. M., and Lucius, R., Regeneration in the optic nerve of adult rats: influences of cultured astrocytes and optic nerve grafts of different ontogenetic stages, *J Neurocytol* 1995, 24, 783-793.
270. Sievers, J., Hausmann, B., Unsicker, K., and Berry, M., Fibroblast growth factors promote the survival of adult rat retinal ganglion cells after transection of the optic nerve, *Neurosci Lett* 1987, 76, 157-162.
271. Singh, K., Groth-Vasselli, B., and Farnsworth, P. N., Interaction of DNA with bovine lens alpha-crystallin: its functional implications, *Int J Biol Macromol* 1998, 22, 315-320.
272. Skene, J., Axonal growth-associated proteins, *Annu Rev Neurosci* 1989, 12, 127-156.
273. Skene, J., Jacobson, R., Snipes, G., McGuire, C., Norden, J., and Freeman, J., A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes, *Science* 1986, 233, 783-786.
274. Skene, J. H. and Willard, M., Changes in axonally transported proteins during axon regeneration in toad retinal ganglion cells, *J Cell Biol* 1981, 89, 86-95.
275. Smalheiser, N. R., Crain, S. M., and Reid, L. M., Laminin as a substrate for retinal axons in vitro, *Brain Res* 1984, 314, 136-140.
276. Smulders, R. H., Merck, K. B., Aendekerk, J., Horwitz, J., Takemoto, L., Slingsby, C., Bloemendal, H., and De Jong, W. W., The mutation Asp69-->Ser affects the chaperone-like activity of alpha A-crystallin, *Eur J Biochem* 1995, 232, 834-838.
277. Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M., Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides, *Science* 1998, 281, 1515-1518.
278. Soto, I., Marie, B., Baro, D. J., and Blanco, R. E., FGF-2 modulates expression and distribution of GAP-43 in frog retinal ganglion cells after optic nerve injury, *J Neurosci Res* 2003, 73, 507-517.
279. Sperry, R. W., Optic nerve regeneration with return of vision in anurans, *J Neurophysiol* 1944, 7, 57-59.
280. Stelzner, D. J. and Strauss, J. A., A quantitative analysis of frog optic nerve

- regeneration: is retrograde ganglion cell death or collateral axonal loss related to selective reinnervation?, *J Comp Neurol* 1986, 245, 83-106.
281. Strata, P., Buffo, A., and Rossi, F., Mechanisms of axonal plasticity, *Arch Ital Biol* 1999, 137, 181-192.
 282. Strittmatter, S. M., Fankhauser, C., Huang, P. L., Mashimo, H., and Fishman, M. C., Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43, *Cell* 1995, 80, 445-452.
 283. Südhof, T. C. and Rizo, J., Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic, *Neuron* 1996, 17, 379-388.
 284. Takemoto, L., Emmons, T., and Horwitz, J., The C-terminal region of alpha-crystallin: involvement in protection against heat-induced denaturation, *Biochem J* 1993, 294 (Pt 2), 435-438.
 285. Tamm, E. R., Russell, P., Johnson, D. H., and Piatigorsky, J., Human and monkey trabecular meshwork accumulate alpha B-crystallin in response to heat shock and oxidative stress, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996, 37, 2402-2413.
 286. Tanito, M., Masutani, H., Nakamura, H., Ohira, A., and Yodoi, J., Cytoprotective effect of thioredoxin against retinal photic injury in mice, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002, 43, 1162-1167.
 287. Tardy, M., Role of laminin bioavailability in the astroglial permissivity for neuritic outgrowth, *An Acad Bras Cienc* 2002, 74, 683-690.
 288. Taylor, J. S. and Bampton, E. T., Factors secreted by Schwann cells stimulate the regeneration of neonatal retinal ganglion cells, *J Anat* 2004, 204, 25-31.
 289. Thanos, S., Alterations in the morphology of ganglion cell dendrites in the adult rat retina after optic nerve transection and grafting of peripheral nerve segments, *Cell Tissue Res* 1988, 254, 599-609.
 290. Thanos, S., Bahr, M., Barde, Y. A., and Vanselow, J., Survival and axonal elongation of adult rat retinal ganglion cells, *Eur J Neurosci* 1989, 1, 19-26.
 291. Thanos, S. and Mey, J., Type-specific stabilization and target-dependent survival of regenerating ganglion cells in the retina of adult rats, *J Neurosci* 1995, 15, 1057-1079.
 292. Thanos, S., Mey, J., and Wild, M., Treatment of the adult retina with microglia-suppressing factors retards axotomy-induced neuronal degradation and enhances axonal regeneration in vivo and in vitro, *J Neurosci* 1993, 13, 455-466.
 293. Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M., and Martin, G. R., Laminin--a glycoprotein from basement membranes, *J Biol Chem* 1979, 254, 9933-9937.

294. Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I., and Davison, M., Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology, *Proteomics* 2001, 1, 377-396.
295. Udvardia, A. J., Koster, R. W., and Skene, J. H., GAP-43 promoter elements in transgenic zebrafish reveal a difference in signals for axon growth during CNS development and regeneration, *Development* 2001, 128, 1175-1182.
296. Ueda, Y., Duncan, M. K., and David, L. L., Lens proteomics: the accumulation of crystallin modifications in the mouse lens with age, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002, 43, 205-215.
297. Valter, K., Bisti, S., and Stone, J., Location of CNTFRalpha on outer segments: evidence of the site of action of CNTF in rat retina, *Brain Res* 2003, 985, 169-175.
298. van Noort, J. M., Bajramovic, J. J., Plomp, A. C., and van Stipdonk, M. J., Mistaken self, a novel model that links microbial infections with myelin-directed autoimmunity in multiple sclerosis, *J Neuroimmunol* 2000, 105, 46-57.
299. van Stipdonk, M. J., Willems, A. A., Verbeek, R., Boog, C. J., and van Noort, J. M., T- and B-cell nonresponsiveness to self-alphaB-crystallin in SJL mice prevents the induction of experimental allergic encephalomyelitis, *Cell Immunol* 2000, 204, 128-134.
300. Vanselow, J., Müller, B., and Thanos, S., Regenerating axons from adult chick retinal ganglion cells recognize topographic cues from embryonic central targets, *Vis Neurosci* 1991, 6, 569-576.
301. Vanselow, J., Schwab, M. E., and Thanos, S., Responses of Regenerating Rat Retinal Ganglion Cell Axons to Contacts with Central Nervous Myelin in vitro, *Eur J Neurosci* 1990, 2, 121-125.
302. Verdi, J. M., Groves, A. K., Farinas, I., Jones, K., Marchionni, M. A., Reichardt, L. F., and Anderson, D. J., A reciprocal cell-cell interaction mediated by NT-3 and neuregulins controls the early survival and development of sympathetic neuroblasts, *Neuron* 1996, 16, 515-527.
303. Vidal-Sanz, M., Bray, G. M., Villegas-Perez, M. P., Thanos, S., and Aguayo, A. J., Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat, *J Neurosci* 1987, 7, 2894-2909.
304. Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Bray, G. M., and Aguayo, A. J., Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats, *J Neurobiol* 1993, 24, 23-36.
305. Walsh, N., Valter, K., and Stone, J., Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina,

- Experimental Eye Research 2001, 72, 495-501.
306. Wang, K. C., Koprivica, V., Kim, J. A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R. L., and He, Z., Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth, *Nature* 2002, 417, 941-944.
 307. Watanabe, M. and Fukuda, Y., Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats, *Prog Retin Eye Res* 2002, 21, 529-553.
 308. Watanabe, M. and Rodieck, R. W., Parasol and midget ganglion cells of the primate retina, *J Comp Neurol.* 1989, 289, 434-454.
 309. Watanabe, M., Sawai, H., and Fukuda, Y., Number, distribution, and morphology of retinal ganglion cells with axons regenerated into peripheral nerve graft in adult cats, *J. Neurosci.* 1993, 13, 2105-2117.
 310. Weibel, D., Cadelli, D., and Schwab, M. E., Regeneration of lesioned rat optic nerve fibers is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors, *Brain Res* 1994, 642, 259-266.
 311. Wen, R., Song, Y., Cheng, T., Matthes, M. T., Yasumura, D., LaVail, M. M., and Steinberg, R. H., Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina, *J Neurosci* 1995, 15, 7377-7385.
 312. Wiederkehr, A., Staple, J., and Caroni, P., The motility-associated proteins Gap-43, MARCKS, and CAP-23 share unique targeting and surface activity-inducing properties, *Exp Cell Res* 1997, 236, 103-116.
 313. Wilkens, S., Dunn, S. D., Chandler, J., Dahlquist, F. W., and Capaldi, R. A., Solution structure of the N-terminal domain of the delta subunit of the E. coli ATPsynthase, *Nat Struct Biol* 1997, 4, 198-201.
 314. Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Sanchez, J. C., Bairoch, A., and Hochstrasser, D. F., Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number, *Electrophoresis* 1998, 19, 1501-1505.
 315. Winkler, B. S., Boulton, M. E., Gottsch, J. D., and Sternberg, P., Oxidative damage and age-related macular degeneration, *Mol Vis* 1999, 5, 32.
 316. Wistow, G., Lens crystallins: gene recruitment and evolutionary dynamism, *Trends Biochem Sci* 1993, 18, 301-306.
 317. Wodarczyk, L., Merrill, V. K., and Perry, G. W., Differential regulation of fast axonally transported proteins during the early response of rat retinal ganglion cells to axotomy, *J Neurochem* 1997, 68, 1114-1123.
 318. Wong, P., Kutty, R. K., Darrow, R. M., Shivaram, S., Kutty, G., Fletcher, R. T., Wiggert, B., Chader, G., and Organisciak, D. T., Changes in clusterin expression associated with light-induced retinal damage in rats, *Biochem Cell Biol* 1994, 72,

- 499-503.
319. Wouters, B. C., Bock-Samson, S., Little, K., and Norden, J. J., Up-regulation of fast-axonally transported proteins in retinal ganglion cells of adult rats with optic-peroneal nerve grafts, *Brain Res Mol Brain Res* 1998, 53, 53-68.
320. Xi, J., Farjo, R., Yoshida, S., Kern, T. S., Swaroop, A., and Andley, U. P., A comprehensive analysis of the expression of crystallins in mouse retina, *Mol Vis* 2003, 9, 410-419.
321. Yin, Y., Cui, Q., Li, Y., Irwin, N., Fischer, D., Harvey, A. R., and Benowitz, L. I., Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration, *J. Neurosci.* 2003, 23, 2284-2293.
322. Yip, H. K. and So, K.-F., Axonal regeneration of retinal ganglion cells: effect of trophic factors, *Progress in Retinal and Eye Research* 2000, 19, 559-575.
323. Yoshida, K., Muraki, Y., Ohki, K., Harada, T., Ohashi, T., Matsuda, H., and Imaki, J., C-fos gene expression in rat retinal cells after focal retinal injury, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995, 36, 251-254.
324. Zhang, F., Lu, C., Severin, C., and Sretavan, D. W., GAP-43 mediates retinal axon interaction with lateral diencephalon cells during optic tract formation, *Development* 2000, 127, 969-980.
325. Zhao, X., Ahram, A., Berman, R. F., Muizelaar, J. P., and Lyeth, B. G., Early loss of astrocytes after experimental traumatic brain injury, *Glia* 2003, 44, 140-152.
326. Zhou, F. C. and Wei, L. N., Expression of cellular retinoc acid-binding protein I is specific to neurons in adult transgenic mouse brain, *Gene Expr Patterns* 2001, 1, 67-72.
327. Zhu, Q. and Julien, J. P., A key role for GAP-43 in the retinotectal topographic organization, *Exp Neurol* 1999, 155, 228-242.
328. Zischka, H., Weber, G., Weber, P. J., Posch, A., Braun, R. J., Buhringer, D., Schneider, U., Nissum, M., Meitinger, T., Ueffing, M., and Eckerskorn, C., Improved proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria by free-flow electrophoresis, *Proteomics* 2003, 3, 906-916.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Karin Rose
Geboren: 13.07.1973, in Meschede
Anschrift: Marientalstr. 76, 48149 Münster
Telefon: 0251/2390610
E-mail: krose@uni-muenster.de

Schulbildung

08/1980 – 06/1984 Grundschule Hirschberg
08/1984 – 07/1990 Realschule Belecke
08/1990 – 06/1993 Gymnasium Warstein
06/1993 Abitur

Studium und beruflicher Werdegang

10/1993 – 10/1997 Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
11/1997 – 04/1998 Pharmaziepraktikum, Adler-Apotheke Gießen
05/1998 – 10/1998 Pharmaziepraktikum, Bayer AG, Leverkusen
Zentrale Forschung
11/1998 3. Staatsexamen und Approbation zur Apothekerin

01/1999 – 10/2000 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharm. Chemie,
Philipps-Universität Marburg, Abteilung Biochemie, AK Klumpp
11/2000 – dato Wissenschaftliche Angestellte und Promotion in der Augenklinik des UK
Münster, Abteilung für Exp. Ophthalmologie, AK Thanos
07/2004 Abgabe der Dissertation

8. Publikationsliste

Originalarbeiten:

1. Kukley M., Schaper C., Becker A., Rose K., Krieglstein J.
Effect of 5-hydroxytryptamine 1A receptor agonist BAY X 3702 on BCL-2 and BAX proteins level in the ipsilateral cerebral cortex of rats after transient focal ischaemia.
Neuroscience 2001,107 (3), 405-413.
2. König S. Schmidt O., Rose K., Thanos S., Besselmann M., Zeller M.
Sodium dodecyl sulfate versus acid-labile surfactant gel electrophoresis: comparative proteomic studies on rat retina and mouse brain.
Electrophoresis 2003, Feb, 24 (4), 751-756
3. Schütz E., Rose K. and Thanos S.
Regeneration of ganglion cell axons into a peripheral nerve graft alters retinal expression of glial markers and decreases vulnerability to re-axotomy
Restorative Neurology and Neuroscience, 2003, 21, 11-18
4. Thanos S., Püttmann S., Naskar R., Rose K., Langkamp-Flock M. and Paulus W.
Potential role of Pax-2 in retinal axon navigation through the chick optic nerve stalk and optic chiasm
Journal of Neurobiology, 2004, Apr, 59 (1), 8-23
5. Thanos S., Rose K., Volk G.F. and Schlatt S.
Axonal regeneration of neurons in the mature monkey retina in organ culture
(eingereicht)
6. Rose K., König S., Zeller M. and Thanos S.
Proteomic studies of the regenerating rat retina
(in Vorbereitung)

7. Rose K., König S., Zeller M., Lütjens M. and Thanos S.
Proteomic analysis of the regenerating monkey retina
(in Vorbereitung)
8. Rose K., Schütz E., Lee Y., Naskar R. and Thanos S.
Role of GFAP in the regeneration of RGCs
(in Vorbereitung)

Abstracts:

1. Thanos S., Schuetz E. and Rose K.
Simple requirements for axonal regeneration of mature primate retinal ganglion cells in vitro
Program No. 334.3. 2002 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2002. CD-ROM
2. Rose K., Zeller M., König S. and Thanos S.
Proteomic analysis of the regenerating marmoset (*C. jacchus*) retina
Proceedings of the Anatomical Society of Great Britain and Ireland
Journal of Anatomy, 2003, Jul, 203 (1), 143 - 154

Poster:

1. Rose K. and Thanos S.
Analysis of proteins expressed in regenerating neurons of the adult retina
Proteomic Forum, Sept.2001, Technische Universität München, Deutschland
2. Stupp T., Rose K., Busse H. and Thanos S.
Influence of lens epithelium on regenerating adult retinal axons
Annual Meeting of the ARVO, Mai 2002, Ford Lauderdale, Florida, USA

3. Thanos S., Schuetz E. and Rose K.
Simple requirements for axonal regeneration of mature primate retinal ganglion cells in vitro
International meeting of the Society for Neuroscience, 2002, Washington D.C., USA
4. Rose K., Zeller M., König S. and Thanos S.
Proteomic analysis of the regenerating marmoset (*C. jacchus*) retina
Symposium on "Repairing the nervous system" of the Anatomical Society of Great Britain and Ireland, Jan. 2003, Egham, Surrey, Great Britain
5. Schmidt O., Zeller M., Rose K., Thanos S., Besselmann M. and König S.
Detergent change in gel electrophoresis supports proteomic analysis
DGMS, März 2003, Münster, Deutschland
6. Rose K., Zeller M., König S. and Thanos S.
Studies of the regenerating marmoset (*Callithrix jacchus*) retina proteome
29th Neurobiology Conference, Juni 2003, Göttingen, Deutschland
7. Rose K., Zeller M., König S. and Thanos S.
Proteome Analysis of the regenerating retinas in marmosets (*Callithrix jacchus*)
Proteomic Forum, Sept. 2003, Technische Universität München, Deutschland
8. Lasseck J., Rose K., König S., Naskar R. and Thanos S.
Proteomic analysis of retinas from glaucomatous eye regenerating axons in organ culture
Annual Meeting of the ARVO, Mai 2004, Ford Lauderdale, Florida, USA