

Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin
der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

in Zusammenarbeit mit dem

Zentralinstitut für Seelische Gesundheit in Mannheim

Abteilung Psychopharmakologie

Leitung: Professor Dr. R. Spanagel

Etablierung von home-made cDNA Microarrays und
Untersuchung der Genexpression bei Posttraumatischer
Belastungsstörung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Judith Monika Zieker, geb. Fliegner

aus

Tübingen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Gebicke-Haerter

*Meinem Ehemann Derek
meinen Eltern, Beate und Harald Fliegner
meiner Schwester Angelika*

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 Einleitung | 5 |
| 2 Material | 22 |
| 2.1 Geräte und Chemikalien | 22 |
| 3 Methoden..... | 25 |
| 3.1 Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays und Etablierung der Hybridisierung-Methode des cDNA Microarrays | 25 |
| 3.1.1 Allgemeines zum cDNA Microarray..... | 25 |
| 3.1.2 Theoretisches Hintergrundwissen zur Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays | 26 |
| 3.1.2.1 Auswahl der Art der Produkte zum Auftragen auf den Slide..... | 26 |
| 3.1.2.2 Auswahl der Slides..... | 27 |
| 3.1.2.3 Auswahl des Spottingverfahrens..... | 27 |
| 3.1.3 Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays..... | 28 |
| 3.1.3.1 Etablierung und Optimierung der PCR für 384-well Platten in 50µl Ansätzen..... | 29 |
| 3.1.3.2 Entwerfen und Etablierung von Programmen für einen Pipettierroboter | 31 |
| 3.1.3.3 Etablierung und Optimierung des Spottingpuffers..... | 32 |
| 3.1.3.4 Entwerfen und Etablierung von Programmen für den Microarray-Spotter | 33 |
| 3.2 Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays zu Forschungszwecken . | 34 |
| 3.2.1 Aufzucht der Bakterien..... | 35 |
| 3.2.2 Amplifizierung der cDNA-Inserts | 36 |
| 3.2.3 Spotten von PCR Produkten | 37 |
| 3.3 Etablierung der Hybridisierung eines cDNA Microarrays | 38 |
| 3.3.1 Isolierung und Vorbereitung der Nukleinsäuren | 40 |
| 3.3.2 Sondenherstellung mithilfe der cDNA-Synthese | 41 |
| 3.3.3 Prähybridisierung der Slides und Hybridisierung der Proben | 43 |
| 3.3.4 Quantifizierungen – Überprüfungen – Sicherheiten..... | 46 |
| 3.4 Vorversuche zur Etablierung eines cDNA Microarrays..... | 48 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.4.1 Validierung des neuen cDNA Microarrays | 50 |
| 3.5 PTSD | 51 |
| 3.5.1 Blutentnahme bei den PTSD Patienten und den entsprechenden Kontrollen | 51 |
| 3.5.1.1 <i>Das Patientenkollektiv</i> | 51 |
| 3.5.2 Aufarbeitung der RNA, Amplifikation und Labeling der Proben | 54 |
| 3.5.3 Hybridisierung der Proben..... | 55 |
| 3.5.4 Scannen..... | 56 |
| 3.5.5 Signal- und Bildextraktion..... | 56 |
| 3.5.6 Normalisierung | 56 |
| 3.5.7 Detektion differentiell exprimierter Gene..... | 57 |
| 3.5.8 Quantitative Real Time PCR | 58 |
| 4 Ergebnisse | 62 |
| 4.1 Microarray-Ergebnisse | 62 |
| 4.2 Real Time PCR-Ergebnisse | 64 |
| 5 Diskussion..... | 67 |
| Zusammenfassung der Ergebnisse..... | 67 |
| Einfluss einer lange zurückliegenden Traumasituation auf die Genexpression | 67 |
| PTSD und oxidativer Stress..... | 68 |
| PTSD und Entzündung | 73 |
| Weitere gefundene Gene | 76 |
| Schlussfolgerung | 79 |
| Zusammenfassung | 80 |
| Protokolle | 82 |
| Liste der Gene auf dem Microarray | 98 |
| Literaturverzeichnis | 105 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Algorithmus zum Vorgehen bei PTSD unter Berücksichtigung der traumareaktiver Entwicklung | 16 |
| Abbildung 2: Darstellung der Chip Präparation..... | 35 |
| Abbildung 3: Qualitätskontrolle der PCR-Amplifikate vor dem Spotten | 37 |
| Abbildung 4: Darstellung eines hybridisierten Array nach dem Scannen | 38 |
| Abbildung 5: Ablauf der Probenvorbereitung..... | 39 |
| Abbildung 6: Darstellung des Hybridisierungsablaufs | 44 |
| Abbildung 7: Auswertung zweier Dye-Swap-Versuche mit unstimulierten und stimulierten Blutproben | 51 |
| Abbildung 8: Ausschnitt einer RNA-Qualitätsbestimmung mit dem Bioanalyzer von Agilent | 54 |
| Abbildung 9: Darstellung der Normalisationsprozedur | 60 |
| Abbildung 10: Box-plots der Real Time PCR Messungen | 65 |
| Abbildung 11: Interaktion der gefundenen Gene im oxidativen Stoffwechsel..... | 70 |
| Abbildung 12: Darstellung des Zusammenhangs IL16 – EDG1 – Caspase 3..... | 76 |

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-------|----------------------------|
| bp | Basenpaare |
| cDNA | complementary DNA |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| g | Gramm |
| ID | Identifikation |
| l | Liter |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| µl | Mikroliter |
| ng | Nanogramm |
| nl | Nanoliter |
| nm | Nanometer |
| pg | Pikogramm |
| pmol | Pikomol |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| vs | Versus (Gegenüberstellung) |

1 Einleitung

1. Definition der posttraumatischen Belastungsstörung

Eine posttraumatische Belastungsstörung (posttraumatic stress disorder, PTSD) ist eine protrahierte Reaktion auf eine belastende Situation kürzerer oder längerer Dauer, mit außergewöhnlicher Bedrohung oder katastrophenartigem Ausmaß, die bei fast jedem Menschen eine tiefe Verzweiflung hervorruft. Die Definition wurde so von der Internationalen Statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme in der 10. Revision und der Version von 2004 (ICD-10) festgelegt.

Nach der Klassifikation des von der American Psychiatric Association 1994 veröffentlichten Leitfadens „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV“ (DMS-IV) handelt es sich bei PTSD um einen gehemmten Zustand nach einem furchteinflößenden Ereignis, bei dem die betroffenen Menschen die Erfahrung von Todesbedrohung, Lebensgefahr oder starker Körperverletzung gemacht, bzw. an anderen Personen erlebt haben.

2. Die akute Belastungsreaktion

Für eine richtige Diagnose ist es entscheidend, die posttraumatische Belastungsstörung von einer akuten Belastungsreaktion abzugrenzen. Ein akute Belastungsreaktion ist laut ICD-10 eine vorübergehende Störung, die sich bei einem psychisch nicht manifest gestörten Menschen als Reaktion auf eine außergewöhnliche physische oder psychische Belastung entwickelt, und die im Allgemeinen innerhalb von Stunden bis Tagen abklingt. Typisch ist eine wechselnde Symptomatik, die häufig mit einer Bewusstseinsengung oder einer Art „Betäubung“ beginnt und mit eingeschränkter Aufmerksamkeit, einer Unfähigkeit Reize zu verarbeiten und Desorientiertheit einhergehen kann. Hierauf kann eine Phase des Rückzugs aus der Umweltsituation erfolgen, die bis zum dissoziativen Stupor führen kann oder aber eine Phase der Unruhe und Überaktivität, wie z.B. einer Fluchtreaktion. Man beobachtet häufig vegetative

Zeichen panischer Angst wie Tachykardie, Schwitzen und Erröten. Das Auftreten einer teilweisen oder vollständiger Amnesie bezüglich der Phase der akuten Belastungsreaktion ist möglich. Die Symptome treten meist innerhalb von Minuten auf und dauern höchstens zwei bis drei Tage, in der Regel gehen sie innerhalb von Stunden zurück.

3. Symptomatik bei der posttraumatischen Belastungsstörung

Im Gegensatz zur Symptomatik bei der akuten Belastungsreaktion ist das typische Merkmal bei der posttraumatischen Belastungsstörung das wiederholte Erleben des Traumas in sich ständig aufdrängenden Erinnerungen oder Alpträumen. In diesen sogenannten Flashbacks, Intrusionen oder auch Nachhallerinnerungen werden vom Patienten die gleichen sinnlichen Eindrücke wahrgenommen wie zum Zeitpunkt des Traumas. Es kann sich hierbei um bestimmte Bilder, Geräusche, Geschmacksempfindungen, Körperwahrnehmungen aber auch um emotionale und physische Reaktionsweisen handeln. Diese Flashbacks werden als sehr belastend erlebt und führen zur ständigen Angst, das Ereignis könnte sich wiederholen. Situationen und Aktivitäten, die Erinnerungen an das Trauma hervorrufen könnten, werden vermieden, was häufig mit zwischenmenschlichen Konflikten einhergeht. Zum Beispiel können Vergewaltigungsopfer funktionale Sexualstörungen entwickeln.

Parallel dazu tritt meist ein andauerndes Gefühl der emotionalen Betäubtheit auf. Die Mischung aus einer reduzierten emotionalen Reaktionsfähigkeit verbunden mit dem Gefühl der Entfremdung, sowie Gefühle von panischer Angst, großer Traurigkeit aber auch Ärger mit aggressiven Ausbrüchen, Wutanfällen und Schuldgefühlen stellen typische emotionale Reaktionen der Patienten dar. Das Desinteresse am Alltagsleben und Gleichgültigkeit gegenüber anderen Menschen sowie Freudlosigkeit gehören ebenfalls zum Symptomkomplex. Meist tritt ein Zustand von vegetativer Übererregbarkeit auf. Dieser manifestiert sich häufig in einer Vigilanzsteigerung und einem Hyperarousal, einer übermäßigen Schreckhaftigkeit und Schlafstörungen, aber auch Herzrasen, Schweißausbrüche, Ohnmachtsanfälle, Zittern, Hyperventilation oder Appetitlosigkeit können auftreten. Angst und depressive Verstimmungen sind häufig

mit den genannten Symptomen assoziiert. Auch eine übermäßige Beschäftigung mit dem Tod, Suizidgedanken und Selbstmordversuche sind nicht selten. Mit zunehmender Dauer der Erkrankung treten weitere psychiatrische Nebenerkrankungen auf, häufig sind, neben Depressionen, Substanzenmissbrauch und Alkoholabusus. Unter Umständen entwickelt der Patient Kontrollzwänge zur Angstbewältigung, dazu zählen beispielsweise die ständige Kontrolle von Türschlössern aus Angst vor Eindringlingen. Sehr häufig resultiert aufgrund der mannigfaltigen Symptome eine allgemeine Abgeschlagenheit mit Konzentrationsstörungen und Leistungsbeeinträchtigungen im Alltags- und Berufsleben, die bis zur Berufsunfähigkeit führen kann.

Der Beginn der posttraumatischen Belastungsstörung folgt dem Trauma mit einer zeitlichen Latenz, die Wochen bis Monate dauern kann. Der Verlauf ist wechselhaft. Eine Heilung ist möglich. Bei chronischem Verlauf ist der Übergang in eine andauernde Persönlichkeitsveränderung möglich.

4. Diagnostische Kriterien nach DSM-IV

Das DSM-IV nennt folgende diagnostische Kriterien:

A. Die Person wurde mit einem traumatischen Ereignis konfrontiert, bei dem die beiden folgenden Kriterien vorhanden waren:

- (1) Die Person erlebte, beobachtete oder war mit einem oder mehreren Ereignissen konfrontiert, die den tatsächlichen oder drohenden Tod oder ernsthafte Verletzung oder eine Gefahr der körperlichen Unversehrtheit der eigenen Person oder anderer Personen beinhalteten.
- (2) Die Reaktion der Person umfasste intensive Furcht, Hilflosigkeit oder Entsetzen.

B. Das traumatische Ereignis wird beharrlich auf mindestens eine der folgenden Weisen wiedererlebt:

- (1) wiederkehrende und eindringliche belastende Erinnerungen an das Ereignis, die Bilder, Gedanken oder Wahrnehmungen umfassen können.

- (2) Wiederkehrende, belastende Träume von dem Ereignis.
- (3) Handeln oder Fühlen, als ob das traumatische Ereignis wiederkehrt (beinhaltet das Gefühl, das Ereignis wiederzuerleben, Illusionen, Halluzinationen und dissoziative Flashback-Episoden, einschließlich solcher, die beim Aufwachen oder bei Intoxikationen auftreten).
- (4) Intensive psychische Belastung bei der Konfrontation mit internalen oder externalen Hinweisreizen, die einen Aspekt des traumatischen Ereignisses symbolisieren oder an Aspekte desselben erinnern.
- (5) Körperliche Reaktionen bei der Konfrontation mit internalen oder externalen Hinweisreizen, die einen Aspekt des traumatischen Ereignisses symbolisieren oder an Aspekte desselben erinnern.

C. Anhaltende Vermeidung von Reizen, die mit dem Trauma verbunden sind, oder eine Abflachung der allgemeinen Reagibilität (vor dem Trauma nicht vorhanden).

Mindestens drei der folgenden Symptome liegen vor:

- (1) bewusstes Vermeiden von Gedanken, Gefühlen oder Gesprächen, die mit dem Trauma in Verbindung stehen,
- (2) bewusstes Vermeiden von Aktivitäten, Orten oder Menschen, die Erinnerungen an das Trauma wachrufen,
- (3) Unfähigkeit, einen wichtigen Aspekt des Traumas zu erinnern,
- (4) deutlich vermindertes Interesse oder verminderte Teilnahme an wichtigen Aktivitäten,
- (5) Gefühl der Losgelöstheit oder Entfremdung von anderen,
- (6) eingeschränkte Bandbreite des Affekts (z.B. Unfähigkeit, zärtliche Gefühle zu empfinden),
- (7) Gefühl einer eingeschränkten Zukunft (z.B. erwartet nicht, Karriere, Ehe, Kinder oder normal langes Leben zu haben).

D. Anhaltende Symptome erhöhten Arousal (vor dem Trauma nicht vorhanden).

Mindestens zwei der folgenden Symptome liegen vor:

- (1) Schwierigkeiten ein- oder durchzuschlafen,
- (2) Reizbarkeit oder Wutausbrüche,
- (3) Konzentrationsschwierigkeiten,
- (4) übermäßige Wachsamkeit (Hypervigilanz),
- (5) übertriebene Schreckreaktion.

E. Das Störungsbild (Symptome unter Kriterium B, C und D) dauert länger als 1 Monat.

F. Das Störungsbild verursacht in klinisch bedeutsamer Weise Leiden oder Beeinträchtigungen in sozialen, beruflichen oder anderen wichtigen Funktionsbereichen.

5. Diagnostische Kriterien nach ICD-10

Nach den Forschungskriterien des ICD-10 ist eine posttraumatische Belastungsstörung (F43.1) folgendermaßen definiert:

- A. Die Betroffenen sind einem kurz oder lang dauernden Ereignis oder Geschehen von außergewöhnlicher Bedrohung oder mit katastrophalem Ausmaß ausgesetzt, das nahezu bei jedem tief greifende Verzweiflung auslösen würde.
- B. Anhaltende Erinnerungen oder Wiedererleben der Belastung durch aufdringliche Nachhallerinnerungen (Flashbacks), lebendige Erinnerungen, sich wiederholende Träume oder durch innere Bedrängnis in Situationen, die der Belastung ähneln oder mit ihr in Zusammenhang stehen.

C. Umstände, die der Belastung ähneln oder mit ihr im Zusammenhang stehen, werden tatsächlich oder möglichst vermieden. Dieses Verhalten bestand nicht vor dem belastenden Erlebnis.

D. Entweder (1) oder (2)

(1) Teilweise oder vollständige Unfähigkeit, einige wichtige Aspekte der Belastung zu erinnern.

(2) Anhaltende Symptome einer erhöhten psychischen Sensitivität und Erregung (nicht vorhanden vor der Belastung) mit zwei der folgenden Merkmale:

- a. Ein- und Durchschlafstörungen
- b. Reizbarkeit oder Wutausbrüche
- c. Konzentrationsschwierigkeiten
- d. Hypervigilanz
- e. erhöhte Schreckhaftigkeit

E. Die Kriterien B, C und D. treten innerhalb von sechs Monaten nach dem Belastungsereignis oder nach Ende einer Belastungsperiode auf. (In einigen speziellen Fällen kann ein späterer Beginn berücksichtigt werden, dies sollte aber gesondert angegeben werden).

6. Arten der traumatischen Erfahrungen

Prinzipiell kann man die erlebten traumatischen Erfahrungen, die zu einer posttraumatischen Belastungsstörung führen können in fünf große Bereiche untergliedern.

(1) Individuelle Gewalt

- a. Körperliche Misshandlung
- b. Sexueller Missbrauch
- c. Vergewaltigung

- d. Entführung, Geiselhaft
- e. Körperverletzung
- f. Folterung
- g. Angedrohter oder versuchter Mord

(2) Kollektive Gewalt

- a. Kriegserfahrungen, Kampfhandlungen, Terrorismus
- b. Kriegsverwundung
- c. Verschleppung, Verfolgung, Vertreibung
- d. Unmenschliche Haftbedingungen (Konzentrationslager)
- e. Aussteiger aus Sekten

(3) Naturkatastrophen

- a. Großbrand
- b. Blitzschlag
- c. Überschwemmung
- d. Lawinenunglück
- e. Erdbeben
- f. Vulkanausbruch
- g. Tornados

(4) Technische Katastrophen

- a. Autounfall
- b. Eisenbahn-, Schiffs-, Flugzeugunglück
- c. Explosionen
- d. Arbeitsunfall
- e. Chemieunfall

(5) Körperliche oder psychische Extremlastungen

- a. Schwere Verbrennungen
- b. Extreme Schmerzzustände
- c. Gehirnblutung
- d. Überlebter Herzstillstand
- e. Schwerer allergischer Schock
- f. Lebensbedrohliche Erkrankung

7. Traumahäufigkeit und -dauer

Man kann des weiteren zwischen einer einmaligen traumatischen Erfahrung und lange andauernden, bzw. wiederholten traumatischen Erfahrungen unterscheiden. Zu Ersterem zählen Überfall, Vergewaltigung oder Unfall. Lange andauernde Erfahrungen oder sich mehrfach wiederholende Traumata, die eine posttraumatische Belastungsstörung hervorrufen können, sind beispielsweise Kriegserfahrungen, jahrelanger sexueller Missbrauch oder andauernde körperliche Misshandlung.

8. Epidemiologie

In der amerikanischen Studie National Comorbidity Survey (NCS), die im Zeitraum vom September 1990 bis Februar 1992 durchgeführt wurde, wurden repräsentativ 8098 Personen im Alter zwischen 15 und 54 Jahren befragt. Ziel der Studie war es einen Überblick über die Epidemiologie der Erkrankung des PTSD zu erhalten.

Die Studie ergab, dass die Wahrscheinlichkeit eines amerikanischen Bürgers irgendwann in seinem Leben an PTSD zu erkranken 7,8 % betrug. Dabei waren Frauen mit 10,4 % deutlich häufiger betroffen als Männer, bei denen nur 5 % in ihrem Leben eine posttraumatische Belastungsstörung entwickelten.

Dies ist ein geringer Anteil, wenn man bedenkt, dass 60,7 % der Männer und 51,2 % aller Frauen mindestens ein traumatisches Ereignis in ihrem Leben angeben.

Die am häufigsten mit PTSD assoziierten Traumata sind bei Männern Vergewaltigung, Krieg und Kampfhandlungen, Vernachlässigung und Missbrauch in der Kindheit. Bei Frauen sind die häufigsten Auslöser für ein PTSD Vergewaltigung, sexuelle Belästigung, körperlicher Angriff, Bedrohung mit einer Waffe und Missbrauch in der Kindheit.

Epidemiologie in Deutschland

Epidemiologische Zahlen der Posttraumatischen Belastungsstörung in Deutschland wurden im Jahr 2000 in einer Studie von Perkonig et al. erhoben.: In einer repräsentativen Bevölkerungsgruppe, die 3021 Probanden im Alter von 14 bis 24 Jahre umfasste, berichteten 26 % der männlichen und 17,7 % der weiblichen Teilnehmer von mindestens einem traumatisches Ereignis in ihrem Leben. Im Gegensatz zu den amerikanischen Zahlen, war die Prävalenz einer voll ausgeprägten chronischen Posttraumatischen Belastungsstörung jedoch deutlich niedriger. Nur 1 % der männlichen Teilnehmer und 2,2 % der Teilnehmerinnen wiesen im Rahmen des Munich Composite International Diagnostic Interview (CIDI) ein chronisches PTSD auf (65).

Eine etwas kleinere Studie, die 1999 an der Universität Bremen durchgeführt wurde, ergab für Jugendliche im Alter von 12 bis 17 Jahren bei einer Probandenanzahl von 1035 eine Prävalenz der chronischen Erkrankung an PTSD von 1,6 %. Dabei waren auch hier häufiger weibliche Probanden betroffen (1,8 % weiblich vs. 1,4 % männlich). 22,5 % der Probanden waren mindestens einmal in ihrem Leben mit einem lebensbedrohlichen, traumatischen Ereignis konfrontiert (23).

9. Behandlung der Posttraumatischen Belastungsstörung

Ein 1992 veröffentlichtes Review über die Behandlungsmöglichkeiten beim Posttraumatischen Belastungssyndrom stellte fest, dass medikamentöse Therapien einen bescheidenen Effekt auf Patienten mit PTSD haben. Bessere Ergebnisse zeigten sich jedoch bei der Anwendung von Techniken der Verhaltenstherapie. Auch kognitive und psychodynamische Therapien sowie der Einsatz von Hypnose scheinen einen günstigen Effekt zu haben. Jedoch wurde deutlich auf die Komplikationen bei der Behandlung vor

allem mit traumakonfrontierenden Techniken hingewiesen. Eine wirklich wirksame Behandlung wurde nicht gefunden (72).

Die Behandlungsmöglichkeiten bei Patienten mit Posttraumatischen Belastungsstörungen lassen sich in drei Bereiche untergliedern.

(1) medikamentöse Therapie

Der pharmakologische Ansatz zur Therapie Posttraumatischer Belastungsstörungen beinhaltet als Therapie der ersten Wahl den Einsatz von selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern (SSRI). SSRI gehören zu den modernen Antidepressiva, die über die Hemmung der Serotonin-Aufnahme zu einer Stimmungsaufhellung und häufig zu einer Antriebssteigerung führen. Dabei haben sie im Gegensatz zu den tri- oder tetrazyklischen Antidepressiva keine anticholinergen und wenig kardiovaskuläre Nebenwirkungen. Als weitere Therapieansätze, besonders zur Behandlung von Angstzuständen kommen Benzodiazepine zum Einsatz. Antikonvulsiva, Stimmungsaufheller, atypische Neuroleptika, Alpha1-Adreno Antagonisten und Beta-Blocker gelten ebenfalls als Therapieoptionen. Eine Verbesserung der PTSD Symptome, bzw. die Vermeidung von Rückfällen durch die oben angeführten Pharmaka wird in der Literatur diskutiert (18). Die gezielte pharmakologische Behandlung aller PTSD Symptome ist nicht möglich. Es werden lediglich einzelne Symptome behandelt.

(2) Psycho- und Verhaltenstherapie

Im Rahmen der Behandlung eines PTSD wurde in der Literatur gezeigt, dass Kognitive Verhaltenstherapie das Management der Krankheit verbessern kann (27). Unter anderem werden Methoden der "Prolonged exposure (PE) therapy", einer spezifischen Form der Konfrontationstherapie eingesetzt. Entscheidend ist die dosierte Rekonfrontation mit dem auslösenden Ereignis mit dem Ziel der Durcharbeitung und Integration unter geschützten therapeutischen Bedingungen. Wichtige Ansätze stellen auch die Erlernung von Stressbewältigung und die Einbeziehung adjuvanter Verfahren dar. Dazu zählen unter anderem die

stabilisierende Körpertherapie, künstlerische Therapie, psychosoziale Reintegration sowie soziale Unterstützung.

(3) Sonstige Verfahren

In den letzten Jahren wurden die Behandlungsoptionen des PTSD um das Verfahren des EMDR (Eye movement desensitization and reprocessing) ergänzt. Bei dieser Technik werden vom Patienten rhythmische Augenbewegungen ausgeführt, während er sich auf das traumatische Erlebnis konzentriert. Als Wirkungsmechanismus wird diskutiert, dass EMDR dabei abwechselnd beide Gehirnhälften stimuliert und damit die Möglichkeit schafft, Gefühle logisch zu be- und verarbeiten. Hintergrund ist die angenommene blockierte Weiterleitung von den, beim Trauma erfahrenen, Sinneseindrücken von der Amygdala zum Broca-Zentrum in der linken Hemisphäre. EMDR spielt in der Behandlung von PTSD Patienten eine noch untergeordnete Rolle. Die Literatur bestätigt den positiven Einfluss von EMDR auf die PTSD Symptomatik. Zum Teil wird EMDR als ergänzende Therapie angewandt (14; 60; 74).

10. Übersicht traumareaktiver Entwicklungen

Aus den Leitlinien Psychotherapeutische Medizin und Psychosomatik (der deutschen psychosomatisch-psychotherapeutischen Fachgesellschaften DGPM, DKPM, AÄGP, DGPT und DeGPT) (25)

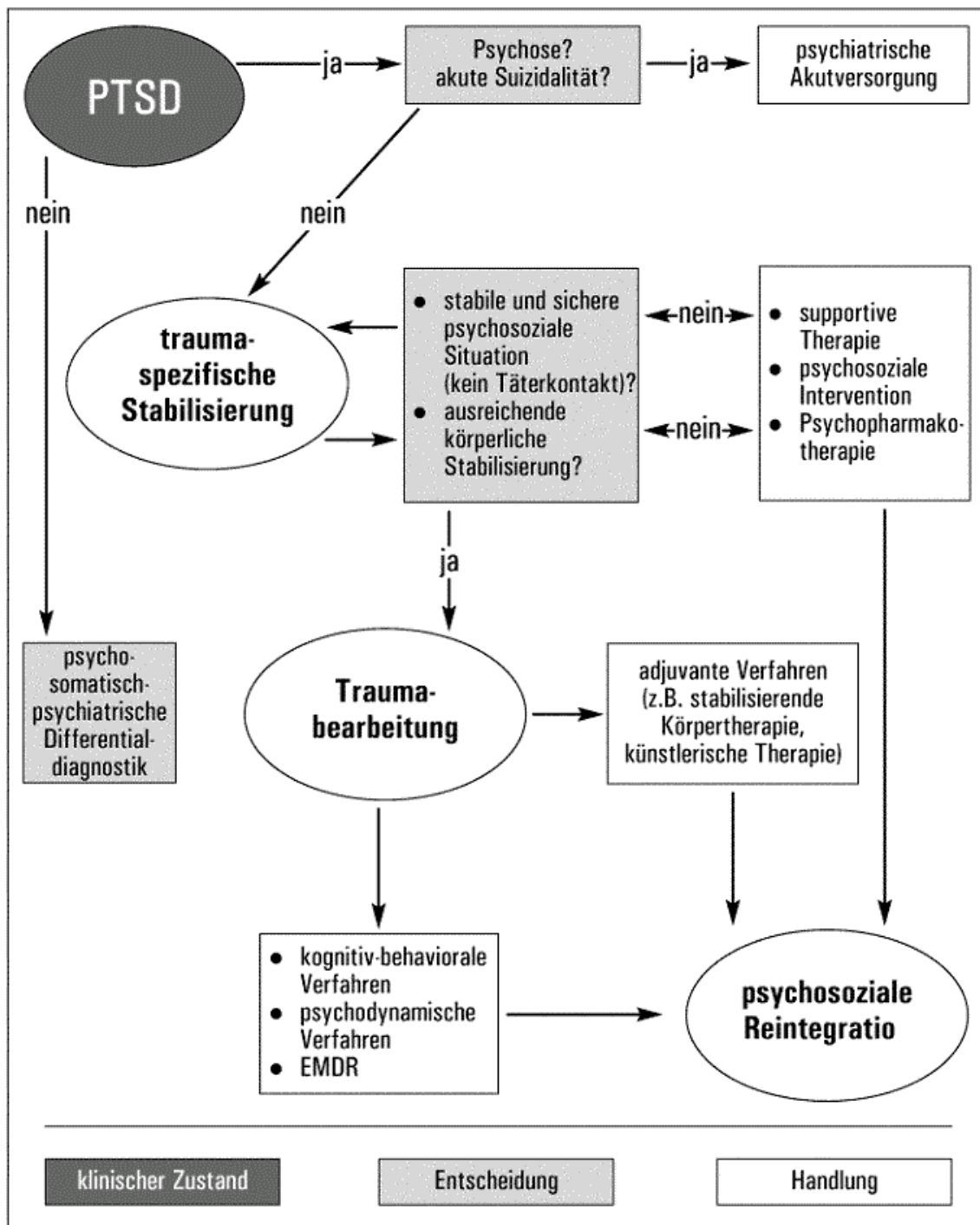


Abbildung 1: Algorithmus zum Vorgehen bei PTSD unter Berücksichtigung der traumareaktiven Entwicklung

Anhand dieses Schemas aus den Leitlinien für Psychotherapeutische Medizin und Psychosomatik (25) ist die Entscheidungsfindung bzgl. Behandlung eines Patienten mit

PTSD-Symptomatik möglich. Dazu muss im ersten Schritt geklärt werden, ob ein PTSD vorliegt. Ist dies der Fall, muss als nächstes ein eventueller akuter Handlungsbedarf festgestellt und eine entsprechende Therapie eingeleitet werden. Anschließend führt der Algorithmus zur symptomangepassten Therapie unter Berücksichtigung der sozialen und physischen Verfassung des Patienten.

11. Entstehungsmodelle des PTSD

Zur möglichen Entstehung einer Posttraumatischen Belastungsstörung werden fünf verschiedene Erklärungsmodelle diskutiert (68).

- (1) Im psychodynamischem Modell, das auf die Erkenntnisse der Psychoanalyse und damit auf Sigmund Freud zurückgeht, wird das Trauma als überwältigendes Reizgeschehen betrachtet, welches eine normale psychische Abwehr unmöglich macht. Es handelt sich um einen klassischen innerseelischen (intrapsychischen) Konflikt, dem der Patient mit zwei Mechanismen begegnet. Zum einen versucht er das Geschehene zu verdrängen und zu leugnen, zum anderen unterliegt er dem ständigen Zwang, sich zu erinnern um das Erlebte eventuell doch noch aufarbeiten zu können.

- (2) Die entwicklungspsychologische Theorie basiert auf Auswirkungen von frühen körperlichen und sexuellen Traumata. Bei der damit verbundenen relativen Schutzlosigkeit des Kindes hat dies Einfluss auf dessen weitere psychische Entwicklung. Die bisherigen Forschungsergebnisse zeigen, dass früh traumatisierte Heranwachsende oft schwerwiegende Defizite in der Fähigkeit zur Steuerung intensiver Affekte und sexueller, bindender oder aggressiver Impulse aufweisen. Sie sind zudem in ihrer Bindungsfähigkeit erheblich gestört. Folgen früher Traumatisierungen sind häufig auch Aufmerksamkeits- und Konzentrationsstörungen, dissoziales Verhalten, Entstehung körperlicher Symptome als Ausdruck seelischer Probleme (Somatisierung) sowie eine

tiefgreifende Hoffnungslosigkeit und Mangel an Urvertrauen. Je früher die Traumatisierungen stattfinden, umso tiefgreifender sind in der Regel die Folgen.

- (3) Im verhaltenstherapeutischen kognitiven Modell wird angenommen, dass es sich um ein Konditionierungsgeschehen als Grundmechanismus für die Entstehung einer PTSD handelt. Pathologische Lernprozesse können auch auf neuronalem Niveau, also an der Nervenzelle selber festgeschrieben werden. Kolb postulierte 1987 (42), dass ein Trauma bleibende Veränderungen an den Nervenzellen hervorrufen kann mit der Folge, dass Traumatisierte bereits auf unterschwellige Reize sehr empfindlich reagieren und v.a. die Fähigkeit zur Unterscheidung verschiedener Stimuli einbüßen. Daraus könnte die Unfähigkeit traumatisierter Patienten resultieren, zwischen wichtigen und unwichtigen Reizen unterscheiden zu können. Sie reagieren stattdessen "ereigniskorreliert". Das Modell der „erlernten Hilflosigkeit“, das Seligman 1975 erstmals beschrieb, unterstützt das kognitive Modell. Seligman stellte fest, dass eine wiederholte Konfrontation mit aversiven Ereignissen, die unvorhersagbar sind und außerhalb der Kontrolle des konfrontierten Individuums liegen, sich langfristig hemmend auswirken können. Das Individuum entwickelt die Erwartung, dass sein eigenes Verhalten nur geringe Auswirkungen auf das Geschehene hat. Dies führt zu dem als erlernte Hilflosigkeit beschriebenen Zustand.
- (4) Im genetischen Modell wird erläutert, dass die Anfälligkeit von Menschen, in deren Familie mehrere Personen an psychischen Störungen leiden, für die Ausbildung einer PTSD nach einem Trauma im Vergleich zur Restbevölkerung unspezifisch erhöht ist.

(5) Das neurobiologische Modell erklärt die Entstehung eines PTSD mit der Fehlreaktion des Körpers auf psychophysiologischer, neurohormoneller, neuroanatomischer und immunologischer Ebene, mit denen der Organismus versucht, einer Traumatisierung zu begegnen. Im Rahmen von Stressreaktionen werden z.B. Katecholamine, Serotonin und endogene Opiode freigesetzt, und es kommt zu einer Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Diese physiologischen Reaktionen, die der Stressbewältigung dienen, können aber erheblich gestört und in der Folge dysfunktional werden, wenn das Trauma zu heftig ist oder zu lange andauert. So führt eine "adrenerge Dysfunktion" zu dem bei PTSD typischem "Hyperarousal". Eine "serotonerge Dysfunktion" zeigt sich symptomatisch in einer erhöhten Schreckhaftigkeit und Hypersensibilität auf banale Reize. Die körpereigene Opioid-Ausschüttung im Rahmen der Stressreaktion führt anfänglich dazu, dass das Trauma weniger Panik auslöst, es tritt eher eine Erstarrung und ein Betäubungsgefühl ein. Sind körperliche Verletzungen aufgetreten, werden die Schmerzen unter der Opioidwirkung weniger oder gar nicht verspürt. Im Falle eines posttraumatischen Syndroms kann aber auch diese ursprünglich sinnvolle Stressreaktion in eine Dysfunktion übergehen, wenn nämlich die Betäubung und Erstarrung anhalten und in Folge zu einer dauerhaften Dissoziation führen.

12. Stand der Forschung

Es ist bereits bekannt, dass Stress Immunfunktionen beeinträchtigt. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass Dysfunktionen und Krankheiten, die mit Stress verknüpft sind, mit Veränderungen von Immunparametern einhergehen. Aufgrund der Tatsache, dass PTSD Patienten an einem Hyperarousal leiden, wurde schon früh vermutet, dass Immunfunktionen bei PTSD verändert sind. Mason war der erste, der sich in diesem Zusammenhang mit dem Immunsystem beschäftigte und fand bei PTSD Patienten eine Verminderung der Cortisolkonzentration (50). Bis jetzt ist die Diskussion über erhöhte (30; 48; 66) oder verminderte (50; 83) Cortisolwerte bei PTSD noch nicht

abgeschlossen. In den meisten Studien, die sich mit der Cortisolsuppression beschäftigen, wird über eine verstärkte Cortisolsuppression nach Dexamethasongabe beim Vorliegen von PTSD berichtet, was auf Unterschiede in der Antwort auf funktionale Tests hinweist (19; 43; 82). Andere Parameter, die direkten Einfluss auf das Immunsystem haben und deren Veränderung in PTSD gezeigt werden konnte, sind Katecholamine (20). Auch Untersuchungen zu weiteren Immunparametern stehen zum Teil im Widerspruch zu vorher veröffentlichten Ergebnissen. So wurden beispielsweise bei Zytokinen folgende Veränderungen festgestellt. IL-1 beta wurde in erhöhten Konzentrationen gefunden (20; 24; 73). Studien zeigten eine Erhöhung von IL-6 im Serum (49; 75) sowie im Liquor cerebralis (4), im Gegensatz dazu beschrieben jedoch weitere Untersuchungen unveränderte IL-6 Werte im Serum (4; 67). IL-6 Rezeptor war in früheren Studien erhöht (49; 75) und IL-4 vermindert (40). TNF alpha war erhöht (75) und in einer anderen Studie als nicht verändert vorgefunden worden (67). Ebenso wurde IFN-gamma in PTSD Patienten teilweise als erhöht (81) oder kontrovers dazu als vermindert (40) vorliegend beschrieben. Die Immunreaktion vom verzögerten Typ (2), Aktivierung von Lymphozyten sowie die Zell-vermittelte Immunantwort (79) wurden als verstärkt beschrieben. In der Literatur liegen kontroverse Funde über erhöhte (45) oder verminderte Aktivität (34; 35; 40) der Natürlichen Killerzellen (NK) vor, sowie über die erhöhte (9) oder verminderte (35) Anzahl von CD4 Zellen. Somit herrscht bezüglich Veränderungen der Immunantwort vom verzögerten Typ in den aktuellen Veröffentlichungen keine Einigkeit.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Ergebnisse bezüglich der Immunfunktion bei PTSD mehrdeutig bzw. unklar sind. Es zeigt sich ein Trend hinsichtlich einer verstärkten Zell-vermittelten Immunantwort, die Regulation der Zytokine bleibt jedoch weiterhin strittig.

Ziele und Fragestellung dieser Arbeit

Aufgrund der oben beschriebenen Forschungsergebnisse ist es nicht möglich Aussagen über Veränderungen im Immungeschehen von PTSD Patienten zu machen, die für diese Erkrankung spezifisch sind. Zudem wurde bisher vorwiegend auf Proteinebene nach

Veränderungen gesucht. Der Ansatz dieser Arbeit konzentrierte sich auf die Suche nach Veränderungen der Genexpression auf RNA-Ebene unter Verwendung eines selbstkonzipierten, selbst hergestellten und validierten (kostengünstigen) „home-made“ Genexpressionsmicroarrays. Durch Screening einer relativ großen Anzahl von Genen sollte geprüft werden, ob sich unter anderem auch solche finden ließen, die bisher in der Literatur in diesem Zusammenhang nicht beobachtet wurden. Sämtliche Arbeitsschritte und Ergebnisse, die sich auf die Konzeption, Herstellung und Validierung des Microarrays beziehen, sind der besseren Übersicht wegen im Abschnitt Material und Methoden integriert dargestellt. Bestandteil des Konzepts war es, die nötigen Algorithmen zur Validierung, Ergebnisdarstellung und Auswertung in Zusammenarbeit mit dem Bioinformatischen Institut Tübingen zu erarbeiten. Schließlich war geplant, die Ergebnisse der Microarray Versuche mit einer unabhängigen Methode, der Real Time PCR, zu überprüfen und zu bestätigen.

Für die Studie wurde ein homogenes Patientenkollektiv gewählt, das dieselbe traumatische Erfahrung am selben Ort und zum selben Zeitpunkt durchlebt hat. Eine weitere Besonderheit der Studie war, dass das PTSD-auslösende Ereignis zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits 15 Jahre zurück lag.

Ziel dieser Studie war nicht, bereits bekannte Gene zu bestätigen, sondern vielmehr neue Kandidatengene im Zusammenhang mit Posttraumatischen Belastungsstörungen zu entdecken, und zu untersuchen, inwieweit die Microarraytechnologie bei psychiatrischen Krankheitsbildern geeignet und einsetzbar ist.

2 Material

2.1 Geräte und Chemikalien

Geräte

| | |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Agilent RNA Bioanalyzer | Agilent Technologies, Palo Alto, USA |
| Biorobotics Total Array System | Genomic Solution, Cambridgeshire, UK |
| Centrifuge 5403 | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Centrifuge GS-6R | Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA |
| COMFORT plus -20°C Kühlschrank | Siemens, München, Deutschland |
| EBA 12R Zentrifuge | Hettich, Tuttlingen, Deutschland |
| Fireboy eco Bunsenbrenner | INTEGRA Biosciences AG (IBS), Chur, Schweiz |
| Gelkammer Md 41-2325 | Pequlab Biotechnoloy GmbH, Erlangen, Deutschland |
| Heizblock 1202 | Pequlab Biotechnoloy GmbH, Erlangen, Deutschland |
| HF-4000 pH Meter pH 540 GLP | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| Hybridisierungskammer | TeleChem International, Sunnyvale, USA |
| ImaGene 5 | BioDiscovery, CA, USA |
| Inkubations-Wasserbad | GFL, Burgwedel, Deutschland |
| Kühlschrank +4°C | Kirsch, Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland |
| Kühlschrank -20°C | Siemens, München, Deutschland |
| Microarray Scanner | Genetix Limited, Hampshire, UK |
| MicroGrid I Spotter | BioRobotics, Cambridge, UK |
| Micro-spotting Pins | BioRobotics, Cambridge, UK |
| Milli-Q Water Purification System | Millipore, Billerica, USA |
| MultiPROBE II HT EX Pipettierroboter | PerkinElmer, Wellesley, USA |
| PCR-Gerät Primus 96 plus | MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland |

| | |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Pipetus akku | Hirschmann, Eberstadt, Deutschland |
| QMT Amino slides 75x25mm | Quantifoil, Jena , Deutschland |
| REAX Top Vortexer | Heidolph, Schwabach, Deutschland |
| Rotina 46R Zentrifuge | Hettich, Tuttlingen, Deutschland |
| Scotsman Eismaschine | Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA |
| Thermomixer compact | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Tuttnauer System 2540EL Autoklav | Tuttnauer Brinkmann, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Unimax 1010 Schüttler | Heidolph, Schwabach, Deutschland |
| Vacuum-Konzentrator BA-VC 300H | Saur Laborgeräte, Reutlingen, Deutschland |
| Vip series – 86°C Kühlschrank | Sanyo, Concord, Ontario, Kanada |
| Vortexer Reax 2000 | Heidolph, Schwabach, Deutschland |
| Wärmeschrank Heraeus Fb. Nr. 40121926 | Kendro, Asheville, USA. |

Chemikalien

| | |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 20x SSC Puffer | Ambion, Austin, USA |
| 5-(3-Aminoallyl)-2' Deoxyuridin 5'-Triphosphat | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Ambion's Hybridisierung Buffer #1 | Ambion, Austin, USA |
| Beta-Actin | Stratagene, La Jolla, USA |
| Betaine | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Cyanine-3 Ester | Amersham Biosciences, Amersham, UK |
| Cyanine-5 Ester | Amersham Biosciences, Amersham, UK |
| Dimethylsulfoxid wasserfrei 99,9% | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Dithiothreitol (DTT) 0.1 M | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| DNA Polymerase | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| DNA Polymerase Biotaq Red | Bioline, London, UK |
| dNTPs 100 mM | Promega, Mannheim, Deutschland |

| | |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Ethanol absolut zur Analyse | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0.5 M pH 8.0 | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| First Strand Buffer 5x | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| Humane COT-1 DNA | Stratagene, La Jolla, USA |
| Kaliumdihydrogenphosphat 99% | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| MessageAmp™ cRNA Amplification Kit | Ambion, Austin, USA |
| MgCl ₂ 50 mM | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Natiumcarbonat wasserfrei | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| Natriumdihydrogenphosphat 99 % | Sigma-Aldrich, München, Deutschland |
| PAXgene™ Blood RNA Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| PAXgene™ Blood RNA Tubes | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| PCR-Puffer 10x | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| poly(dA) Oligonucleotide | Stratagene, La Jolla, USA |
| Random Primers 3µg/µl | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 % | Ambion, Austin, USA |
| Stratagene's SpotReport | Stratagene, La Jolla, USA |
| SuperScript II RNase H- RT 200u/µl | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| Universal RNA | Stratagene, La Jolla, USA |

3 Methoden

3.1 Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays und Etablierung der Hybridisierung-Methode des cDNA Microarrays*

3.1.1 Allgemeines zum cDNA Microarray

Die Microarray- Technologie lässt sich in zwei große Abschnitte unterteilen. Der erste Abschnitt beinhaltet die Herstellung eines Microarrays und der zweite die Bearbeitung der Proben, die auf den Microarray aufgebracht werden.

Zu Herstellung eines Microarrays werden oft rechtwinklige, oberflächenbehandelte, Glas-Objektträger eingesetzt. Auf diese „Slides“ können tausende von Genfragmenten aufgetragen werden. Das Auftragen dieser Fragmente auf einen Slide wird als Spotting bezeichnet. Die DNA-Abschnitte, die auf einen Slide gespottet werden, können unterschiedlicher Herkunft sein. Man kann einerseits aus Gewebe oder Zellreihen, welchen besonderes Interesse gilt, mRNA gewinnen und diese mittels reverser Transcriptase in cDNA umschreiben und auf den Slide spotten. Auf der anderen Seite, kann man Gene aus so genannten „Genexpressionsbibliotheken“ auf den Slide spotten. In einer Genexpressionsbibliothek sind cDNAs, welche aus RNAs ausgesuchter Gewebe gewonnen wurden, in bakterielle Plasmide eingebaut und können mittels vektorspezifischen Primern und der Polymerase- Kettenreaktion (PCR) in großen Mengen gewonnen werden. Diese PCR Produkte stehen dann zum Spotten der Slides zur Verfügung (58).

Das Probenmaterial wird aus Patientengeweben und gesunden Kontrollen gewonnen. Dieses Material, welches auf den gespotteten Microarray letztlich zur Hybridisierung aufgetragen wird, bedarf einer qualitativ hochwertigen und reproduzierbaren Aufarbeitung.

Die isolierte mRNA aus Patienten und Kontrollen wird in cDNA umgeschrieben und anschließend mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen behandelt. Dieser Vorgang

* Kapitel geschrieben von Derek Zieker bis einschließlich Kapitel 3.1.3

nennt sich Labeling. Es werden meist gleichzeitig Proben von Kontrollpersonen und Patienten auf einen Slide aufgetragen. Diese fluoreszenzmarkierten cDNAs hybridisieren mit den gespotteten cDNAs, zu denen sie homolog sind, und lagern damit die Fluoreszenzmarkierung an die nicht-fluoreszierende, gespottete cDNA an. Nach Ende der Hybridisierung wird der Slide gescannt. Beim Scannen werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch Laser angeregt. Die Emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe werden gemessen. Bei einer Zweifachmarkierung (Kontrolle und Patient auf einem Slide) werden die Emissionen bei den zwei jeweils korrespondierenden Wellenlängen gemessen. Der Quotient dieser zwei Messwerte gibt an, ob beim Patienten oder bei der Kontrollperson mehr RNA eines bestimmten Gens vorhanden war, oder ob bei beiden Personen gleich viel RNA exprimiert wurde (58).

3.1.2 Theoretisches Hintergrundwissen zur Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays

Zur Herstellung eines Mikroarrays bedarf es im Vorfeld folgender Schritte und Überlegungen:

- Auswahl der Art der Produkte, die man auf den Slide auftragen möchte
- Auswahl der Slides (die Glasoberflächen können unterschiedliche „Beschichtungen“ aufweisen)
- Auswahl des Spottingverfahrens

3.1.2.1 Auswahl der Art der Produkte zum Auftragen auf den Slide

Als erstes wird entschieden welches Produkt auf den Slide gespottet werden soll. Es besteht die Möglichkeit Oligonucleotide oder DNA-Fragmente auf den Slide aufzutragen. Oligonucleotide sind kurze Moleküle meist unter 100bp, im Gegensatz zu DNA-Molekülen die bevorzugt im Bereich zwischen 500-1500bp gewählt werden.

Für die Fragestellung dieser Studie haben wir uns für den Einsatz von DNA-Fragmenten entschieden.

3.1.2.2 Auswahl der Slides

Die Immobilisierung der gespotteten cDNAs erfolgt im Allgemeinen auf modifizierten Glasoberflächen. Für die Immobilisierung von größeren DNA-Fragmenten werden bevorzugt amino-modifizierte Glasoberflächen verwendet. Die amino-modifizierten Glasoberflächen interagieren durch elektrostatische Kräfte der positiv geladenen Amino-Gruppen mit den negativ geladenen Gruppen des DNA-Phosphatrückgrats der aufgespotteten cDNAs. Durch zusätzliche Bestrahlung der gespotteten Slides mit UV-Licht und Inkubation bei 80°C, wird die Bindungseffizienz der cDNA-Fragmente mit dem Slide verstärkt (58).

Bei der Herstellung unserer Microarrays kamen aufgrund der Verwendung von längeren DNA-Fragmenten, Slides mit amino-modifizierten Oberflächen zum Einsatz.

3.1.2.3 Auswahl des Spottingverfahrens

Ein Microarray-Spotter ist ein computer-gesteuerter Roboter. Er transferiert einige Nanoliter cDNA aus einer Microtiterplatte auf die Slide-Oberfläche. Dies geschieht mittels Spotting-Nadeln, die auch Pins genannt werden. Die Anzahl der Pins, mit denen ein Spotter bestückt ist, bestimmt, wie viele Proben gleichzeitig auf den Slide abgesetzt werden können.

Prinzipiell wird zwischen zwei mechanischen Spotting-Methoden unterschieden. Zum einem dem „Contact-Spotting“ und zum anderen dem „Non-Contact-Spotting“.

Das mechanische Contact-Spotting, bei dem der Pin den Slide berührt, ist das gebräuchlichste Verfahren.

Die Unterschiede der verschiedenen Pin-Modelle liegen in der Aufnahmeart der zu spottenden Lösungen. Man unterscheidet zwischen „Solid-Pins“, „Split-Pins“ und dem „Ring-and-Pin System“. Mit Solid-Pins kann immer nur ein Slide bei einem Transfer gespottet werden. Split-Pins, bei denen die Pins mit einem kapillarähnlichem Reservoir versehen sind, und Ring-and-Pin-Systeme, bei denen die zu spottende Lösung von einer Öse aufgenommen wird, bieten die Möglichkeit, Slides hintereinander zu spotten, ohne neue DNA aus der Vorratsplatte aufnehmen zu müssen. Diese Pins bieten einen

schnellen Durchsatz aber bergen die Gefahr ungleicher Volumina beim Spotten (58). Das Spotten mit „Solid-Pins“ ist zeitaufwendiger, und der Verbrauch an gespotteter cDNA ist größer durch vermehrte Evaporation.

Das Non-Contact-Spotting beruht auf dem Prinzip der Inkjet-Applikation. Die zu spottende Lösung wird durch Besprühen auf den Slide aufgebracht. Diese Methodik hat eine hohe Applikationsgeschwindigkeit und eine gute Spot-Morphologie, wird aber momentan noch von sehr wenigen Firmen angeboten.

Die verwendete Spotting-Methode unseres Projektes war das Contact-Spotting mit Solid-Pins.

3.1.3 Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays

Um die Herstellung eines cDNA Microarrays durchzuführen war es wichtig, im Vorfeld einzelne Arbeitsschritte, die zur Herstellung notwendig sind, zu etablieren und zu optimieren. Dazu gehören:

- Etablierung und Optimierung der PCR für 384-well Platten mit 50µl PCR-Volumen
- Entwerfen und Etablierung von Programmen für einen Pipettierroboter zur Durchführung von folgenden Tätigkeiten: Pipettieren von PCR-Gemischen für
 - o Hochdurchsatz PCRs in 96- oder 384-well Platten
 - o Auftragen der PCR Produkte aus 96- oder 384-well Platten auf Agarose-Gele zur elektrophoretischen Analyse
 - o Aufreinigung von cDNAs aus 96- oder 384-well Platten über eine Vakuumstation
 - o Vorbereitung von 96- oder 384-well Platten zum Spotten
- Etablierung und Optimierung des Spottingpuffers
- Entwerfen und Etablierung von Programmen für den Microarray-Spotter

3.1.3.1 Etablierung und Optimierung der PCR für 384-well Platten in 50µl Ansätzen

Zur Etablierung der PCR im 384-well Format wurden humane Klone aus einer Leukozyten-Expressions-Bibliothek verwendet. Da alle Leukozyten-cDNAs in das gleiche Plasmid inkloniert wurden, konnte für alle Klone ein und dasselbe Primerpaar zur PCR-Amplifikation der Inserts eingesetzt werden.

Die Reaktionszyklen bei der PCR setzen sich aus drei Schritten zusammen. Im ersten Schritt (Denaturierung) wird die DNA durch Hitze in ihre Einzelstränge aufgespaltet. Anschließend wird die Temperatur so weit gesenkt, dass die spezifischen Primer an die komplementären Bereiche der cDNA binden können (Annealing) und die DNA-Polymerase an den Primer-DNA-Komplex binden kann. Im dritten Schritt wird die Temperatur auf 72° C erhöht. Dies ist die optimale Reaktionstemperatur der hitzestabilen Taq-Polymerase. Das Enzym synthetisiert den Komplementärstrang, der der ursprünglichen DNA exakt gleicht. Da die Komplementierung an beiden Strängen der cDNA gleichzeitig abläuft, hat man in einem Zyklus die Zahl der Moleküle verdoppelt.

Diese Reaktionsschritte werden in circa 30 – 40 Zyklen zur Vervielfältigung der cDNA wiederholt.

Die PCR ist im Institut für Transfusionsmedizin der Universität Tübingen eine bereits etablierte Methode für Einzelreaktionen bis 20µl. Für die Microarray-Herstellung war es notwendig die bereits bestehende Methode auf eine Hochdurchsatz- PCR von 384-Proben mit einem Reaktionsvolumen von 50µl abzuändern und neu zu etablieren.

Zusammensetzung einer 20µl PCR-Reaktion :

| | |
|---------------------------|----------|
| RNA / DNase freies Wasser | 11.25 µl |
| 10 x PCR-Reaktionspuffer | 2.00 µl |
| dNTPs 10mM | 2.00 µl |
| MgCl ₂ 25mM | 3.00 µl |
| Hin-Primer | 0.25 µl |
| Rück-Primer | 0.25 µl |

| | |
|------------------------------------|---------|
| Taq-Polymerase | 0.25 µl |
| Template / Probenmaterial 100ng/µl | 1.00 µl |

Zur Durchführung der 384-well PCR mit 50µl Reaktionsvolumen wurde die Zusammensetzung der 20µl PCR-Lösung auf 50µl hochgerechnet und optimiert.

Zusammensetzung einer 50µl PCR-Reaktion :

| | |
|------------------------------------|----------|
| RNA / DNase freies Wasser | 28.50 µl |
| 10 x PCR-Reaktionspuffer | 5.00 µl |
| dNTPs 10mM | 5.00 µl |
| MgCl ₂ 25mM | 7.50 µl |
| Hin-Primer | 0.65 µl |
| Rück-Primer | 0.65 µl |
| Taq-Polymerase | 0.65 µl |
| Template / Probenmaterial 100ng/µl | 2.00 µl |

Vor der Durchführung im 384-well Format wurde die 50µl PCR-Reaktion im kleinen Maßstab optimiert und etabliert. Hierzu wurden einzelne PCRs mit bekannten Positiv- und Negativ-Proben in 20- und 50µl PCR-Reaktionen durchgeführt. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet.

Temperatur-Zeit-Profil der 20µl PCR

| | | | |
|----|--------|-------|-------------|
| 1. | 94.0°C | 3 min | |
| 2. | 94.0°C | 1 min | } 28 Zyklen |
| 3. | 59.5°C | 1 min | |
| 4. | 72.0°C | 1 min | |
| 5. | 72.0°C | 10min | |
| 6. | 4.0°C | 60min | |

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein 1,5 % Agarose-Gel aufgetragen. Die positiven Proben des 20µl Reaktionsansatz zeigten auf dem Gel und auch bei der Auswertung stärkere und bessere Ergebnisse im Vergleich zum 50µl Reaktionsansatz. Das schwach positive Ergebnis ist auf das Temperatur-Zeit-Profil zurückzuführen, da die Zeiten für das erhöhte Reaktionsvolumen unzureichend sind.

Daraufhin wurden verschiedene Zeiten für das Temperaturprofil verwendet, bis die Ergebnisse der 50µl PCR die der 20µl PCR entsprachen.

Optimiertes und etabliertes Temperatur-Zeit-Profil der 50µl PCR

| | | | |
|----|--------|----------|-------------|
| 1. | 94.0°C | 3 min | |
| 2. | 94.0°C | 1:15 min | } 28 Zyklen |
| 3. | 59.5°C | 1:30 min | |
| 4. | 72.0°C | 1:30 min | |
| 5. | 72.0°C | 10 min | |
| 6. | 4.0°C | 60 min | |

Das Einzel-PCR-Reaktionsvolumen wurde für 384 Reaktionen hochgerechnet. Das Ergebnis der 384-well Platten PCR, mit bekannten Positiv- und Negativ-Proben, lieferte das äquivalent hochwertige Ergebnis wie bei einer Einzelreaktion.

3.1.3.2 Entwerfen und Etablierung von Programmen für einen Pipettierroboter

Der MultiProbe II ist ein Pipettierroboter mit acht einzeln ansteuerbaren Spitzen. Perkin Elmer garantiert Pipettier-Präzision bis zu 2 Mikrolitern. Man kann wahlweise mit waschbaren Stahlspitzen arbeiten, oder auch Einmalspitzen verwenden. Die große Auswahl von Zusatzkomponenten, wie Thermocycler, Plattenschüttler, Kühlblock und Vakuumkammern, machen den MultiProbe II zu einem sehr flexibel einsetzbaren Gerät für nahezu jede Pipettieraufgabe.

Folgende Programme wurden für den Pipettierroboter entworfen und etabliert und sind im Computerverzeichnis des Pipettierroboters im Zentralinstitut für Seelische Gesundheit/ Abteilung für Psychopharmakologie in Mannheim einzusehen (C:\Programme\Packard\Derek) :

- Hochdurchsatz PCRs mit 96- und 384-well Platten
- Auftragen von 96- und 384-well PCR-Platten-Produkte auf ein Agarose-Gel
- Aufreinigung von 96- und 384-well Platten über eine Vakuumstation
- Vorbereitung von 96- und 384-well Platten zum Spotten

3.1.3.3 Etablierung und Optimierung des Spottingpuffers

Da mit längeren cDNA-Fragmenten gearbeitet wurde, kamen bei der Microarray-Herstellung amino-modifizierte Oberflächen zum Einsatz.

Der Microarray-Markt bietet für diese Art der Slideoberfläche eine Vielzahl von verschiedenen Pufferlösungen zum Spotten an. Vor den eigenen Untersuchungen wurde ein kommerziell erworbener Spottingpuffer mit einem selbst hergestellten Spottingpuffer verglichen.

Mehrere mit Amino-Allyl-Gruppen modifizierte cDNA Proben wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Cyanine-5) markiert. Diese cDNAs wurden anschließend mithilfe einer Evaporisationszentrifuge, einer so genannten Speed-Vac, konzentriert. Ein Teil der cDNAs wurde dann mit dem kommerziell erworbenen Spottingpuffer, der Firma TeleChem International, resuspendiert. Der andere Teil wurde mit einem selbst hergestellten Spottingpuffer resuspendiert (siehe nachfolgend die Zusammensetzung).

Die zu vergleichenden Proben wurden zu je 5µl, 10µl, 15µl, 20µl, 25 µl und 30µl mit dem entsprechenden Spottingpuffer resuspendiert. Nach dem Spotten wurden die Proben auf den Slides mit einem UV-Crosslinker und bei 80°C für zwei Stunden im Wärmeschrank weiter behandelt. Anschließend wurden die Slides gescannt und die Spotmorphologie beurteilt. Beurteilungskriterien waren die Form und die Größe der Spots. Bei einer Verdünnung mit 15µl selbst hergestellten Spottingpuffer, was einer

cDNA-Konzentration von circa 200 ng/µl entspricht, ergab sich die beste Spotmorphologie.

Selbst hergestellter Spottingpuffer:

| Spottingpuffer | Vol (10ml) | Endkonzentration (1X) |
|---------------------------|-------------------|------------------------------|
| 20x SSC | 1,5 ml | 3x |
| 600 mM NaP04 | 2, 5 ml | 150 mM |
| 5 M Betaine (monohydrat) | 3,0 ml | 1.5 M |
| RNAse/DNAse freies Wasser | 3,0 ml | |

3.1.3.4 Entwerfen und Etablierung von Programmen für den Microarray-Spotter

Der Microgrid II von Biorobotics ist ein Microarray-Spotter. Er ist mit 16 soliden Stahlpins ausgerüstet. Die verwendete Spotting-Methode ist das Contact-Spotting. Bei dieser Spotting-Methode ist es wichtig darauf zu achten, dass die Pins sowohl den optimalen Kontakt mit dem Spottingmedium als auch mit dem Slide haben. Die Pins sollten nur minimalen Kontakt mit dem Spottingmedium haben, um so Materialverluste des Spottingmediums und ungleiche Spottingmuster auf dem Slide zu verhindern. Ebenso sollte der Kontakt der Pins mit dem Slide nur minimal sein, um ein homogenes Spottingmuster zu erhalten und die Pins vor Deformierungen zu schützen. Eine Deformierung der Pins würde Materialverluste des Spottingmediums und ungleiche Spottingmuster auf dem Slide zur Folge haben. Mithilfe der Software des Microarray-Spotter ist es möglich die optimale Höhe und Tiefe der Pin-Bewegungen für die jeweilig gewünschte Aktion zu justieren und optimieren. Der Microarray-Spotter verfügt über eine Kühlung und einen Luftbefeuchter im hinteren Bereich des Gerätes. Dadurch wird ein zu schnelles Austrocknen der Proben verhindert. Die Pins werden automatisch nach jedem Arbeitsschritt in RNAse/DNAse freiem Wasser und anschließend in 70% Ethanol gereinigt und getrocknet.

Die Programme die für den Microarray-Spotter entworfen und etabliert wurden, sind im Computerverzeichnis des Microarray-Spotters im Zentralinstitut für Seelische Gesundheit/ Abteilung für Psychopharmakologie in Mannheim einzusehen (C:\Programme\Derek).

3.2 Herstellung und Etablierung eines cDNA Microarrays zu Forschungszwecken*

Die erfolgreichen Ergebnisse der Vorversuche bestätigten die Validität und Reproduzierbarkeit der selbst hergestellten cDNA Microarrays. Für die wissenschaftliche Fragestellung, die sich mit Vorgängen im Bereich des Entzündungsgeschehens und Immunologie befasst, wurden in diesem Zusammenhang bakterielle Klone die cDNA-Fragmente von 300 verschiedenen humanen Genen enthielten, vom Ressourcen Zentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) in Berlin, Deutschland ausgewählt und bestellt (siehe im Anhang).

* Kapitel geschrieben von Derek Zieker bis einschließlich Kapitel 3.2.3

Chip Präparation

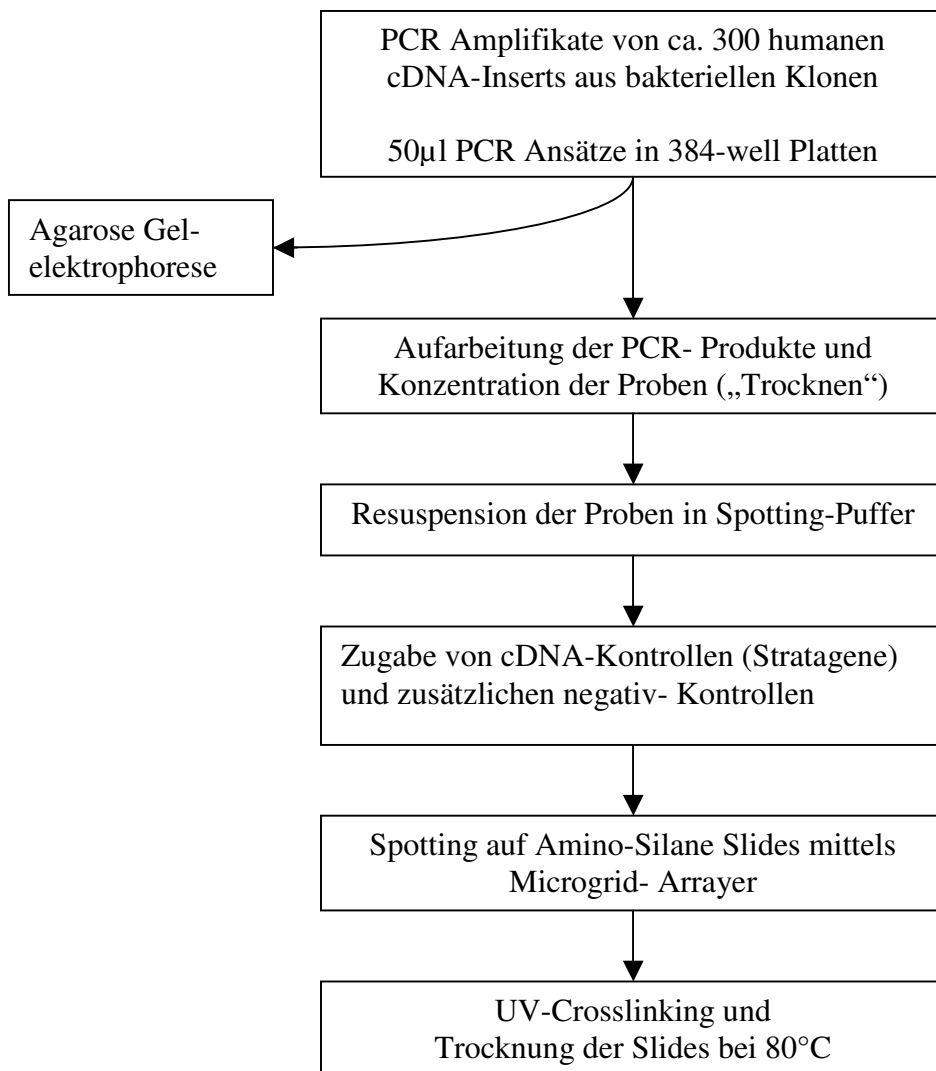


Abbildung 2: Darstellung der Chip Präparation

3.2.1 Aufzucht der Bakterien

Die 300 Klone des Ressourcen Zentrum für Genomforschung wurden in 96-well Platten in Agar geliefert.

Von jedem Well der gelieferten Platten wurde ein Aliquot entnommen und in eine neue 96- well Platte mit 200µl LB-Medium und Ampicillin (100µg/ml) überführt.

LB-Medium

Tryptone 9.6g

Yeast extrakt 19.2g

Glycerol 3.2ml

in 720 ml RNase/DNase freiem Wasser aufnehmen und autoklavieren.

KH₂PO₄ 1.85gK₂HPO₄ 10.00g

in 80 ml RNase/DNase freiem Wasser aufnehmen und autoklavieren.

Nach dem Autoklavieren wurden beide Flüssigkeiten miteinander vermischt und Ampicillin zugegeben.

Die 96-well Platten mit den in LB-Medium aufgenommenen bakteriellen Klonen wurden in einem Schüttler über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.2 Amplifizierung der cDNA-Inserts

Mithilfe des Pipettierroboters wurden je 48 µl der PCR-Reaktionslösung (siehe oben) mit vectorspezifischen-Primern des Ressourcen Zentrum für Genomforschung in 300 Wells einer 384-well Platte vorgelegt. Anschließend wurden je 2 µl der über Nacht in LB-Medium aufgezogenen bakteriellen Klone mit dem Pipettierroboter in die bereits vorgelegte PCR-Reaktionslösung überführt, gemischt und die humanen cDNA-Inserts amplifiziert. Die Amplifikate wurden qualitativ auf einem 1.5 % Agarose-Gel geprüft.

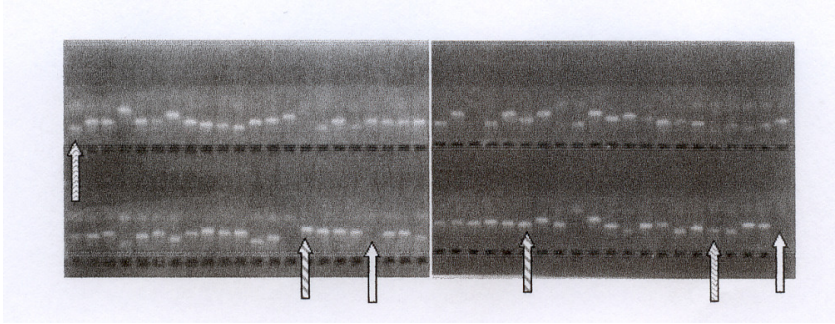


Abbildung 3: Qualitätskontrolle der PCR-Amplifikate vor dem Spotten

Qualitätskontrolle der PCR-Amplifikate vor dem Spotten auf einem 1.5 % Agarose-Gel. Die gestreiften Pfeile zeigen auf PCR-Produkte, die ausreichend und gut amplifiziert wurden. Die gepunkteten Pfeile zeigen auf PCR-Produkte, die befriedigend amplifiziert wurden und die weißen Pfeile zeigen auf PCR-Produkte, die mangelhaft amplifiziert wurden.

3.2.3 Spotten von PCR Produkten

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte aufgereinigt, bei 37°C im Wärmeschrank konzentriert und anschließend in 15µl Spottingpuffer resuspendiert. 15 µl der bereits erwähnten cDNA-Kontrollen von Stratagene mit zusätzlichen Negativ-Kontrollen wie Leerprobe oder nur Spottingpuffer wurden an ausgewählten Stellen auf der Spottingplatte verteilt. Die Spottingplatte mit den Proben und Kontrollen wurde als Triplikat auf den Slide gespottet. Die Eckpunkte der Triplikate sind mit Universal-cDNA der Firma Stratagene markiert um jedes Triplikat später bei der Auswertung zu erkennen.

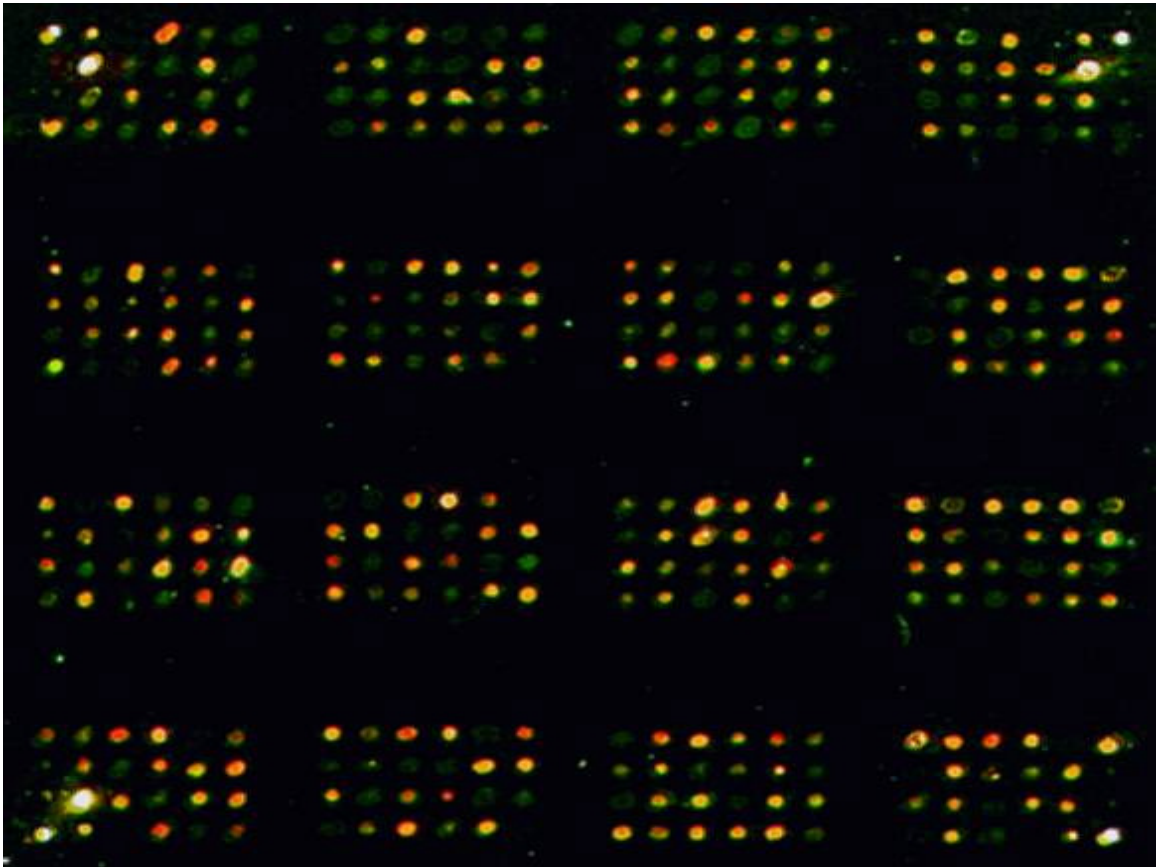


Abbildung 4: Darstellung eines hybridisierten Array nach dem Scannen

3.3 Etablierung der Hybridisierung eines cDNA Microarrays

Wie bereits oben erwähnt, lässt sich die Microarray-Technologie in zwei große Abschnitte unterteilen. Der erste Abschnitt beinhaltet die Herstellung eines Microarrays und der zweite die Bearbeitung der Proben, die auf den Microarray aufgebracht werden.

Dieser zweite Abschnitt beinhaltet folgende Arbeitsschritte:

- Isolierung und Vorbereitung der Nukleinsäuren, die auf den Slide aufgetragen werden sollen
- Sondenherstellung mithilfe der cDNA-Synthese
- Prähybridisierung der Slides und Hybridisierung der Proben
- Quantifizierungen-Überprüfungen-Sicherheiten

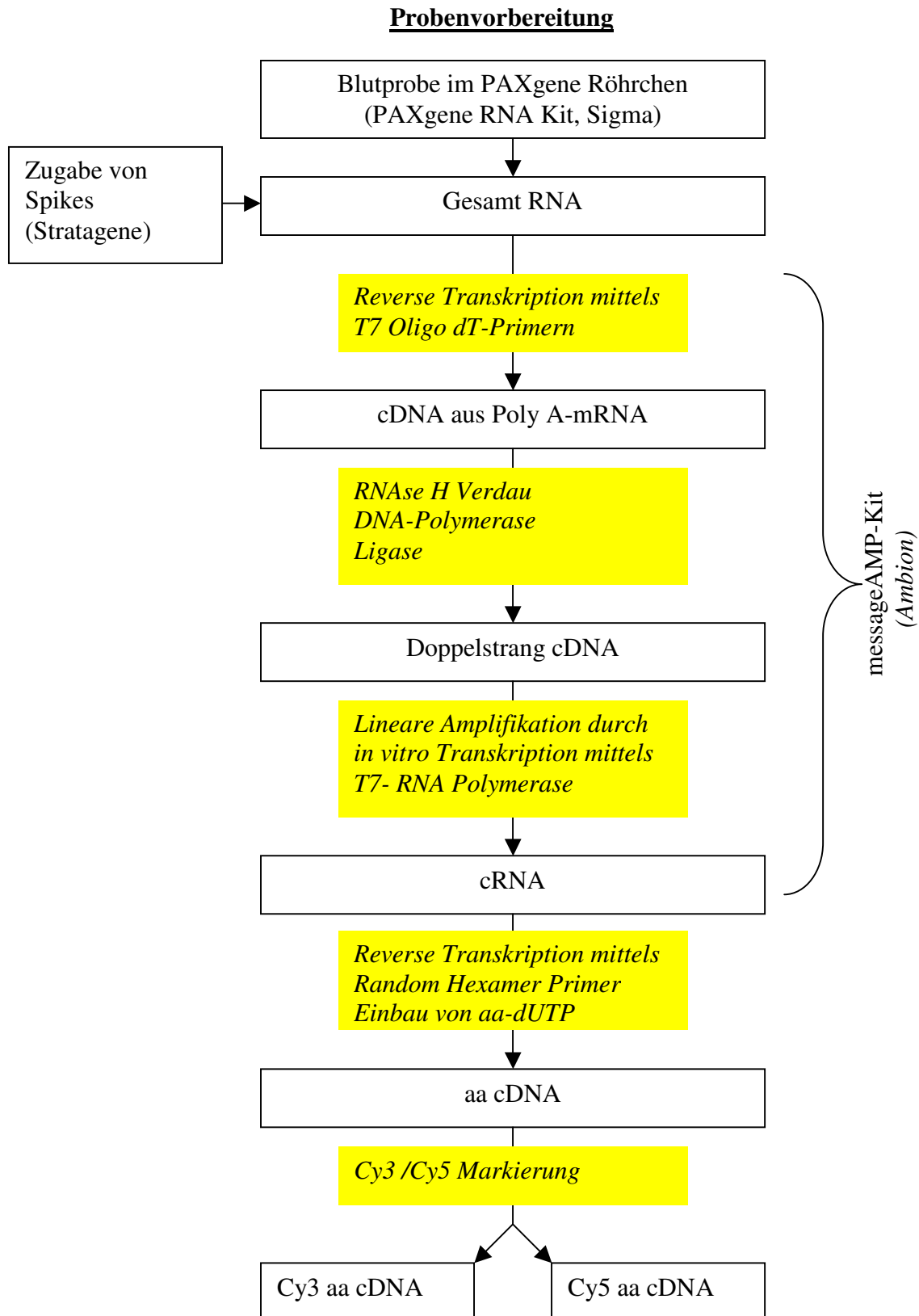


Abbildung 5: Ablauf der Probenvorbereitung

3.3.1 Isolierung und Vorbereitung der Nukleinsäuren

In den folgenden Kapiteln werden die verschiedenen Methoden zuerst im Allgemeinen erklärt. Anschliessend werden die in der Studie angewandten Methoden beschrieben.

RNA-Isolation (im Überblick)

Einer der entscheidenden Schritte bei nahezu allen Microarray-Experimenten ist die RNA-Isolierung. Bedauerlicherweise ist die RNA nicht annähernd so stabil wie die DNA. Die RNA und insbesondere die mRNA ist ausgesprochen vulnerabel und hat einen ubiquitär vorkommenden Feind: die RNase (58). Aus diesem Grund ist bei der RNA-Isolierung auf eine RNase-freie Umgebung zu achten. Mögliche Quellen für eine Kontamination können das zu isolierende Gewebe der Wahl selbst sein, die Umwelt, der Laborbereich sowie der Laborarbeiter. Um die Gefahrenquellen zu minimieren empfiehlt es sich, einige Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Absolute Sauberkeit und die Verwendung von Desinfektionsmitteln ist sehr nützlich. RNA-Isolierungen und das Arbeiten mit Bakterien sollten räumlich voneinander getrennt werden. Alle Materialien, mit denen die RNA in Verbindung kommt, müssen steril und vor allem RNase frei sein. Das Probenmaterial sollte schnell und frisch verarbeitet werden. Ebenso sollten entsprechende Prozeduren, die ein möglichst schnelles Inaktivieren der RNAsen gewährleisten, eingehalten werden. Des Weiteren empfiehlt es sich RNA möglichst bei 4°C oder 65-70°C zu verarbeiten (58).

RNA kann mit einem RNA-Isolierung-Kit, oder mit der klassischen ‚Phenol-Methode‘ nach Chomczynski und Sacchi isoliert werden (15).

MessengerRNA (mRNA) ist nur zu einem kleinen Teil (1,0-5,0%) in der Gesamt-RNA-Population vertreten. Ausgehend von Gesamt-RNA kann gezielt mRNA in cDNA durch Verwendung von Oligo-dT Primern umgeschrieben werden.

RNA-Isolation (Anwendungsspezifisch)

Wie bereits erwähnt, kann die RNA mit einem RNA-Isolierung-Kit, oder mit der klassischen ‚Phenol-Methode‘ nach Chomczynski und Sacchi isoliert werden. Da zur Anfertigung dieser Arbeit Blut das Gewebe der Wahl ist, wurde im Selbstversuch Blut abgenommen, um die RNA-Isolation für die Microarray-Versuche zu etablieren.

RNA-Isolation nach Chomczynski und Sacchi (siehe Protokoll 1)

RNA-Isolation mit PAXgene™ Blood RNA Kit (siehe Protokoll 2)

Die Qualität der RNA und die Reproduzierbarkeit der Qualität und Quantität der RNA, gemessen mit dem Bioanalyzer von Agilent, war bei fast allen Proben mit der RNA-Isolations-Methode mit PAXgene™ Blood RNA Kit (Qiagen) höher als die mit der RNA-Isolation-Methode nach Chomczynski und Sacchi. Da bei den Microarray-Versuchen ein Optimum an RNA-Qualität sehr wichtig ist, fiel die Entscheidung für den Einsatz der PAXgene Methodik.

3.3.2 Sondenherstellung mithilfe der cDNA-Synthese

In-vitro-Transkription und cDNA-Synthese (im Überblick)

Steht nicht ausreichend Probenmaterial für einen Microarray-Versuch zur Verfügung, muss eine lineare Amplifikation des Materials erfolgen. Eine der häufigsten Methoden ist die in-vitro-Transkription mithilfe der T7-RNA-Polymerase. Die aus dem Probenmaterial gewonnene RNA wird mit einem Oligo(dT)-Primer, der auch über eine T7-RNA-Polymerase Promotor-Sequenz verfügt, revers transkribiert. Nach der cDNA-Synthese, die unter Standardbedingungen erfolgt, wird eine konventionelle Zweitstrang-Synthese angehängt. Die doppelsträngige DNA wird mithilfe von PCR-Produkt-Reinigungssäulen aufgereinigt. Aus der cDNA wird nun mithilfe der T7-RNA-Polymerase komplementäre RNA (cRNA) synthetisiert. Nach erfolgter Synthese wird der Ansatz gereinigt. Die gereinigte cRNA kann nun wiederum für die cDNA-Synthese eingesetzt werden. Dazu wird die RNA bei 70°C denaturiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuheben. Anschließend wird die Probe auf Eis gestellt. Danach sollten alle anderen Ingredienzien in die Lösung gegeben werden (cDNA-Synthese-Puffer, Nukleotide, ergänzt durch aadUTP (Amino-Allyl-dUTP), RNase-Inhibitor und letztlich die Reverse-Transkriptase). Die cDNA-Synthese muss jetzt aber mit Random-Hexamer-Primern durchgeführt werden, da mit der cRNA nun der andere (falsche) Strang vorliegt und ein Oligo(dT)-Primer hier nicht binden könnte. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 42°C ist die Synthese beendet (58).

In-vitro-Transkription und cDNA-Synthese (Anwendungsspezifisch)

Die Sondenherstellung erfolgte weitgehend gemäß dem Protokoll von Jeremy Hasseman "Aminoallyl labeling of RNA for microarrays" (<http://pga.tigr.org/sop/M004.pdf>). Veränderungen und Optimierungen fanden im folgendem Bereich statt: die Inkubationszeiten wurden bei den Elutionsschritten während der Reinigung der Proben verlängert, mit dem Erfolg höherer cDNA-Ausbeute.

In-vitro-Transkription und reverse Transkription (siehe Protokoll 3)*Labeling (im Überblick und Anwendungsspezifisch)*

Nach der cDNA-Synthese wird die noch vorhandene RNA durch einen alkalischen Verdau mit 1M NaOH und 0.5M EDTA pH 8.0 für 15 Min bei 65°C zerstört. Daran schließt sich eine Neutralisierung mit 1M HCL an. Die neutralisierte Probe sollte mithilfe kommerziell erworbener PCR-Produkt-Reinigungssäulen aufgereinigt werden. Die gereinigte cDNA wird in einer Speed-Vac konzentriert und in Natriumcarbonat resuspendiert. Die cDNA ist jetzt bereit zur Kopplung mit einem Farbstoff an den Amino-Allyl-Gruppen der Erststrang-cDNA. Dazu werden NHS-Ester der jeweiligen Farbstoffe, wie z.B. Cyanine-3 und Cyanine-5 (Cy3, Cy5, Amersham Biosciences) verwendet. Die Farbstoffe werden im Vorfeld in einem kleinen Volumen DMSO aufgenommen und dann mit der Probe vermischt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) und Dunkelheit gekoppelt. Da nicht alle Bindungsstellen abgesättigt werden können, gibt man nach der zweistündigen Inkubation Natriumacetat zu den Proben. Anschließend wird die nun markierte cDNA von allen anderen Reaktionspartnern mithilfe von PCR-Produkt Reinigungssäulen befreit. In diesem Zustand werden zu der cDNA Poly(dA), Yeast-Total-tRNA und humane Cot1-DNA hinzugegeben, die zur Vermeidung unspezifischer Bindungen dienen. Daraufhin wird die Probe wieder in der Speed-Vac konzentriert.

Labeling (siehe Protokoll 3)

3.3.3 Prähybridisierung der Slides und Hybridisierung der Proben

Prähybridisierung der Slides (im Überblick)

Die Spots auf den verwendeten Microarrays bestehen aus doppelsträngiger DNA. Vor dem Gebrauch der Microarrays müssen diese Doppelstrang-Verbindungen gelöst werden, da sonst keine Hybridisierung stattfindet. Zusätzlich muss der Microarray prähybridisiert werden, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Dazu wird der gespottete Slide in einer Lösung (10% SDS 5ml mit RNase/DNase freies Wasser 495ml vermischt) geschüttelt und anschließend mit RNase/DNase freiem Wasser gereinigt. In einem weiteren Schritt wird der Slide in RNase/DNase freiem Wasser bei 95°C geschüttelt und dann in einer Prähybridierungslösung (20x SSC 12.5ml, 10% SDS 0.5ml, BSA 500mg, RNase/DNase freies Wasser 37.0ml) bei 55°C 45 min lang inkubiert. Nach der Inkubation wird der Slide wieder in RNase/DNase freiem Wasser gereinigt und sofort mit Stickstoff trocken geblasen. Der Slide steht jetzt für die Hybridisierung bereit.

Prähybridisierung der Slides (Anwendungsspezifisch)

| | |
|--------|-------------------------------------------------------|
| 10 sec | Rinsing Solution |
| | Bei Wechsel zu H ₂ O Slide-Halter wechseln |
| 10 sec | H ₂ O (RT) |
| 3 min | H ₂ O (95°C) |
| 45 min | Prä-Hybd.-Lsg in Wasserbad (55°C) |
| 10 sec | H ₂ O (RT) |
| | Sofort mit N ₂ trocknen |

Bei diesen Vorgängen muss schnell gearbeitet werden um Temperaturschwankungen zu vermeiden und in den Lösungen sollten die Slides intensiv hin- und herbewegt werden. Die Prä-Hybridisierungs-Lösung muss schon vor Beginn der Prä-Hybridisierung im Wasserbad erwärmt werden.

Hybridisierung der Proben (im Überblick)

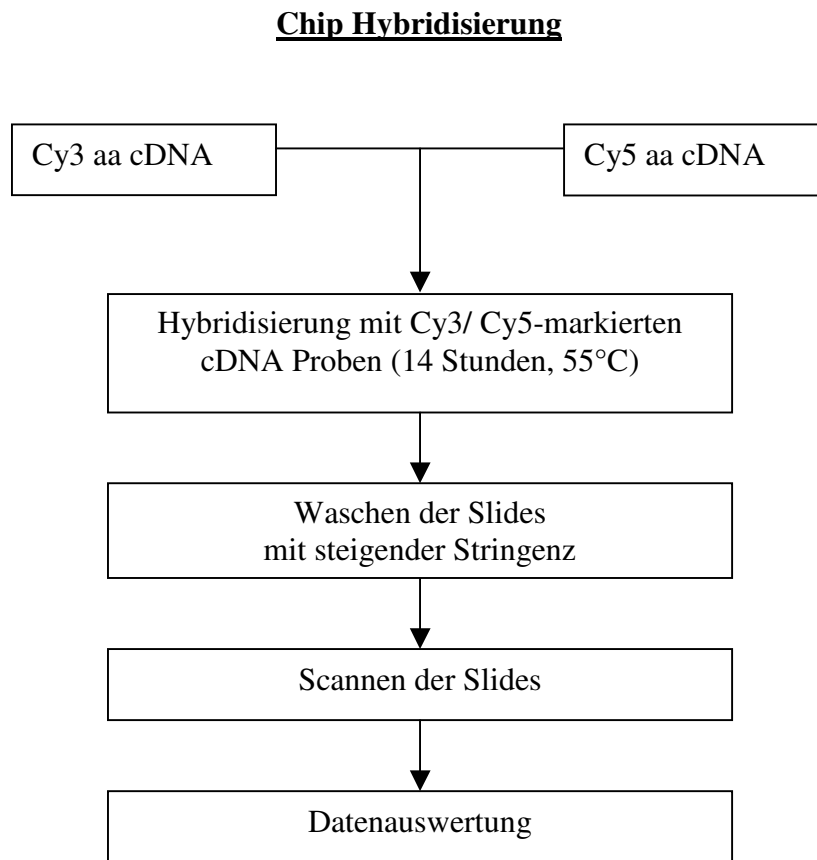


Abbildung 6: Darstellung des Hybridisierungsablaufs

Die farbstoffmarkierte cDNA-Probe wird nach dem Konzentrationsschritt in der Speed-Vac in 10mM EDTA aufgenommen und bei 95°C denaturiert, mit Hybridisierungspuffer verdünnt, auf den Slide aufgetragen und mit einem Deckgläschen bedeckt. Der Slide wird nun in eine Hybridisierungskammer (TeleChem) gelegt.

Die Hybridisierung wird bei 55°C über Nacht im Wasserbad durchgeführt. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass die Microarrays während der Hybridisierung nicht austrocknen. Dies würde mit einer Veränderung der Ionenkonzentration einhergehen, was wiederum zu verfälschten Hybridisierungsergebnissen führen würde. Um diese Gefahr weitgehend zu vermeiden, muss bei diesen Schritten schnell gearbeitet werden und vor der Hybridisierung Flüssigkeit (3xSSC) in dafür vorgesehenen Vertiefungen in der Hybridisierungskammer eingebracht werden.

Hybridisierung der Proben (Anwendungsspezifisch)

Vor Beginn der Hybridisierung ein Deckglas kurz in Wasser und Ethanol reinigen und mit N₂ sofort trocknen.

1. Die Proben aus der Speed-Vac holen. (*Die Ambion-Lsg bei 68°C für 15 min. inkubieren*)
2. Die erste Probe in 10 µl (10mM) EDTA aufnehmen und mischen bis die Farbe komplett aufgenommen ist. Dann dieses Gemisch auf die zweite Probe geben und diese ebenfalls darin aufnehmen und wie oben mischen.
3. Die Probe für 5 Min. bei 95°C in den Heizblock stellen.
4. Die Probe für 5 Min. bei RT stehen lassen. In dieser Zeit auf beiden Seiten der Kammer je 60 µl 3x SSC zugeben.
5. 35 µl Ambion Hybridisierungs-Lösung zugeben.
6. Das Gemisch für 10 sec. bei 68°C inkubieren.
7. Dann die Probe auf den Slide geben, die Hybridisationskammer schnell schließen und ins Wasserbad geben.
8. 14 Stunden bei 55°C im Wasserbad inkubieren.

Bei der Auswahl des Hybridisierungspuffers wurden mehrere Puffer untereinander verglichen.

Hybridisierungspuffer I: 50% Formamid, 6.0x SSC, 0.5% SDS, 5x Dehnhardt's-Lösung (50x Denhardt's-Lösung: 1.0% (w/v) Ficoll, 1.0% Polyvinylpyrrolidon, 1.0% BSA)

Hybridisierungspuffer II: Ambion's Hybridisierung Buffer #1 (Ambion)

Die Hybridisierungsergebnisse der beiden Hybridisierungspuffer zeigten annähernd qualitativ gleiche Ergebnisse. Die Lauffähigkeit auf dem Slide von Ambion's Hybridisierung Buffer #1, war aber deutlich höher als die des Hybridisierungspuffer I. Die höhere Lauffähigkeit des Puffers erlaubt auf Dauer ein schnelleres und zuverlässigeres Arbeiten bei der Hybridisierung des Slides.

Slidewäsche (im Überblick)

Nach der Hybridisierung werden die Slides in verschiedenen Waschlösungen gewaschen. Die Stringenzwaschungen sollten im Dunkeln erfolgen, um die Farbstoffe zu schonen. Die Stringenz der Waschlösungen hängt vom Salzgehalt, Detergenzien und von der Temperatur ab. Nach dem letzten Waschen wird der Slide sofort mit Stickstoff trockengeblasen sowie dunkel und trocken gelagert. Anschließend wird der Slide gescannt und ausgewertet.

Slidewäsche (Anwendungsspezifisch)

1. Waschpuffer A auf 30°C erwärmen.
2. Slide schnell aus der Hybridisierungs-Kammer holen und kurz in Waschpuffer A halten, um das Deckglas zu entfernen.

| | |
|---------|------------------------------------|
| 10 Min. | Wash A |
| 10 Min. | Wash B |
| 10 Min. | Wash C |
| | Sofort mit N ₂ trocknen |

Bei dem Wechsel von Wash A zu Wash B sollte auch der Slideschüttler gewechselt werden (Reste von SDS können zur Verunreinigung des Hintergrunds führen).

Herstellung Wash A, B und C (siehe Protokoll 4)

3.3.4 Quantifizierungen – Überprüfungen – Sicherheiten

Da es sich bei den Microarray-Experimenten um komplexe, mehrstufige Experimente handelt, ist es sehr nützlich, wenn nach möglichst jedem Schritt nachgewiesen werden kann, ob qualitativ und quantitativ das erwartete Ergebnis erreicht wurde. Eine einfache Methode für entsprechende Überprüfungen ist die photometrische Messung. Hierbei ist jedoch eine Qualitätskontrolle nicht möglich. Die Qualität der RNA kann mithilfe des Agilent-Bioanalyzers (Agilent Technologies) überprüft werden. Die hierfür benötigte RNA-Menge liegt im Pikogramm-Bereich, im Gegensatz zur einer RNA-Gelelektrophorese, die eine Qualitätsaussage von RNA erst im Mikrogramm-Bereich

ermöglicht. Der Bioanalyser liefert hochwertige Aussagen über eine erfolgreiche RNA-Isolation bzw. den Grad der Degradation der RNA und gehört zum Goldstandard bei Microarray-Versuchen. Die Kontrolle am Photometer lässt Aussagen über die Mengen und auch die Reinheit (über den Koeffizienten der gemessenen Werte bei den Wellenlängen 260/280nm) der RNA-Präparation zu. Um Aussagen über die Mengenverhältnisse, die Hybridisierungsqualität und Spezifität der Probe zu erhalten, werden der Probe während der Aufarbeitung Positiv- und Negativ-Kontrollen in einer definierten Mengenverdünnungsreihe zugegeben. Diese Kontrollen kann man kommerziell beziehen (Stratagene's SpotReport- 10 Array Validation System RNA spikes (Stratagene)). Sie ermöglichen Aussagen über die Effizienz der RNA-Isolation, der reversen Transkription und der Hybridisierung.

Ein weiterer kritischer Punkt ist die Kopplung des Farbstoffes an die cDNA. Um diesen Prozess quantitativ zu erfassen, wird ein Aliquot der fluoreszenz-markierten Proben photometrisch bei der Emissionswellenlänge des Farbstoffes gemessen.

$$\text{pmol Nucleotide} = \frac{\text{OD}_{260} * \text{Volumen } (\mu\text{l}) * 37 \text{ ng}/\mu\text{l} * 1000 \text{ pg}/\text{ng}}{324.5 \text{ pg}/\text{pmol}}$$

$$\text{pmol Cy3} = \frac{\text{OD}_{550} * \text{volume } (\mu\text{l})}{0.15}$$

$$\text{pmol Cy5} = \frac{\text{OD}_{650} * \text{volume } (\mu\text{l})}{0.25}$$

$$\text{Nukleotid /Farbstoff- Verhältnis} = \frac{\text{pmol cDNA}}{\text{pmol Cy Farbstoff}}$$

Anmerkung: 1 OD₂₆₀= 37 ng/μl für cDNA; 324.5 pg/pmol ist das durchschnittliche molekulare Gewicht von einem dNTP

Optimale Voraussetzungen für die Hybridisierung ist eine Farbstoffinkorporation von >200 pmol einer Probe und ein Nukleotid /Farbstoff- Verhältnis von unter 50.

3.4 Vorversuche zur Etablierung eines cDNA Microarrays*

Zur Überprüfung, ob die während der Untersuchung etablierten und optimierten Einzelschritte auch im Ganzen funktionieren, wurden 16 mal je 50μl von 20 unbekanntem PCR-Amplifikaten aus der Leukozyten-Bibliothek auf eine 384-well Platte verteilt. Diese Proben wurden bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet und in 15μl Spottingpuffer resuspendiert. Um Aussagen über die Hybridisierungsqualität treffen zu können, wurden zusätzlich Positiv- und Negativ-Kontrollen zu der Probenplatte gegeben. Die von Stratagene kommerziell erworbenen Kontrollen bestehen aus 10 verschiedenen cDNAs, 3'-und 5' Beta-Actin, Poly(dA) und humane Cot1-DNA. Die 384-well Platte mit den in Spottingpuffer aufgenommenen Proben und Kontrollen wurde anschließend als Triplikat auf zwölf Slides gespottet.

In einem Selbstversuch in PAXgene™ Blood RNA Tubes abgenommenes Blut wurde nach Protokoll und mithilfe des entsprechenden Kits aufgearbeitet. Die isolierte RNA wurde dann quantitativ mit einem Photometer und qualitativ mit dem Bioanalyzer analysiert. Die getestete RNA wurde mit dem Message Amp Amplification Kit revers transkribiert und anschließend in-vitro-transkribiert. Die amplifizierte cRNA wird unter Einschluss von aadUTP in cDNA umgeschrieben und dann entsprechend dem Labeling-Protokoll weiterbehandelt. Nach dem Labeling wurde die Inkorporations-Effizienz nochmals am Photometer bei 260nm, für Cy3 bei 550nm und für Cy 5 bei 650nm, gemessen.

Zwei von den gespotteten Slides wurden nach dem Prähybridisierungsprotokoll für die Hybridisierung mit den Proben vorbereitet. Die markierten Proben wurden dann auf die Slides aufgetragen und über Nacht im Wasserbad bei 55°C hybridisiert. Am nächsten

* Kapitel geschrieben von Derek Zieker bis einschließlich Kapitel 3.4.1

Tag wurden die Slides nach Protokoll gewaschen, mit Stickstoff getrocknet und anschließend gescannt und ausgewertet.

Die Qualität der bereits im Vorfeld etablierten und optimierten Schritte für die Herstellung und Hybridisierung eines Microarrays wurden von den Ergebnissen der hybridisierten Slides bestätigt. Die Slides zeigten eine homogene Spotmorphologie und einen geringen Farbhintergrund der Hybridisierung. Die Auswertung zeigte bei beiden Slides übereinstimmende Hybridisierungsergebnisse ohne Ausreißer was bei identischem Probematerial zu erwarten war und sich auch bestätigt hat.

Dieser Versuch wurde noch zwei weitere Male mit ähnlichen Resultaten durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit der selbst hergestellten Microarrays mit identischen Proben war gegeben. Zur Überprüfung des Microarrays mit zwei verschiedenen Proben wurde wieder im Selbstversuch Blut abgenommen. Ein Teil des Blutes wurde mit LPS für 2 Stunden stimuliert, der andere Teil des Blutes wurde unstimuliert belassen. Die RNA der Proben wurde nach dem entsprechenden Protokoll isoliert. Die isolierte RNA wurde dann quantitativ mit einem Photometer und qualitativ mit dem Bioanalyser getestet und wie im oben beschriebenen Versuch weiterverarbeitet. Da die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ein unterschiedliches Inkorporationsverhalten aufzeigen und der Slide mit zwei unterschiedlichen Proben hybridisiert wurde, ist es sinnvoll bei diesem Versuch einen Dye-Swap (Farbwechsel) zu machen. Ein Dye-Swap bedeutet, dass jedes Probenmaterial ein Mal mit dem Farbstoff Cy3 und ein Mal mit dem Farbstoff Cy5 markiert und auf zwei Slides aufgetragen wird. Dies dient bei der Auswertung zur Korrektur des Inkorporationsunterschiedes der Fluoreszenzfarbstoffe. Für die vorliegende Untersuchung bedeutete dies, dass auf dem einen Slide die unstimulierte Probe mit Cy3 gefärbt und aufgetragen wurde und die stimulierte Probe mit Cy5 gefärbt und aufgetragen wurde. Auf dem zweiten Slide wurde die unstimulierte Probe nun mit Cy5 gefärbt und aufgetragen und die stimulierte Probe mit Cy3 gefärbt und aufgetragen. Die Ergebnisse beider Slides des Dye-Swaps wurden miteinander verglichen. Erst danach können Aussagen zu den verschiedenen Regulationen der Gene getroffen werden.

In dem Versuch ergaben sich nach dem Dye-Swap-Vergleich Unterschiede zwischen den unstimulierten- und stimulierten Proben. Dieses Ergebnis zeigt, dass der für die

Untersuchung verwendete Microarray in der Lage ist, Unterschiede im Probematerial wiederzugeben.

Um auch hier die Reproduzierbarkeit des Microarrays zu zeigen wurde dieser Versuch noch zwei weitere Male mit übereinstimmenden Ergebnissen durchgeführt.

3.4.1 Validierung des neuen cDNA Microarrays

Auch bei dem in dieser Studie verwendeten Slide wurden zur Validierung und zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit des Microarrays mehrere Versuche nur mit unstimulierten Blut und Versuche mit unstimulierten und stimulierten Blut im Vergleich durchgeführt. Die Ergebnisse aller Versuche waren durchweg übereinstimmend und ohne Ausreißer, so dass die Validität und Reproduzierbarkeit des entwickelten Microarrays gegeben ist.

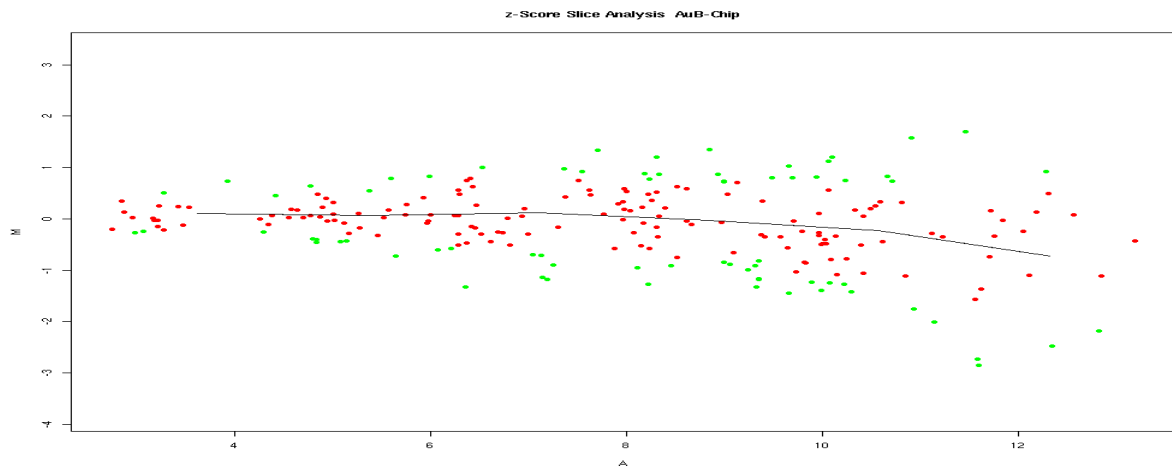


Abbildung 7: Auswertung zweier Dye-Swap-Versuche mit unstimulierten und stimulierten Blutproben

Das Ergebnis zeigt, dass alle Gene entweder 0.5x (rote Punkte) oder 1x (grüne Punkte) von der Regressionsgerade entfernt sind. Es sind keine Ausreißer ($>1x$) vorhanden.

3.5 PTSD

3.5.1 Blutentnahme bei den PTSD Patienten und den entsprechenden Kontrollen

3.5.1.1 Das Patientenkollektiv

Am 28. August 1988 verunglückten bei einer Flugshow auf dem Militärstützpunkt Ramstein drei Düsenjets der italienischen Kunstflugstaffel Frece Tricolori und stürzten in die Zuschauermenge. Von den 30.000 Zuschauern starben 70 Menschen. Hunderte Menschen wurden zum Teil schwer verletzt.

Das in der Studie untersuchte Patientenkollektiv setzt sich ausschließlich aus Opfern und Helfern des Ramstein-Unglücks zusammen. Die Besonderheit des gemeinsam erfahrenen Traumas macht diese homologe Gruppe einzigartig. Um die Gruppe möglichst homolog zu halten, wurden ausschließlich männliche Patienten für diese

Untersuchung herangezogen. Damit kann zugleich der Einfluss des weiblichen Hormonzyklus auf Parameter des peripheren Bluts außer Acht gelassen werden.

Bei den Patienten wurde mithilfe von Fragebögen zu dissoziativen Symptomen und traumatischen Erfahrungen (Posttraumatic Stress Diagnostik Scale (PDS) und Fragebogen für Dissoziative Symptome (FDS)) und nach klinischer Diagnostik die Erkrankung einer posttraumatischen Belastungsstörung festgestellt. Die acht Patienten wiesen zum Zeitpunkt der Blutabnahme im Dezember 2003 typische Symptome eines PTSD auf. Keiner der Patienten litt zum Zeitpunkt der Abnahme an einer akuten Entzündung. Chronisch entzündliche Erkrankungen wurden von keinem der Patienten angegeben. Psychopharmaka wurden von keinem der Patienten eingenommen. (siehe Tabelle 1).

Die Kontrollgruppe besteht aus acht bezüglich Alter gematchten männlichen Probanden. Bei keinem dieser Probanden konnte nach Auswertung der Fragebögen PDS und FDS eine posttraumatische Belastungsstörung festgestellt werden. Zwei der acht Kontrollprobanden litten an chronischen Erkrankungen, die medikamentös auf Normwerte eingestellt waren. Keiner der Kontrollprobanden litt an einer akuten Entzündung. Keiner nahm Psychopharmaka ein. (siehe Tabelle 2)

Tabelle 1

Übersicht über die PTSD-Patienten

| <u>Patient</u> | <u>Alter</u> | <u>Verbrennungen</u> | <u>Symptome</u> | <u>Chronische Erkrankungen</u> | <u>Psycho-pharmaka</u> |
|----------------|--------------|----------------------|-------------------------|--------------------------------|------------------------|
| P1 | 64 | Nein | Seelische Veränderungen | Keine | Keine |
| P2 | 61 | Nein | Einschränkung im Alltag | Keine | Keine |
| P3 | 50 | | Seelische Veränderungen | Keine Angabe | Keine |
| P4 | 52 | Nein | Keine Angabe | Keine Angabe | Keine |
| P5 | 36 | Ja | Vorhanden | Keine | Keine |
| P6 | 47 | Ja | Vorhanden | Keine | Keine |

| | | | | | |
|------------------------------|---------------|------|-------------------------|-----------------|-------|
| P7 | 55 | Nein | Seelische Veränderungen | Keine | Keine |
| P8 | 44 | Nein | Einschränkung im Alltag | Keine Angabe | Keine |
| Alters- durch- schnitt | 51,1 Jahre | | | | |

Tabelle 2

Übersicht über die Kontrollgruppe

| <u>Kontrolle</u> | <u>Alter</u> | <u>Trauma (PDS)</u> | <u>Symptome</u> | <u>Chronische Erkrankungen</u> | <u>Psycho- pharmaka</u> |
|------------------------------|---------------|-------------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------------------|
| K1 | 60 | Nein | Nein | Keine | Keine |
| K2 | 61 | Ja | Nein | Keine | Keine |
| K3 | 50 | Nein | Nein | Hyperurikämie | Keine |
| K4 | 53 | Ja | Nein | Hypertonie, Hyperlipidämie | Keine |
| K5 | 40 | Nein | Nein | Keine | Keine |
| K6 | 46 | Ja | Nein | Keine | Keine |
| K7 | 56 | Ja | Nein | Keine | Keine |
| K8 | 43 | Ja | Nein | Keine | Keine |
| Alters- durch- schnitt | 51,1 Jahre | | | | |

Die Blutproben der Patienten und Kontrollpersonen (5x 2.5ml Vollblut) wurden in PAXgene™ Blood RNA Tubes in sitzender Position entnommen.

Jeder Teilnehmer dieser Studie wurde ausführlich über den Versuchsablauf aufgeklärt und hat schriftlich sein Einverständnis gegeben. Die Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt, entsprechend den Prinzipien des Helsinki Abkommens.

3.5.2 Aufarbeitung der RNA, Amplifikation und Labeling der Proben

Das in PAXgene™ Blood RNA Tubes abgenommene Blut wurde nach Protokoll und mit dem entsprechenden PAXgene™ Blood RNA Kit aufgearbeitet. Die isolierte RNA wurde dann quantitativ mit einem Photometer und qualitativ mit dem Bioanalyzer getestet. Die getestete RNA wurde mit dem Message Amp Amplification Kit revers transkribiert und anschliessend in-vitro-transkribiert. Die amplifizierte cRNA wurde unter Einschluss von aadUTP in cDNA umgeschrieben. Die synthetisierte cDNA wurde dann entsprechend dem Labeling-Protokoll weiterbehandelt. Nach dem Labeling wurde die Inkorporations-Effizienz nochmals am Photometer bei 260nm, für Cy3 bei 550nm und für Cy 5 bei 650nm, gemessen.

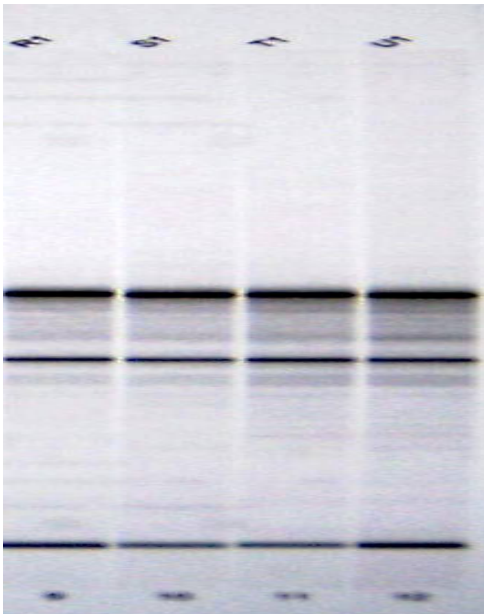


Abbildung 8: Ausschnitt einer RNA-Qualitätsbestimmung mit dem Bioanalyzer von Agilent

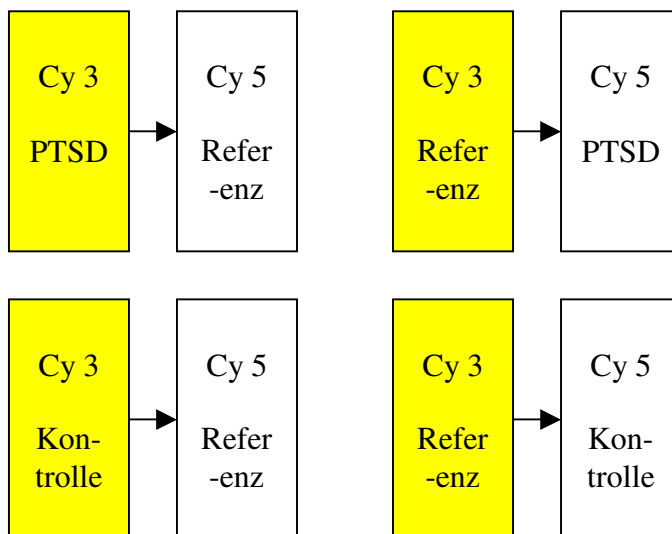
Die obere breite Bande ist die sogenannte 28 S-Bande und die im Vergleich dünnere Bande ist die 18 S-Bande. Die hier gemessene RNA zeigt die erwünschte hochwertige Qualität, die für Microarray-Versuche notwendig ist.

3.5.3 Hybridisierung der Proben

Die gespotteten Slides wurden nach dem Prähybridisierungsprotokoll für die Hybridisierung vorbereitet.

Die Proben der Patienten sowie die Proben der Kontrollpersonen wurden gegen eine standardisierte kommerziell erworbene Referenzprobe bei 55°C über Nacht hybridisiert. Mit den Referenz RNAs wurde wie beschrieben eine reverse Transkription, eine in-vitro-Transkription, eine Umschreibung mit aadUTP in cDNA und das Labeling durchgeführt. Verwendet wurden Universal Human Reference RNAs der Firma Stratagene. Diese Referenz RNAs werden aus zehn verschiedenen Zelllinien gewonnen, die folgende Gewebe beinhalten: Gehirn, Lunge, Zervix, Leber, B-Lymphozyten und Y-Lymphozyten, Liposarkom, Makrophagen, Hoden und Haut. Diese Versuchsanordnung ermöglicht einen Vergleich aller Proben untereinander, da alle Proben gegen eine standardisierte Referenz gemessen werden. Desweiteren bietet sich die Möglichkeit, bei Folgeversuchen auf die gegen die Referenz gemessenen Daten leicht zurückzugreifen. Zur Korrektur des Inkorporationsunterschiedes der Fluoreszenzfarbstoffen wurde zusätzlich ein Dye-Swap durchgeführt. Dies bedeutet, dass jedes Probenmaterial ein Mal mit dem Farbstoff Cy3 und ein Mal mit dem Farbstoff Cy5 gelabelt wird.

Versuchsdurchführung



3.5.4 Scannen

Die Slides wurden in einem Microarray Scanner (Genetix Limited) gescannt. Die Spannung der Photomultiplier-Röhre war sowohl für den roten als auch für den grünen Kanal immer auf 100 % eingestellt. Die beiden resultierenden Ansichten (rot und grün) wurden mithilfe von ImaGene 5 (BioDiscovery) übereinander gelegt.

3.5.5 Signal- und Bildextraktion

Der erste Schritt der Bildextraktion umfasste den Ausschluss aller Spots, die von der ImaGene 5 software als „poor“ (schlecht beurteilbar aufgrund von Verunreinigungen des Signalvorder- oder Hintergrunds, Formunregelmäßigkeiten oder schlechter Spotqualität) markiert worden waren.

Der Modus der Pixelverarbeitung für den Signalvordergrund oder Hintergrund jedes einzelnen Spots wurde als Schätzfunktion beider Kanäle gewählt.

3.5.6 Normalisierung*

Die Auswertung und Normalisierung der Microarraydaten wurde in Zusammenarbeit mit der Fakultät für Informations- und Kognitionswissenschaften, Wilhelm-Schickard-Institut für Informatik an der Eberhard Karls Universität Tübingen durchgeführt. Die nachfolgende Erläuterung der Normalisierung und der Detektion differentiell exprimierter Gene lehnt sich an die vom Wilhelm-Schickard-Institut für Informatik bereitgestellte Beschreibung dieser Abläufe an. Das detaillierte Vorgehen wurde bereits von Zieker et al. veröffentlicht (84). Die Normalisierung wurde in drei Schritten durchgeführt (siehe Abbildung 9). Die drei einzelnen identischen Unterarrays wurden mit der Loess-Korrektur bearbeitet, um die vorhandenen lokalen Bias der Intensitätswerte zu verringern (6; 16). Diese Intensitätswerte des roten (Ch^{red}) und des grünen Kanals (Ch^{green}) wurden als Ausgangswerte verwendet, um den Log-Ratio M und das logarithmierte geometrische Mittel der Intensitäten A für alle Spots auf dem Array zu berechnen (6; 21):

* Kapitel geschrieben von Judith Zieker in Zusammenarbeit mit Janko Dietzsch (Institut für Bioinformatik, Eberhard Karls Universität Tübingen) bis einschließlich Kapitel 3.5.7

$$M = \log_2 \left(\frac{Ch^{red}}{Ch^{green}} \right), A = \log_2 \sqrt{Ch^{red} \cdot Ch^{green}}$$

Um die Auswertung noch verlässlicher zu machen wurde ein Dye-Swap-Design durchgeführt. Es wurden zwei Microarrays hybridisiert. Dies bedeutet, dass auf dem einen Microarray die Probe im roten Kanal (s^{red}) und die Referenz im grünen Kanal (r^{green}) gemessen wurde. Die Hybridisierung wurde auf dem anderen Microarray genau andersherum durchgeführt, so dass die Referenz im roten (r^{red}) und die Probe im grünen Kanal (s^{green}) gemessen wurde. Daraus folgt für die Log-Ratios der Spots:

$$M' = \log_2 \left(\frac{s^{red}}{r^{green}} \right), M'' = \log_2 \left(\frac{r^{red}}{s^{green}} \right)$$

Die drei Replikate (Subarrays) einer Hybridisierung werden anschliessend arithmetisch gemittelt. Dadurch liegen für jedes Transkript jeweils zwei Schätzer vor. M^I , M^{II} und A^I , A^{II} . I und II kennzeichnen die beiden komplementären Dye-Konfigurationen. Am Ende der Normalisierung

werden die Dye-Effekte mithilfe der beiden Schätzer M^I und M^{II} wie folgt eliminiert:

$$M = \log_2 \left(\frac{s}{r} \right) \cong \frac{1}{2} \cdot (M' - M'') = \frac{1}{2} \cdot \left(\log_2 \left(\frac{s^{red}}{r^{green}} \right) - \log_2 \left(\frac{r^{red}}{s^{green}} \right) \right) = \frac{1}{2} \cdot \left(\log_2 \left(\frac{s^{red}}{r^{red}} \right) + \log_2 \left(\frac{s^{green}}{r^{green}} \right) \right)$$

3.5.7 Detektion differentiell exprimierter Gene

Durch das indirekte Design der Hybridisierungsexperimente (siehe 3.5.3) sind unterschiedlich exprimierte Gene an statistisch signifikant unterschiedlichen Log-Ratios M eines Patienten und ihrer entsprechenden Kontrollperson in Bezug auf die Referenz zu ersehen. Verschiedene statistische Testmethoden erlaubten die Einschätzung der statistischen Signifikanz von Unterschieden zwischen den Log-Ratios. Als parametrischer Test wurde als erstes ein gepaarter Zwei-Stichproben-t-Test durchgeführt. Anschliessend wurde der Wilcoxon Test als nichtparametrische Methode angewendet. Die Signifikanzschwelle wurde auf 5 % festgelegt ($\alpha=0.05$). So wurde ein Gen als differentiell expremiert bezeichnet, wenn der P-Value des Tests unter 5 % lag. Um das Problem des mutliplen Testens zu umgehen wurde die Bonferroni-Korrektur (7) durchgeführt. Unter Rücksichtnahme des dateninherenten hohen Rauschens wurde das

Rangprodukt (RP) verwendet. Das RP stellt eine neue nichtparametrische Testmethode dar (11). Bei dieser Anwendung werden die Gene detektiert, die über die einzelnen Replikate eines Experimentes hinweg, durchweg zu den am stärksten hoch oder runterregulierten Genen zählen. Hierbei wird für jedes Gen und jede Hybridisierung der Log-Ratio aus den beiden Expressionswerten des Patienten und der Kontrollperson bestimmt. Für jede einzelne Hybridisierung wird eine Liste hergestellt. Innerhalb einer solchen Liste werden die Gene entsprechend ihres Log-Ratio-Wertes sortiert und in eine Rangfolge gebracht. Ein Gen mit dem höchsten positiven Log-Ratio besetzt dann den ersten Platz und ein Gen mit dem niedrigsten negativen Log-Ratio besetzt den letzten Platz. Anschließend wird für jedes Gen, über alle Hybridisierungen hinweg, das geometrische Mittel der Platzierungen bestimmt. Schließlich werden die Rangprodukte bestimmt und es ergeben sich zwei geordnete Listen in der Reihenfolge mit der die Gene am wahrscheinlichsten hoch bzw. herunter reguliert sind. Um so kleiner der Wert des Rangproduktes eines Genes ist, desto wahrscheinlicher ist seine Position in der Liste nicht zufälligen Faktoren zuzuordnen. Die Signifikanz eines Rangproduktes wird durch die Percentage of False Positive Predictions (pfp), bzw. False Discovery Rate (FDR), in einem permutationsbasierten Ansatz bestimmt (11). In der Studie wurden 100000 Permutationen durchgeführt. Gene mit einem pfp-Wert $< 5\%$ wurden als statistisch signifikant bezeichnet.

3.5.8 Quantitative Real Time PCR

Gene von Interesse, die sich nach der Auswertung der Slides verändert haben, müssen mit einer zweiten unabhängigen Methode bestätigt werden. Die Methode der Wahl mit einer entsprechenden Sensitivität ist die Real Time PCR.

Einige ausgewählte cDNAs wurden mithilfe von Real Time PCR in einem LightCycler Instrument (Roche, Mannheim/ Germany) quantifiziert. Für diese PCR gestützte Vervielfältigung wurde das LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I-kit (Roche) entsprechend der Anleitung verwendet. Die finalen Konzentrationen von Primern und Magnesium wurden für jedes Primerpaar mit Vorversuchen optimiert.

Die Spezifität der PCR Bedingungen wurde gesichert durch Ermittlung der Schmelztemperaturen der betreffenden zu amplifizierenden cDNAs. Von diesen wurde

zuvor in Agarose-Gel-Analysen gezeigt, dass sie mit der erwarteten Produktgröße korrelieren.

Eine relative Quantifizierung der Genexpressionslevel wurde mithilfe einer externen Standard-Kurve durchgeführt, die parallel zu den zu untersuchenden Proben mitlief. Diese Standard-Kurven wurden durch serielle Verdünnung einer bereits durch PCR amplifizierten Probe des betreffenden Amplifikats hergestellt.

Die lineare Anordnung wurde für jeden PCR Lauf festgelegt indem der CP-value (crossing point), der LightCycler Software, gegen den Verdünnungsfaktor dieser Standards berechnet wurde. Dieses Vorgehen erlaubt den quantitativen Vergleich der Proben. Für Proben innerhalb der linearen Verteilung der Standardkurven wurde der betreffende Wert über die Regressionsanalyse berechnet. Das Verhältnis der Werte spezifischer Proben zu β -Actin Werten erlaubt die relative Quantifizierung der Genexpression.

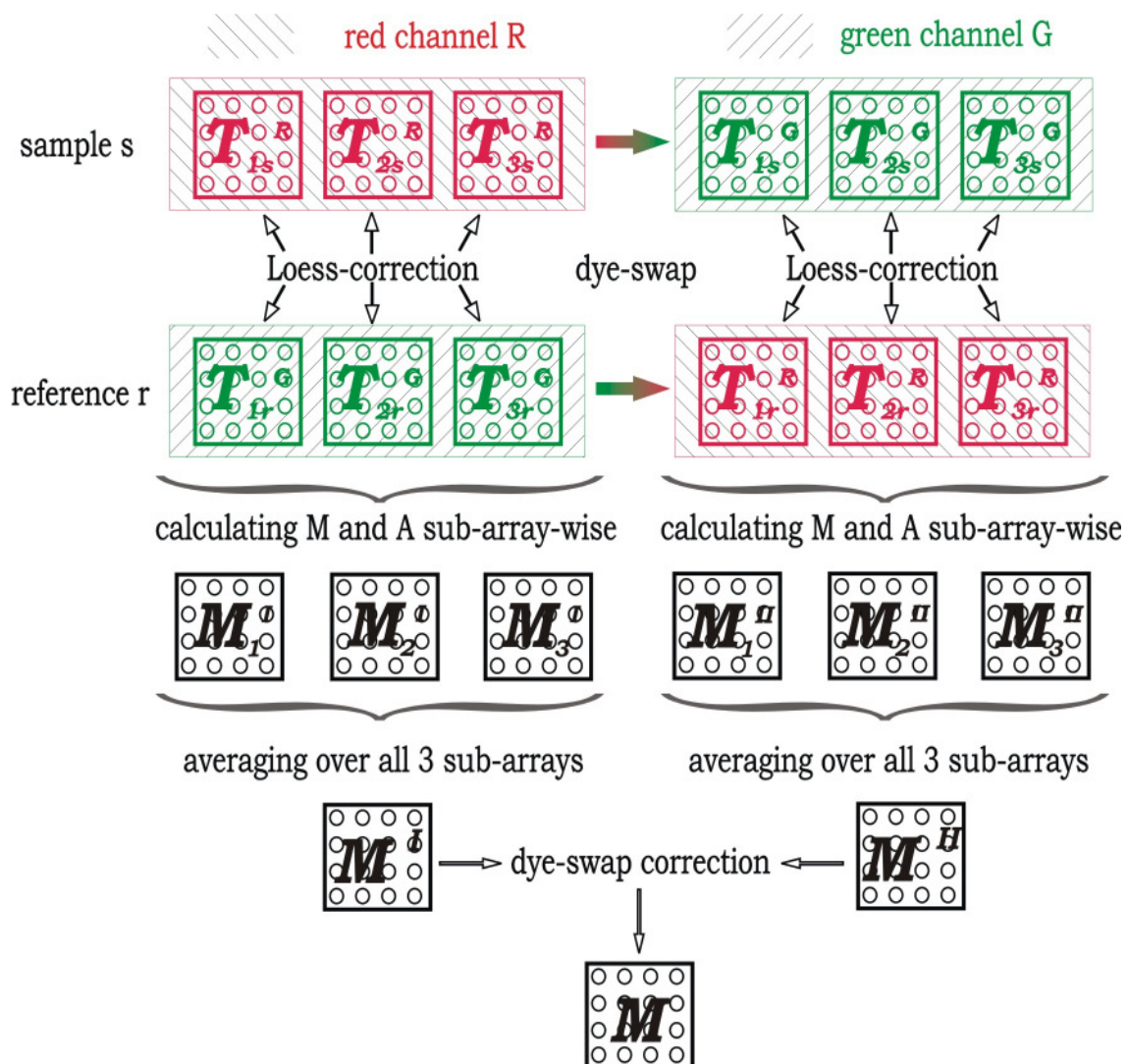


Abbildung 9: Darstellung der Normalisationsprozedur*

Die Vorgehensweise des Dye-swaps ist im oberen Teil der Darstellung zu sehen. Auf der linken Seite ist die Probe rot fluoreszierend und die Vergleichsprobe fluoresziert grün. Auf der rechten Seite sind die Fluoreszenzen vertauscht. Nachdem die drei einzelnen identischen Unterarrays mit der Loess-Korrektur bearbeitet wurden, wurden die log-Relationen M_x^I , M_x^{II} der einzelnen Spotintensitäten von Probe und Vergleichsprobe berechnet. M^I , M^{II} sowie A^I , A^{II} ergaben sich durch Bildung des Mittelwertes aller drei identisch gespotteten Unterarrays. Beide auf diesem Weg ermittelte Werte M^I und M^{II} wurden benutzt, um schließlich den über die Dye-Swap-

* Grafik erstellt von Janko Dietzsch (Institut für Bioinformatik, Eberhard Karls Universität Tübingen)

Korrektur berechneten Wert M zu erhalten (siehe Material und Methoden, Normalisation).

4 Ergebnisse

4.1 Microarray-Ergebnisse

Es wurde eine Vielzahl von verändert exprimierten Genen im Vergleich zwischen Patienten mit posttraumatischer Belastungsstörung und dem Kontrollkollektiv gefunden.

Die vermehrt und vermindert exprimierten Gene mit einem pfp-Value (pfp < 0,05) sind in den Tabellen 3 und 4 aufgelistet.

Tabelle 3

Microarray Ergebnisse

Vermindert exprimierte Gene / Downregulated genes

| <u>Genprodukte</u> | <u>pfp-value</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Colony stimulating factor 2 receptor, beta, low affinity (granulocyte-macrophage) | 0.00034 |
| Thioredoxin reductase 1 (*) | 0.00031 |
| IL 18 (interferon gamma inducing factor) (*) | 0.00110 |
| Chemokine receptor 1 | 0.00104 |
| 3-Phosphoglycerate dehydrogenase (*) | 0.00207 |
| Casein kinase1, gamma 3 | 0.00704 |
| Caspase 2 | 0.00668 |
| Superoxide dismutase 1 (*) | 0.00972 |
| CD 3Z | 0.01077 |
| IL 16 (*) | 0.02826 |
| Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 (*) | 0.02658 |
| G-protein coupled receptor 65 | 0.03056 |
| Calnexin | 0.03283 |
| CD 81 | 0.04736 |

(*) In vorliegender Studie untersuchte Gene

Tabelle 4

Microarray Ergebnisse

Vermehrt exprimierte Gene /Upregulated genes

| <u>Genprodukte</u> | <u>pfp-value</u> |
|------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Insulin-like growth factor 2 | 0.00078 |
| IL 8 receptor alpha | 0.00401 |
| Integrin beta 4 | 0.02113 |
| High affinity aspartate/ glutamate transporter, member 6 | 0.03260 |
| Endothelial differentiation lysophosphatidic acid G-Protein coupled receptor 4 (*) | 0.08566 |

(*) In vorliegender Studie untersuchtes Gen

Aus der Liste der durch das Rang-Produkt gefundenen, vermindert exprimierten Gene wurden sieben Gene ausgewählt. Diese sieben Gene sind in den Tabellen 3 und 4 durch (*) markiert. Es handelt sich hierbei um Gene, deren Interaktionen im Zusammenhang mit Posttraumatischen Belastungsstörungen von besonderem Interesse sein könnte. Zu diesen Genen zählen Interleukin 18 (IL18), Superoxide dismutase 1 (SOD), Thioredoxin reductase 1 (TXR), Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 (EDG1), Interleukin 16 (IL16), 3-Phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) und Endothelial differentiation lysophosphatidic acid G-Protein coupled receptor 4 (EDG4).

Diese sieben signifikant regulierten Gene ($pfp < 0.05$), und ein zusätzliches Gen, das nicht auf dem Microarray vertreten war, der xc(-) Glutamat-Cystin-Antiporter (XC), wurden mit einer zweiten unabhängigen Methode, der Real Time PCR, überprüft.

4.2 Real Time PCR-Ergebnisse

Fünf der sieben auf dem Chip als reguliert angegebenen Gene zeigten bei der Real Time PCR signifikante Ergebnisse ($p < 0.05$). Diese Gene waren IL18, SOD, TXR, EDG1 und IL16. Damit wurden die Chipergebnisse für diese Gene bestätigt.

PHGDH und EDG4 zeigten in der Real Time PCR keine Signifikanz. Das zusätzlich untersuchte xc(-)-Glutamat-Cystin-Antiporter Gen war signifikant herab-reguliert.

Die Ergebnisse der Real Time PCR sind in Tabelle 5 und in der Abbildungen 7 dargestellt. Die Primersequenzen der Gene sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Die daraus resultierenden, physiologischen Interaktionen sind in vereinfachter Weise in Abbildung 11 und 12 veranschaulicht.

Tabelle 5

Ergebnisse der Real Time PCR

| Genprodukte | <u>mean</u> | <u>median</u> | <u>tTest pValue</u> |
|-------------|-------------|---------------|---------------------|
| IL18 | -1.4407 | -1.7337 | 0.0047 |
| SOD | -0.7834 | -0.7213 | 0.0156 |
| TXR | -1.0474 | -1.4807 | 0.0265 |
| EDG1 | -1.208 | -2.4014 | 0.0377 |
| IL16 | -0.4975 | -0.4157 | 0.0407 |
| XC | -2.2625 | -2.45 | 0.0490 |
| PHGDH | -0.4454 | -0.5422 | 0.2738 |
| EDG4 | -0.3044 | -0.0056 | 0.7790 |

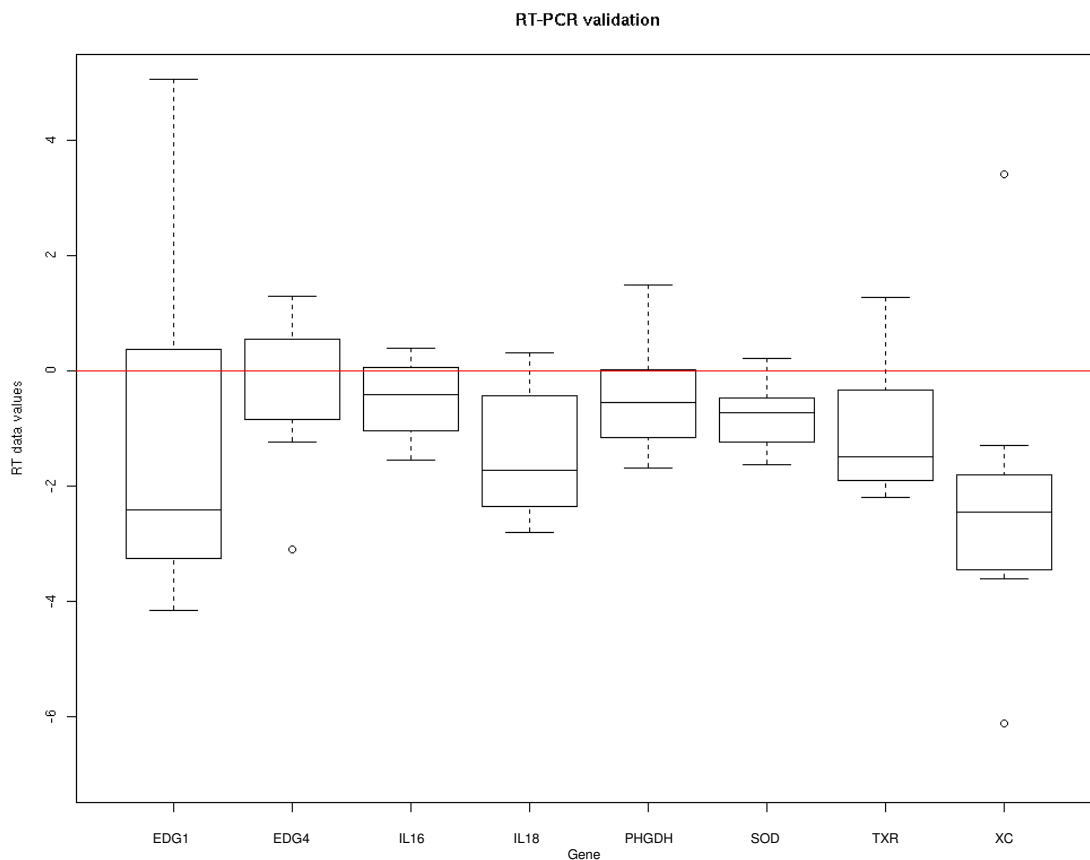


Abbildung 10: Box-plots der Real Time PCR Messungen*

Die Box-plots der Real Time PCR Messungen werden hier dargestellt als \log_2 -Werte der vielfachen Veränderungen zwischen Patienten und Kontrollpersonen. Die gezeigten box-whisker-plots visualisieren das Minimum (unterster Querstrich), den Median (Linie durch die Box) und das Maximum (oberer Querstrich) der Aufteilung der Ergebnisse. Die separat dazu eingezeichneten Punkte sind Ausreißer nach der Definition, die in standardisierter Weise benutzt wird: Punkte wurden als Ausreißer betrachtet, wenn das Minimum der Entfernung zum ersten und dritten Viertel größer ist als das 1,5 fache des dazwischen liegenden Bereiches (IQR= drittes Viertel – zweites Viertel).

* Grafik erstellt von Janko Dietzsch (Institut für Bioinformatik, Eberhard Karls Universität Tübingen)

Tabelle 6

Verwendete Primer bei der Real Time PCR

| <u>Genprodukte</u> | <u>Primer</u> |
|--------------------|-------------------------------------------------------|
| IL18 | 5'- TGCATCAACTTTGTGGCAAT 5'- ATAGAGGCCGATTCCTTGG |
| SOD | 5'- TGGCGGATGTGTCTATTGAA 5'- TTACACCACAAGCCAAACGA |
| TXR | 5'- CTTGTGGCCTTTCTGAGGAG 5'- CCCACAACACGTTTCATTGTC |
| EDG1 | 5'- CCACAACGGGAGCAATAACT 5'- CAGAATGACGATGGAGAGCA |
| IL16 | 5'- TCTGCAGCCAGTGATGTTTC 5'- TGTTCTGAGGCTGCTCCTTT |
| XC | 5'- TTGTGTCCACCATCTCCAAA 5'- TAGTGACAGGACCCACACA |
| PHGDH | 5'- GGCTCAATGGAGCTGTCTTC 5'- TTCAGTCACATGCTGCTTCC |
| EDG4 | 5'- TACTCTTGCCGAGATGCTGA 5'- AAGGGTGGAGTCCATCAGTG |

5 Diskussion

Zusammenfassung der Ergebnisse

Posttraumatische Belastungsstörungen gehen einher mit einer verminderten Expression von Genen, die im Zusammenhang mit Entzündung und Stress relevant sind.

Es konnte in Micorarray-Versuchen gezeigt werden, dass bei 15 Genen eine verminderte Genexpression im Blut der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe vorliegt. Fünf Gene zeigten eine erhöhte Genexpression.

Aus diesen 20 Genen wurden sieben Gene von speziellem Interesse ausgewählt und mit Real Time PCR untersucht. Thioredoxin Reduktase 1, Interleukin 18, 3-Phosphoglycerate dehydrogenase, Superoxiddismutase 1, Interleukin 16, Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 und Endothelial differentiation lysophosphatidic acid G-Protein coupled receptor 4. Bei fünf dieser sieben Gene konnten die Ergebnisse der Microarray-Versuche bestätigt werden. Die anderen beiden Gene zeigten in der Real Time PCR keine signifikante Veränderung, wiesen aber auch keinen gegenteiligen Trend auf. Zusätzlich wurde ein weiteres Gen, das nicht auf dem Chip vertreten war, aber im Zusammenhang mit den anderen Genen von besonderem Interesse war mit der Real Time Methode getestet, der xc(-)Cystin-Glutamat Antiporter. Die mRNA dieses Genes war im Patientenblut ebenfalls signifikant herab reguliert.

Einfluss einer lange zurückliegenden Traumasituation auf die Genexpression

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von einem 15-Jahre zurückliegenden speziellen Trauma auf die Genexpression von weißen Blutkörperchen im peripheren Blut untersucht. Die als reguliert gefundenen Gene sind mehreren Gruppen zuzuordnen. Die erste große Gruppe spielt eine wichtige Rolle im oxidativen Stressgeschehen. Die zweite Gruppe hat mit entzündlichen Prozessen zu tun.

PTSD und oxidativer Stress

In der Literatur gibt es Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen PTSD und oxidativem Stress (62). Es ist bekannt, dass oxidativer Stress Zell-, Gewebe- und Organschäden verursacht. Diese Schäden können als mögliche Konsequenzen zu Zelltod, vorzeitiger Zellalterung und degenerativen Erkrankungen führen. Oxidativer Stress wird hauptsächlich von Reaktiven Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS) verursacht. ROS unterscheiden sich von anderen Verbindungen in der Anzahl ihrer Elektronen in der äußeren Schale. ROS weisen hier ein ungepaartes Elektron auf. Diese Eigenschaft macht sie sehr reaktiv gegenüber anderen Molekülen. Durch Aufnahme eines weiteren Elektrons oxidieren ROS eine Vielzahl anderer Moleküle und setzen die Zelle damit unter oxidativen Stress. Die Hauptursache für die Entstehung von ROS ist das Elektronen-Leck, das bei der mitochondrialen Phosphorylierung entsteht (78). Dabei gelangen geringe Anteile des Elektronenflusses der inneren Mitochondrienmembran durch diese hindurch. Einzelne Elektronen werden dabei auf ein Sauerstoffmolekül übertragen. So entsteht ein Superoxid-Anion O_2^- . Aber auch chemische, physikalische und biologische Stressoren führen zu einem erhöhten Anteil von ROS. Zu den chemischen und physikalischen Stressoren zählen UV- und ionisierende Strahlungen, Hypoxie, Chemikalien und Medikamente sowie Metallverbindungen. Bei den biologischen Einflussfaktoren auf die ROS Bildung spielen insbesondere Hormone, Zytokine, die beispielsweise bei Entzündungsprozessen ausgeschüttet werden, sowie Enzyme, z.B. die Cyclooxygenasen und Wachstumsfaktoren eine große Rolle.

Neben den Sauerstoffradikalen sind auch Stickstoffradikale (reaktive nitrogen species, RNS) ins oxidative Stressgeschehen involviert. ROS und RNS können direkt und indirekt oxidative Veränderungen und Schäden in Biomolekülen verursachen. Sowohl DNA als auch RNA wird geschädigt. Die Schäden an DNA und RNA können zu Zelldysfunktion und Apoptose führen und sind mit Krebserkrankungen und Autoimmunerkrankungen assoziiert (28; 32). Des Weiteren wirken ROS und RNS auch auf Proteine und Lipide. Schäden und Veränderungen an Lipiden führen zu einer erhöhten Menge an LDL (low density lipoproteins), die von ROS oxidiert werden.

Diese Lipoproteine werden an die Gefäßwände angelagert und bilden damit einen der ersten Schritte der Artheroskleroseentstehung (47).

Es gibt mehrere Systeme, die die Zelle vor oxidativem Stress schützen. Der wichtigste intrazelluläre antioxidative Puffer ist Glutathion (GSH) (54). GSH ist ein Tripeptid, bestehend aus Glutamat (Glu), Cystein (Cys) und Glycin (Gly). Über zwei ATP-abhängige Reaktionen findet die GSH Synthese statt. Zunächst wird enzymatisch eine Ligation von Glutamat und Cystein katalysiert. Anschließend wird das Dipeptid mit Glycin verknüpft (55). Die zuerst beschriebene Reaktion ist gleichzeitig der limitierende Schritt für die GSH Synthese und hängt ab von der Verfügbarkeit von Cystin. Des Weiteren findet sich eine Feedback-Hemmung des betroffenen Enzyms durch GSH. Das für die Synthese essentielle Cystein wird als Dipeptid Cystin (Cys₂) in die Zelle transportiert und dort gespalten. Den primären Aufnahme-Mechanismus für Cys₂ garantiert der chlorid-abhängige xc(-)Cystin-Glutamat Austauscher (5). Der xc(-) Austauscher wurde in C6 Glioma Zellen (39) und in primären Astrozyten (1) gefunden, sowie in fetalen Gehirnzellen (70) und Neuronen des Hippocampus (1). Aber auch humane T-Zellen und Lymphozyten verfügen über diesen Transporter (29; 33). Ein weiterer wichtiger Regulations-Mechanismus der Cystin-Aufnahme ist deren Hemmung durch freies Glutamat. Dies führt ebenso wie die Verminderung der Cystin-Aufnahme durch einen defekten xc(-) Transporter zu einer Verringerung von Glutathion in der Zelle und damit zu einer Verminderung des antioxidativen Schutzes.

In der vorliegenden Studie wurde im Zusammenhang mit oxidativem Stress die Genexpression des xc(-) Transporter mit der Real Time PCR untersucht und eine verminderte Regulation der mRNA in Patienten mit PTSD gefunden.

Extrazellulär erhöhtes freies Glutamat hemmt die Cystin-Aufnahme in die Zelle (59). Stress erhöht den Glutamatspiegel durch Stimulation der cortico-limbischen Glutamat-Ausschüttung. Dieser Zusammenhang ist relevant für Patienten mit PTSD. Wie auch in vielen anderen psychiatrischen Krankheitsbildern spielt Glutamat auch bei PTSD eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass durch Stress ausgelöste hohe Mengen an freiem Glutamat zu dissoziativen Symptomen führen können, die auch zum Symptomkomplex bei Patienten mit einer posttraumatischen Belastungsstörung gehören (12). Dieser mögliche Zusammenhang kann nun durch die zusätzlich Wirkung des freien Glutamats auf die Glutathion-Synthese ergänzt werden. In diesem Kontext steht auch die

verminderte Expression der xc(-)Cystin-Glutamat Antiporter mRNA. Dieser Transporter wird über mehrere Mechanismen reguliert. In Makrophagen ist Lipopolysaccharid (LPS) ein potentes Stimulanz der systemischen xc(-)Transporter Aktivität und führt damit zu einer Erhöhung des Glutathions. Gehemmt wird der xc(-) Austausch von Glutamat, Aspartat und weiteren nicht-selektiven Inhibitoren wie L-Serine-O-Sulfat (64). Zudem wirkt auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) hemmend auf die Aktivität des Cystin-Glutamat-Transporters (siehe Abbildung 11).

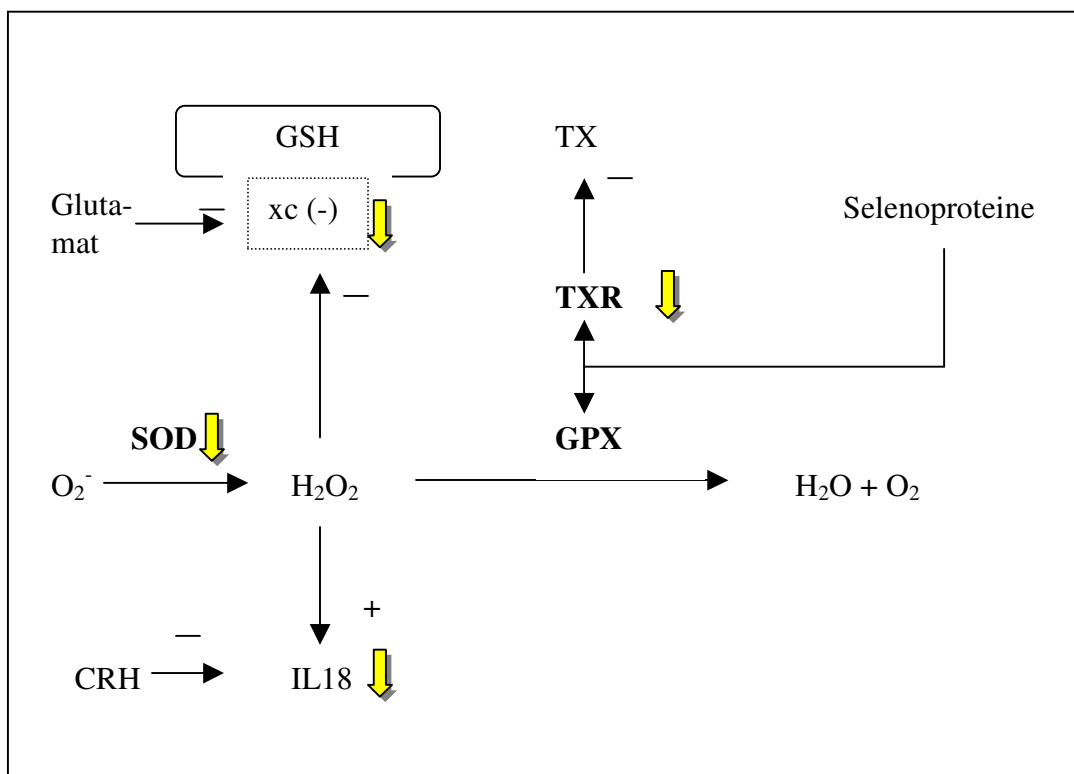


Abbildung 11: Interaktion der gefundenen Gene im oxidativen Stoffwechsel
Schaubild zur Darstellung des Zusammenhangs xc(-)Transporter, Glutathion, SOD.

Legende

(-) Reduktion

(+) Vermehrung

↓ in der vorliegenden Studie vermindert expremiert

(SOD). Superoxiddismutase

(xc(-)) xc(-) Transporter

- (GPX) Glutathionperoxidase.
- (GSH) Glutathion
- (TXR) Thioredoxinreduktase
- (TX) Thioredoxin
- (CRH) Corticotropin Releasing Hormone

Bei an PTSD erkrankten Patienten könnte demnach eine erhöhte Glutamatmenge im Blut eine Erklärung für die verminderte Genexpression des xc(-)Transporters darstellen. Dies könnte zu einer Reduktion des verfügbaren redox-aktiven Glutathions führen mit der oben erläuterten Konsequenz, die eine Erhöhung der freien Radikale im Körper bewirkt und damit vorzeitige Alterung von Zellen und Geweben, ein höheres Risiko an Autoimmunerkrankungen zu erkranken und ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen.

Es wurde nachgewiesen, dass der xc(-)Transporter und der extrazelluläre Glutamatspiegel im Gehirn voneinander abhängig sind. Der non-synaptische xc(-)Transporter stellt dabei eines der wichtigsten Bestandteile zur Aufrechterhaltung der Glutamatkonzentration in diesem Zusammenhang dar. Es wurde bereits gezeigt, dass dieser Transporter im Nucleus Accumbens entscheidend für die Regulation von extrazellulärem Glutamat ist (3). Bei einer Erhöhung des extrazellulären Glutamats im Nucleus Accumbens kann der xc(-)Transporter die synaptische Freisetzung von Glutamat hemmen (57). Im Gegensatz dazu führt eine verringerte extrazelluläre Glutamatkonzentration, die nicht durch den non-synaptischen xc(-)Transporter verursacht wurde, konsekutiv zur vermehrten Glutamatfreisetzung durch synaptische Transporter. Somit könnte ein extrazellulär verminderter Glutamatspiegel, verursacht durch einen defekten xc(-)Transporter und der daraus resultierenden verminderten Glutamatfreisetzung, auch die Cystin Aufnahme in die Zelle negativ beeinträchtigen. Dieser Effekt könnte im Gehirn von besonderer Bedeutung sein. Grundsätzlich kann man davon ausgehen, dass der extrazelluläre Glutamatspiegel im Gehirn in einem bestimmtem Konzentrationsbereich aufrechterhalten wird.

In Verhaltensstudien konnte gezeigt werden, dass die oben beschriebene Konstellation der Glutamatfreisetzung von synaptischen Transportern ein starker Reiz für die Rückfälligkeit zur Droge bei Süchtigen auslösen kann (52). An Tiermodellen wurde

nachgewiesen, dass das Verlangen nach der Droge durch N-Acetyl Cystin (NAC), einem xc(-)Transporter Agonist, vermindert werden konnte (57). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass Patienten mit PTSD oft an sekundärem Alkoholismus leiden (10; 41; 53; 71). Aus diesem Grund ist es denkbar, dass bei Behandlung mit NAC die Aktivität des Cystin-Glutamat-Transporters gesteigert und damit die Stressbelastung für Patienten mit PTSD abgeschwächt wird.

Es gibt mehrere antioxidativ wirkende Enzyme, die ROS reduzieren und in weniger oder nicht reaktive Moleküle überführen. Ein wichtiges Enzym in diesem Zusammenhang ist die Superoxiddismutase (SOD), die Sauerstoffradikale (O_2^-) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umwandelt. Es gibt mehrere Formen der SOD, die von unterschiedlichen Metallen abhängig sind. Die wichtigste Form ist die Mangan-abhängige SOD (MnSOD). Es wurde im Tiermodell gezeigt, dass knock-out Mäuse mit defektem MnSOD Gen kurz nach der Geburt sterben (56). Andererseits führt eine Überexpression dieses Genes zu einer verlängerten Lebensspanne bei *Drosophila melanogaster* (61).

Ein weiteres antioxidatives Enzym ist die Selen-abhängige Glutathionperoxidase (GPX), die H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff umwandelt. Während dieses Vorgangs wird GSH in seine oxidierte Form übertragen

Die Eisen-abhängige Katalase reduziert ebenfalls H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff.

Die Selen-abhängige Thioredoxin Reduktase (TXR) reduziert das ubiquitär vorkommende redox-aktive Thioredoxin unter NADPH-Verbrauch. Thioredoxin Reduktase weist eine breite Substratspezifität auf. Neben Thioredoxin reduziert es außerdem Hydroperoxide, Vitamin C oder lipoic acid (LPA). Die in Säugetieren vorkommenden TXR Isoformen sind homolog zur Glutathion Reduktase aufgebaut und enthalten eine C-terminale Verlängerung mit einer Cystin-SelenoCystin Sequenz, die das aktive Zentrum des Enzyms bilden.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass die mRNAs einiger für das antioxidative System äußerst wichtigen Enzyme bei PTSD Patienten in veränderten Mengen vorhanden sind. Es konnte gezeigt werden, dass die SOD und die TXR mRNAs

vermindert exprimiert sind. Dies konnte sowohl im Microarray-Versuch als auch in der Real Time PCR nachgewiesen werden.

Man kann davon ausgehen, dass bei Patienten mit verminderter SOD Aktivität die physiologisch normal vorkommende Menge von Sauerstoffradikalen nicht suffizient neutralisiert werden kann. Schlussfolgernd kann also festgehalten werden, dass die damit entstehende Menge an Sauerstoffradikalen, die leicht erhöht ist, über einen unphysiologisch verlängerten Zeitraum bestehen bleibt und damit Ursache für ständig andauernde Schädigung darstellen könnte. Vermutlich führt die reduzierte Verfügbarkeit von SOD und TXR zu einem persistierenden, jedoch nicht signifikant erhöhten, Überschuss an Sauerstoffradikalen. Das könnte erklären, dass Patienten, die an PTSD leiden, ein höheres Risiko haben kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln (36). Eine Studie hat des weiteren gezeigt, dass PTSD Patienten häufiger an Autoimmunkrankheiten wie rheumatoider Arthritis, Psoriasis, insulin-abhängigem Diabetes mellitus oder Erkrankungen der Schilddrüse leiden (8). In der Pathophysiologie all dieser Erkrankungen spielt das vermehrte Vorhandensein von freien Radikalen eine wichtige Rolle.

PTSD und Entzündung

Zusätzlich zu den Ergebnissen, die das antioxidative System betreffen, zeigen die in der vorliegenden Untersuchung gewonnenen Daten interessanterweise eine verminderte Expression von Interleukin 18 (IL18) mRNA, Interleukin 16 (IL16) mRNA und Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 (EDG1) mRNA, was durch Real Time PCR bestätigt wurde. Keines dieser Gene wurde bisher im Zusammenhang mit posttraumatischen Belastungsstörungen erwähnt.

Stress kann über das oben erwähnte oxidative System eine Entzündungsreaktion im Körper aktivieren. Diese hat kurzfristig physiologischen Nutzen, sie setzt das Immunsystem in Alarmbereitschaft. Lang andauernder Stress hingegen führt zu einer chronischen Entzündungsreaktion mit zum Teil schwerwiegenden Folgen für physiologische und psychische Abläufe.

IL18 ist ein proinflammatorisches Zytokin. Dieses Zytokin kann die Interferon gamma Produktion von T-Zellen induzieren, was zu einer Stimulation des gesamten Immunsystems führt. Des weiteren induziert es die Produktion von Tumornekrose Faktor alpha (TNF-alpha). Durch diese und weitere inflammatorische Wirkungen ist es an der Entstehung von entzündlicher rheumatischer Arthritis (51) oder entzündlichen Lungenerkrankungen (17) beteiligt. In diversen Studien wurde gezeigt, dass IL18 über verschiedene Mechanismen reguliert wird. H_2O_2 führt in Herzmuskelzellen zu einer Induktion von IL18 mRNA und dem zugehörigen Protein sowie zur Ausschüttung von IL18 (13). Wie oben im Zusammenhang mit SOD erläutert, könnte H_2O_2 bei Patienten, die an PTSD leiden, vermindert vorhanden sein (siehe Abbildung 11).

Es gibt einen weiteren Regulationsmechanismus, der Einfluss auf die Genexpression von IL18 hat. Corticotropin Releasing Hormone (CRH) ist ein Liberin, das im Hypothalamus gebildet wird und die Ausschüttung von ACTH aus der Hypophyse fördert. ACTH führt zu einer Freisetzung von Cortisol aus der Zona fasciculata der Nebennierenrinde. Durch negative Rückkopplung von Cortisol auf Hypothalamus und Hypophyse wird der Cortisolspiegel geregelt. Eine gesteigerte Aktivität von Hypothalamus und Hypophyse sind im Sinne einer Verstellung des Cortisol-Sollwertes aufzufassen. Es wurde gezeigt, dass CRH zu einer verminderten Genexpression von IL18 in Keratinozyten führt (63). Patienten mit PTSD zeigen erhöhte Werte von CRH (38). Zudem haben betroffene Patienten einen erniedrigten Cortisol-Spiegel im Blut (37). Vermutlich kann das Ergebnis der verminderten Regulation von IL18 mRNA in Patienten mit PTSD auf zwei Ursachen zurückgeführt werden: zum einen auf das verminderte Vorhandensein von H_2O_2 , zum anderen auf die Erhöhung der hypothalamischen Aktivität und damit von CRH in Patienten mit PTSD (siehe Abbildung 11).

Ein weiteres interessantes reguliertes Gen, das in den Zusammenhang mit Inflammation und Immungeschehen eingeordnet werden kann, ist IL16. IL16 ist in der vorliegenden Studie bei Patienten mit PTSD signifikant vermindert exprimiert. Dieses pleiotrope Zytokin spielt eine wichtige Rolle im chemotaktischen Geschehen, in der Modulation der T-Zell-Aktivierung sowie bei der Entzündungs- und Immunantwort. Des weiteren agiert IL16 als Inhibitor der HIV Replikation. Sowohl im Zellkern als auch im

Zytoplasma von T Zellen wird das Vorläuferprotein von IL16, das sogenannte Pro-Interleukin 16 (pro-IL16) exprimiert. Zytoplasmatisches pro-IL16 stellt das Vorläufermolekül von ausgereiftem und damit funktionellem IL16 dar. Im Gegensatz dazu ist das im Kern exprimierte pro-IL16 mit der G0/G1 Zell Zyklus Phase verknüpft (80). Das Produkt dieses Genes (Pro-IL16) unterliegt einem proteolytischen Prozess. Pro-IL16 wird von Caspase 3 in seine bioaktive Form gespalten (22). Caspase 3 wird durch Sphingosin 1-phosphat (S1P) reguliert. Diese Regulation wird vermittelt über den Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 (EDG1). EDG1 ist in unserer Studie ebenfalls signifikant vermindert reguliert. Dieser Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor und ist in Endothelzellen stark vermehrt exprimiert. Er ist beteiligt an Prozessen, die für die Differenzierung von Endothelzellen verantwortlich sind (46). Eine Aktivierung des Rezeptors fördert die Zell-Adhesion. Die verringerte Verfügbarkeit von EDG1 hebt die hemmende Wirkung auf Caspase 3 auf. Dies könnte ein Regulationsmechanismus sein, um die Spaltung von pro-IL16 in seine aktive Form durch vermehrte Aktivität von Caspase 3 zu fördern. Bei geringen Mengen von pro-IL16 kann eine solche Umwandlung nicht stattfinden (siehe Abbildung 12).

Die verminderte Expression von IL18 und IL16 könnte als Schutzmechanismus des Körpers gegen das chronische Entzündungsgeschehen verstanden werden, das durch den psychischen Stress, dem PTSD Patienten ständig ausgesetzt sind, verursacht wird.

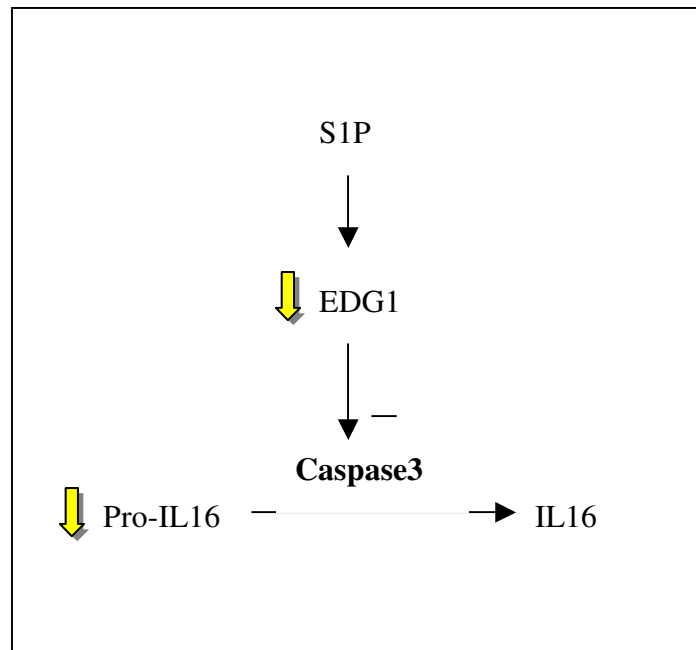


Abbildung 12: Darstellung des Zusammenhangs IL16 – EDG1 – Caspase 3

Caspase 3 spaltet Pro-IL16 in seine aktive Form. Die Regulation erfolgt über S1P und wird über EDG1 vermittelt.

(-) Reduktion

(+) Vermehrung

↓ in der vorliegenden Studie vermindert expremiert

S1P Sphingosin 1-phosphat

EDG1 Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1

Weitere gefundene Gene

Die in den Tabellen 1 und 2 aufgelisteten, durch die Mikroarray-Versuche entdeckten, zusätzlichen Gene wurden nicht durch eine quantitative Real Time PCR bestätigt, weil ein direkter, physiologischer Zusammenhang mit den selektierten und in den Abbildungen 11 und 12 dargestellten Gene nicht ersichtlich war. Die Tatsache, dass bereits bei den selektierten Genen zwei Abbildungen benötigt wurden, zeigt jedoch, dass wir aufgrund der Datenlage in der Literatur und auch mangels eigener Vorstellungskraft nicht in der Lage sind, einen möglichen, physiologischen

Gesamtkontext zu entwerfen, in den sich alle gefundenen Gene zwanglos einfügen lassen. Immerhin ergeben sich aber auch für die nicht näher betrachteten Gene Anhaltspunkte in der Literatur, die darauf hinweisen, dass sie bei Stressreaktionen oder der Bildung von Radikalen beteiligt sind.

Eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen nimmt beispielsweise der in dieser Studie vermindert exprimierte Colony stimulating factor 2 receptor beta (CSF2RB) ein. Aus der Literatur ist bekannt (26), dass die CSF-Rezeptor-Aktivierung durch GM-CSF, IL-3, oder IL-5 zur Produktion und Freisetzung von Sauerstoffradikalen führt. Eine Herabregulierung der beta-Untereinheit hat zur Folge, dass der Rezeptor nur noch vermindert aktivierbar ist und damit die ROS-Produktion abnimmt. Diese Zusammenhänge unterstützen unsere Sicht, dass bei den PTSD-Patienten vermehrte ROS-Produktion stattfindet, in deren Folge kompensatorische Mechanismen, wie hier z.B. die – möglicherweise permanente – Herabregulierung der Rezeptor-beta Untereinheit aufgebaut werden. Da diese Untereinheit entscheidend für die hochaffine Ligandenbindung an den CSF-Rezeptor ist, muss davon ausgegangen werden, dass hier an einer wichtigen Stelle des Immunsystems chronische, funktionelle Einschränkungen auftreten können..

Reaktive Sauerstoffspezies aktivieren zudem Caspase 2, welche durch Freisetzung von Cytochrom c und weiteren mitochondrialen Apoptosefaktoren Zellapoptose induziert (31; 76). Eine vermindert exprimierte Caspase 2 mRNA könnte demnach ein Mechanismus zur Reduktion, der in dieser Studie vermuteten, schädigende Einflüsse durch konstant leicht erhöhte ROS Konzentrationen bei PTSD Patienten sein.

Ähnlich zu interpretieren ist die hier gefundene vermehrte Expression des Insulin-like growth factor 2 (IGF2), einem Wachstumsfaktor, der Zellen vor oxidativem Stress schützen kann (44).

11 Chemokine sind bekannt (77), die an den Chemokine receptor 1 (CCR1) binden. Die rezeptorvermittelte Signaltransduktion führt zur Differenzierung und Aktivierung von Leukozyten in inflammatorischen Geweben, und ist bei der Pathogenese von Entzündung und Autoimmungeschehen beteiligt (69). Eine verminderte Expression der CCR1 mRNA könnte einen Regulationsmechanismus darstellen, um die in dieser Studie vermuteten chronischen Entzündungszustände bei PTSD Patienten durch reduzierte Aktivierung inflammatorischer Zellen und Prozesse zu vermindern.

Die weiteren gefundenen Gene ließen sich nicht ohne weiteres mit oxidativem Stress oder Entzündungsgeschehen in Zusammenhang bringen.

Schlussfolgerung

Das Ziel dieser Studie war es, Veränderungen in der Genexpressionen, die im Zusammenhang mit PTSD stehen, und gegebenenfalls neue Ansatzmöglichkeiten für die Therapie des PTSD zu entdecken. Mithilfe der cDNA Microarray Technologie wurde die Genexpression von Patienten mit PTSD und den entsprechenden Kontrollen im peripheren Blut untersucht. Es ist gelungen, eine Reihe von bisher im Zusammenhang mit PTSD unbekannt Genen zu ermitteln und diese hier detailliert zu beschreiben. Des weiteren konnte die Zuverlässigkeit der selbst entwickelten Microarray Methoden mithilfe der Real Time PCR gut und reproduzierbar bestätigt werden.

Es sei nochmals angemerkt, dass eine veränderte Expression der mRNA nicht zwangsläufig veränderte Expression des Proteins bewirkt. Über Regulationen auf Proteinebene kann derzeit zu diesen Genen keine Aussage getroffen werden. Die Bestimmung dieser Gene auf Proteinebene und weitere Untersuchungen sind bereits in Planung. Ob diese Gene neue Ansatzpunkte für eine eventuelle Pharmakotherapie darstellen, wird sich bei weiteren Untersuchungen auf Proteinebene zeigen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Untersuchungen im peripheren Blut mittels Microarray Technologie auch Einsatzmöglichkeiten im Bereich psychischer Erkrankungen haben können.

Die Daten und Ergebnisse dieser Studie werden in Molecular Psychiatry publiziert. Momentan befindet sich der Artikel unter dem Titel "Differential Gene Expression In Peripheral Blood of Patients Suffering From Posttraumatic Stress Disorder" im Druck.

Zusammenfassung

Die Posttraumatische Belastungsstörung (PTSD) könnte sich im Zuge einer Fehladaptation des Körpers zur Abwehr der akuten Stressantwort entwickeln. Aufgrund des sympathischen Hyperarousals in PTSD wurde schon früh angenommen, dass bei Patienten mit Posttraumatischen Belastungsstörungen das Immunsystem betroffen sein könnte.

Mit selbst hergestellten cDNA Microarrays, die vornehmlich Gene aus Stressgeschehen, Inflammation sowie Apoptose enthielten, wurden in der vorliegenden Arbeit Auswirkungen von PTSD auf Genexpressionsebene untersucht. Erhebliche Anstrengungen wurden unternommen, um sämtliche Bedingungen, die die Messungen beeinträchtigen könnten, zu standardisieren. Besonders erwähnenswert ist, dass es sich beim untersuchten Patientenkollektiv um eine homogene Gruppe handelt, da alle Probanden das selbe traumatische Erlebnis hatten (Flugkatastrophe von Ramstein, 1989). Trotz des langen Zeitintervalls zwischen traumatischem Erlebnis und dieser Studie zeigten sämtliche Probanden immer noch typische Auffälligkeiten bei den diagnostischen Interviews, sowie typische psychosomatische Symptome. Das Studienkollektiv umfasste acht Patienten und acht Kontrollpersonen. Des weiteren wurde großer Aufwand betrieben, um die Microarray Versuche unter bestmöglichen standardisierten Bedingungen durchzuführen. Nach Normalisierung der Daten wurden drei statistische Methoden angewendet, der gepaarte t-Test, der Wilcoxon-Test und die Rank Produkt Methode. Letztlich wurden vier hoch- und 14 vermindert exprimierte Gene gefunden, die für mindestens eine dieser statistischen Methoden Signifikanz erreichten.

In dieser Studie wurde der Fokus auf die vermindert regulierten Gene gerichtet. Sieben dieser Gene und ein zusätzliches Gen, der xc(-)Glutamat-Cystin Antiporter wurden aufgrund ihres möglichen physiologischen Zusammenhangs ausgewählt, und ihre Regulation durch quantitative Real Time PCR nachgewiesen. Die Ergebnisse der Real Time PCR bestätigten die Microarray Versuche bis auf zwei Gene, 3-PHGDH und EDG4.

Die meisten vermindert exprimierten Gene sind mit Immunfunktionen oder reaktiven Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS) assoziiert. Die selenabhängigen

Enzyme Superoxid dismutase (SOD), Thioredoxin reductase (TXR) sowie der xc(-) Transporter lassen sich in einen physiologischen Zusammenhang bringen. Es ist lange bekannt, dass SOD das O₂- Radikal zu H₂O₂ reduziert. Aufgrund der verminderten Genexpression von SOD könnte kurzzeitig eine reduzierte Präsenz von antioxidativen Enzymen wie SOD und TXR (und reduziertem Enzymprotein) könnte es zu einer reaktiven Anhäufung von OH-Radikalen kommen, die nicht ausreichend kompensiert werden kann. Demzufolge könnte eine ROS Akkumulation ein Grund für das höhere Risiko von PTSD-Patienten sein, Autoimmunerkrankungen oder kardiovaskulären Krankheiten zu entwickeln.

Glutathion (GSH) ist der wichtigste antioxidative intrazelluläre Puffer. Die in dieser Studie gezeigte verminderte Expression des Chlorid-abhängigen xc(-)Transporters, dessen Funktion die Glutathion-Synthese limitiert, könnte die Glutathion Erneuerung durch reduzierte Cystin-Aufnahme beeinflussen. Dieser Transporter spielt desweiteren eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der extrazellulären Glutamatkonzentration im Gehirn, die mit der Rückfallgefahr bei Drogenkonsum assoziiert ist. Dies könnte ein Ansatz für eine pharmakologische Therapie mit N-acetyl Cystine (NAC), einem xc(-)Agonisten darstellen, die im Tierversuch erfolgreich eingesetzt wurde. Eine Behandlung von PTSD Patienten mit NAC könnte zu einer Verminderung der Stress-assozierten Symptome führen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Microarray Technologie auch bei lange zurückliegenden Traumata Änderungen der mRNA Genexpression detektieren kann. Die Ergebnisse dieser Studie können als Ausgangspunkt für Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkungen auf Proteinebene dienen. Sollten Veränderungen der Zielmoleküle auf dieser Ebene bestätigt werden, würden sich neue pharmakologische Therapieansätze für eine Erkrankung ergeben, deren Symptomatik bisher nur unzureichend behandelbar ist.

Protokolle

Protokoll 1

RNA-Isolation nach Chomczynski und Sacchi

1. 5 ml Vollblut in Zitratröhrchen abgenommen.
2. 5 ml Vollblut mit 45 ml Erythrozytenlysepuffer mischen.
 - Erythrozytenlysepuffer :
 - 8.29g Ammoniumchlorid
 - 1.00g Kaliumhydrogencarbonat
 - 0.0368g Komplexon III
 - auf 1000 ml mit RNase/DNase freiem Wasser auffüllen
 - steril filtrieren und anschließend autoklavieren
3. 15 min auf Eis inkubieren (ab und zu leicht durchschütteln).
4. 10 min bei 4°C und 160 x g zentrifugieren.
5. Überstand abgießen und Pellet mit 5 ml PBS waschen.
6. 10 min bei 4°C und 160 x g zentrifugieren.
7. Überstand abgießen.
8. Pellet mit 500µl PBS resuspendieren und in ein 2 ml Tube überführen.
9. Zu der Probe 990µl GTC-Puffer und 10 µl Mercaptoethanol geben.
 - GTC-Puffer :
 - 42.20g Guanidinoisothiocyanat (4M) - Endkonzentration
 - 0.50g Natrium-Lauroylsarcosin (0.5%) - Endkonzentration
 - 0.735g Natrium-Zitrat (0.25M) - Endkonzentration

- auf 100 ml mit RNase/DNase freiem Wasser auffüllen
 - mit HCL 5N oder NaOH 1M auf pH 7 einstellen
 - steril filtrieren und anschließend autoklavieren
10. 200µl Chloroform zur der Probe geben.
 11. Gründlich vortexen.
 12. 15 min bei 4°C und 17500 x g zentrifugieren.
 13. Überstand vorsichtig abgießen.
 14. 200µl Isopropanol zur Probe zugeben.
 15. Über Nacht bei -20°C die Probe präzipitieren.
 16. 40 min bei 4°C und 17500 x g zentrifugieren.
 17. Überstand vorsichtig abgießen.
 18. 200µl 70% Ethanol zugeben.
 19. 15 min bei 4°C und 17500 x g zentrifugieren.
 20. Überstand vorsichtig abgießen.
 21. Probe für 15 min in der Speed-Vac trocknen.
 22. Probe in 20µl RNase/DNase freiem Wasser aufnehmen.

Die Probe sofort auf Eis und Kontrolle der Qualität-und Quantität. Nach der Kontrolle die reverse Transkriptase Reaktion anschließen oder die RNA einfrieren bei -70°C mit Natriumacetat und Ethanol.

Protokoll 2

RNA-Isolation mit PAXgene™ Blood RNA Kit

1. Blutabnahme von 5 ml Vollblut in zwei PAXgene™ Blood RNA Tubes (Qiagen), gut mischen und Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur (RT).
2. 10 min. bei RT und 2800 x g zentrifugieren.
3. Abgießen des Überstands. Zugabe von 5 ml RNase/DNase freiem Wasser. Neuer Deckel.
4. Pellet durch Vortexen auflösen und erneut bei RT für 10 min. bei 2800 x g zentrifugieren. Anschließend den Überstand abgießen.
5. Jedes Pellet in 360 µl Buffer BR1 durch Vortexen lösen.
(Falls sich das Pellet nicht komplett auflöst, mit Pipettenspitze vorsichtig ablösen).
6. Zugabe von:

| | |
|--------------|--------|
| Buffer BR 2 | 300 µl |
| Proteinase K | 40 µl |

Vorher nicht mischen !

Vortexen.

Bei 55°C 10 min. inkubieren. Nach 5 min. Proben 1x vortexen.
7. 2x 3 min. bei maximaler Geschwindigkeit (17500 x g) und RT zentrifugieren. Überstand in neues Tube überführen.
8. Zugabe zum Überstand: 350 µl Ethanol (100%). Vortexen.

9. 700 μ l der Probe werden auf das rosa PAXgene Säulchen (im processing tube) gegeben. Anschließend wird 1 min bei RT mit 9000 x g zentrifugiert. Filter-Säulchen wird auf neues processing tube gesteckt.
10. Die restliche Probe wird ebenfalls auf das Säulchen gegeben. Zentrifugieren 1 min. bei RT mit 9000 x g. Verwerfen des Eluats.

DNase Verdau

11. Zugabe von 350 μ l Buffer BR3 auf das Säulchen. Zentrifugieren 1 min. bei RT mit 9000 x g. Verwerfen des Eluats.
12. Für jede Probe Herstellung folgendes Mixes

| | |
|------------------|------------|
| DNase I Solution | 10 μ l |
| Buffer RDD | 70 μ l |

(Umgang mit der DNase: aufgetaute DNase nicht mehr einfrieren, sondern bei 4°C im Kühlschrank lagern. 6 Wochen haltbar.)

13. Den Mix direkt auf die Säulchen-Membran pipetieren und 15 min bei RT inkubieren.
14. Zugabe von 350 μ l Buffer BR3 auf das Säulchen und 1 min. bei RT bei 9000 x g zentrifugieren. Anschließend das Säulchen auf ein neues Processing tube setzen.

DNase Verdau beendet

15. Zugabe von 500 μ l BR4 auf das Säulchen. 1 min zentrifugieren bei RT bei 9000 x g. Säulchen auf neues porcessing tube setzen.

16. Erneute Zugabe von 500 µl BR4 und zentrifugieren 3 min. bei RT mit 17500 x g. Verwerfen des Eluats und erneut zentrifugieren 1 min. bei RT mit 17500 x g, um die Membran zu trocknen.

17. Säulchen auf ein Elution tube setzen.

In zwei aufeinander folgenden Schritten je 40 µl Buffer BR5 direkt auf die Säulchen Membran pipettieren. Zentrifugieren 1 min bei RT bei 9000 x g.

18. Das Eluat 5 min bei 65°C inkubieren.

19. Die Probe sofort auf Eis und Kontrolle der Qualität-und Quantität. Nach der Kontrolle die reverse Transkriptase Reaktion anschließen oder die RNA einfrieren bei -70°C mit Natriumacetat und Ethanol.

Protokoll 3

Reverse Transkription mit in-vitro Transkription (Message Amp cRNA Amplification Kit (Ambion)), reverse Transkription und Labeling

Reverse Transkription mit in-vitro Transkription (Message Amp cRNA Amplification Kit (Ambion))

A. First Strand cDNA Synthese

Teil a)

1. Bis zu 5µg Gesamt RNA werden in ein RNase freies Tube gegeben.
2. Zugabe von 1µl T7 Oligo dT-Primer
3. Mit Nuklease freiem Wasser auf 12µl auffüllen
4. 10 min. bei 70°C im Thermocycler inkubieren.
Anschließend Probe auf Eis stellen.

Teil b)

Herstellung eines Reverse-Transkription-Mastermixes für alle Proben mit 5% Überschuss

für eine Probe:

| | |
|-------------------------|-----|
| 10x First Strand Buffer | 2µl |
| Ribonuklease Inhibitor | 1µl |
| dNTP Mix | 4µl |
| Reverse Transkriptase | 1µl |
| Total | 8µl |

Gut mischen.

5 sec. zentrifugieren und die Probe auf Eis stellen.

Teil c)

1. Zu jeder Probe aus Schritt a) 4. werden 8µl Reverse-Transkriptions-Mastermix gegeben.
Gut mischen

2. 2 Stunden bei 42°C inkubieren

Anschließend auf Eis und sofort weiterverarbeiten.

B. Second Strand (Zweitstrang) cDNA Synthese

Teil a)

Herstellung eines Mastermixes für die Zweitstrang cDNA-Synthese für alle Proben mit 5% Überschuss

für eine Probe:

| | |
|--------------------------|------|
| Nuklease freies Wasser | 63µl |
| 10x Second Strand Buffer | 10µl |
| dNTP Mix | 4µl |
| DNA Polymerase | 2µl |
| RNase | 1µl |
| Total | 80µl |

Gut mischen.

5 sec. Zentrifugieren.

Teil b)

1. Zugabe von 80µl Mastermix zu jeder Probe
2. 2 Stunden bei 16°C inkubieren
3. Proben können bei -20°C gelagert werden.

C. cDNA Aufreinigung

Teil a)

Erwärmen von 5ml nuklease-freiem Wasser auf 50°C für mindestens 10 min.

Teil b)

Vorbereiten der Filteraufsätze

1. Sichergehen, dass pro Probe ein Filter in einem 2ml Wash-Tube sitzt
2. 50µl cDNA Binding Buffer auf die Membran geben

3. Filter für 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren

Teil c)

Zu jeder cDNA-Probe von Schritt B.b) werden 250µl cDNA Binding Buffer pipettiert.
Gut mischen.

Teil d)

1. Probe-Gemisch auf die Filter-Membran geben
2. 1 min. bei RT bei 9000 x g zentrifugieren
3. Durchlauf verwerfen

Filter auf neues Tube setzen.

Teil e)

Sicherstellen, dass vor Erstgebrauch Ethanol zum cDNA Wash-Buffer gegeben wurde.

1. 500µl cDNA Wash-Buffer auf jeden Filter geben
2. 1 min. bei RT bei 9000 x g zentrifugieren
3. Eluat verwerfen
Erneut 1 min. bei RT bei 9000 x g zentrifugieren
4. cDNA Filter in ein cDNA Elution Tube stellen

Teil f)

1. 10µl nuklease-freies Wasser (bereits mindestens 10 min. bei 50°C vorerwärmt)
direkt auf die Filtermembran geben.
2. 2 min. bei Raumtemperatur inkubieren
Anschließend 1,5 min. bei RT bei 9000 x g zentrifugieren
3. Schritt 1 + 2 wiederholen
Im Elutions Tube befindet sich die cDNA in ca. 16 µl nuklease-freiem Wasser
4. Filter verwerfen

Teil h)

Volumen jeder einzelnen Probe überprüfen

- Falls das Volumen 16 – 18µl beträgt: die Probe auf Eis stellen oder bei -20°C einfrieren
- Falls das Volumen unter 16µl beträgt: die Probe mit nuklease-freiem Wasser auf 16µl auffüllen, anschließend auf Eis stellen oder bei -20°C einfrieren

Die Proben können an dieser Stelle bei -20°C gelagert werden.

D. In vitro Transkription (cRNA Synthese)

Teil a)

Herstellung eines Transkriptions-Reaktions-Mixes für alle Proben mit 5% Überschuss

Für eine Probe:

| | |
|---------------------|------|
| ATP Soln 75mM | 4µl |
| CTP Soln 75mM | 4µl |
| GTP Soln 75mM | 4µl |
| UTP Soln 75mM | 4µl |
| 10x Reaction Buffer | 4µl |
| Enzyme Mix | 4µl |
| Total | 24µl |

Pro Tube:

| | |
|-----------------------------|------|
| Reaktions-Mix | 24µl |
| Probe aus Schritt E Teil h) | 16µl |
| Total | 40µl |

Gut mischen.

5 sec. zentrifugieren.

Teil b)

Die Reaktion mindestens 6 Stunden höchstens 14 Stunden bei 37°C inkubieren.

Beachten: Im Luft-Inkubator arbeiten um Kondensation im Tube zu vermeiden.

Teil c)

1. 2µl Dnase I zu jeder Probe geben

Mindestens 5x mit Pipette mischen

2. 5 sec. zentrifugieren
3. 30 min. bei 37°C inkubieren
4. Proben können anschließend bei –20°C gelagert werden

E. cRNA-Aufreinigung

1. Zugabe von 60µl Elution Solution zu jeder Probe geben, um ein Endvolumen von 100µl zu erhalten
2. Gut mischen

Teil a)

Nuklease-freies Wasser mindestens 10 min auf 50°C vorheizen.

Teil b)

Zugabe von 350µl cRNA Binding Buffer zu jeder Probe.

Gut mischen.

Teil c)

Zugabe von 250µl 100% Ethanol zu jeder Probe.

Gut mischen.

Sofort mit dem nächsten Schritt fortfahren.

Teil d)

1. je 1 cRNA Filter auf 1 cRNA collection Tube setzen
Probe aus Schritt c) auf den Filter pipetieren
2. 1 min. bei 9000 x g zentrifugieren
3. Eluat verwerfen
4. Tube erneut 1 min. bei 9000 x g trocken zentrifugieren
5. Filter auf neues Collection Tube setzen

Teil e)

Sicherstellen, dass vor Gebrauch Ethanol zum cRNA Wash-Buffer zugegeben wurde.

1. Zugabe von 650 μ l cRNA Wash-Buffer auf jeden cRNA Filter.
2. 1 min. bei 9000 x g zentrifugieren
3. Eluat verwerfen
4. 1 min. bei 9000 x g bei RT trocken zentrifugieren
5. Filter in neues Tube setzen

Teil f)

1. 50 μ l nuklease-freies Wasser (mindestens 10 min. bei 50°C vorgewärmt) direkt auf die Filtermembran geben
2. Die Probe 2 min. bei Raumtemperatur inkubieren
1,5 min. bei RT bei 9000 x g zentrifugieren
3. Schritt 1 + 2 wiederholen
Die cRNA befindet sich jetzt im Eluat in 100 μ l nuklease-freiem Wasser.
4. Filter verwerfen.

Teil g)

cRNA Lagerung.

Bei -70°C lagern und häufiges Auftauen und Einfrieren vermeiden.

Reverse Transkription

1. 3 μ g der in-vitro transkribierten cRNA in der Speed-Vac trocknen.
2. Pellet in 9,5 μ l RNase/DNase freiem Wasser aufnehmen. Gut mischen.
3. 9 μ l Random-Hexamer-Primer (1 μ g/ μ l) dazugeben und mischen.
4. 10 min bei 70°C inkubieren.
5. 2 min auf Eis.
6. Reaktionsansatz für 4 Proben:

5x First Strand buffer 25,0 μ l

| | |
|--------------------------------|---------|
| 0,1 M DTT | 12,5 µl |
| 50x aminoallyl-dNTP-Mix | 2,5 µl |
| Super Script II | 8,3 µl |
| <i>(kurz vorher erst dazu)</i> | |

Aus dem Reaktionsansatz zu
jeder Probe aus 3. 11,6 µl

7. 2 Stunden bei 42°C inkubieren.

8. Entweder weiter im Protokoll oder bei -20°C lagern.

Aminoallyl dUTP 100mM

1mg aa-dUTP in 19,1µl 0.1M KPO4 lösen. Vortexen und bei -20°C lagern.

50x aminoallyl-dNTP-Mix

| | |
|-----------------|-------|
| dATP (100mM) | 5 µl |
| dCTP (100mM) | 5 µl |
| dGTP (100mM) | 5 µl |
| dTTP (100mM) | 3 µl |
| aa-dUTP (100mM) | 2 µl |
| Total | 20 µl |

Lagerung bei -20°C

Labeling

9. Zu jeder der 30 µl Proben

| | | |
|------|-----------|------|
| NaOH | 1M | 10µl |
| EDTA | 0,5M pH 8 | 10µl |

Gut mischen.

10. 15 min. bei 65°C in den Heizblock.

11. Zu jeder Probe

| | | |
|-----|----|------|
| HCl | 1M | 10µl |
|-----|----|------|

Buffer PB 300µl

Gut mischen.

12. Alles auf Reinigungs-Säulchen geben.

13. 1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.

Filtrat verwerfen.

14. 750 µl Phosphatwaschpuffer aufs Säulchen geben.

1 min. zentrifugieren bei RT mit 15000 x g.

Filtrat verwerfen.

15. Erneut 750 µl Phosphatwaschpuffer aufs Säulchen geben.

1 min. zentrifugieren bei RT mit 15000 x g.

Filtrat verwerfen.

16. Nochmals die Probe ohne Lösungen 1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.

17. Säulchen in ein neues Tube setzen.

18. Direkt auf die Säulchenmembran 30 µl Phosphat Elutionspuffer (4 mM KPO₄) geben.

19. Bei RT 5 min. inkubieren.

20. 1 min. zentrifugieren bei RT mit 15000 x g.

21. Die eluierten Proben in der Speed-Vac 30 min. trocknen lassen.

10 min. vor Speed-Vac-Ende die Farbstoffe Cy 3 und Cy 5 aus dem -80°C Kühlschranks holen und im Dunkeln 10 min. auftauen lassen.

22. Die Proben aus der Speed-Vac holen und in je 4,5 μ l 100mM Na₂CO₃, pH 9 aufnehmen. Gut mischen.
23. Cy 3 und Cy 5 in je 4,5 μ l (H₂O-freiem) DMSO aufnehmen und zur jeweiligen Probe geben. Gut mischen.
24. 2 Std. bei RT im Dunkeln inkubieren.
25. Zu jeder Probe zugeben:
- | | | |
|-----------|--------|-------------|
| NaAc | 100mM | 35 μ l |
| | pH 5,2 | |
| buffer PB | | 250 μ l |
- Gut mischen
26. Auf Säulchen geben.
27. 1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.
Filtrat verwerfen.
28. 750 μ l buffer PE aufs Säulchen geben.
1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.
Filtrat verwerfen.
29. 400 μ l buffer PE aufs Säulchen geben.
1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.
Filtrat verwerfen.
30. Nochmals die Probe ohne Lösungen 1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.
31. Säulchen auf ein neues Tube setzen.
32. 30 μ l buffer EB-Buffer aufs Säulchen geben.

5 Min. bei RT inkubieren.

1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.

33. 30 μ l buffer EB aufs Säulchen geben.

5 Min. bei RT inkubieren.

1 min. zentrifugieren bei RT bei 15000 x g.

34. Messen am Photometer bei 260, 550 und 650 nm.

35. Proben in Speed-Vac 2 – 3 Stunden trocknen.

Protokoll 4Herstellung Wash A, B und C

Wash A

| | |
|------------------|--------|
| 20x SSC | 50 ml |
| 10% SDS | 10 ml |
| H ₂ O | 440 ml |
| Total | 500 ml |

Wash B

| | |
|------------------|--------|
| 20x SSC | 50 ml |
| H ₂ O | 450 ml |
| Total | 500 ml |

Wash C

| | |
|------------------|--------|
| 20x SSC | 5 ml |
| H ₂ O | 495 ml |
| Total | 500 ml |

Liste der Gene auf dem Microarray

| Gen-ID | Gename |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------|
| AI625116 | 3-Phosphoglycerate dehydrogenase |
| H18371 | 4-aminobutyrate aminotransferase |
| R02455 | 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A |
| R08445 | Adrenergic beta 2 receptor surface |
| H15250 | adrenergic beta recetor kinase 2 |
| AI827546 | Amyloid beta percursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease) |
| BX099240 | Annexin A3 |
| AA401645 | Arachidonate 5-lipoxygenase |
| R08446 | Beta 2 receptor |
| R37590 | Calmodulin dependend protein kinase 2 alpha |
| AI890021 | Calnexin |
| BX101374 | CAMK2G |
| N42544 | Capase 8 |
| H00587 | Casein kinase1, gamma 3 |
| T95149 | Caspase 1 |
| T96912 | Caspase 10 |
| AA481283 | Caspase 2 |
| AA001875 | Caspase 3 |
| T47302 | Caspase 4 |
| W60703 | Caspase 5 |
| W45688 | Caspase 6 |
| N45588 | Caspase 7 |
| T97630 | Caspase 9 |
| T76941 | Cationic amino acid transporter Y+system member 11 |
| R15360 | CD 14 |
| W01042 | CD 163 |
| H60010 | CD 164 |
| AI217645 | CD 19 |
| AI581337 | CD 1A |
| BX094495 | CD 1B |
| BX116983 | CD 1C |
| AI131504 | CD 2 |
| AI363168 | CD 244 |
| AI309276 | CD 33 |
| BX115969 | CD 36 |
| H25061 | CD 3E |
| T90300 | CD 3G |
| AI125073 | CD 3Z |
| AI493245 | CD 44 |
| BX089501 | CD 58 |
| T82464 | CD 59 |

| | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| BX107300 | CD 68 |
| BX106067 | CD 69 |
| T70375 | CD 74 |
| R72128 | CD 79B |
| W07753 | CD 8 |
| AA983817 | CD 80 |
| H30366 | CD 81 |
| AA443748 | CD 83 |
| H48796 | CD 84 |
| R27966 | CDP-diacylglycerol synthase 1 |
| AA126322 | Chemokine ligand 10 |
| W17274 | Chemokine ligand 21 |
| W79160 | Chemokine ligand 3 |
| N57175 | Chemokine ligand 4 |
| BC028078 | Chemokine receptor 1 |
| AA479357 | Chemokine receptor 4 |
| AI417775 | Chemokine receptor 5 |
| AI808029 | Chemokine receptor 6 |
| BX110824 | Chemokine receptor 9 |
| R17689 | Choline kinase |
| H65052 | Coagulation factor II (thrombin) |
| AA995402 | Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) |
| H04648 | Colony stimulating factor 2 receptor, beta, low affinity (granulocyte-macrophage) |
| R02281 | Colony stimulation factor 1 (macrophage) |
| R31999 | Colony stimulation factor 3 receptor (granulocyte) |
| R28219 | CPD-diacylglycerol synthase 1 |
| BX108502 | Creatine kinase mitochondrial 1 |
| AF119711 | Cystinyl leukotriene receptor 1 |
| AI791352 | D-amino-acid oxidase |
| AI792161 | D-aspartate oxidase |
| AA026189 | Diacylglycerol kinase alpha |
| BX102108 | DNA cytosine-5-methyltransferase 1 |
| W60555 | Endothelial differentiation G-protein-receptor 4 |
| AA147537 | Endothelial differentiation lysophosphatidic acid G-protein coupled receptor 2 |
| W21494 | Endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 |
| BX119598 | Endothelial differentiation, G-protein-coupled receptor 6 |
| R07399 | Endothelin 1 |
| AI140863 | Endothelin 2 |
| R55533 | Endothelin 3 |
| BX109539 | Endothelin receptor type A |
| H28710 | Endothelin receptor type B |
| AI620493 | Erythropoietin |
| AI912442 | Erythropoietin receptor |

| | |
|-----------|----------------------------------------------------------|
| R14669 | Fibroblast growth factor 1 |
| R70281 | Fibroblast growth factor 2 |
| H53584 | FK506 binding protein 5 |
| N48860 | GABRA2 |
| BI824607 | Glial high affinity glutamate transporter member 2 |
| R35481 | Glial high affinity glutamate transporter member 3 |
| H75385 | Glutamat receptor 4 |
| AI939470 | Glutamat receptor ionotropic AMPA2 |
| R32945 | Glutamat receptor ionotropic kainate 1 |
| R44770 | Glutamat receptor metabotropic 2 |
| AA583221 | Glutamat receptor metabotropic 4 |
| BX100407 | Glutamat receptor metabotropic 7 |
| H23378 | Glutamate receptor ionotropic AMPA 1 |
| AI 219670 | Glutamate receptor ionotropic delta 2 |
| H15472 | glutamate receptor ionotropic kainate 2 |
| BI544689 | Glutamate receptor ionotropic kainate 3 |
| R60315 | Glutamate receptor ionotropic, kainate 5 |
| BX109400 | Glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 |
| H92366 | Glutathion peroxidase 3 |
| H44827 | Glutathion peroxidase 4 |
| R40853 | Glutathion synthetase |
| N58247 | Glutathione peroxidase 1 |
| R63065 | Glutathione S-transferase M3 |
| AA416781 | Glutathione S-transferase pi |
| R00993 | Glycin-N-acyltransferase |
| T87010 | G-protein coupled receptor 65 |
| AI587350 | G-Protein coupled receptor CKR-L2 |
| AA579697 | Granulocyte colony stimulation factor |
| AA456241 | Heme oxygenase 1 |
| H23171 | High affinity aspartate/ glutamate transporter, member 6 |
| H11697 | HLA-B |
| H80088 | HLA-DRA |
| AA629034 | HSPA8 |
| R33648 | HSPB 1 |
| N51133 | HSPD1 |
| AI832179 | Hydroxyprostaglandine dehydrogenase 15 |
| H12569 | Hypothetical protein MGC16121 |
| N92072 | ICAM 1 |
| R21644 | ICAM 2 |
| BX104157 | ICAM 3 |
| R87840 | ICAM 5 |
| AI769523 | IFN gamma |
| R34333 | IFN gamma receptor 1 |
| H70425 | IFNAR1 |
| H11838 | IFNGR1 |
| H78484 | IL 1 R2 |

| | |
|----------|------------------------------------------|
| W03241 | IL 1 receptor 1 |
| AA497054 | IL 1 receptor antagonist |
| R83860 | IL 1 receptor associated kinase 1 |
| H53227 | IL 10 rezeptor |
| W47426 | IL 11 |
| BX100275 | IL 12 RB2 |
| BC029121 | IL 12 receptor beta1 |
| AI208823 | IL 13 |
| R52796 | IL 13 receptor alpha 2 |
| BX116580 | IL 15 |
| H57532 | IL 16 |
| BX093651 | IL 18 (interferon gamma inducing factor) |
| AA482489 | IL 18 R1 |
| AA922389 | IL 1A |
| W47225 | IL 1B |
| R62939 | IL 2 receptor beta |
| AI807898 | IL 21 rezeptor |
| BC009681 | IL 24 |
| BX112502 | IL 3 receptor alpha |
| BX099369 | IL 4 receptor |
| AI381503 | IL 5 receptor alpha |
| W31016 | IL 6 |
| AA411559 | IL 6 receptor |
| AI278395 | IL 6 signal transducer |
| BF001579 | IL 8 receptor alpha |
| H78484 | IL1 receptor type 2 |
| BX102575 | INF gamma |
| BX089562 | Inositol hexa phosphate kinase 3 |
| AI273559 | Insulin-like growth factor 1 |
| H79027 | Insulin-like growth factor 2 |
| AA461266 | Integrin alpha 10 |
| H16112 | Integrin alpha 11 |
| BX118387 | Integrin alpha 2 |
| AI610203 | Integrin alpha 3 |
| BX091768 | Integrin alpha 4 |
| R06523 | Integrin alpha 5 |
| H16046 | Integrin alpha 6 |
| N50605 | Integrin alpha 7 |
| AI092330 | Integrin alpha 9 |
| R05815 | Integrin alpha E |
| AA925878 | Integrin alpha L |
| Ai307732 | Integrin alpha M |
| N64384 | Integrin alpha x |
| AI825940 | Integrin beta 1 |
| W68403 | Integrin beta 2 |
| R48163 | Integrin beta 4 |

| | |
|----------|-----------------------------------------------------|
| H74205 | Integrin beta 5 |
| BX114422 | Integrin beta 7 |
| AA569711 | Integrin beta 8 |
| BX100858 | jun B proto-oncogene |
| H42105 | Leptin |
| W06971 | Leptin receptor |
| R50018 | Leukemia inhibitory factor |
| R38159 | Leukemia inhibitory factor receptor |
| R15731 | Lipopolysaccharide binding protein |
| W74395 | Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member1) |
| AI537595 | Lymphotoxin beta |
| BX089209 | Macrophage scavenger receptor 1 |
| BX114709 | MAP2K4 |
| R40676 | MAP3K5 |
| AI689229 | MAPK10 |
| W76332 | MAPK14 |
| BX116807 | MAPK8 |
| R71819 | MAPKAP K2 |
| AA122237 | Microsomal glutathion S transferase 2 |
| AI277275 | Microsomal glutathione S-transferase 3 |
| W02452 | MKK3 |
| R40514 | Nerve growth factor receptor |
| AA450336 | Neurexin 3 |
| AA423955 | Neuropeptide Y-receptor Y1 |
| BX113942 | Neurotransmitter transporter dopamine member 3 |
| W90214 | Neutral amino acid transporter member 5 |
| BX115063 | NOS 1 |
| AI493548 | NOS 2A |
| H15032 | NOS 3 |
| AA701502 | PDGFA |
| R40559 | PDGFB |
| H79419 | PDGFRA |
| R45650 | PDGFRB |
| W17301 | Peroxiredoxin 4 (ap) |
| H20248 | Peroxiredoxin 5 |
| BX118512 | Peroxisome proliferative activated receptor alpha |
| BX111682 | Phosphate cytidyltransferase, choline, beta isoform |
| AA424760 | Phosphoglycerate kinase 1 |
| W03943 | Phospholipase A2, group XIIB |
| BX103148 | Phospholipase C delta 1 |
| AA041245 | Phospholipase C epsilon 1 |
| BX105088 | Phospholipase C gamma 2 |
| AA424760 | Phosphoglycerate kinase 1 |
| AI024617 | Platelet derived growth factor 10 |
| R22459 | Platelet/endothelia cell adhesion molecule (CD 31) |
| BX115959 | prokineticin 2 |

| | |
|----------|---------------------------------------------------------------|
| BX102242 | Prostaglandin E receptor 2 |
| BX109537 | Prostaglandin I2 synthase |
| AA454668 | Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 |
| AI123006 | Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 |
| AA461272 | Protein arginine N-methyltransferase 7 |
| BX107014 | Protein C |
| H79363 | Protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha isoform |
| T87071 | Protein phosphatase 2, regulatory subunit B--, alpha |
| R39428 | Protein tyrosine phosphatase receptor type G |
| R33323 | Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21 |
| AI610837 | Protooncogen protein |
| T39278 | PTAFR |
| AA831306 | RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1 |
| AA404273 | Retinoic acid receptor alpha |
| H72224 | S 12 |
| H39991 | Selectin E |
| H00756 | Selectin L |
| T70809 | Selectin P |
| BX118929 | Sex determining region Y - box 2 |
| BX106428 | Sialyltransferase 8D |
| T95741 | Signal transducer and activator of transcription 6, IL 4 ind. |
| H85744 | Sphingomyelin phosphodiesterase 1 |
| W32352 | Sphingomyelin phosphodiesterase 2 |
| BX092054 | Sphingosine 1-phosphate phosphatase 2 |
| H19077 | Sphingosine kinase 2 |
| R45235 | Stromal cell derived factor 20 |
| AA426577 | Stromal cell derived factor receptor 1 |
| W25024 | Superoxide dismutase 1 |
| BX098594 | Superoxide dismutase 3 |
| AI924869 | Syntaxin 4A |
| H19474 | Synuclein beta |
| BX118929 | SYR (sex-determining region Y) - box 2 |
| H73417 | T-Cell activation protein phosphatase 2C |
| R83156 | Thioredoxin |
| N32554 | Thioredoxin 2 |
| BX101312 | Thioredoxin interacting protein |
| H15481 | Thioredoxin reductase 1 |
| R45108 | Thioredoxin reductase 2 |
| BX112338 | Thrombomodulin |
| AA479058 | Thrombopoietin |
| R76436 | Thromboxane A synthase 1 |
| R82831 | Thromboxane A2 receptor |
| BX118951 | TNF alpha |
| AI492518 | TPTE |
| H20229 | Transforming growth factor alpha |
| R36466 | Transforming growth factor beta 1 |

| | |
|----------|------------------------------------|
| W44691 | Vascular endothelial growth factor |
| BX092558 | Vasoactive intestinal peptide |
| R79352 | Zink transporter |

Literaturverzeichnis

1. **Allen JW, Mutkus LA and Aschner M.** Mercuric chloride, but not methylmercury, inhibits glutamine synthetase activity in primary cultures of cortical astrocytes. *Brain Res* 891: 148-157, 2001.
2. **Altemus M, Cloitre M and Dhabhar FS.** Enhanced cellular immune response in women with PTSD related to childhood abuse. *Am J Psychiatry* 160: 1705-1707, 2003.
3. **Baker DA, Xi ZX, Shen H, Swanson CJ and Kalivas PW.** The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J Neurosci* 22: 9134-9141, 2002.
4. **Baker DG, Ekhtor NN, Kasckow JW, Hill KK, Zoumakis E, Dashevsky BA, Chrousos GP and Geraciotti TD, Jr.** Plasma and cerebrospinal fluid interleukin-6 concentrations in posttraumatic stress disorder. *Neuroimmunomodulation* 9: 209-217, 2001.
5. **Bannai S and Kitamura E.** Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 255: 2372-2376, 1980.
6. **Bolstadt B.M., R.A.Irizzary, M.Åstrand and T.P.Speed.** A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19: 185-193, 2003.
7. **Bonferroni C.E.** Teoria statistica delle classi e calcolo della probabilita. *Pubblicazioni del Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze* 8: 3-62, 1936.
8. **Boscarino JA.** Posttraumatic stress disorder and physical illness: results from clinical and epidemiologic studies. *Ann N Y Acad Sci* 1032:141-53.: 141-153, 2004.
9. **Boscarino JA and Chang J.** Higher abnormal leukocyte and lymphocyte counts 20 years after exposure to severe stress: research and clinical implications. *Psychosom Med* 61: 378-386, 1999.

10. **Branchey L, Davis W and Lieber CS.** Alcoholism in Vietnam and Korea veterans: a long term follow-up. *Alcohol Clin Exp Res* 8: 572-575, 1984.
11. **Breitling R, Armengaud P, Amtmann A and Herzyk P.** Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett* 573: 83-92, 2004.
12. **Chambers RA, Bremner JD, Moghaddam B, Southwick SM, Charney DS and Krystal JH.** Glutamate and post-traumatic stress disorder: toward a psychobiology of dissociation. *Semin Clin Neuropsychiatry* 4: 274-281, 1999.
13. **Chandrasekar B, Colston JT, de la Rosa SD, Rao PP and Freeman GL.** TNF-alpha and H₂O₂ induce IL-18 and IL-18R beta expression in cardiomyocytes via NF-kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 1152-1158, 2003.
14. **Chemali Z and Meadows ME.** The use of eye movement desensitization and reprocessing in the treatment of psychogenic seizures. *Epilepsy Behav* 5: 784-787, 2004.
15. **Chomczynski P and Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
16. **Cleveland W.S.** Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *Journal of the American Statistical Association* 74: 829-839, 1979.
17. **Crapo JD.** Redox active agents in inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1027-1028, 2003.
18. **Davidson JR.** Pharmacologic treatment of acute and chronic stress following trauma: 2006. *J Clin Psychiatry* 67 Suppl 2:34-9.: 34-39, 2006.
19. **de Kloet CS, Vermetten E, Geuze E, Kavelaars A, Heijnen CJ and Westenberg HG.** Assessment of HPA-axis function in posttraumatic stress disorder: Pharmacological and non-pharmacological challenge tests, a review. *J Psychiatr Res* .: 2005.
20. **Delahanty DL, Nugent NR, Christopher NC and Walsh M.** Initial urinary epinephrine and cortisol levels predict acute PTSD symptoms in child trauma victims. *Psychoneuroendocrinology* 30: 121-128, 2005.

21. **Dudoit S., Y.H.Yang, M.J.Callow and T.P.Speed.** Statistical methods for identifying genes with differential expression in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica* 12: 111-139, 2002.
22. **Elssner A, Doseff AI, Duncan M, Kotur M and Wewers MD.** IL-16 is constitutively present in peripheral blood monocytes and spontaneously released during apoptosis. *J Immunol* 172: 7721-7725, 2004.
23. **Essau CA, Conradt J and Petermann F.** [Incidence of post-traumatic stress disorder in adolescents: results of the Bremen Adolescent Study]. *Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother* 27: 37-45, 1999.
24. **Ferguson E and Cassaday HJ.** Theoretical accounts of Gulf War Syndrome: from environmental toxins to psychoneuroimmunology and neurodegeneration. *Behav Neurol* 13: 133-147, 2001.
25. **Flatten G, Gast U, Hofmann A, Liebermann P, Reddemann L, Siol T, Wöller W and Petzold E.** *Posttraumatische Belastungsstörung - Leitlinie und Quellentext.* Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York, 2004.
26. **Fleetwood AJ, Cook AD and Hamilton JA.** Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Crit Rev Immunol* 25: 405-428, 2005.
27. **Foa EB.** Psychosocial therapy for posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry* 67 Suppl 2:40-5.: 40-45, 2006.
28. **Foth H, Degen GH and Bolt HM.** New aspects in the classification of carcinogens. *Arh Hig Rada Toksikol* 56: 167-175, 2005.
29. **Gmunder H, Eck HP and Droge W.** Low membrane transport activity for cystine in resting and mitogenically stimulated human lymphocyte preparations and human T cell clones. *Eur J Biochem* 201: 113-117, 1991.
30. **Griffin MG, Resick PA and Yehuda R.** Enhanced cortisol suppression following dexamethasone administration in domestic violence survivors. *Am J Psychiatry* 162: 1192-1199, 2005.
31. **Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES.** Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* 277: 13430-13437, 2002.

32. **Hadjigogos K.** The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Panminerva Med* 45: 7-13, 2003.
33. **Han D, Handelman G, Marcocci L, Sen CK, Roy S, Kobuchi H, Tritschler HJ, Flohe L and Packer L.** Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors* 6: 321-338, 1997.
34. **Inoue-Sakurai C, Maruyama S and Morimoto K.** Posttraumatic stress and lifestyles are associated with natural killer cell activity in victims of the Hanshin-Awaji earthquake in Japan. *Prev Med* 31: 467-473, 2000.
35. **Ironson G, Wynings C, Schneiderman N, Baum A, Rodriguez M, Greenwood D, Benight C, Antoni M, LaPerriere A, Huang HS, Klimas N and Fletcher MA.** Posttraumatic stress symptoms, intrusive thoughts, loss, and immune function after Hurricane Andrew. *Psychosom Med* 59: 128-141, 1997.
36. **Kang HK, Bullman TA and Taylor JW.** Risk of Selected Cardiovascular Diseases and Posttraumatic Stress Disorder among Former World War II Prisoners of War. *Ann Epidemiol* .: 2005.
37. **Kanter ED, Wilkinson CW, Radant AD, Petrie EC, Dobie DJ, McFall ME, Peskind ER and Raskind MA.** Glucocorticoid feedback sensitivity and adrenocortical responsiveness in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 50: 238-245, 2001.
38. **Kasckow JW, Baker D and Geraciotti TD, Jr.** Corticotropin-releasing hormone in depression and post-traumatic stress disorder. *Peptides* 22: 845-851, 2001.
39. **Kato S, Negishi K, Mawatari K and Kuo CH.** A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cystine uptake leading to glutathione depletion. *Neuroscience* 48: 903-914, 1992.
40. **Kawamura N, Kim Y and Asukai N.** Suppression of cellular immunity in men with a past history of posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 158: 484-486, 2001.
41. **Keane TM, Gerardi RJ, Lyons JA and Wolfe J.** The interrelationship of substance abuse and posttraumatic stress disorder. Epidemiological and clinical considerations. *Recent Dev Alcohol* 6:27-48.: 27-48, 1988.

42. **Kolb L.** Neurophysiological hypothesis explaining posttraumatic stress disorder. *American Journal of Psychiatry* 144: 474-478, 1987.
43. **Kudler H, Davidson J, Meador K, Lipper S and Ely T.** The DST and posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 144: 1068-1071, 1987.
44. **Kurzawa R, Glabowski W, Baczkowski T, Wiszniewska B and Marchlewicz M.** Growth factors protect in vitro cultured embryos from the consequences of oxidative stress. *Zygote* 12: 231-240, 2004.
45. **Laudenslager ML, Aasal R, Adler L, Berger CL, Montgomery PT, Sandberg E, Wahlberg LJ, Wilkins RT, Zweig L and Reite ML.** Elevated cytotoxicity in combat veterans with long-term post-traumatic stress disorder: preliminary observations. *Brain Behav Immun* 12: 74-79, 1998.
46. **Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI and Hla T.** Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99: 301-312, 1999.
47. **Libby P.** Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 419: 868-874, 2002.
48. **Maes M, Lin A, Bonaccorso S, van HF, Van GA, Delmeire L, Biondi M, Bosmans E, Kenis G and Scharpe S.** Increased 24-hour urinary cortisol excretion in patients with post-traumatic stress disorder and patients with major depression, but not in patients with fibromyalgia. *Acta Psychiatr Scand* 98: 328-335, 1998.
49. **Maes M, Lin AH, Delmeire L, Van GA, Kenis G, De JR and Bosmans E.** Elevated serum interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor concentrations in posttraumatic stress disorder following accidental man-made traumatic events. *Biol Psychiatry* 45: 833-839, 1999.
50. **Mason JW, Giller EL, Kosten TR, Ostroff RB and Podd L.** Urinary free-cortisol levels in posttraumatic stress disorder patients. *J Nerv Ment Dis* 174: 145-149, 1986.
51. **Matsui K, Tsutsui H and Nakanishi K.** Pathophysiological roles for IL-18 in inflammatory arthritis. *Expert Opin Ther Targets* 7: 701-724, 2003.

52. **McFarland K, Lapish CC and Kalivas PW.** Prefrontal glutamate release into the core of the nucleus accumbens mediates cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci* 23: 3531-3537, 2003.
53. **McLeod DS, Koenen KC, Meyer JM, Lyons MJ, Eisen S, True W and Goldberg J.** Genetic and environmental influences on the relationship among combat exposure, posttraumatic stress disorder symptoms, and alcohol use. *J Trauma Stress* 14: 259-275, 2001.
54. **Meister A.** Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 269: 9397-9400, 1994.
55. **Meister A and Anderson ME.** Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-60.: 711-760, 1983.
56. **Melov S.** Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1395-1400, 2002.
57. **Moran MM, McFarland K, Melendez RI, Kalivas PW and Seamans JK.** Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking. *J Neurosci* 25: 6389-6393, 2005.
58. **Müller HJ and Röder T.** *Der Experimentator. Microarrays.* Spektrum Akademischer Verlag, 2004.
59. **Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL and Coyle JT.** Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2: 1547-1558, 1989.
60. **Oras R, de Ezpeleta SC and Ahmad A.** Treatment of traumatized refugee children with Eye Movement Desensitization and Reprocessing in a psychodynamic context. *Nord J Psychiatry* 58: 199-203, 2004.
61. **Orr WC and Sohal RS.** Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263: 1128-1130, 1994.
62. **Pall ML and Satterlee JD.** Elevated nitric oxide/peroxynitrite mechanism for the common etiology of multiple chemical sensitivity, chronic fatigue syndrome, and posttraumatic stress disorder. *Ann N Y Acad Sci* 933:323-9.: 323-329, 2001.

63. **Park HJ, Kim HJ, Lee JH, Lee JY, Cho BK, Kang JS, Kang H, Yang Y and Cho DH.** Corticotropin-releasing hormone (CRH) downregulates interleukin-18 expression in human HaCaT keratinocytes by activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. *J Invest Dermatol* 124: 751-755, 2005.
64. **Patel SA, Warren BA, Rhoderick JF and Bridges RJ.** Differentiation of substrate and non-substrate inhibitors of transport system xc(-): an obligate exchanger of L-glutamate and L-cystine. *Neuropharmacology* 46: 273-284, 2004.
65. **Perkonigg A, Kessler RC, Storz S and Wittchen HU.** Traumatic events and post-traumatic stress disorder in the community: prevalence, risk factors and comorbidity. *Acta Psychiatr Scand* 101: 46-59, 2000.
66. **Pitman RK and Orr SP.** Twenty-four hour urinary cortisol and catecholamine excretion in combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 27: 245-247, 1990.
67. **Rohleder N, Joksimovic L, Wolf JM and Kirschbaum C.** Hypocortisolism and increased glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production in Bosnian war refugees with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 55: 745-751, 2004.
68. **Sachsee U.** *Traumazentrierte Psychotherapie.* Schattauer Verlag, 2004.
69. **Saeki T and Naya A.** CCR1 chemokine receptor antagonist. *Curr Pharm Des* 9: 1201-1208, 2003.
70. **Sagara J, Miura K and Bannai S.** Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspension. *J Neurochem* 61: 1667-1671, 1993.
71. **Solomon SD, Gerrity ET and Muff AM.** Efficacy of treatments for posttraumatic stress disorder. An empirical review. *JAMA* 268: 633-638, 1992.
72. **Solomon SD, Gerrity ET and Muff AM.** Efficacy of treatments for posttraumatic stress disorder. An empirical review. *JAMA* 268: 633-638, 1992.

73. **Spivak B, Shohat B, Mester R, Avraham S, Gil-Ad I, Bleich A, Valevski A and Weizman A.** Elevated levels of serum interleukin-1 beta in combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 42: 345-348, 1997.
74. **Stapleton JA, Taylor S and Asmundson GJ.** Effects of three PTSD treatments on anger and guilt: exposure therapy, eye movement desensitization and reprocessing, and relaxation training. *J Trauma Stress* 19: 19-28, 2006.
75. **Sutherland AG, Alexander DA and Hutchison JD.** Disturbance of pro-inflammatory cytokines in post-traumatic psychopathology. *Cytokine* 24: 219-225, 2003.
76. **Takahashi A, Masuda A, Sun M, Centonze VE and Herman B.** Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). *Brain Res Bull* 62: 497-504, 2004.
77. **Tian Y, New DC, Yung LY, Allen RA, Slocombe PM, Twomey BM, Lee MM and Wong YH.** Differential chemokine activation of CC chemokine receptor 1-regulated pathways: ligand selective activation of Galpha 14-coupled pathways. *Eur J Immunol* 34: 785-795, 2004.
78. **Wallace DC.** Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488, 1999.
79. **Watson IP, Muller HK, Jones IH and Bradley AJ.** Cell-mediated immunity in combat veterans with post-traumatic stress disorder. *Med J Aust* 159: 513-516, 1993.
80. **Wilson KC, Center DM and Cruikshank WW.** The effect of interleukin-16 and its precursor on T lymphocyte activation and growth. *Growth Factors* 22: 97-104, 2004.
81. **Woods AB, Page GG, O'campo P, Pugh LC, Ford D and Campbell JC.** The Mediation Effect of Posttraumatic Stress Disorder Symptoms on the Relationship of Intimate Partner Violence and IFN-gamma Levels. *Am J Community Psychol* 36: 159-175, 2005.
82. **Yehuda R, Southwick SM, Krystal JH, Bremner D, Charney DS and Mason JW.** Enhanced suppression of cortisol following dexamethasone administration in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 150: 83-86, 1993.

83. **Yehuda R, Southwick SM, Nussbaum G, Wahby V, Giller EL, Jr. and Mason JW.** Low urinary cortisol excretion in patients with posttraumatic stress disorder. *J Nerv Ment Dis* 178: 366-369, 1990.

84. **Zieker D, Fehrenbach E, Dietzsch J, Fliegner J, Weidmann M, Nieselt K, Gebicke-Haerter P, Spanagel R, Simon P, Niess AM and Northoff H.** cDNA-microarray analysis reveals novel candidate genes expressed in human peripheral blood following exhaustive exercise. *Physiol Genomics* 17; 23(3): 287-94, 2005.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. Northoff, dem Ärztlichen Direktor der Abteilung für Transfusionsmedizin, danke ich herzlich für die Vergabe des Dissertationsthemas sowie für die Bereitstellung aller zur Durchführung des Projektes erforderlichen Ressourcen. Desweiteren bedanke ich mich für die Ratschläge und Hilfestellungen sowie für die Vermittlung komplexer immunologischer Zusammenhänge, die ich in vielen Gesprächen erhalten habe.

Herrn Prof. Dr. P. Gebicke gilt mein besonderer Dank für die gute Betreuung während meiner Arbeit. Bedanken möchte ich mich des weiteren für die vielen Anregungen und Ratschläge und sein persönliches Engagement, sowie der Bereitstellung von Laborräumlichkeiten und verwendeter Geräte und Materialien seiner Abteilung.

Herrn Prof. Dr. Spanagel, für die geleistete Investition und Hilfe die zur Durchführung dieses Projektes beigetragen hat.

Herrn Dr. A. Jatzko, für die Bereitstellung des Patientenkollektivs, die Auswertung der Fragebögen sowie für die Vermittlung klinischen Wissens.

Frau Prof. Dr. K. Struwe und J. Dietzsch der Abteilung Bioinformatik, für die Analyse der Microarraydaten. Dank ihrer kompetenten Hilfe konnten unsere experimentell gewonnenen Daten in physiologischen Zusammenhang gesetzt werden.

Herrn D. Zieker für die gelungene Zusammenarbeit und Hilfe zur Etablierung der cDNA Microarrays, sowie für die Hilfestellung beim Erlernen labortechnischer Fertigkeiten

Mein weiterer Dank gilt den Patienten und Kontrollpersonen, die sich zur Teilnahme an dieser Studie bereit erklärt haben.

Danke allen, die mich während meiner Disseration unterstützt haben.

Lebenslauf**Judith Monika Zieker**
(geb. Fliegner)Geburtsdatum: 24. März 1980
Geburtsort: Tübingen/ Deutschland

Schulabschluss

Abitur (Juni 1999, Johannes-Kepler-Gymnasium, Reutlingen)

Studium

Studium der Humanmedizin.
Beginn im SS 2000 an der Eberhard-Karls Universität Tübingen
3. Staatsexamen am 15. November 2006, Friedrichshafen

Praktisches Jahr:

Chirurgie: Kalafong Hospital in Pretoria (Südafrika)

Innere Medizin: Ospedale Italiano in Lugano (Schweiz)

Pädiatrie: Klinikum Friedrichshafen

Publikationen

Zieker J*, Zieker D*, Jatzko A*, Dietzsch J, Nieselt K, Schmitt A, Bertsch T, Fassbender K, Spanagel R, Northoff H and Gebicke-Haerter PJ.

Differential gene expression in peripheral blood of patients suffering from Posttraumatic Stress Disorder.

Mol Psychiatry. 2007 Feb;12(2):116-8.

Zieker D*, **Zieker J***, Dietzsch J, Burnet M, Northoff H, Fehrenbach E.

cDNA-microarray analysis as a research tool for expression profiling in human peripheral blood following exercise.

Exerc Immunol Rev. 2005 ;11:86-96.

Zieker D*, Fehrenbach E*, Dietzsch J*, **Fliegner J**, Weidmann M, Nieselt K, Gebicke-Haerter P, Spanagel R, Simon P, Niess AM, Northoff H.

cDNA-microarray analysis reveals novel candidate genes expressed in human peripheral blood following exhaustive exercise.

Physiol Genomics. 2005 ;17;23(3):287-94.

*equally contributing first authors

Ehrenamtliche Tätigkeiten

Gewähltes Mitglied des Jugendgemeinderats Reutlingen (1997 – 1999)

Gewählte Vertreterin der Studierenden im Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen (2002 - 2003)