

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genexpressionsveränderungen nach experimenteller fokaler cerebraler
Ischämie: Transkriptidentifikation und
-charakterisierung

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von
Ute Kannbley
aus Frankfurt / Oder

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Dirnagl
 2. Prof. Dr. med. J. B. Schulz
 3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. E. Klußmann

Datum der Promotion: 22.06.2007

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung, Bestätigung und weitere Charakterisierung noch unbekannter ischämierelevanter differentiell exprimierter Gene auf der Grundlage der Daten eines SAGE-Projektes an einem in vivo-Modell der transienten fokalen cerebralen Ischämie im Maushirn.

Da die korrekte Sequenzdatenbank-basierte SAGE-*tag*-Gen-Zuordnung problematisch ist, wurde eine verbesserte PCR-basierte Methode zur Identifizierung der korrespondierenden SAGE-*tag* spezifischen Transkripte etabliert. In Anlehnung an das RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)-PCR Prinzip wurde die Methode SARA-PCR (SAgeRAce) genannt. Sie beruht auf einer Isolation 3`terminaler cDNA Restriktionsfragmente unter Verwendung paramagnetischer Kügelchen und der Ligation von Linkern an die cDNA vor dem nachfolgenden Amplifikationsschritt. Im Gegensatz zu früher beschriebenen Amplifikationsmethoden profitiert das Protokoll von der Länge der *tag*-spezifischen Plusprimer und erlaubt stringente PCR-Bedingungen. Es ermöglichte eine zuverlässige *tag*-Gen-Zuordnung auch für *tags* mit unklarer Datenbankzuordnung. Weiterhin wurde demonstriert, dass die SARA-PCR - durchgeführt als Real Time PCR mit der Light Cycler-Technik - quantitative Informationen liefert und zur Bestätigung der differentiellen Expression spezifischer SAGE-*tags* verwendet werden kann. Die SARA-PCR ist zeitsparend, wenig arbeitsintensiv und zur Genidentifizierung in großem Umfang geeignet.

Zwei zugeordnete, differentiell exprimierte Gene wurden molekularbiologisch weiter charakterisiert.

Schlagwörter: fokale cerebrale Ischämie, Serielle Analyse der Genexpression (SAGE), SAGE-*tag*, Transkriptidentifikation, Polymerasekettenreaktion (PCR)

Abstract

The aim of this study was identification, confirmation and further characterization of differentially expressed genes in mouse brain after the induction of focal cerebral ischemia on the basis of a Serial analysis of gene expression (SAGE) project.

SAGE is a powerful method for large-scale analysis of gene expression patterns and yields digital information on transcript abundance by the use of short sequence fragments (tags). It does not require *a priori* knowledge of the expressed genes in the starting material, SAGE can be used for gene discovery.

Unfortunately, correct tag-to-gene-allocation after SAGE remains difficult or even impossible when the short sequence of the tag corresponds to more than one gene in the reference database or when novel, yet uncloned genes were detected.

To overcome this problem, we developed an improved protocol for the proper identification of tag-corresponding genes. It relies on the isolation of 3'-terminal cDNA restriction fragments by the use of paramagnetic streptavidin beads, and the ligation of linkers prior to the amplification step. Because the principle is related to rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR, this approach was termed SARA-PCR, where SA stands for SAGE and RA for RACE-PCR. In contrast to competing protocols, stringent PCR conditions can be applied because of the length of the specific primers, which are composed of linker- and tag-specific sequences. Additionally, it is demonstrated that the protocol yields quantitative information, which can be used for further expression analysis of specific SAGE tags.

Additional two allocated differentially expressed genes in focal cerebral ischemia were further characterized.

Keywords: focal cerebral ischemia, Serial analysis of gene expression (SAGE), SAGE-tag, transcript identification, polymerase chain reaction (PCR)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	9
1.1.	Der Schlaganfall	9
1.2.	Tiermodell der fokalen cerebralen Ischämie	9
1.3.	Genexpression nach fokaler cerebraler Ischämie	10
1.4.	Detektion differentiell exprimierter Gene nach fokaler cerebraler Ischämie	12
1.5.	Das Prinzip der SAGE-Technik (Serial Analysis of Gene Expression)	13
1.5.1.	Methoden zur SAGE <i>tag</i> -spezifischen Transkriptidentifikation	17
1.5.2.	Aspekte der SAGE <i>tag</i> -spezifischen Transkriptidentifikation	18
1.5.3.	Validierung von SAGE-Daten	19
2.	Herleitung der Aufgabenstellung	20
3.	Material	21
3.1.	DNA- und RNA-Größenstandards	21
3.2.	Primer und Linker	21
3.2.1.	Primer für Standardsonden	21
3.2.2.	SAGE- <i>tag</i> -spezifische SARA-PCR Primer	23
3.2.3.	Unmarkierte M13-Primer	24
3.2.4.	Cy5-markierte M13-Primer	25
3.2.5.	Sequenzierprimer EST10	25
3.2.6.	Primer EST01	25
3.2.7.	Linker	26
3.3.	Kommerzielle Reaktionssätze	26
3.4.	Enzyme	27
3.5.	Restriktionsenzyme	27
3.6.	Chemikalien / Reagenzien	28
3.7.	Geräte	31
3.8.	Sonstige Materialien	32
3.9.	Software	32
4.	Methoden	33
4.1.	Herstellung von Puffern und Lösungen	33
4.2.	In vivo-Modell der fokalen cerebralen Ischämie im Maushirn	37
4.3.	SAGE-cDNA-Expressionsbibliothek / SAGE- <i>tags</i>	38
4.4.	RNase freies Arbeiten	39
4.5.	Isolation von Gesamt-RNA aus Maushirnen	39

4.6.	Isolation von m-RNA aus Gesamt-RNA	39
4.7.	cDNA-Synthese	40
4.7.1.	cDNA-Synthese aus m-RNA	40
4.7.2.	cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA mit Random Hexamers	41
4.8.	Photometrische Bestimmung von RNA- und DNA-Konzentrationen	41
4.9.	PCR	42
4.9.1.	SARA-PCR	42
4.9.1.1.	Synthese biotinylierter cDNA	42
4.9.1.2.	Restriktionsverdau der biotinylierten cDNA mit NlaIII	42
4.9.1.3.	Bindung der Nla III verdauten cDNA an paramagnetische Kugelchen	42
4.9.1.4.	Linkerligation der an paramagnetische Kugelchen gebundenen cDNA	43
4.9.1.5.	Primerkonzeption	43
4.9.1.6.	PCR mit an paramagnetische Streptavidin - Kugelchen gebundener cDNA als Matrize (SARA-PCR)	44
4.9.2.	Standard-Sonden PCR	45
4.9.3.	Real Time RT-PCR mit der Light Cycler-Technik	45
4.9.4.	5`RACE-PCR zur Isolierung der vollständigen 5`cDNA-Enden	48
4.9.4.1.	Prinzip	48
4.9.4.2.	Modifikation der RNA und cDNA-Synthese	48
4.9.4.3.	5`RACE-PCR	49
4.10.	Gelelektrophorese	50
4.10.1.	Agarosegelelektrophorese	50
4.10.2.	PAGE-Gel Elektrophorese	50
4.11.	Restriktionsverdau	50
4.11.1.	Restriktionsverdau von PCR-Produkten	50
4.11.2.	Restriktionsverdau von Plasmiden	51
4.12.	Gelreinigung von DNA	51
4.12.1.	Aus Agarose-Gelen	51
4.12.2.	Aus PAGE-Gelen	52
4.13.	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	52
4.14.	Präzipitation von DNA mit Ethanol	52
4.15.	Northern Blot	52
4.15.1.	Probenvorbereitung	52
4.15.2.	Agarosegelelektrophorese der denaturierten RNA	53

4.15.3.	Transfer der RNA auf die Membran	53
4.15.4.	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit ^{32}P dCTP	54
4.15.5.	Hybridisierung der Northern blot Membran mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	54
4.15.6.	Densitometrische Auswertung des Northern Blots	55
4.15.7.	Wiederverwendung hybridisierter Membranen - Entfernung der gebundenen Sonde	55
4.16.	Klonieren von PCR-Produkten	55
4.16.1.	Transformation der elektrokompetenten <i>E. coli</i> mit dem Vektor	55
4.16.2.	Kultur der transformierten <i>E.coli</i> -Suspension auf LB-Agar	56
4.16.3.	Kultivierung einzelner Klone	57
4.16.4.	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Kulturen	57
4.17.	Sequenzierung mit fluoreszierenden M13-Primern	58
4.18.	Datenbankrecherche	59
5.	Ergebnisse	60
5.1.	Ausgangspunkt und Vorgehen	60
5.2.	Herstellung EST-spezifischer Sonden für SAGE-Kandidatengene	62
5.3.	Untersuchung der Expression der SAGE-Kandidatengene mit EST-spezifischen Sonden im Northern Blot	63
5.4.	Zwischenbilanz nach Untersuchung erster Kandidatengene im Northern Blot	64
5.5.	SARA-PCR	65
5.5.1.	Das Prinzip der SARA-PCR	65
5.5.2.	Optimierung der SARA-PCR-Bedingungen	67
5.5.2.1.	Paramagnetische Kügelchen inhibieren die Amplifikation erst bei sehr hohen Konzentrationen	67
5.5.2.2.	Annealingtemperatur und DNA-Polymerase als wesentlicher Faktor der Amplifikationsspezifität und -effektivität	69
5.5.2.3.	„Schmier“ als Problem bei geringer Amplifikationseffizienz	70
5.5.2.4.	Erhöhung der Amplifikationseffektivität durch lineare Preamplifikation	71
5.5.3.	SARA-PCR identifiziert SAGE- <i>tag</i> -spezifische Transkripte	72
5.5.4.	Quantitative Aspekte der SARA-PCR	76
5.5.4.1.	Quantifizierung I: SARA-PCR-Amplifikate als Sonde im Northern Blot	76
5.5.4.2.	Quantifizierung II: SARA-PCR als Real Time RT-PCR mit der Light Cycler-Technik	77

5.6.	Zusammenfassung der Expressionsergebnisse aller untersuchten SAGE- <i>tags</i>	80
5.7.	Charakterisierung des SAGE- <i>tags</i> EST10	82
5.7.1.	Homologie des SARA-PCR-Produktes EST10	82
5.7.2.	5`RACE-PCR zur Isolierung des vollständigen EST10-Transkriptes	82
5.7.3.	Sequenzierung und Homologie des 5`RACE-PCR-Produktes EST10	83
5.7.4.	Putative Proteinsequenz der EST10-Transkriptsequenz	84
5.7.5.	Strukturanalyse der putativen Proteinsequenz des Transkriptes EST10	85
5.7.6.	Zeitkinetik der EST10-Expression nach transienter fokaler cerebraler Ischämie	86
5.8.	Charakterisierung des SAGE- <i>tags</i> EST01	87
5.8.1.	Homologie des SARA-PCR-Produktes des <i>tags</i> EST01	87
5.8.2.	5`RACE-PCR zur Amplifikation des vollständigen EST01-Transkriptes	88
5.8.3.	EST01 wird als 5,8 kb Transkript nach fokaler cerebraler Ischämie induziert	89
5.8.4.	Zeitkinetik der EST01-Expression nach transienter fokaler cerebraler Ischämie	90
6.	Diskussion	92
6.1.	Aspekte der SAGE- <i>tag</i> -Gen-Zuordnung	92
6.2.	SARA-PCR	96
6.2.1.	cDNA-Synthese und cDNA-Modifikation	96
6.2.2.	Primerkonstruktion	97
6.3.	Optimierung der SARA-PCR Bedingungen	98
6.4.	Anwendung der SARA-PCR	99
6.4.1.	Sensitivität der SARA-PCR	99
6.4.2.	Spezifität der SARA-PCR - <i>Multiple match tags</i> und <i>no match tags</i>	99
6.5.	SARA-PCR Quantifizierung: Northern blot und Real Time RT-PCR mit der Light Cycler-Technik	101
6.6.	Unterschiede im detektierten Expressionsunterschied zwischen SAGE-Daten, Northern Blot, und Real Time RT-PCR	102
6.7.	Gesamtbilanz	103
6.8.	Weitere Charakterisierung verifizierter Kandidatengene	106
6.8.1.	Charakterisierung von EST10	106
6.8.1.1.	Konsensussequenz EST10	106
6.8.1.2.	Putative Proteinstruktur und Lokalisation	106
6.8.1.3.	Expression und mögliche Funktion	107
6.8.1.4.	Ausblick	108
6.8.2.	Charakterisierung von EST01	109

6.8.2.1.	Aufbau der VL30-Elemente	109
6.8.2.2.	EST01 Homologierecherche und Expressionsuntersuchung	110
6.8.2.3.	Expression von EST01 und mögliche Funktion von VL30-Elementen	112
6.8.2.4.	Ausblick	113
7.	Zusammenfassung	114
Literaturverzeichnis		116
Abkürzungsverzeichnis		125
Publizierte Ergebnisse		126
Danksagung		127
Curriculum vitae		128
Erklärung		129

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Acc.No.	<i>accession number</i> (Nummer der Sequenzen in den Datenbanken)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	aus Boten-RNA hergestellte DNA
CP	<i>crossing point</i> (Punkt, an dem die detektierte Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz überschreitet)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ssDNA	Einzelstrang-DNA
EST	<i>expressed sequence tag</i> (kurzes cDNA Stück eines Gens)
G	Guanin
I	Ischämie
Ko	Kontrolle
kb	Kilobasen
LTR	<i>long terminal repeat</i> (lange terminale, sich wiederholende Sequenzen)
mRNA	Boten-RNA
nt	Nukleotid
PBF	<i>PTTG Binding Factor</i> (PTTG-bindender Faktor)
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pos	Position
PTTG	<i>Pituitary Tumor-Transforming Gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i> (schnelle Amplifikation von cDNA-Enden)
RT	Reverse Transkriptase
SAGE	Serielle Analyse der Genexpression
T	Thymin
tag	kurzes Sequenzstück eines Transkriptes
VL	<i>virus like</i> (Virus-ähnlich)

Publizierte Ergebnisse

1. **Kannbley U**, Kapinya K, Dirnagl U, Trendelenburg G (2003). Improved protocol for SAGE Tag-to-Gene Allocation. BioTechniques 34: 1212-4, 1216-9.
2. **Kannbley U**, Kapinya K, Dirnagl U, Trendelenburg G (2003). Improved protocol for SAGE Tag-to-Gene Allocation. 14th European Students Conference, Berlin (Poster).
3. Trendelenburg G, Prass K, Priller J, Kapinya K, Polley A, Muselmann C, Ruscher K, **Kannbley U** et al. (2002). Serial analysis of gene expression identifies metallothionein II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. J Neurosci 22: 5879-5888.
4. **Kannbley U**, Potas J R, Trendelenburg G (2005). An Improved Protocol for SAGE Tag-to-Gene Allocation. Wang S M: SAGE: Current Technologies and Applications. Chapter 4: 91-102.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. U. Dirnagl für die Überlassung des Themas und Bereitstellung der großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung für Experimentelle Neurologie.

Mein Dank gilt Herrn Dr. G. Trendelenburg für die Betreuung der Arbeit, und die konstruktiven Hinweise und Kommentare insbesondere auch in schwierigen Phasen der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Krisztian Kapinya bedanken, der die Induktion der fokalen cerebralen Ischämie im Maushirn sowie die anschließende Dekapitierung und Entnahme der Hirne durchgeführt hat.

Bei Frau Claudia Muselmann möchte ich mich für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Techniken, sowie ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen methodischen Fragen bedanken.

Herrn Dr. Dirk Megow danke ich für die jederzeit prompte Hilfsbereitschaft bei Problemen mit dem Computer.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meinen ehemaligen, allen hier nicht namentlich genannten Laborkollegen und Mitdoktoranden für die kooperative und kollegiale Zusammenarbeit im Labor. Sie haben wesentlich zu einem angenehmen Arbeitsklima im Laboralltag beigetragen.

Nicht zuletzt ist mein besonderer Dank an meine Eltern gerichtet, die mich in vielfältiger Weise unterstützt haben und mir immer zur Seite standen.

Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Ute Kannbley, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Genexpressionsveränderungen nach experimenteller fokaler cerebraler Ischämie: Transkriptidentifikation und -charakterisierung“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift