

# **Differentielle Genexpression in den Blut- Hirnschrankkapillaren von Stroke-Prone Spontan Hypertensiven Ratten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Torsten Kirsch

aus Düsseldorf

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

Berlin 2001

Gutachter

Prof. Dr. H. Haller

Prof. Dr. V. A. Erdmann

Datum der Disputation

8. Juli 2002

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Schlaganfall (Apoplexie)</b>	<b>8</b>
1.1.1	Klassifizierung des Schlaganfalls	8
1.1.1.1	Ischämischer Schlaganfall	8
1.1.1.2	Hämorrhagischer Schlaganfall	9
1.1.1.3	Subarachnoidalblutung	9
<b>1.2</b>	<b>Schlaganfall und Bluthochdruck</b>	<b>9</b>
1.2.1	Ursachen eines Schlaganfalls	9
1.2.1.1	Umwelteinflüsse und vaskuläre Erkrankungen	9
1.2.1.2	Genetische Prädisposition	10
1.2.2	Einfluß des Bluthochdruckes auf die Pathogenese des Schlaganfalls	10
1.2.3	Zerebrovaskuläre Degeneration und die Rolle von Leukozyten	10
<b>1.3</b>	<b>Stroke-prone spontan hypertensive Ratten (SHRSP)</b>	<b>11</b>
1.3.1	SHRSP sind ein genetisches Modell für den humanen Schlaganfall	12
1.3.2	Veränderungen der zerebralen Gefäße in den SHRSP	12
1.3.2.1	Veränderte vasodilatatorische Reaktionen der Gefäße	13
1.3.3	Genetische Untersuchungen an den SHRSP	13
<b>1.4</b>	<b>Die Blut-Hirnschranke</b>	<b>14</b>
1.4.1	Funktionen der Blut-Hirnschranke	14
1.4.2	Aufbau der Blut-Hirnschranke	14
<b>1.5</b>	<b>Tight Junctions</b>	<b>15</b>
1.5.1	Molekulare Zusammensetzung der tight junctions	16
1.5.1.1	Zonula occludens Proteine	16
1.5.1.2	Occludin	17
1.5.1.3	Claudine	17
1.5.1.4	Junctional Adhesion Molecule	17
1.5.1.5	Weitere perijunktionale Proteine	18
1.5.2	Funktionen der tight junctions	19
1.5.2.1	Polarisierung der Zellmembran	19
1.5.2.2	Regulation der parazellulären Diffusion	19
<b>1.6</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Enzyme und Reaktionspuffer, Antibiotika, Nukleinsäuremarker</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Tiere</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>21</b>
<b>2.5</b>	<b>Plasmide</b>	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Primer und Oligonukleotide</b>	<b>22</b>
<b>2.7</b>	<b>TaqMan-Sets</b>	<b>23</b>
<b>2.8</b>	<b>Allgemein verwendete Lösungen und Puffer</b>	<b>24</b>
<b>2.9</b>	<b>Medien für Bakterienanzucht</b>	<b>24</b>

---

<b>2.10</b>	<b>Zellkulturmedium</b>	<b>25</b>
<b>2.11</b>	<b>Kits</b>	<b>25</b>
<b>2.12</b>	<b>Geräte</b>	<b>26</b>
<b>2.13</b>	<b>Software</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Präparation der zerebralen KapillargefäÙe</b>	<b>27</b>
3.1.1	MikrogefäÙ-Präparation nach Harik et al. (1985)	27
3.1.2	Kapillar-Präparation nach Risau et al. (1990)	27
<b>3.2</b>	<b>RNA Präparationsmethoden</b>	<b>28</b>
3.2.1	Guanidiniumhydrochlorid-Extraktion von RNA	28
3.2.2	Extraktion von RNA aus kleinen Mengen Gewebe mit Trizol	29
3.2.3	Extraktion von RNA über Qiagen RNeasy Mini-Säulen	29
<b>3.3</b>	<b>Allgemeine molekularbiologische Methoden</b>	<b>30</b>
3.3.1	Phenolextraktion von RNA oder cDNA	30
3.3.2	Alkoholfällung von Nukleinsäuren	30
3.3.3	Verdau der genomischen DNA mit DNase I	31
3.3.4	Reverse Transkription von RNA	31
3.3.4.1	Einzelstrangsynthese	31
3.3.4.2	Synthese von doppelsträngiger cDNA	31
3.3.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	32
3.3.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	32
3.3.7	5'-RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA ends)	34
3.3.8	Agarose-Gelelektrophorese	36
3.3.8.1	Analytische Gelelektrophorese	36
3.3.8.2	Präparative Gelelektrophorese	36
3.3.9	DNA-Aufreinigung	36
3.3.9.1	Aufreinigung von DNA über Qiaquick Spin Minisäulen	36
3.3.9.1.1	PCR-Aufreinigung	37
3.3.9.1.2	Entfernung von Nukleotiden aus DNA-Reaktionen	37
3.3.9.1.3	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	37
3.3.9.2	Aufreinigung von kleinen DNA Fragmenten über Qiaex II	38
3.3.10	Ligation von DNA-Fragmenten	38
3.3.11	Topo-TA Ligation von PCR-Fragmenten	39
3.3.12	Herstellung kompetenter E.coli Zellen (CaCl <sub>2</sub> -Methode)	40
3.3.13	Transformation kompetenter E.coli	40
3.3.13.1	Hitzeschock-Transformation	40
3.3.13.2	Schnelltransformation ( nach Pope und Kent, 1996)	40
3.3.14	Anlegen von Glycerinkryokonserven	41
3.3.15	Präparation von Plasmid-DNA	41
3.3.15.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	41
3.3.15.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA	41
3.3.15.3	Endotoxin-freie Maxipräparation	42
3.3.16	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	42
3.3.17	RNA-Analyse mit dem Bioanalyzer	43
<b>3.4</b>	<b>Subtraktive cDNA-Hybridisierung</b>	<b>43</b>
3.4.1	Theorie	43
3.4.2	SMART cDNA Synthese	45

---

3.4.2.1	Erststrang-Synthese	46
3.4.2.2	Amplifizierung der cDNA durch LD-PCR (long-distance PCR)	46
3.4.2.3	Aufreinigung der cDNA	47
3.4.2.4	Fragmentierung der cDNA	48
3.4.3	Subtraktive Hybridisierung	49
3.4.3.1	Ligation der Adaptoren an die fragmentierte cDNA	49
3.4.3.2	Kontrolle der Ligationseffizienz	49
3.4.3.3	Erste und Zweite Hybridisierung	50
3.4.3.4	PCR-Amplifizierung der subtrahierten cDNA-Proben	51
3.4.3.5	Klonierung der subtrahierten cDNA-Proben	52
3.4.3.6	Kontrolle der Subtraktionseffizienz	53
3.4.4	Differential Screening Protokoll	53
3.4.4.1	Herstellung des Dot Blots	53
3.4.4.2	Markierung der Proben und Hybridisierung	54
3.4.4.3	Waschen und Exponieren der hybridisierten Filter	54
<b>3.5</b>	<b>Herstellung von hochdichten cDNA-Filter</b>	<b>55</b>
3.5.1	Spotten der cDNA-Filter	56
3.5.2	Vorbereitung und Markierung der Hybridisierungsproben	56
3.5.3	Hybridisierung der cDNA-Filter	57
3.5.4	Analyse der Hybridisierungsergebnisse	57
<b>3.6</b>	<b>Sequenzierung von DNA</b>	<b>58</b>
<b>3.7</b>	<b>Quantitative RT-PCR</b>	<b>58</b>
3.7.1	Theorie der real-time quantitativen RT-PCR (TaqMan-PCR)	58
3.7.2	Definition der verwendeten Werte	60
3.7.3	Auswahl der Primer und der Sonden	60
3.7.4	Verdünnung der Sonde	61
3.7.5	Optimierung der einzelnen TaqMan Sets	62
3.7.6	Pipettierschema einer TaqMan PCR	63
3.7.7	Analyse der TaqMan-PCR	64
<b>3.8</b>	<b><i>In situ</i> Hybridisierung</b>	<b>65</b>
<b>3.9</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>66</b>
3.9.1	Präparation von HUVE Zellen	66
3.9.2	Transfektion von Endothelzellen	66
3.9.3	Stimulierung von HUVE Zellen	67
<b>3.10</b>	<b>Konfokale Mikroskopie</b>	<b>68</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich der RNA Expressionsmuster in den Blut-Hirnschranken-kapillaren von SHRSP und SHR</b>	<b>69</b>
4.1.1	Präparation der zerebralen Mikrokapillaren und RNA-Extraktion	69
4.1.1.1	Kapillarpräparation	69
4.1.1.2	RNA Extraktion aus den Kapillaren	69
4.1.2	Subtraktive Hybridisierung	70
4.1.2.1	Analyse der Ligationseffizienz	70
4.1.2.2	Test der Effizienz der subtraktiven Hybridisierung	72
4.1.2.3	Überprüfung der differentiell exprimierten cDNA Fragmente im Dot Blot	73
4.1.2.4	Nukleotidsequenzanalyse der differentiell exprimierten cDNA-Fragmente	74
4.1.2.4.1	BM247 und BM259	74

---

4.1.2.4.2	BM254	76
4.1.2.4.3	BM269	77
4.1.3	Verwendung hochdichter cDNA-Filter zur Expressionsanalyse	77
4.1.3.1	Aufbau der cDNA-Filter	77
4.1.3.2	Beurteilung der Qualität der Hybridisierung	78
4.1.3.3	Auswertung der cDNA-Filterexperimente	81
4.1.4	Quantitative RT-PCR der differentiell exprimierten cDNAs	83
4.1.4.1	Vergleich der Expressionshöhen der cDNAs aus der Subtraktion	84
4.1.4.2	Vergleich der Expressionshöhen der cDNAs aus den Hybridisierungsexperimenten mit den hochdichten cDNA-Filtern	85
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung von RGS5</b>	<b>86</b>
4.2.1	Klonierung der kodierenden Sequenz von RGS5 aus der Ratte	86
4.2.2	Verifizierung der differentiellen Expression für RGS5	89
4.2.3	RGS5 wird im Gehirn vorwiegend in den Kapillargefäßen exprimiert	89
4.2.4	Pertussistoxin-spezifische Hemmung der inhibitorischen heterotrimeren G-Proteine	90
4.2.5	Angiotensin II reguliert die Expression von RGS5 in vivo	91
4.2.6	Beeinflussung der Expression von RGS5 durch Proteinkinase C	92
4.2.7	Zelluläre Lokalisierung von RGS5 mit Hilfe eines RGS5-GFP-Fusionsproteins	93
4.2.7.1	Klonierungsstrategie	93
4.2.7.2	RGS5 ist im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert	95
4.2.7.3	cAMP verursacht eine Translokation von RGS5 an die Membran	96
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
<b>5.1</b>	<b>Analyse der Expressionsprofile</b>	<b>97</b>
<b>5.2</b>	<b>Präparation der Mikrogefäße</b>	<b>98</b>
<b>5.3</b>	<b>Beurteilung der für die Expressionsanalyse eingesetzten Techniken</b>	<b>99</b>
5.3.1	Suppression Subtractive Hybridization	99
5.3.2	cDNA-Filter	100
<b>5.4</b>	<b>Isolierung differentiell exprimierter cDNAs</b>	<b>100</b>
5.4.1	Sulfonylharnstoffrezeptor 2B	101
5.4.2	BM247	102
5.4.3	BM259	103
5.4.4	RGS5	104
5.4.4.1	Regulatoren für G-Proteine vermittelte Signalprozesse	104
5.4.4.2	Charakterisierung von RGS5	105
5.4.4.3	Lokalisation der RGS5 mRNA durch <i>in situ</i> Hybridisierung	106
5.4.4.4	Regulation der Expression von RGS5	107
5.4.4.4.1	G-Protein-abhängige Regulationsmechanismen	107
5.4.4.4.2	Einfluß von Angiotensin II auf die Expression von RGS5	107
5.4.4.4.3	Proteinkinase C reguliert die Expression von RGS5	108
5.4.4.5	Intrazelluläre Verteilung von RGS5	109
5.4.4.6	Translokation von RGS5 durch cAMP	110
5.4.5	Cyclophilin A	110
5.4.6	Galectin-9	111
5.4.7	Cystatin- $\beta$	112
5.4.8	Ubiquitin B	112

---

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Abstract</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>118</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>132</b>
<b>9.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>132</b>
<b>9.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>134</b>
<b>9.3</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>135</b>
<b>9.4</b>	<b>Danksagung</b>	<b>137</b>
<b>9.5</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>138</b>