

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Nukleinsäuren

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

allgemein verwendete Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	micro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym (angiotensin converting enzyme)
Amp	Ampicillin
Ang II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine
c	Konzentration

9. Anhang

CADASIL	Zerebral autosomal dominante Arteriopathy mit subkortikalen Infarkten and Leukenzephalopathie
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CSF-1	colony stimulating factor-1
CTP	Cytidintriphosphat
CyPA	Cyclophilin A
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	desoxy ribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglykol-N,N,N',N'-tetraacetat
FAM	6 – Carboxy - Fluorescein
FET	Fluoreszenzenergietransfer
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAP	G-TPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3'-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green fluorescence protein
GTC	Guanidiniumthiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HUVEC	humane Nabelschnurendothelzellen (human umbilical vein endothelial cells)
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Kan	Kanamycin
K _{ATP}	ATP-sensitiver Kaliumkanal
Kb	Kilobasenpaar
KIR	einwärts gleichgerichteter Kaliumkanal
L	Liter
LAN	Linker Arm Nukleotid (Thymidin mit C ₆ -Linker)
LB	Luria Bertani
m	milli
M	molar
MAYP	macrophage actin-associated tyrosinephosphorylated protein
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano
ng	Nanogramm
NIH	National Institute of Health
OD	optische Dichte
p	piko
PBS	phosphate buffered seline
PCR	polymerase chain reaction
PDBu	Phorboldibutytrat
PDGF	platelet derived growth factor

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbolmyristolazetat
PTX	Pertussistoxin
QTL	quantitative trait loci
RACE-PCR	Rapid amplification of cDNA ends Polymerase chain reaktion
RAS	Renin-Angiotensin-System
RGS	Regulator of G-protein signaling
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS 7700	Sequence Detection System 7700
SDS PAGE	Natriumdodecylsulfat
SHR	spontaneously hypertensive rat
SHRSP	stroke-prone spontaneously hypertensive rat
ssDNA	single strand DNA
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
SUR2B	Sulfonylharnstoffrezeptor 2B
TAMRA	6 –Carboxy-tetramethyl-rhodamin
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
TNF α	tumor necrosis factor α
TTP	Thymidintriphosphat
U	unit, Einheit der Enzymaktivität
UNG	Uracil N-Glykosidase
Upm	Umdrehung pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V/V	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
w/V	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WKY	Wistar-Kyoto rat
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galactosid

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schema der Blut-Hirnschranke.	15
Abb. 1.2: <i>Tight junction</i>-Stränge.	16
Abb. 1.3: Schema der <i>tight</i> und <i>adherens junctions</i>.	18
Abb. 3.1: Topo-TA Klonierung.	39
Abb. 3.2: Schema der subtraktiven cDNA-Hybridisierung.	44
Abb. 3.3: SMART cDNA-Synthese.	46
Abb. 3.4: Darstellung des Pipettierschrittes für die zweite Hybridisierung.	51
Abb. 3.5: Ablauf der TaqMan PCR-Reaktion.	59
Abb. 3.6: Graphische Darstellung des Amplikons für die TaqMan-Analyse.	61
Abb. 3.7: Beispiel eines TaqMan-Plots.	64
Abb. 4.1: Kontrolle der präparierten Gesamt-RNA im Bioanalyzer.	70
Abb. 4.2: Schema der Analyse der Effizienz der Adaptorligation.	71
Abb. 4.3: Analyse der Ligationseffizienz.	71

Abb. 4.4: Reduktion der GAPDH-Expression nach erfolgter cDNA-Subtraktion.	72
Abb. 4.5: Vergleich der Hybridisierungsintensitäten im Dot Blot.	74
Abb. 4.6: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Klone BM247 und BM259.	75
Abb. 4.7: Alignment des Klones BM247 mit dem EST-Klon AL550371.	76
Abb. 4.8: Alignment des Klones BM254 mit M. musculus RGS5.	76
Abb. 4.9: Schema des Aufbaus eines hochdichten cDNA-Filters.	77
Abb. 4.10: Qualität der Doppelspots eines cDNA-Filter.	79
Abb. 4.11: Hybridisierungsqualität der einzelnen Blöcke eines cDNA-Filters.	80
Abb. 4.12: Beispiel eines hybridisierten cDNA Filters.	82
Abb. 4.13: Verteilung der GAPDH in den zerebralen Kapillaren von SHRSP und SHR.	84
Abb. 4.14: Expressionshöhen der in der Subtraktion isolierten cDNAs.	85
Abb. 4.15: Expressionshöhen der im Filterversuch isolierten cDNAs.	86
Abb. 4.16: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von RGS5 aus der Ratte.	87
Abb. 4.17: cDNA- und Aminosäuresequenzen von RGS5 aus Mensch, Maus und Ratte	88
Abb. 4.18: RNA-Verteilung von RGS5 im Gehirn und in den zerebralen Kapillaren.	89
Abb. 4.19: Nachweis der RGS5 mRNA im Rattenhirn.	90
Abb. 4.20: RNA-Expression von RGS5 nach PTX-Behandlung.	91
Abb. 4.21: Einfluß des Renin-Angiotensin-Systems auf die Expression von RGS5.	92
Abb. 4.22: RGS5-Expression nach Inkubation von HUVE Zellen mit PMA bzw. PDBu.	93
Abb. 4.23: Klonierungsschema des rekombinanten RGS5-GFP-Konstruktes.	94
Abb. 4.24: Transfektion von HUVE Zellen mit einem RGS5-GFP-Konstrukt.	95
Abb. 4.25: cAMP induzierte Translokation von RGS5.	96
Abb. 5.1: Hypothetisches Modell der durch RGS-Proteine vermittelten Signalprozesse	105

9.3 Veröffentlichungen

Publikationen:

Kirsch T, Wellner M, Luft FC, Haller H, Lippoldt A (2001). Altered gene expression in cerebral capillaries of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 910:106-115.

Kirsch, T, Wellner M, Elger M, Hentschel H, Litteral J, Haller H (2001). Identification of genes expressed in developing nephrons using subtractive cDNA hybridization. *Mount Desert Island Biological Laboratory* 40:102-105.

Löhn M, Muzzolini U, Conrad H, Kirsch T, Litteral J, Waldron P, Klugbauer N, Hofmann F, Haller H, Luft FC, Gollasch M (2001). Effect of farnesol on vascular smooth muscle calcium channels. *Mount Desert Island Biological Laboratory* 40:99-101.

Hentschel H, Quach L, Wellner M, Kirsch T, Haller H, Elger M (2001). Developing and mature nephrons of adult dogfish *Squalus acanthias* express VEGF-like protein. *Mount Desert Island Biological Laboratory* 40:109-111.

Lippoldt A, Kniesel U, Liebner S, Kalbacher H, Kirsch T, Wolburg H, Haller H (2000). Structural alterations of *tight junctions* are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Res* 885:251-261.

Kirsch T, Wellner M, Haller H (2000). Partial cloning of the Inosine 5-Monophosphate Dehydrogenase from the kidney of the spiny dogfish *Squalus acanthias*. *Mount Desert Island Biological Laboratory* 39:82-83.

Wellner M, Kirsch T, Haller H (2000). Partial cloning of genes expressed in the kidney and involved in the calcium signaling pathway from *Squalus acanthias*. *Mount Desert Island Biological Laboratory* 39:108-109.

9. Anhang

Löhn M, Muzzulini U, Kirsch T, Litteral J, Waldron P, Conrad H, Klugbauer N, Hofmann F, Haller H, Luft FC, Huang Y, Gollasch M. Cilnidipine is a novel slow-acting blocker of vascular L-type calcium channels that does not target protein kinase C. (in Revision)

Lippoldt A, Liebner S, Kirsch T, Busjahn A, Kniessel U, Haller H, Wolburg H. G-protein signaling is important for maintenance of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells of the rat. (eingereicht)

Kirsch T, Wellner M, Luft FC, Haller H, Lippoldt A. Cytoplasmic, membran and nuclear localization of RGS5 in human endothelial cells. (Manuskript in Vorbereitung)

Vorträge:

Altered gene expression in cerebral capillaries of SHRSP. 10th international Symposium on SHR and Molecular Medicine. Rat Genetics, Genomics and model systems for human diseases 2001, Berlin-Buch.

Gene expression profiling in small tissue samples. Kongreß für Nephrologie 2001, Münster

Poster:

Kirsch T, Wellner M, Haller H, Lippoldt A. Altered gene expression in cerebral capillaries of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. American Society of Nephrology Congress 2001, San Francisco, USA.

Kirsch T, Wellner M, Elger M, Hentschel H, Litteral J, Haller H. Identification of genes expressed in developing nephrons in the adult kidney of *Squalus acanthias*. American Society of Nephrology Congress 2001, San Francisco, USA.

Wellner M, Kirsch T, Buchwalow I, Luft FC, Haller H. Altered gene expression in fenestrated endothelium. American Society of Nephrology Congress 2001, San Francisco, USA.

Elger M, Quach L, Litteral J, Kirsch T, Wellner M, Haller H, Hentschel H. Nephrogenesis in adult elasmobranch fish. American Society of Nephrology Congress 2001, San Francisco, USA.

Kirsch T, Wellner M, Luft FC, Haller H, Lippoldt A. Altered gene expression in the cerebral capillaries of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). Congress for Cerebrovascular Biology 2001, Cambridge, UK.

Lippoldt A, Kirsch T, Rascher G, Kalbacher H, Wolburg H, Haller H. RGS5 is a new tight junction protein in endothelial and epithelial cells. Congress for Cerebrovascular Biology 2001, Cambridge, UK.

Kirsch T, Wellner M, Luft FC, Haller H, Lippoldt A. Untersuchungen zur Genexpression in den zerebralen Mikrokapillaren von stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). Deutsche Hochdruckliga 2000, Heidelberg.

Lippoldt A, Kirsch T, Wellner M, Faas B, Luft FC, Haller H. Cellular mechanisms of altered permeability in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. 5th Franz Volhard Symposium on Twigs and Branches – Tube Formation and Branching in the Cardiovascular System 1998, Groß Dölln.

Preise:

Nachwuchswissenschaftlerpreis Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes e.V. Deutsche Hypertonie Gesellschaft. 2000, Heidelberg.

Posterpreis Congress for Cerebrovascular Biology 2001, Cambridge, UK

9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. H. Haller danke ich für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit anfertigen zu können. Darüber hinaus möchte ich mich für die wissenschaftlichen Freiheiten bedanken, die es mir ermöglichten, meinen Ideen freien Lauf zu lassen und die Richtung dieser Arbeit maßgeblich mit zu bestimmen.

Herrn Prof. Dr. V. Erdmann danke ich für die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität Berlin und für seine bereitwillige Unterstützung in allen Belangen dieser Arbeit.

Andrea Lippoldt danke ich für die Einführung in die Thematik und für die große Unterstützung dieser Arbeit sowie für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Maren Wellner danke ich für ihre Hilfe und Beistand während dieser Arbeit, sowie für die vielen hilfreichen Tips und Ratschläge während der letzten Jahre. Besonderen Dank auch für die bereitwillig gewährte großzügige Gastfreundschaft in ihrer Gruppe.

Dank auch an Jana Czychi, Dora Fiedler, Ute Gerhard, Anja Sieber und Heike Thränhardt, die mit ihrer unendlichen Hilfsbereitschaft erheblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Ebenfalls ein Dank an alle Kellerkinder in der Franz-Volhard Klinik, die mir die Zeit dort sehr erträglich gemacht haben.

Margit Knoblauch hat mir die Arbeiten am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Dahlem ermöglicht.

In diesem Zusammenhang geht ein besonderer Dank an Heike Zimdahl, Claudia Gösele und Stephen Gelling, sowie alle anderen Bewohner des Labors 116, die mich während meiner Zeit in Dahlem unterstützt und mir die Zeit dort versüßt haben.

Eine wesentliche Stütze waren auch meine Eltern, ohne die diese Arbeit nie entstanden wäre und die mich in allen Entscheidungen lebhaft unterstützt haben.

Britt, Dir danke ich für Deine Geduld und die liebevolle Begleitung, die mich all die Mühen und Sorgen dieser Arbeit durchstehen ließ!

9.5 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Torsten Kirsch
Anschrift: Gottschedstr. 26
13357 Berlin
Geburtsdatum: 20.12.1970
Geburtsort: Düsseldorf
Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang:

1977-1981 Ernst-Henning Grundschule Hamburg-Bergedorf
1981-1990 Luisengymnasium Hamburg-Bergedorf
1990-1991 Grundwehrdienst bei der Marine Flensburg
1991-1996 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
Vordiplom 23.06.1993
mündliche Diplomprüfung 31.10.1996
1996-1997 Diplomarbeit am Max-Planck Institut für Infektionsbiologie, Berlin
in der Abteilung Molekulare Biologie bei Prof. T.F. Meyer
Diplom der Biologie 23.1.98
1998-2001 Promotionsarbeit am Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin
in der Abteilung von Prof. F.C. Luft/ Prof. H. Haller