

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der
Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin und dem
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch

DISSERTATION

Untersuchung zur gewebspezifischen Genexpression
in einem Tiermodell für Schlaganfall

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Christina Pellnitz

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. Detlef Ganten
2. Prof. Dr. Stefan-Martin Brand-Hermann
3. Prof. Dr. Wilhelm Haverkamp

Datum der Promotion: 20.11.2009

Meinen Eltern
und Alexander gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen.....	vi
2. Einleitung.....	1
2.1. Charakterisierung einfacher und komplexer Erbkrankheiten.....	1
2.2. Beschreibung der Tiermodelle SHR und SHRSP.....	3
2.3. Hypertonie als komplexe Erkrankung.....	6
2.3.1. Bedeutung der Hypertonie.....	6
2.3.2. Molekulargenetische Grundlagen von Hypertonie in Tiermodellen.....	7
2.3.3. Hypertonie als ein Risikofaktor für Schlaganfall.....	10
2.4. Schlaganfall als komplexe Erkrankung.....	11
2.4.1. Bedeutung des Schlaganfalls.....	11
2.4.2. Molekulargenetische Grundlagen von Schlaganfall bei SHRSP.....	13
2.5. Differential Display of mRNA.....	14
2.6. Zielsetzung der Arbeit.....	20
3. Materialien und Methoden.....	22
3.1. Chemikalien und Substanzen.....	22
3.2. Tierexperimentelle Protokolle.....	24
3.2.1. Versuchstiere.....	24
3.2.2. Behandlung der Versuchstiere.....	24
3.2.3. Entnahme von Geweben.....	25
3.3. RNA Extraktion.....	25
3.3.1. Extraktion von gesamter zellulärer RNA.....	25
3.3.2. Extraktion von messenger RNA.....	26
3.4. Einzelsträngige cDNA Synthese.....	27
3.5. PCR.....	28
3.6. Differential Display of mRNA.....	29
3.6.1. Schematische Darstellung von Differential Display of mRNA.....	31
3.6.2. Primersequenzen.....	32
3.6.3. DD-PCR.....	35
3.6.4. Elektrophorese und Autoradiographie.....	35
3.6.5. Eluierung und Reamplifizierung der DD-PCR-Produkte.....	36
3.6.6. Klonierung der DD-Produkte.....	37

3.6.7. Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	40
3.6.8. Sequenzieren der PCR-Produkte.....	41
3.7. Hybridisierung von Membranen.....	43
3.7.1. Membranen mit transferierten menschlichen cDNA-Fragmenten.....	43
3.7.2. Membranen mit transferierter DD-PCR-Produkten.....	44
3.8. Northern Blotting.....	46
3.8.1. Herstellung des Northern Blots	46
3.8.2. Herstellung der radioaktiv markierten Sonde.....	48
3.9. In vitro Transkription.....	49
3.10. Ribonuclease Protection Assay.....	52
4. Resultate.....	54
4.1. Differential Display-PCR.....	54
4.2. Unterschiede im Bandenmuster.....	57
4.3. Charakterisierung der isolierten DD-PCR-Produkte.....	62
4.3.1. Sequenzierung der klonierten DD-PCR-Produkte.....	62
4.3.2. Hybridisierung von Membranen mit transferierter DD-PCR-Produkten.....	64
4.3.3. Hybridisierung von Membranen mit menschlichen cDNA-Fragmenten.....	65
4.3.4. Northern Blot Analyse ausgewählter DD-PCR-Produkte.....	66
4.3.5. Expressionsanalyse mit RNase Protection Assay.....	67
5. Diskussion.....	72
5.1. Genetischer Hintergrund von Schlaganfall im Tiermodell SHRSP.....	72
5.2. Vor- und Nachteile von Differential Display of mRNA.....	72
5.2.1. Differential Display-PCR.....	74
5.2.2. Heterogenität der DD-Banden.....	75
5.2.3. Verifizierung potentiell unterschiedlich exprimierter Sequenzen.....	77
5.3. Bedeutung des TRH-Rezeptors auf die Blutdruckregulation.....	79
6. Zusammenfassung.....	82
7. Danksagung	85
8. Lebenslauf.....	86
9. Selbständigkeitserklärung.....	87
10. Literaturverzeichnis.....	88

1. Abkürzungen

A	Ampere
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
BNP	brain (ventriculäres) natriuretisches Peptid
bp	Basenpaare
BSA	bovin (Rinder) Serum Albumin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
Cl ⁻	Chlorid
cpm	Zerfälle pro Minute
dATP	2'-Deoxyadenosin 5'-Triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytidin 5'-Triphosphat
DD	Differential Display
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DD-PCR	Differential Display-PCR
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Deoxyguanidin 5'-Triphosphat
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	2'-Deoxynucleosid-5'Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Deoxytymidin 5'-Triphosphat
dUTP	2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fg	Femtogramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galaktose

K ⁺	Kalium
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
μ	Mikro
m	Milli
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
Na ²⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Kettenreaktion
QTL	quantitative trait loci
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPA	RNase Protection Assay
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SHR	spontan hypertensive Ratte
SHRSP	zum Schlaganfall neigende spontan hypertensive Ratte
SNP	single nucleotid polymorphism
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Hydroxymethylaminomethan
V	Volt
WKY	Wistar-Kyoto-Ratte
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktose

2. Einleitung

2.1. Charakterisierung einfacher und komplexer Erbkrankheiten

Durch genetisch-epidemiologische Beobachtungen wurde gezeigt, dass viele chronische Erkrankungen aufgrund von familiärer Häufung und erhöhter Konkordanz der Erkrankung bei eineiigen Zwillingen genetisch mitbedingt sind. Als Beispiele können weit verbreitete Krankheiten wie Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit, primäre Hypertonie und Schlaganfall aufgeführt werden. Signifikante Fortschritte in Diagnostik und Therapie dieser komplexen Erkrankungen werden von der Identifikation der diesen Erkrankungen zugrundeliegenden Gene mitbedingt. Das Verständnis der molekularen Pathogenese kann nicht nur zu einer Verbesserung in der Diagnostik und Therapie dieser Erkrankungen beitragen, sondern stellt die Grundlage in Prävention und Heilung dar.

Erbkrankheiten zeigen sich in einfachen Mendel'schen Vererbungszügen bis hin zu komplexen genetischen Erkrankungen. Der österreichische Augustinermonch Gregor J. Mendel hatte die grundlegenden Regeln der Vererbung bereits 1865 vorgestellt und damit den Grundstein der modernen Vererbungslehre gelegt. Aus der mathematischen Analyse seiner Kreuzungsversuche an verschiedenen Erbsensorten im Klostergarten im damals österreichischen Brunn leitete Mendel die Gesetze ab, nach denen sich bestimmte Merkmale spalten, neu kombinieren und zusammenwirken. Er stellte fest, dass die erste Nachkommengeneration ($F_1=1$. Filialgeneration) reinrassiger Eltern stets ein gleichförmiges Aussehen hatte, also uniform war, wobei sie ein vorherrschendes dominierendes Merkmal aufwies (Uniformitätsregel). In der folgenden zweiten Generation traten die elterlichen Merkmale im Verhältnis von 3:1 vom dominanten zum rezessiven, zurücktretenden, Merkmal wieder auf, im Verhältnis von 9:3:3:1, wenn zwei elterliche Merkmale betrachtet wurden, und spalteten sich so gesetzmäßig auf (Spaltungsregel). Bei der Kreuzung von Individuen mit mehreren unterschiedlichen Merkmalen wurden die einzelnen Merkmale unabhängig voneinander und ohne sich zu vermischen vererbt (Unabhängigkeitsregel). Diese Ergebnisse schrieb Mendel im Aufsatz „Versuche über Pflanzenhybride“ nieder, der 1866 vom Naturforschenden Verein Brunn publiziert wurde, und prägte so die Grundbegriffe der Genetik wie Dominanz, Rezessivität, Homozygotie und Heterozygotie. Diese Erkenntnisse blieben jedoch lange Zeit weitgehend unbeachtet, bis 1900 unabhängig voneinander der Deutsche Carl Erich Correns, der Holländer Hugo de Vries und der

Österreicher Erich Tschermak Edler von Seysenegg die in Vergessenheit geratenen Vererbungsregeln von Gregor Mendel wiederentdeckten.

Ein einfacher Mendelscher Erbgang folgt somit ganz bestimmten Regeln der Vererbung, der Phänotyp der Nachkommen ist an Hand des Genotyps vorhersagbar. Meist ist der Phänotyp in vollem Maße betroffen oder nicht betroffen, wie zum Beispiel bei dem Mangel oder der Präsenz eines Enzyms. Die phänotypische Ausprägung kann, wie schon bei Mendel beschrieben, auf verschiedene Weise erfolgen: Der Effekt eines bestimmten Allels, die Zustandsform eines Gens gegeben durch eine bestimmte Nukleotidsequenz, ist im allgemeinen entweder dominant oder rezessiv. Bei gleichberechtigter Ausprägung von Genprodukten beider Allele liegt Codominanz vor, bei gleichzeitiger Ausprägung und Vereinigung zu einem Zwischenprodukt spricht man von Semidominanz (oder „additiver“ Effekt). Den Prototyp semidominanter Vererbung beschrieb Mendel in der Kreuzung von weiß- und rotblühenden Wunderblumen, bei der die F₁-Generation uniform rosablühende Blüten erhielt. Im Gegensatz zu diesen monogenetischen Erbgängen mit relativ einfachem Muster der Vererbung, Penetration und Expression sind polygenetische Erkrankungen sehr viel komplexer und schwierig in ihrer Charakterisierung. Zu ihnen zählen prinzipiell fast alle häufigen chronischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit, Hypertonie und Schlaganfall, die aufgrund ihrer hohen Prävalenz und ihrer belastenden Langzeitkomplikationen von großer Bedeutung für die Gesundheit der Bevölkerung sind. All diese Erkrankungen zeigen eine gewisse familiäre Häufung – der Hinweis auf die genetische Komponente – ohne annähernd so voraussagbar zu sein, wie es monogenetische Erkrankungen sind.

Mehrere Faktoren tragen zu der Komplexität dieser Erbkrankheiten bei. Einerseits werden diese Erkrankungen als polygenetisch angesehen. Dies bedeutet, dass eine Anzahl von Genen zur Ausprägung des Phänotyps beitragen, wobei bestimmte Allele einen dominanten, additiven oder rezessiven Effekt ausüben können. Manchmal tragen Gene zum Phänotyp nur in Anwesenheit von anderen Genen bei, was als Epistasie bezeichnet wird. Wenn der Beitrag einer Gen-Variante zu der Erkrankung in Abhängigkeit von der Zahl der entsprechenden Allele variiert, so spricht man von additivem oder Gen-Dosis Effekt. Andererseits sind diese Erkrankungen multifaktoriell bedingt. Das heißt, die relevanten genetischen Faktoren stehen in komplizierter Wechselwirkung mit Umweltfaktoren, zu denen auch Lebensgewohnheiten (wie, unter anderem z. B. Rauchen, fettreiche Ernährung, mangelnde Bewegung), bzw. auch der Faktor Zeit (in anderen Worten, Lebensalter) zählen. Bestimmte Umweltfaktoren interagieren in diesem Modell mit einer oder mehreren relevanten Gen-Varianten, wodurch der Effekt auf die Ausprägung eines Phänotyps verstärkt oder abgeschwächt werden kann. Charakteristisch für komplexe Erbkrankheiten ist auch

ihre Heterogenität. Während eine bestimmte Kombination von Genen den vorliegenden Phänotyp in einem Individuum (oder möglicherweise einer Familie) beeinflusst, so sind für denselben Phänotyp in einem anderen Individuum oder Familie möglicherweise eine andere Kombination von Genen ausschlaggebend. Die Analyse dieser polygenetischen Erkrankungen wird weiter dadurch erschwert, dass es sich in den seltensten Fällen um klar abgrenzbare, kategorische Phänotypen handelt, sondern normalerweise um kontinuierlich variable, quantitativ ausgeprägte.

Die genetische Analyse komplexer Erkrankungen, wie etwa Hypertonie und Schlaganfall stellt im Menschen aus den oben aufgezählten Gründen eine äußerst schwierige Herausforderung dar.

Ein Ansatz, durch den sich die Komplexität vermindern lässt und womit trotzdem wertvolle Einsichten möglich sind, stellt seit langem die Forschung an Tiermodellen dar. Seit über 50 Jahren gilt die Ratte als ein führendes Tiermodell für Studien komplexer, polygenetisch und multifaktorieller Erkrankungen des Menschen (Jacob and Kwitek, 2002; Wallace and Aitman, 2004), speziell im Bereich kardiovaskulärer und metabolischer Erkrankungen. Durch die Verwendung von Inzuchtstämmen für die Analyse von komplexen Erbkrankheiten wird das Problem der genetischen Heterogenität umgangen. Außerdem können die Tiere unter konstanten Bedingungen gehalten werden, so dass Einflüsse von Umweltfaktoren kontrolliert und gezielt modifiziert werden können. Je nach Fragestellung können bestimmte Komponenten, wie zum Beispiel die Zusammensetzung des Futters, leicht verändert werden. Vor allem aber erlaubt die gezielte Verkreuzung von Versuchstierstämmen mit kontrastierenden Phänotypen genetische Fragestellungen viel direkter zu verfolgen, als dies je in menschlichen Probanden möglich ist. Die mittlerweile bestehende Verfügbarkeit der Genomsequenz der Ratte erleichtert die Durchführung von Gen-expressionsstudien an phänotypisch gut charakterisierten Rattenmodellen (Gibbs *et al.*, 2004). All diese Faktoren erlauben es, die Identifizierung genetischer Ursachen bestimmter Erkrankungen in diesen Tiermodellen mit einer Erfolgsaussicht zu verfolgen, die deutlich höher als in der Humangenetik ist.

2.2. Beschreibung der Tiermodelle SHR und SHRSP

In den letzten Jahrzehnten wurden eine Reihe von Rattenstämmen mit primärer Hypertonie entwickelt. Unter den sehr gut charakterisierten Stämmen befindet sich die spontan hypertensive Ratte, spontaneously hypertensive rat, SHR (Okamoto, 1969), und die eng verwandte, zum Schlaganfall neigende spontan hypertensive Ratte, stroke-prone spontaneously hypertensive rat,

SHRSP (Okamoto *et al.*, 1974; Nagaoka *et al.*, 1976; Yamori *et al.*, 1984). Diese Modelle wurden aus Einzeltieren, die aufgrund eines spontan aufgetretenen Bluthochdrucks auffielen, durch fortgesetzte Inzucht mit Selektion für den hypertensiven, bzw. Schlaganfalls-Phänotyp entwickelt, welcher nunmehr ein genetisch fixiertes Merkmal darstellt, das konstant auftritt und an nachfolgende Generationen weitergegeben wird.

So entstand der Stamm der SHR durch Paarung einer männlichen Wistar Ratte mit mildem Bluthochdruck mit einer weiblichen Ratte des gleichen Stammes an der Medizinischen Fakultät der Kyoto Universität. Jene Nachkommen dieser Paarung, die erhöhten Blutdruck aufwiesen, wurden im Rahmen von selektiven Bruder-Schwester-Paarungen wieder miteinander verkreuzt, bis der erhöhte Blutdruck nach einer Reihe von Generationen als fixiertes, verlässlich auftretendes Merkmal etabliert war (Okamoto, 1969). SHR Ratten entwickelten im Alter von 7-15 Wochen ausnahmslos einen Bluthochdruck mit einem systolischen Blutdruckwert von etwa 200 mmHg (Yamori *et al.*, 1984). An diesem Modell wurde im weiteren Verlauf beobachtet, daß trotz gleichen Blutdruckes manche einen Schlaganfall erleiden, andere nicht. Durch selektive Inzucht von Tieren, von denen ein oder beide Elternteile einen Schlaganfall erlitten hatten, wurde erfolgreich ein Rattenstamm gezüchtet, der verlässlich cerebrovaskuläre Läsionen entwickelt (Nagaoka *et al.*, 1976). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass für die Schlaganfallneigung wahrscheinlich zusätzliche genetische Faktoren, die nicht mit den für den Bluthochdruck an sich relevanten identisch sind, eine Rolle spielen. Neben dieser zum Schlaganfall neigenden Ratte, SHRSP, konnte auch eine dem Schlaganfall gegenüber resistente Ratte gezüchtet werden aus Tieren, die trotz sehr hohen Blutdruckes eine äußerst geringe Inzidenz für den Schlaganfall aufwiesen.

Für SHRSP wurden von Okamoto im Jahre 1974 folgende charakteristische Eigenschaften beschrieben (Okamoto *et al.*, 1974): SHRSP fielen durch starken Anstieg des Blutdrucks in jungem Alter auf. Sie entwickelten systolische Blutdruckwerte von bis zu 240-250 mmHg, die um 40-50 mmHg weit höher lagen als bei Schlaganfall resistenten SHR. Das durchschnittliche Lebensalter betrug 33 bis 41 Wochen bei den Männchen und war niedriger als bei den Weibchen. Dabei zeigten männliche SHRSP einen schnelleren Anstieg der systolischen Blutdruckwerte auf 230 mmHg schon in der 17. Lebenswoche im Vergleich zur 32. Woche bei den Weibchen. Sie erreichten im Durchschnitt höhere systolische Blutdruckwerte von bis zu 250 mmHg im Vergleich zu 230 mmHg bei weiblichen SHRSP und erlitten häufiger einen Schlaganfall als weibliche SHRSP, die im höheren Alter eher an Infektionskrankheiten wie Pneumonie oder renaler Dysfunktion starben. Zeichen, welche jene Tiere aufwiesen, bei denen im Folgenden durch Autopsie ein Schlaganfall bestätigt werden konnte, waren Hyperkinesen, verstärkte Reizbarkeit und Aggressivität, sowie Antriebsarmut, unkoordinierte, stereotype Bewegungen, epileptische Episoden

und Paralyse. Prädilektionsstellen der zerebralen Läsionen fanden sich im Cortex und Subcortex des Frontal-, Medial- und Occipitallappens des Telencephalon. Makroskopisch konnten alte Herde von frischen Einblutungen unterschieden werden. Histologische Untersuchungen ergaben fibrinoide Angionekrosen und Microaneurysmata. Im Vergleich zu histologischen Darstellungen glatter Gefäßmuskelzellen der Basilararterie in normotensiven Vergleichstieren, dem Wistar-Kyoto Stamm (WKY), waren die glatten Gefäßmuskelzellen in SHRSP unorganisiert in ihrer Anordnung (Arribas *et al.*, 1996).

Ersetzt man das Trinkwasser durch eine 1 %ige Natriumchloridlösung, so kommt es bei SHR und SHRSP zu einem weiteren Ansteigen des Blutdrucks. Unter dieser Behandlung treten Schlaganfälle bei SHRSP in jüngeren Lebensaltern und in höherer Inzidenz auf, während sie bei den Schlaganfall-resistenten SHR auch in hohem Lebensalter weiterhin kaum beobachtet werden. Bei WKY als normotensiven Kontrollen verändert sich der Blutdruck auch unter 1 %iger Natriumlösung nicht signifikant (Okamoto *et al.*, 1974; Nagaoka *et al.*, 1976).

Der Schlaganfall-Phänotyp beim SHRSP-Stamm ist des Weiteren von Umweltfaktoren abhängig: nur unter Verabreichung einer natriumreichen, kaliumarmen Diät, einer sogenannten „Japanischen“ Diät, kommt es bei den Tieren zum Schlaganfall, während dieser bei Gabe eines standardmäßigen „amerikanischen“ Rattenfutters nicht auftritt. Die Gründe dafür bzw. der Mechanismus der permissiven Wirkung der speziellen Japanischen Diät auf das Auftreten von Schlaganfall sind unklar (Yamori *et al.*, 1984). Einige Untersuchungen beschrieben einen früher einsetzenden und gravierenderen Anstieg der Hypertonie bei SHRSP im Vergleich zu SHR unter der speziellen Japanischen Diät (Ogata *et al.*, 1982). In anderen Studien waren diese Beobachtungen nur teils zu erheben (Smeda, 1989), oder es wurden keine Unterschiede im Blutdruckverhalten zwischen SHRSP, gefüttert mit der speziellen Japanischen oder einer amerikanischen Diät, aufgezeigt (Rubattu *et al.*, 1996). Speziell dem Kaliumgehalt der Nahrung wird allerdings eine wichtige Rolle zugeschrieben, da bei zusätzlicher Gabe von Kalium zu der Japanischen Diät SHRSP Tiere weitestgehend vor cerebrovaskulären Ereignissen geschützt sind (Tobian *et al.*, 1985; Volpe *et al.*, 1990).

Diese Ergebnisse zeigen, dass diätetische Faktoren die Inzidenz von Schlaganfall in SHRSP ohne signifikante Auswirkungen auf den Blutdruck stark beeinflussen. Obwohl Bluthochdruck als einflussreicher Faktor für den Schlaganfall gilt, lassen dieser aus selektiver Inzucht hervorgegangene, zum Schlaganfall neigende Rattenstamm und die folgenden Experimente mit erhöhter Salzzufuhr weitere genetische Faktoren für den Schlaganfall vermuten (s. Abbildung 2.1.).

SHR	SHRSP
„Bluthochdruck-Gene“ „Modifizierende Gene“	„Bluthochdruck-Gene“ „Modifizierende Gene“ „Schlaganfall-Gene“
+	+
„Japanische“ Diät (Na ⁺ reich, K ⁺ arm)	„Japanische“ Diät (Na ⁺ reich, K ⁺ arm)
=	=
Bluthochdruck, Schlaganfall-resistent	Bluthochdruck, zum Schlaganfall neigend

Abbildung 2.1.: Der hypothetische Unterschied im Genotyp zwischen SHR und SHRSP und der Einfluss der speziellen, sogenannten „Japanischen“ Diät. SHR = spontaneously hypertensive rat, spontan hypertensive Ratte; SHRSP = stroke-prone spontaneously hypertensive rat, zum Schlaganfall neigende, spontan hypertensive Ratte.

2.3. Hypertonie als komplexe Erkrankung

2.3.1. Bedeutung der Hypertonie

Abnorm erhöhter Blutdruck, arterielle Hypertonie, ist ein großes Gesundheitsproblem, das fast 30 % der Bevölkerung betrifft. Er wird als einer der wichtigste Risikofaktor in kardiovaskulären Erkrankungen angesehen und führt in vielen Fällen zu sogenannten sekundären Schäden an Herz, Nieren und Gefäßen. In der Praxis wird der Bluthochdruck in primäre, sogenannte essentielle, und sekundäre Hypertonie eingeteilt (Ganten and Ritz, 1985). Die sekundäre Hypertonie, der weitaus kleinere Teil, kann aufgrund bekannter organischer Veränderungen, wie zum Beispiel einer Nierenarterienstenose, erklärt werden. Bei der primären Hypertonie ist der Pathomechanismus bislang unbekannt, es wird jedoch hypothetisch erbliche Veranlagung in Verbindung mit Umweltfaktoren für die primäre Hypertonie verantwortlich gemacht. Es ist zu erwarten, dass diese klassische Einteilung in primäre und sekundäre Hypertonie zu revidieren ist, da sich hinter beiden Begriffen möglicherweise Krankheitsbilder verbergen, die eine genetische Ursache bzw. Komponente haben können .

So haben Familien- und Zwillingsstudien gezeigt, dass die Entwicklung der menschlichen primären Hypertonie zum Teil auf monogenetischen Ursachen beruht (Ward, 1990). Als eine seltene monogenetische Form von Hypertonie, die nach klassischen Mendel'schen Gesetzen vererbt wird, wurde zum Beispiel das Liddle Syndrom beschrieben, dem eine Mutation in der β -Unter-

einheit des epithelialen Natrium-Kanals in der Niere zugrunde liegt (Shimkets *et al.*, 1994). Anzunehmenderweise viel häufiger handelt es sich bei „essentieller“ Hypertonie um polygenetisch bedingte Erkrankungen mit komplexer Vererbung und zusätzlicher Beeinflussung durch Umweltfaktoren, so dass die Pathogenese der primären Hypertonie heute als multifaktoriell angesehen wird. Die Herausforderung, die die Analyse von polygenen Erkrankungen aufgrund unterschiedlicher Kombinationen von Gen(varianten) und deren Interaktion darstellt, ist bei humanen Studien zusätzlich durch die (patho-)genetische Heterogenität verschiedener Patienten, die alle unterschiedlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind, erschwert. Diese Tatsachen unterstreichen die Bedeutung von geeigneten experimentellen Modellen wie SHR und SHRSP, welche ein reduktionistisches, eher fassbares Modell dieser komplexen Zusammenhänge – natürlich mit den entsprechenden Einschränkungen – darstellen.

2.3.2. Molekulargenetische Grundlagen von Hypertonie in Tiermodellen

Eine Reihe unterschiedlicher Vorgehensweisen wie Kandidatengen-Untersuchungen oder Kopplungs-Analysen können angewandt werden, um Gene zu identifizieren, die ursächlich an der Pathogenese von Hypertonie oder anderen komplexen genetischen Erkrankungen beteiligt sein mögen. Als Kandidatengene werden Gene bezeichnet, für deren Varianten aufgrund bestehender physiologischer und pathophysiologischer Kenntnisse eine mögliche Beteiligung an der Entstehung einer bestimmten Erkrankung vermutet wird. Kandidatengene für den Bluthochdruck sind daher z. B. Gene, die für Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems, des Kallikrein-Systems oder andere vasoaktive Substanzen kodieren.

Ein Beispiel für Kandidatengen-Untersuchungen in der Hypertonie-Forschung stellt die Durchführung von Kosegregationsstudien zwischen Blutdruck und einem RFLP-Marker (Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus) im Renin-Gen in F₂-Populationen von Kreuzungen verschiedener Rattenstämme dar (Rapp *et al.*, 1989; Kurtz *et al.*, 1990; Lindpaintner *et al.*, 1990).

Grundlage von Kosegregationsstudien bilden die Gesetzmäßigkeiten der Rekombination während der Meiose, das heißt der Neu- und Umverteilung der Erbanlagen durch Bruch- und überkreuzte Wiedervereinigung, sog. Crossing over, von gleichlangen Abschnitten zwischen homologen Chromosomen, und die Annahme, dass ein Gen-Marker, deren chromosomale Lokalisation bekannt ist und der in der Nähe eines Kandidatengens bzw. krankheitsbeitragenden Gens liegt, gekoppelt mit diesem weitervererbt wird. Lediglich Gen-Marker, die sehr nah an einem Kandi-

datengen bzw. krankheitsbeitragenden Gen lokalisiert sind, bleiben dabei mit dem Phänotyp assoziiert, während entfernt gelegene Gen-Marker oder Gen-Marker auf anderen Chromosomen keine Assoziation zum Phänotyp aufweisen. Diese chromosomalen Regionen, die mehrere Gene mit Einfluss auf den zu untersuchenden Phänotyp enthalten können, werden als „Quantitative Trait Loci“ (QTL) bezeichnet.

Bei der Verpaarung zweier sich in Bezug auf den zu untersuchenden Phänotyp unterscheidenden Inzuchtrattenstämme entstehen genetisch identische Nachkommen, die sog. F₁-Population. In der durch Paarung von Nachkommen der F₁-Population entstehenden genetisch heterogenen F₂-Population zeigen lediglich die Nachkommen, die die Region mit dem Kandidatengen bzw. krankheitsbeitragenden Gen geerbt haben, eine Assoziation mit dem zu untersuchenden Phänotyp. Dabei wird für den in unmittelbarer Nachbarschaft zum Kandidatengen bzw. krankheitsbeitragenden Gen lokalisierte Gen-Marker die stärkste Phänotyp-Assoziation dokumentiert. Durch Kosegregationsstudien zwischen hypertensiven und normotensiven Rattenstämmen konnten zahlreiche QTLs identifiziert werden.

Dabei wurde in einer Studie, die mit Dahl-salzsensitiven Ratten und Dahl-salzresistenten Ratten durchgeführt wurde, eine statistisch signifikante Kopplung zwischen dem Renin-Gen-Polymorphismus/Lokus und Bluthochdruck gefunden (Rapp *et al.*, 1989). Ähnliche molekulargenetische Analysen in der F₂-Population von SHRSP und WKY fanden dagegen keine derartige Kopplung zwischen dem Renin-Gen und Bluthochdruck (Lindpaintner *et al.*, 1990). Diese widersprüchlichen Ergebnisse für die Kopplung zwischen dem Renin-Lokus und Hypertonie sind möglicherweise dahingehend zu interpretieren, dass verschiedenen Tiermodellen unterschiedliche genetische Mechanismen zuzuschreiben sind. Sie machen deutlich, dass durch eine positive Kosegregation eines Gen-Markers mit einem bestimmten Phänotyp in einem bestimmten Modell nicht direkt auf eine generelle primär pathologische Beteiligung dieses Gens in der „primären“ Hypertonie geschlossen werden kann. Zudem könnte der Gen-Marker in verschiedenen Tiermodellen in enger Verbindung zu einem anderen, eigentlich krankheitsbeitragendem Gen liegen, welches noch unbekannt ist.

Um die Bedeutung eines Kandidatengens für die Entwicklung von Hypertonie zu untermauern, bedarf es weiterer Untersuchungen, wie z. B. Genexpressionsstudien. Das mittels cDNA-Subtraktionsklonierung zwischen SHR- und WKY-Ratten aus der Niere isolierte SA-Gen ist ein gutes Beispiel (Iwai *et al.*, 1991). Es wurde gezeigt, dass das SA-Gen vermehrt in der Niere von SHR exprimiert wird. Um die Bedeutung des SA-Gens überprüfen zu können, wurden auch hier mittels polymorpher DNA-Marker Kosegregationsstudien durchgeführt. In mehreren Studien konnte eine deutliche Assoziation zwischen dem SA-Lokus und erhöhtem Blutdruck in verschie-

denen Tierstämmen gefunden werden, so dass es als potentiell relevantes Kandidatengen für Hypertonie auch im Menschen gilt (Iwai *et al.*, 1992; Lindpaintner *et al.*, 1993; Samani *et al.*, 1993).

Im Gegensatz zu diesen Kandidatengen-Untersuchungen können in ähnlichen Kosegregationsanalysen, in sogenannten Linkage-Analysen, mit Hilfe von polymorphen Markern auch unbekannte mit einer Krankheit assoziierte Gene aufgrund ihrer Lage im Genom identifiziert werden. Durch Kreuzung zweier Inzuchtstämme, also von Kontrolltieren mit Tieren eines bestimmten Phänotyps, und Verwendung einer großen Anzahl von polymorphen genetischen Markern können Regionen im Genom identifiziert werden, die mit dem Phänotyp kosegregieren. Dieser molekulargenetische Ansatz führte in mehreren Studien erfolgreich zur Identifizierung von interessanten Regionen für Hypertonie im Genom der Ratte und Hinweisen auf mögliche Kandidatengene (Hilbert *et al.*, 1991; Jacob *et al.*, 1991).

Diese molekulargenetischen Studien demonstrieren eindrucksvoll die Komplexität und die Schwierigkeit, die mit der Analyse von polygenetisch bedingten Erkrankungen verbunden sind, aber auch die Möglichkeiten, die in den Kopplungs-Analysen mit polymorphen Markern für komplexe Erkrankungen liegen. Eine weitere, vielversprechende Vorgehensweise besteht darin, mit Hilfe von Genexpressionsstudien wie Differential Display, bei der die Genexpression zweier oder mehrere unterschiedlicher Gewebe mittels einer auf PCR-basierenden Methode verglichen wird, Gene zu isolieren und zu identifizieren, die mit dem Vorliegen komplexer Erkrankungen korreliert sind, und daher potentiell als ursächlich beteiligte Kandidatengene in Frage kommen.

2.3.3. Hypertonie als ein Risikofaktor für Schlaganfall

Schlaganfall zählt zu der folgenschwersten Komplikation von Bluthochdruck. Die Framingham Heart Disease Epidemiology Studie, die bislang langfristige prospektive Studie zur Bestimmung von kardiovaskulärer und cerebrovaskulärer Morbidität und Mortalität, hat maßgeblich zu der Erkenntnis beigetragen, dass Hypertonie als der wahrscheinlich bedeutendste Risikofaktor für den Schlaganfall anzusehen ist (Dawber, 1980). 5127 Männer und Frauen im Alter zwischen 30 und 62 Jahren, die bei ihrer ersten Untersuchung im Jahre 1950 an keinen kardiovaskulären Erkrankungen litten, wurden über Jahrzehnte standardisierten kardiovaskulären Untersuchungen unterzogen. Erkrankung und Tod wurde genau dokumentiert und evaluiert. Ausgewertete Daten zum Schlaganfall zeigten eine positive Assoziation zwischen Apoplex-Risiko und Hypertonie, wobei in älteren Individuen im Alter von 65 bis 84 Jahren für systolische Blutdruckwerte über 160 mmHg ein über zweifach erhöhtes Infarktisiko beobachtet wurde (Wolf *et al.*, 1983). Fall-Kontroll Studien in den Niederlanden (Herman *et al.*, 1982), wie auch Kohortenstudien in Finnland (Salonen *et al.*, 1982), Schweden (Welin *et al.*, 1987) und Japan (Tanaka *et al.*, 1982) bestätigten diese Erkenntnisse. In der Ni-Hon-Pan Studie, in der die Inzidenz von Schlaganfall unter Japanern verglichen wurde, wobei eine Gruppe in Japan, die andere auf Hawaii lebte, wurde eine dreifach höhere Inzidenz für den Schlaganfall unter den auf Hawaii lebenden Japanern festgestellt. Während auch in dieser Studie Hypertonie den wichtigsten Risikofaktor für Schlaganfall in beiden Populationen darstellte, waren mittlere systolische und diastolische Blutdruckwerte in den beiden Populationen nicht signifikant unterschiedlich, so dass der Unterschied in der Inzidenz auf Umweltfaktoren (Ernährung) zurückgeführt wurde (Takeya *et al.*, 1984). Andererseits beschrieben Untersuchungen in den Vereinigten Staaten eine höhere Inzidenz für den Schlaganfall unter der farbigen Bevölkerung im Vergleich zur weißen Bevölkerung in derselben Region (Ostfeld *et al.*, 1974). Diese und andere Daten bestätigten, dass sowohl genetische wie auch umweltbedingte Faktoren das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, maßgeblich beeinflussen.

Viele klinische Studien zeigten den Zusammenhang zwischen der Behandlung extremer Hypertonie und einem positiven Effekt im Hinblick auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Schlaganfalls (Phillips and Whisnant, 1990). Sogar die Behandlung von mildem Bluthochdruck verringert das Schlaganfallsrisiko bereits um 45 % (1985). Allerdings ist es erforderlich, wie die britische Medical Research Council-Studie (MRC-Studie) zur Behandlung von milder Hypertonie zeigte, dass 850 derartige Patienten mit blutdrucksenkenden Medikamenten behandelt werden müssen, um einen Fall von Schlaganfall zu verhindern, eine enorme Kostenbelastung, ver-

bunden mit dem zusätzlichen Risiko von iatrogen verursachten Nebenwirkungen. Zudem zeigte die European Working Party's Studie zur antihypertensiven Behandlung bei über 60-jährigen Patienten zwar eine signifikante Reduktion von geringgradigeren, nicht lebensbedrohlichen Schlaganfällen wie transienten ischämischen Attacken, aber keine signifikante Reduktion in der gesamten Mortalität dieser Altersgruppe (Amery *et al.*, 1985). Das war eine wichtige Beobachtung, denn die Inzidenz von Schlaganfall ist mit zunehmendem Alter größer (Garraway *et al.*, 1979). Hypertonie scheint zum Schlaganfall zu prädisponieren, indem sowohl kleine Arterien als auch größere Gefäße durch Arteriosklerose geschädigt werden. Die eigentlichen Ursachen, weshalb es bei einer vorliegenden Gefäßschädigung zum Schlaganfall kommt, sind weiterhin unbekannt. Das Verstehen dieser Mechanismen könnte zur nützlichen und äußerst notwendigen Erweiterung der prophylaktischen Maßnahmen führen. „Prevention is still the key to an important impact on stroke incidence, morbidity and mortality“ (Goldstein, 1986).

2.4. Schlaganfall als komplexe Erkrankung

2.4.1. Bedeutung des Schlaganfalls

Cerebrovaskuläre Erkrankungen, speziell ischämische und hämorrhagische Insulte (Schlaganfall oder Apoplex), stehen nach Herzinfarkt und Krebs in den Industrienationen in der Todesursachenstatistik an Platz drei und gehören zu den häufigsten Ursachen für Invalidität im höheren Lebensalter. Die jährliche Inzidenz des Schlaganfalles beträgt in den Industrienationen ca. 200-350/100.000 Einwohner. Die Prävalenz wird auf 600/100.000 geschätzt. Blutdrucksenkende Medikamente vermögen das Risiko für einen Schlaganfall deutlich zu reduzieren (MacMahon *et al.*, 1990). Die ätiologischen Faktoren, die zum Schlaganfall als einer komplexen polygenetischen und multifaktoriellen Erkrankung beitragen, sind jedoch weitgehend unbekannt. Ischämische Hirninfarkte verursachen 80 % aller Schlaganfälle, fast 20 % gehen auf spontane intracerebrale Blutungen zurück, überwiegend als Massenblutung bei Hypertonie. Aufgrund der kaum stattfindenden Regeneration des Hirngewebes zeigen sich bei den einen Schlaganfall überlebenden Patienten kaum Rückbildungen der entstandenen Defekte, was zu gravierenden lebenslangen Beeinträchtigungen führt. Daher ist es insbesondere für die Prävention cerebrovaskulärer Erkrankungen wichtig, Risikofaktoren inklusive genetischer Faktoren aufzudecken.

Neben arterieller Hypertonie stellen auch Rauchen und fettreiche Ernährung (Kannel *et al.*, 1970) Risikofaktoren für den Schlaganfall dar. Aber nicht jeder Patient mit Hypertonie erleidet einen Schlaganfall. Beobachtungen und Erkenntnisse aus Untersuchungen an Familien und Zwillingen zeigen, dass Vererbung als weitere Komponente für den Schlaganfall von Bedeutung ist. In einigen Familien tritt Schlaganfall gehäuft auf und lässt eine vererbte Anfälligkeit vermuten (Gifford, 1966; Welin *et al.*, 1987; Alberts, 1991; Kiely *et al.*, 1993). Zwillingsstudien zeigen ein vielfach höheres Schlaganfall-Risiko für monozygote Zwillinge im Vergleich zu dizygoten (Brass *et al.*, 1992).

Einige seltene monogenetische Erbgänge zeigen ebenfalls, dass primär genetische Mechanismen in der Lage sind, Schlaganfall zu verursachen. Zu ihnen zählt CADASIL, cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (Tournier-Lasserre *et al.*, 1993; Joutel *et al.*, 1996). Die Erkrankung ist charakterisiert durch hyaline Angiokrosen des Endothels der Gehirngefäße, ohne dass Arteriosklerose beschrieben wird, die auch bei SHRSP gefunden wurden. Das Gen von CADASIL konnte bereits auf dem kurzen Arm von Chromosom 19 des menschlichen Genoms lokalisiert werden (Tournier-Lasserre *et al.*, 1993; Ducros *et al.*, 1996).

Andere Erkrankungen wurden beschrieben, die mit Amyloid-Ablagerungen in Blutgefäßen assoziiert sind und intracerebrale Blutungen verursachen. Dabei wurden Mutationen im Gen von β A4 Amyloid Precursor Protein (Levy *et al.*, 1990) oder der Protease Cystein C (Palsdottir *et al.*, 1988) nachgewiesen.

Der Schlaganfall als cerebrovaskuläre Erkrankung beim Menschen fasst so eine Reihe unterschiedlicher Krankheitsbilder zusammen. Intracerebrale Blutungen als ein Bereich cerebrovaskulärer Erkrankungen beim Menschen ähnelt in histologischen Untersuchungen den Befunden bei SHRSP (Ogata *et al.*, 1982; Kase *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Ergebnisse ist es zu rechtfertigen, SHRSP als ein für den Menschen relevantes Modell für genetische Anfälligkeit dem Hirnschlag gegenüber anzusehen.

2.4.2. Molekulargenetische Grundlagen von Schlaganfall bei SHRSP

Unter Verwendung des Tiermodells für den Schlaganfall konnten bereits drei Regionen im Erbgut der Ratte identifiziert werden, in denen sich Gene befinden, deren Varianten für den Schlaganfall mitverantwortlich sind (Rubattu *et al.*, 1996). Es wurde gezeigt, dass die in diesen Regionen lokalisierten Schlaganfall-Gene bis zu etwa einem Drittel die Anfälligkeit für den Schlaganfall in diesem Tiermodell erklären können.

Gekreuzt wurde die SHR mit der SHRSP. Die Ratten beider Stämme entwickelten eine Hypertonie, doch nur die SHRSP erlitten unter natriumreicher und kaliumarmer Diät in wenigen Wochen einen Schlaganfall. Dabei erlagen spätestens nach sechs Wochen alle SHRSP unter der natriumreichen und kaliumarmen Diät einem Schlaganfall. SHR waren unter gleichen Bedingungen davor weitgehend geschützt, nach zwanzig Wochen erlitten lediglich 20 % von SHR unter der natriumreichen und kaliumarmen Diät einen Schlaganfall.

Die aus der Kreuzung zwischen SHR und SHRSP entstandene F₂-Generation wurde einem genomweiten Screening mit Gen-Markern unterzogen, um eine Assoziation zwischen dem Phänotyp Schlaganfall und Regionen mit potenziell krankheitsbeitragenden Genen zu finden. Diese Vorgehensweise, zwei hypertensive Inzuchtstämme zu verwenden und alle Tiere der gleichen Diät auszusetzen, ermöglicht es, den Einfluss der Hypertonie und der Ernährung auf den Pathomechanismus des Schlaganfalls auszublenden und nach Genen zu suchen, die in direktem Zusammenhang mit dem Schlaganfall stehen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen auf Chromosom 1, 4 und 5 der Ratte gelegene Regionen, quantitative trait loci (QTL), genannt *STR 1-3*, die an der genetischen Anfälligkeit für den Schlaganfall in unterschiedlichem Maße beteiligt sind. Auf Chromosom 1 wird das SHRSP-Allel von *STR 1* mit einem signifikant hohen Risiko für den Schlaganfall in Verbindung gebracht. Das SHRSP-Allel von *STR 2* auf Chromosom 5 hat dagegen einen signifikant schützenden Effekt und wird mit einem sichtlich späteren Auftreten von Schlaganfall assoziiert. *STR 2* beinhaltet einen Genort, an der sich auch die Gene befinden, die für das atriale und ventriculäre natriuretische Peptid, ANP und BNP, codieren. Da beide als Gewebshormone vasodilatierend und hemmend auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, RAAS, wirken, könnten sie als Kandidatengene an diesem Locus in Frage kommen. Auf einen weiteren Genort auf Chromosom 4 wirkt das SHRSP-Allel sich ebenfalls schützend in Hinsicht auf den Schlaganfall aus. Für die Regionen *STR 1* und *3* konnten zum Zeitpunkt der Beschreibung dieser Befunde keine Kandidatengene, die logisch mit dem Schlaganfall in Bezug stehen

könnten, gefunden werden. Daher können die Gene für ANP und BNP aufgrund ihrer Beziehung zum *STR 2* als Kandidatengen gelten.

Funktionelle Untersuchungen zeigten pathologische Veränderungen der Endothel-abhängigen Vasorelaxation in den peripheren und cerebralen Gefäßen in SHRSP, die mit einer erhöhten Inzidenz für cerebrovaskuläre Ereignisse vergesellschaftet sind (Volpe *et al.*, 1996). Zur Aufdeckung des genetischen Mechanismus, der der Dysfunktion der Endothelium-abhängige Vasorelaxation in SHRSP zugrunde liegt, wurde eine Analyse verschiedener Kandidatengene in der F₂-Generation von SHRSP und Schlaganfall-resistenten SHR durchgeführt (Rubattu *et al.*, 2000). In die Untersuchung wurden die oben erwähnten Loci *STR 1-3* sowie weitere Kandidatengene, die möglicherweise endotheliale Dysfunktion beeinflussen, miteinbezogen, unter der Prämisse, dass das Endothelium als Regulator der Gefäßfunktion maßgeblich zur Gefäßintegrität bzw. Dysfunktion beiträgt (Vane *et al.*, 1990; Panza *et al.*, 1993). Zu diesen Kandidatengenen zählen neben ANP und BNP u. a. Kallikrein, Renin, Angiotensinogen, Angiotensin II AT_{1b} Rezeptor, angiotensin-converting enzyme (ACE) und die endotheliale Stickstoffsynthetase (nitric oxide synthase, eNOS). Die Ergebnisse zeigten, dass die Dysfunktion der Endothel-abhängigen Vasorelaxation in SHRSP genetisch fixiert und unabhängig von den hohen Blutdruckwerten ist. Eine maßgebliche Beteiligung der untersuchten Kandidatengene an der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Rubattu *et al.*, 2000).

Diese Ergebnisse stellen wichtige Hinweise auf die Existenz von genetischen Faktoren dar, die – unabhängig von einer Beteiligung an der Auslösung der Hypertonie – für die Pathogenese von Schlaganfall in diesem Tiermodell eine entscheidende Rolle spielen.

2.5. Differential Display of mRNA

In höheren Organismen werden ca. 30.000 unterschiedliche Gene angenommen, von denen ungefähr 15% jeweils in einzelnen Geweben oder Zelllinien exprimiert werden. Die Differenzierung und Funktion einer Zelle bestimmt, welche Gene exprimiert werden. So werden neben den sogenannten „housekeeping genes“, die jede Zelle für die Aufrechterhaltung grundlegender Stoffwechsel- und Strukturprozesse benötigt, zell- und/oder entwicklungsspezifische Gene exprimiert, die für gewebs- bzw. entwicklungsspezifische Funktionen nötig und verantwortlich sind. Genetische Veränderungen, die die Ausprägung eines pathologischen Phänotyps verursachen oder begünstigen, gehen häufig mit veränderter Genexpression einher. Ein Vergleich des Genex-

pressionsmusters eines gesunden mit dem eines krankhaften Gewebes kann so Aufschluss auf Gene geben, die unter pathologischen Bedingungen über- und/oder unterexprimiert werden.

Die von Liang und Pardee erstmals im Jahre 1992 beschriebene Methode des mRNA Differential Displays (Liang and Pardee, 1992) und die von McClelland weiterentwickelte RNA Fingerprinting-Strategie (McClelland *et al.*, 1994) erlauben es, die Genexpression zweier oder mehrere unterschiedlicher Gewebe mittels einer auf Polymerase-Kettenreaktion (PCR-) basierenden Methode zu vergleichen. Nach der Methode von Liang werden mit sogenannten arbiträren Primern, d. h. kurzen synthetischen Oligonukleotiden mit willkürlich gewählter Sequenzfolge, cDNA-Fragmente, die komplementäre DNA, aus einer Teilmenge von mRNAs, der Boten-RNA, amplifiziert: Der erste Schritt ist die Synthese von cDNA durch die reverse Transkription einer Teilmenge der RNA mit Hilfe von modifizierten oligo(dT) Primern, die aufgrund ihrer Basenfolge nur einen Teil der gesamten RNA in cDNA umwandeln. Im darauffolgenden zweiten Schritt werden unter Verwendung von kurzen arbiträren Primern, speziellen Primern mit kurzer willkürlicher Sequenzfolge, in Anwesenheit von radioaktiv markierten Deoxynukleotiden doppelsträngige cDNAs synthetisiert, wobei alle jene cDNAs als Matrize fungieren, deren Sequenzfolge ein Anlagern der arbiträren Primer bei niedriger Anlagerungstemperatur erlauben. Während der Differential Display-PCR mit arbiträren Primern und bei niedriger Anlagerungstemperatur erfolgt die Amplifizierung dieser cDNA-Fragmente, die auf einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und auf einem Röntgenfilm als spezifisches Bandenmuster sichtbar gemacht werden. Der simultane Vergleich von amplifizierten cDNA-Fragmenten aus verschiedenen RNA-Proben bei Gebrauch derselben Primer erlaubt die Identifizierung von Unterschieden im Bandenmuster, z. B. die einseitige Präsenz einer Bande in einer Probe allein, oder Banden mit unterschiedlicher Intensität in einer Probe im Vergleich zu anderen. Jeder Unterschied im Bandenmuster lässt auf eine Variation in der relativen Konzentration der korrespondierenden spezifischen mRNA in der Probe schließen, und deckt potentiell unterschiedlich exprimierte Sequenzen auf. Diese Methode erlaubt den systematischen Vergleich aller mRNA-Spezies, die in einem bestimmten Gewebe oder Zelltyp exprimiert werden, da jede mRNA in cDNA transkribiert und mit Hilfe der PCR amplifiziert werden kann. Um die Gesamtheit der exprimierten mRNA-Spezies ausreichend abzudecken, muss jedoch eine genügend große Zahl an PCRs mit verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt werden (Bauer *et al.*, 1993).

Eine Reihe verschiedener Variationen dieser Methode wurde in den vergangenen Jahren publiziert. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Spielart des mRNA Differential Display unterscheidet sich in einigen Bereichen von der Erstbeschreibung. Abbildung 2.2. gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte der hier angewandten Methode.

Im ersten Schritt werden mit Hilfe von reverser Transkriptase und oligo (dT)-Primern cDNAs synthetisiert, wobei die gesamte mRNA als Matrize dient. Im zweiten Schritt werden die so erhaltenen cDNAs mit arbiträren Primern mittels PCR amplifiziert, wodurch alle jene Sequenzen vervielfältigt werden, die zu den Primern nahezu komplementär sind. Das Anlagern der arbiträren Primer ist sequenzspezifisch, aber die Primer werden, begünstigt durch niedrige Anlagerungstemperatur im ersten Zyklus der PCR, nicht aufgrund einer hundertprozentigen Übereinstimmung zu einer bestimmte Sequenz ausgewählt, wie bei einer herkömmlichen PCR. Meistens stimmen nur sechs bis acht Basen der zehn Basen am 3'Ende des langen arbiträren Primers mit der zu amplifizierenden Sequenz überein, so dass auch bei nicht hundertprozentiger Übereinstimmung eine Anlagerung und Verlängerung der Primer erfolgt. Nach Anlagerung des arbiträren Primers, Verlängerung des Primers und anschließender Denaturierung kann sich an die neu synthetisierte einzelsträngige DNA erneut derselbe oder ein anderer arbiträrer Primer anlagern und verlängert werden. Die so synthetisierten Produkte dieses zweiten PCR-Zyklus haben die Primer an jedem Ende und können in den darauffolgenden PCR-Zyklen bei hoher Anlagerungstemperatur vervielfältigt werden. Durch die Wahl vieler verschiedener arbiträrer Primer kann so eine große Zahl von Sequenzen amplifiziert werden, die viele verschiedene mRNAs repräsentieren. Wird dies, in mRNA Präparationen aus gesundem und krankem Gewebe vergleichsweise durchgeführt, so kann man jene mRNA Spezies identifizieren, die unterschiedlich stark exprimiert werden. Dies erlaubt dann den Schluss, dass diese mRNAs unterschiedlich exprimiert und daher möglicherweise krankheitsrelevant sein könnten. Alle in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimierten mRNAs sollten theoretisch nach einer bestimmten Zahl von Differential Display-PCRs mit unterschiedlichen Primerkombinationen identifiziert werden können.

Die unterschiedliche Expression wird anschließend mit Northern Blot Analysen und RNase Protection Assays bestätigt. Northern Blotting ist eine Technik zur qualitativen/semi-quantitativen Analyse von RNA und wird zur Bestimmung der Expression eines bestimmten Gens in verschiedenen Geweben verwendet. Dabei wird die gesamte RNA oder poly(A)RNA verschiedener Gewebe elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert, immobilisiert und in situ mit einer spezifisch für das zu untersuchende Gen radioaktiv markierten Sonde inkubiert. Nach Hybridisierung der markierten Sonde mit dem spezifischen Gen, das in der Sequenz komplementär zu ihr ist, kann die relative Menge und die Größe der zu untersuchenden RNA autoradiographisch bestimmt werden. Eine weitere sensitive Methode zur Detektion und Quantifizierung einer spezifischen mRNA im Kontext komplexer zellulärer RNA ist der RNase Protection Assay, RPA. Hierbei wird eine radioaktiv markierte RNA-Sonde in-vitro hergestellt, welche komplementär zu der zu analysierenden mRNA ist, und im Folgenden mit der gesamten

zellulären RNA inkubiert, so dass sich zwischen komplementären Abschnitten doppelsträngige Hybride bilden. Nach Behandlung mit Ribonuklease wird einzelsträngige, nicht-hybridisierte RNA abgebaut, während markierte, mit komplementärer RNA hybridisierte mRNA vor dem Abbau geschützt ist und autoradiographisch sichtbar gemacht werden kann.

Nach Verifizierung der unterschiedlichen Genexpression kann die amplifizierte cDNA sequenziert und mit bekannten Sequenzen in Datenbanken verglichen werden. Dies kann erste Hinweise auf Art und Funktion der Sequenz bzw. des dazugehörigen Gens liefern.

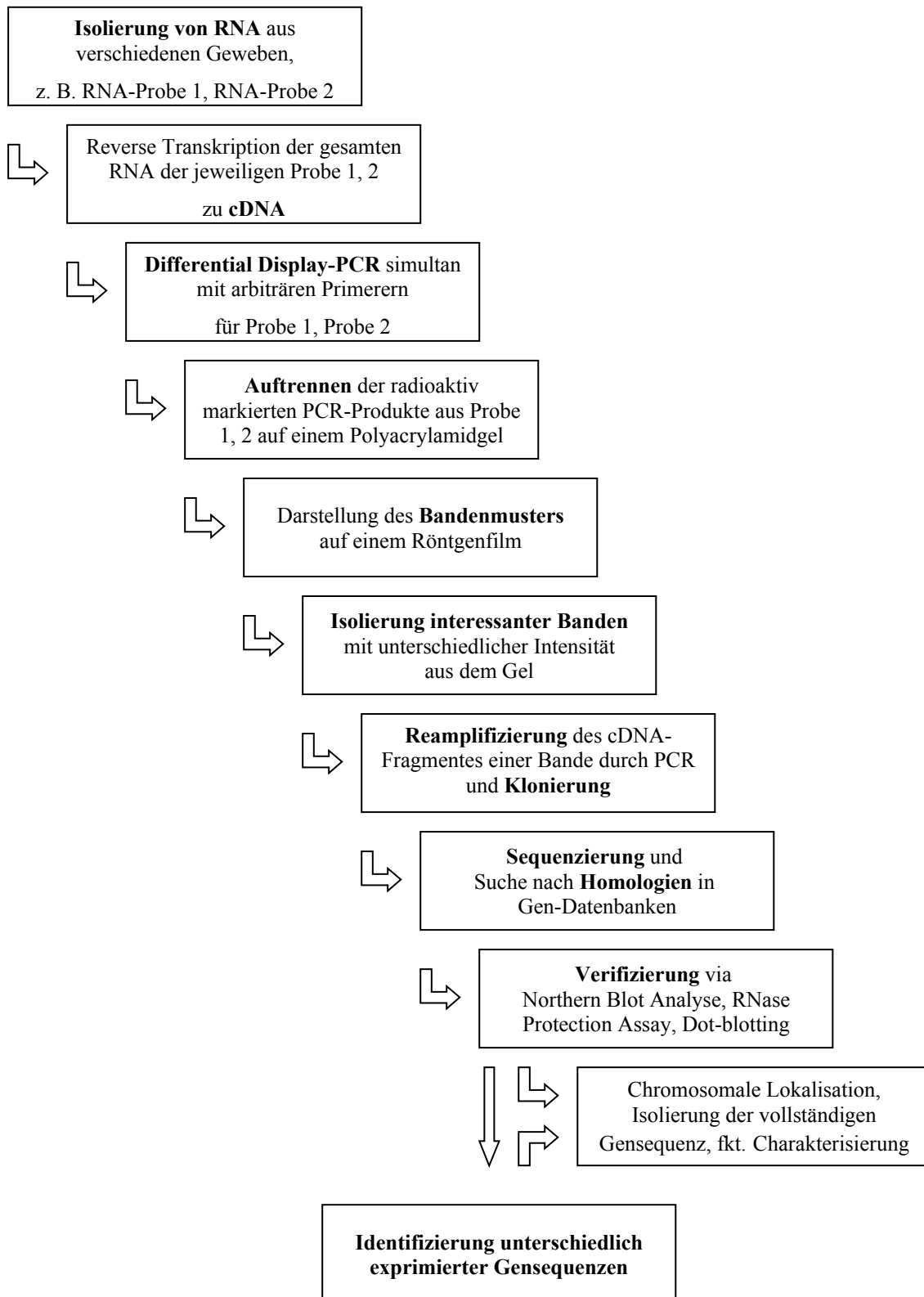


Abbildung 2.2.: Überblick der einzelnen Schritte von Differential Display of mRNA: von der Isolierung der RNA aus Geweben unterschiedlich behandelte Tiergruppen über DD-PCR, Identifizierung und Isolierung potentiell unterschiedlich exprimierter cDNA-Fragmente bis zur Verifizierung, modifiziert nach Liang/Pardee und McClelland

Differential Display wurde zu dem Zeitpunkt, in dem diese Untersuchungen vorgenommen wurden (also bevor mRNA Mikro-Arrays in weitem Gebrauch standen und sich als ausreichend robust qualifiziert hatten), im Vergleich zu früheren Methoden zur hypothesefreien Identifizierung unterschiedlich exprimierter Gene – also im Sinne eines mehr oder weniger genomweiten Ansatzes – eingesetzt. Differential Display wurde als anderen Methoden gegenüber überlegen in Hinsicht auf Schnelligkeit, Einfachheit und Gebrauch von geringen Mengen an Ausgangsmaterial beschrieben. Die Methode erlaubt es also, nicht nur Gene aus der relativ kleinen Gruppe der bekannten Gene zu überprüfen, wie es die Kandidatengen-Untersuchungen tun, sondern deckt auch bislang unbekannte Gene auf, die an der Pathogenese bestimmter Erkrankungen beteiligt sind (n.b.: die Arbeit wurde vor der Fertigstellung der Durchsequenzierung des Rattengenoms durchgeführt). Ein weiterer Vorteil der Methode liegt in der Möglichkeit, sowohl Über- als auch Unterregulation von Genen simultan detektieren zu können, alles bei gleichzeitiger Überprüfung einer sehr großen Anzahl von Transkripten aus mehreren Ausgangsproben. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass auch Unterschiede von weniger häufig exprimierten Genen dargestellt werden können. Differential Display of mRNA ist somit eine sensitive und vielseitige Methode. Untersuchungen haben gezeigt, dass einige RNAs als unterschiedlich exprimiert identifiziert wurden, die in einer so geringen Menge vorlagen, dass Schwierigkeiten bei der Detektion mit Hilfe von Northern Blot Analysen aufgetreten waren. Trotzdem besteht kein Zweifel, dass auch mit dieser Methode Unterschiede in der Expression von seltenen RNAs weniger häufig isoliert werden als jene, die häufig exprimierte RNAs betreffen (McClelland *et al.*, 1995). Im Endeffekt liegt dieser Arbeit freilich die Strategie zugrunde, die Schnittmenge zwischen Genen, welche aufgrund differentieller Expression auffallen, und chromosomal lokalisierten Genen (basierend auf Kopplungsanalysen) zu bilden – was die Sicherheit, dass ein gefundenes Gen relevant ist, wesentlich erhöht (Abbildung 2.3.).

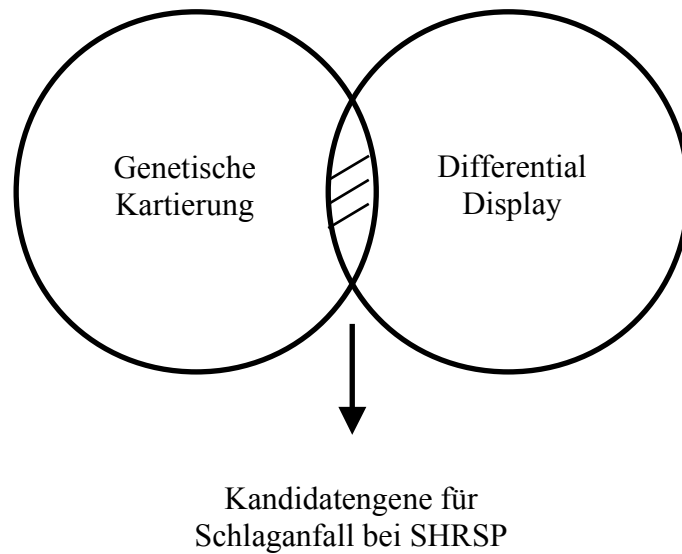


Abbildung 2.3.: Strategie zur Identifizierung von Kandidatengenen für den Schlaganfall bei SHRSP

2.6. Zielsetzung der Arbeit

Um die molekularen Mechanismus des Schlaganfalls und die dazu beitragenden genetischen Faktoren aufzudecken und zu verstehen, wurden SHRSP verwendet. Die SHR, die resistent gegenüber der cerebrovaskulären Erkrankung ist, diente als Vergleich. Bluthochdruck, in beiden Rattenstämmen in ähnlicher Ausprägung vorhanden, und eine natriumreiche, kaliumarme Diät sind Faktoren, die das Auftreten von Schlaganfall in SHRSP auslösen, aber ohne phänotypischen Einfluss auf SHR bleiben.

Wir vermuten, dass die Schlaganfall-induzierende Diät krankheitsrelevante Veränderungen in der Genexpression im Gehirn und/oder in den zerebralen Gefäßen verursacht. Um mögliche Unterschiede in der Genexpression aufzudecken, wurde die Methode Differential Display of mRNA verwendet. Die Identifizierung und Isolierung von Genen, die bei der Pathogenese des Schlaganfalls in dem Rattenstamm SHRSP eine Rolle spielen, ist Ziel dieses Forschungsthemas.

Für die Zukunft steht nach Identifizierung der für den Schlaganfall verantwortlichen Gene das Verstehen ihrer genauen Funktion und das Zusammenspiel mit anderen Erb- und wichtigen Umweltfaktoren im Vordergrund. Eine große Herausforderung besteht dann in der Übertragung dieser in einem Tiermodell gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen. Obwohl Parallelen zwischen dem Schlaganfall bei SHRSP und dem bei Menschen vage erscheinen, fallen doch einige Ähnlichkeiten auf, wie die Abhängigkeit von Ernährung, insbesondere Natrium- und Kalium-Zu-

fuhr, sowie Hypertonie für die Manifestation des Schlaganfalls sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte (Yamori *et al.*, 1976). Auch histologisch ähnelt das komplexe Krankheitsbild von SHRSP einer beim Menschen bekannten vererbten Form des Schlaganfalls, genannt CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy).

Können beim Menschen Gene für den Schlaganfall gefunden werden, so ist zumindest bei einem Teil der Patientenpopulation das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, vorhersagbar. Neben patientenbezogener Beratung können möglicherweise auch eine spezifische medikamentöse Vorbeugung, die das Leiden an ihrer genetischen Ursache bekämpft, zum Einsatz kommen. Die Erkenntnisse können dann in neuen Möglichkeiten für Diagnostik und Behandlung von Patienten mit spezifischen vererbten Erkrankungen schon in vorklinischen Stadien einfließen.

3. Materialien und Methoden

3.1. Chemikalien und Substanzen

Bei den durchgeführten Experimenten wurden folgende Chemikalien und Substanzen verwendet:

Aceton	Sigma, St.Louis, MO, USA
Acrylamid	Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
Agar	Becton Dickinson, Meylan, Frankreich
Agarose	FMC, Rockland, ME, USA
AluI, Puffer 2	BioLabs, Beverly, MA, USA
AlwI, Puffer 4	BioLabs, Beverly, MA, USA
Ampicillin	Sigma, St.Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat	Amresco, Solon, Ohio, USA
[α - ³³ P]dATP	NEN Life Science Products, Boston, MA, USA
[α - ³³ P]dCTP	NEN Life Science Products, Boston, MA, USA
[α - ³² P]dUTP	NEN Life Science Products, Boston, MA, USA
AvaII, Puffer 4	BioLabs, Beverly, MA, USA
BglI, Puffer 3	BioLabs, Beverly, MA, USA
Borsäure	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Bromphenolblau	Sigma, St.Louis, MO, USA
Cac8I, Puffer 3	BioLabs, Beverly, MA, USA
Calciumchlorid	Sigma, St.Louis, MO, USA
Chloroform	Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
Diethylpyrocarbonat	Sigma, St.Louis, MO, USA
DTT	Gibco BRL, Rockville, MD, USA
Ethanol	Sigma, St.Louis, MO, USA
Ethidiumbromid	Sigma, St.Louis, MO, USA
Formaldehyd	Sigma, St.Louis, MO, USA
Formamid	Amresco, Solon, Ohio, USA
Glycerin	Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
Harnstoff	Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA
Hefe-Extrakt	DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA
HhaI, Puffer 4	BioLabs, Beverly, MA, USA

HindIII, Puffer 2	BioLabs, Beverly, MA, USA
IPTG	Promega, Madison, WI, USA
Isopropylalkohol	Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
Kaliumacetat	Sigma, St.Louis, MO, USA
Kaliumchlorid	Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
Lineares Acrylamid	Ambion, USA
Long Ranger	FMC, Rockland, ME, USA
Magnesiumacetat	Sigma, St.Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid	Sigma, St.Louis, MO, USA
Mops	Sigma, St.Louis, MO, USA
Na ₂ EDTA•2 H ₂ O	Sigma, St.Louis, MO, USA
Natriumacetat	Curtin Matheson Scientific, Inc., Houston, Texas, USA
Natriumchlorid	Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
Natriumcitrat	Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
Natriumdodecylsulfat	ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, USA
Natriumhydroxid	Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
NlaIII, Puffer 4	BioLabs, Beverly, MA, USA
NlaIV, Puffer 4	BioLabs, Beverly, MA, USA
Oligo(dT) ₁₂	Gibco BRL, Rockville, MD, USA
Rinderserumalbumin	Biolabs, Beverly, MA, USA
RNase Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA
RsaI, Puffer 1	BioLabs, Beverly, MA, USA
Salzsäure	Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
Tetramethylendiamin	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
Triton X-100	Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA
Tryptone	DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA
Tris	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
XbaI, Puffer 2	BioLabs, Beverly, MA, USA
X-Gal	Promega, Madison, WI, USA
Xylencyanolblau	Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA

3.2. Tierexperimentelle Protokolle

3.2.1. Versuchstiere

Als Studienpopulation dienten zwei verschiedene Ratteninzuchtstämme, die SHR und die SHR-SP. Beide Rattenstämme wurden am Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch gehalten.

Jeweils zwei bis drei Tiere wurden in einem Käfig unter konstanten Bedingungen bei Temperaturen zwischen 20-22 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-70 % unter wechselnden hell/dunkel Zyklen von je 12 h Dauer gehalten. Die Tiere erhielten normales Trockenfutter, gekennzeichnet durch SHR- und SHRSP-, oder die spezielle japanische Diät, reich an Natrium und arm an Kalium, gekennzeichnet durch SHR+ und SHRSP+, und Wasser ad libitum.

3.2.2. Behandlung der Versuchstiere

Beide Rattenstämme entwickeln im Alter von ca. 5 Wochen eine Hypertonie. Nach Erhalt der natriumreichen, kaliumarmen Diät treten jedoch nur bei den SHRSP, SHRSP+, nicht aber bei SHR, SHR+, nach Ablauf von weiteren ca. 5 Wochen regelmäßig Schlaganfälle auf. Sowohl SHR als auch SHRSP, die normales Trockenfutter erhielten, SHR- und SHRSP-, sind resistent gegenüber einem Schlaganfall. Um diesen Einfluss der natriumreichen und kaliumarmen Diät auf die Expression bestimmter Gene in Gehirn, Gehirngefäßen und Aorta von SHR und SHRSP zu untersuchen, wurden Ratten über einen Zeitraum von fünf Wochen mit natriumreichen und kaliumarmen Diät behandelt. Die Kontrollgruppen erhielten normales Trockenfutter.

Dabei wurden vier Wochen alte, männliche Geschwistertiere von SHR und SHRSP in jeweils zwei Gruppen randomisiert. Die Behandlungsgruppen wurden mit der speziellen Diät für weitere fünf Wochen behandelt (SHRSP+ und SHR+), die Kontrollgruppen erhielten normales Trockenfutter (SHRSP- und SHR-). Beide Gruppen erhielten Wasser ad libitum und wurden unter sonst gleichen Bedingungen gehalten. Nach Abschluss der neun Wochen wurden die Tiere beider Gruppen dekapitiert und die Organe (Gehirn, Gehirngefäßen und Aorta) entnommen.

3.2.3. Entnahme von Geweben

Für die Extraktion von mRNA aus den Geweben wurden die Tiere im Alter von zehn Wochen dekapitiert. Gehirn, Gehirngefäße und Aorta der verschiedenen Gruppen SHRSP+ und SHRSP-, SHR+ und SHR- wurden präpariert, in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

3.3. RNA Extraktion

3.3.1. Extraktion von gesamter zellulärer RNA

Prinzip

Durch Homogenisieren von Gewebe in Trizol, einem einphasigen Reagenz aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, werden die Zellen aufgebrochen und die Zellkomponenten aufgelöst, wobei die Integrität der RNA gewährleistet wird. Durch Zugabe von Chloroform und anschließendem Zentrifugieren findet eine Phasenauftrennung statt, die die freigesetzte Gesamt-RNA von Proteinen und Lipiden trennt. Die in der wässrigen Phase befindliche Gesamt-RNA kann durch Präzipitation mit Isopropylalkohol ausgefällt werden. Diese Methode ist eine Abwandlung der RNA Extraktion in einem Schritt (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Reagenzien

Homogenisierungspuffer	Trizol® Reagent (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)
DEPC-H ₂ O	0,01 % Diethylpyrocarbonat in H ₂ O
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA, pH8

Durchführung

Das gefrorene Gewebe wurde in 1 ml Trizol pro 50-100 mg Gewebe aufgenommen und mit einem Homogenisator (Dremel, Model 395, Racine, WI, USA) für mindestens 5 min zerkleinert. Das Homogenat wurde bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Trizol wurden die Röhren für 15 s mit der Hand leicht geschüttelt, bei Raumtemperatur für 3 min inkubiert und für 15 min bei 2-8 °C bei einer Geschwindigkeit von 9.000

rpm zentrifugiert (RC-Superspeed Refrigerated Centrifuge, DuPont, USA). Nach dem Zentrifugieren beobachtete man eine Auftrennung der Flüssigkeit in drei Phasen, eine untere rote Phenol-Chloroform-haltige, eine mittlere und eine obere, farblose wässrige Phase, in der sich die RNA befand. Das Volumen dieser Phase betrug ungefähr 60 % des zum Homogenisieren eingesetzten Trizols.

Für die RNA-Präzipitation wurde die wässrige Phase in ein RNase-freies Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 0,5 ml Isopropylalkohol pro 1 ml zu Beginn eingesetztem Trizol, Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min und Zentrifugieren bei 9.000 rpm für 10 min bei 2-8 °C war das RNA-Präzipitat als käsige Niederschlag am Boden des Röhrchens sichtbar. Nach Abnahme des Überstandes wurde der RNA-Niederschlag mit 1 ml 75 % Ethanol pro 1 ml zu Beginn eingesetztem Trizol gewaschen und bei 7.000 rpm bei 2-8 °C für 5 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde an der Luft getrocknet und je nach Gewebe in 100-500 µl DEPC-H₂O aufgelöst.

Die Konzentration und Reinheit der Gesamt-RNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt und nach der folgenden Formel berechnet: $(OD_{260} - OD_{280}) \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{RNA [ng/}\mu\text{l]}$, bei $OD_{260/280} \approx 1,8$.

Die Integrität der Gesamt-RNA wurde nach Elektrophorese der Proben in einem 1 %igen mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel in TAE-Puffer und anschließender UV-Lichtillumination durch Darstellung der ribosomalen RNA-Banden bei 5 kb (28S), 2 kb (18S) und einer Bandenanhäufung im hochmolekularem Bereich überprüft. Das Verhältnis der Intensität der beiden Banden betrug wie erwartet ca. 1,5-2,5 : 1.

3.3.2. Extraktion von messenger RNA

Prinzip

Für die Extraktion von mRNA aus Gesamt-RNA werden biotinylierte oligo(dT) in Verbindung mit paramagnetischen Partikeln (PolyA Tract System 1000, Promega, USA) verwendet. Biotinylierte oligo(dT) werden mit der Gesamt-RNA inkubiert. Es bilden sich biotinylierte oligo(dT):mRNA-Hybride, die von mit Streptavidin versehenen paramagnetischen Partikeln (SA-PMPs) gebunden werden. Die Partikel werden gewaschen und reine mRNA kann in RNase-freiem Wasser eluiert werden.

Reagenzien

20 x SSC (500 ml)	87,7 g NaCl
	44,1 g NaCitrat
	Einstellung des pH-Werts auf pH 7,2 mit NaOH
DEPC-H ₂ O	0,1 % Diethylpyrocarbonat

Durchführung

1-5 mg Gesamt-RNA wurden in einem Reaktionsvolumen von 1,9 ml mit 500 pmol biotinylierten oligo(dT) (PolyAtract System 1000, Promega, USA) bei 65 °C für 10 min inkubiert. Zur gleichen Zeit wurden für diesen Ansatz 3,5 ml SA-PMPs mit jeweils der gleichen Menge an 0,5 x SSC drei Mal nach Vorschrift des Herstellers gewaschen. Zu den gewaschenen SA-PMPs wurde das Reaktionsvolumen gegeben und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Die nun an die SA-PMPs gebundenen oligo(dT):mRNA-Hybride wurden mit einem Magneten gesammelt, der Überstand verworfen und viermal mit 2 ml 0,1 % SSC gewaschen. Anschließend wurde die mRNA in 1 ml DEPC-H₂O eluiert.

3.4. Einzelsträngige cDNA Synthese

Prinzip

Mit Hilfe der reversen Transkriptase und oligo(dT) als Primer wird poly(A)RNA, extrahiert aus Gehirn, Gehirngefäßen und Aorta der verschiedenen Tiergruppen, in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Die cDNA kann anschließend als Matrize für die Amplifikation durch PCR verwendet werden.

Durchführung

In einem 10 µl Reaktionsvolumen wurden 500 ng poly(A)RNA der jeweiligen Ausgangsmaterialien, 4 Einheiten RNase Inhibitor und 1 µM oligo(dT)₁₂ bei 70 °C für 3 min inkubiert, auf Eis gestellt und 50 nm Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ und 10 mM DTT, 1 µM von jeweils dATP, dGTP, dCTP und dTTP und 20 Einheiten der reversen Transkriptase (SuperScript^T_{MII} RNase H⁻ Reverse Transkriptase, Gibco BRL, USA) zu dem Ausgangsvolumen hinzupipettiert, um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erhalten, das für eine Stunde im Wasserbad bei 42 °C und anschließend für 10 min bei 72 °C inkubiert wurde, um die Reaktion zu beenden. Die cDNA

der Gehirngefäße und der Aorta wurde mit 400µl und die cDNA aus dem Gehirn mit 800µl 1µM Tris-HCl, pH 7,4, 0,1µM EDTA, pH 8, für den weiteren Gebrauch verdünnt.

3.5. PCR

Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion, PCR, ist eine Technik zur in vitro-Amplifikation einer bestimmten DNA Sequenz in einem sich mehrfach wiederholenden Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Anlagerung eines für die Sequenz spezifischen Oligonukleotids (Primer) und Kettenverlängerung. Bei einer Standard-PCR wird im ersten Schritt eines jeden Zyklus die DNA bei einer Temperatur von 94 °C für 30 s denaturiert. Nach Abkühlung auf eine sequenzspezifische Anlagerungstemperatur lagert sich jeweils ein Primer komplementär an die einzelsträngige DNA an entgegengesetzten Seiten des zu amplifizierenden Fragmentes an. Dieser zweite Schritt wird je nach Primerpaar bei einer Temperatur von 50-62 °C für 1 min durchgeführt. In dem darauffolgenden dritten Schritt wird mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase ein Einzelstrang vom 3'OH-Ende jedes Primers komplementär zur DNA-Sequenz synthetisiert. Die Kettenverlängerung findet bei einer Temperatur von 72 °C für 2 min statt. Dieser Zyklus wird anschließend mehrmals wiederholt.

Mit jedem Zyklus wird die Anzahl der Kopien der DNA-Sequenz verdoppelt und nimmt so exponentiell zu. In der Praxis wird nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen ein Plateau erreicht, bei dem mehr Primer-Templat vorliegt, als das Enzym während dieses Zyklus verlängern kann. Der Zuwachs an Kopien der DNA-Sequenz ist dann linear. In 25 Zyklen kann eine bestimmte DNA-Sequenz bis zu 4×10^6 Mal amplifiziert werden. Die Länge des zu amplifizierenden Produktes wird durch den Abstand der beiden Primer zueinander bestimmt und kann bis zu 2 kb betragen.

Durchführung

Für die Standard-PCR wurde die Taq-DNA-Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) aufbewahrt in Puffer A verwendet. Der Puffer A setzte sich aus 50 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % Glycerol und 1 % Triton[®]X-100 zusammen. In einem 25 µl Reaktionsvolumen befanden sich jeweils 0,5 Einheiten der Taq-DNA-Polymerase, 10 mM

Tris-HCl, pH 9, 50 mM KCl und 0,1 % Triton[®]X-100, jeweils 200 µM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 2 mM MgCl und die DNA-Sequenz.

Die Standard-PCR wurde durch einen 2 minütigen Schritt bei 94 °C eingeleitet. Die nun folgenden 20-35 Zyklen setzten sich aus dem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 30 s, Anlagerung der Primer je nach Primerpaar bei 50-62 °C für 1 min und Kettenverlängerung bei 72 °C für 2 min zusammen. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde durch einen zusätzlichen Schritt bei 72°C für 7 min beendet.

3.6. Differential Display of mRNA

Prinzip

Um Unterschiede in der Genexpression von zum Schlaganfall neigenden spontan hypertensiven Ratten, behandelt mit der speziellen Diät (SHRSP+) und unbehandelt (SHRSP-), und spontan hypertensiven Ratten, behandelt mit der speziellen Diät (SHR+) und unbehandelt (SHR-), zu finden, wird die Methode Differential Display of mRNA verwendet. Als Primer werden sowohl lange Primer einer willkürlichen Sequenz, genannt P-Primer, als auch Sequenz-spezifische Primer, genannt Q-Primer, in Kombination mit abgewandelten oligo (dT)-Primern, genannt T-Primer, verwendet.

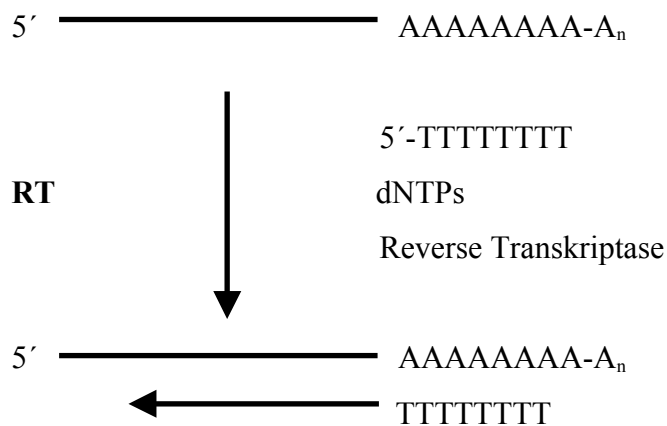
Poly(A)RNA wird aus Gehirn, Gehirngefäßen und Aorta isoliert, die reverse Transkription wird in Anwesenheit von oligo(dT)-Primern wie beschrieben durchgeführt. Ein PCR-Zyklus mit niedriger Anlagerungstemperatur wird gefolgt von 20 PCR-Zyklen mit hoher Anlagerungstemperatur, in denen gezielt die PCR-Produkte des ersten Zyklus hochamplifiziert werden, bei dem sich die Primer willkürlich an Sequenzen innerhalb der cDNA auch bei nicht 100 %iger Übereinstimmung anlagern. Die PCR-Reaktionen werden sowohl für die Behandlungsgruppen SHRSP+ und SHR+ als auch die Kontrollgruppen SHRSP- und SHR- jeweils in Duplikaten unter Verwendung von cDNAs ausgeführt, die von zwei unabhängigen cDNA-Synthesereaktionen stammen. Die schematische Darstellung 3.6.1. verdeutlicht die einzelnen Schritte.

Die PCR-Produkte werden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel der Größe entsprechend aufgetrennt, die Fragmente vom Gel über „blotting“ (Abklatsch) auf ein Filterpapier transferiert und in einer Röntgenkassette für 3-5 d auf photographischem Film exponiert. Es stellt sich je nach verwendetem Primerpaar ein komplexes Bandenmuster dar. Differentiell auftretende Banden, also PCR-Produkte potentiell unterschiedlich exprimierter Gene, werden aus dem Gel aus-

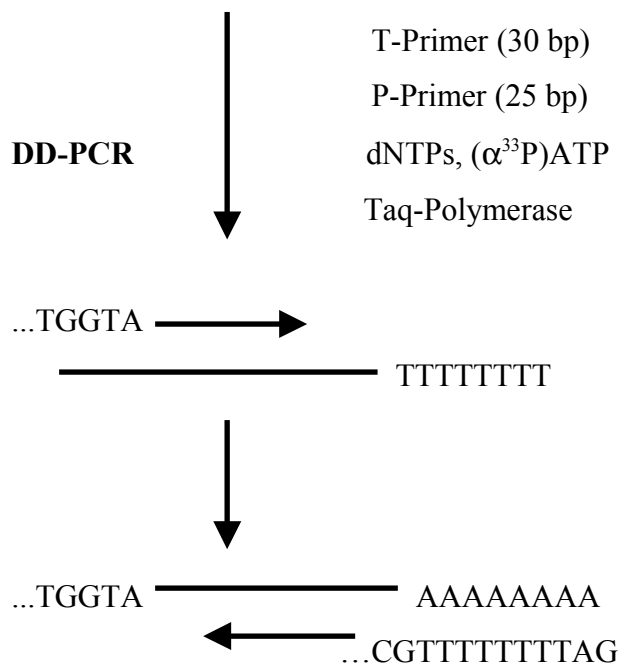
geschnitten, über Nacht in ddH₂O eluiert und mittels PCR bei hoher Anlagerungstemperatur mit der gleichen Primerkombination reamplifiziert, wie in der DD-PCR verwendet. Die aufgereinigten PCR-Produkte werden in einen Vektor kloniert, anschließend werden 4-6 Klone pro reamplifiziertes Fragment für weitere Untersuchungen willkürlich ausgewählt.

3.6.1. Schematische Darstellung von Differential Display of mRNA

1. **Isolierung von mRNA** aus Gehirn von SHRSP+, SHRSP-, SHR+ und SHR-
2. **cDNA Synthese:** Reverse Transkription der mRNA aus Gehirn von SHRSP+, SHRSP-, SHR+ und SHR- simultan mit oligo(dT) als Primer:

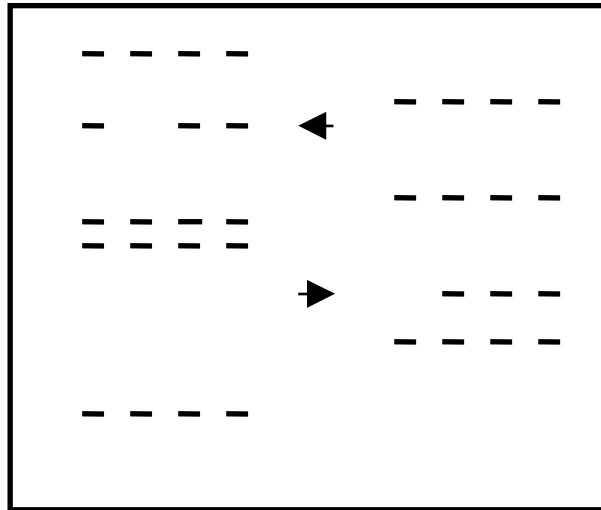


3. **Differential Display-PCR** mit Primerpaar P/T, Q/T, P/P oder Q/Q simultan für cDNA von 1. SHRSP+, 2. SHRSP-, 3. SHR+, 4. SHR-: 2 PCR-Zyklen bei niedriger Anlagerungstemp. ($T_{\text{anneal}}=40^{\circ}\text{C}$), 22-25 Zyklen bei hoher Anlagerungstemp. ($T_{\text{anneal}}=60^{\circ}\text{C}$)



4. **Auftrennung der cDNA-Fragmente** der Probe 1. SHRSP+, 2. SHRSP-, 3. SHR+ und 4. SHR- nach ihrer Größe auf dem Polyacrylamidgel:

Primerpaar:		P1/T1					P1/T2			
Probe:		1	2	3	4		1	2	3	4



6. **Ausschneiden** der interessanten, mit dem Pfeil gekennzeichneten Banden aus dem Gel
7. **Reamplifikation** der cDNA-Fragmente durch PCR
8. Direktes **Klonieren und Sequenzieren**
9. **Suche nach Homologien** zu bekannten Gensequenzen in der Gen-Datenbanken
10. **Verifizierung** differentieller Expression durch Northern Blot Analyse, RNase Protection Assay, Dot-Blotting von PCR-Produkten
11. **Chromosomale Lokalisation**
12. **Isolation von der gesamten Sequenz** mit Hilfe von DNA Bibliotheken
13. **Funktionelle Charakterisierung**

3.6.2. Primersequenzen

P-Primer für DD-PCR

Das Design der P-Primer (Delta™ Differential Display, Clontech, USA) lässt die Bildung von stabilen Sekundärstrukturen nicht zu. Am 3'Ende der Primer befinden sich mehrere Basen, die gemeinschaftliche Motive von Sequenzen, die in codierenden Regionen von eukaryotischen mRNAs gefunden wurden, bevorzugen.

P1: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA-3'
P2: 5'-ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATAG-3'
P3: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG-3'
P4: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG-3'
P5: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG-3'
P6: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG-3'
P7: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG-3'
P8: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG-3'
P9: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG-3'
P10: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC-3'

Abbildung 3.1.: Sequenzen der P-Primer

T-Primer für DD-PCR

T-Primer (DeltaTMDifferential Display, Clontech, USA) haben eine einheitliche Struktur von 5'(N)₁₉(T)₉NM, N= A, G, C oder T, M=A, G oder C. Diese Primerlänge von 30 Basen wird bei der Differential Display-PCR für die 25 Zyklen mit hoher Anlagerungstemperatur benötigt.

T1: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAA-3'
T2: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAC-3'
T3: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAG-3'
T4: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCA-3'
T5: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCC-3'
T6: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCG-3'
T7: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTGA-3'
T8: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTGC-3'
T9: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTGG-3'

Abbildung 3.2.: Sequenzen der T-Primer

Q-Primer für DD-PCR

Die Verwendung sogenannter Q-Primer erlaubt die Identifizierung von unterschiedlich exprimierten Mitgliedern von spezifischen Genfamilien. Die Q-Primer korrespondieren zu codierenden Regionen, die unter Mitgliedern von spezifischen Genfamilien konserviert sind, so dass die Amplifizierung dieser Sequenzen während der Differential Display (DD)-PCR favorisiert wird.

Zu interessanten Familien gehören Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, bestimmte Enzyme und Rezeptoren, von denen 23-25 bp lange konservierte Abschnitte der codierenden Regionen als Primer hergestellt wurden. Vorteile ergeben sich bei Verwendung dieser genspezifischen Primer in der Untersuchung von biologischen Prozessen, bei denen vermutet wird, dass Mitglieder einer bestimmten Genfamilie eine Rolle spielen (Stone and Wharton, 1994).

Q1: 5'-TAT CCA AGC TGG AGA CAT CAT TCT C
Q2a: 5'-GGC TCT TTC GAG TGT CAG TGT CTA
Q2b: 5'-ATT GAA ACA GGA GCT CTC GGT ACA
Q3: 5'-CTG TGG ATG ACC TAG GCA AGT CAG
Q4a: 5'-AGA TGA GTG CCG ATC TGG TAC AAC
Q4b: 5'-CAT TGA CTC TGT CCT TGC AGA CAC
Q5: 5'-GCC TGC CTC TAT GAC AAC TTT GAC
Q6: 5'-CAG GGT GTC TTC CAG ATT CTC ATC
Q7: 5'-ATA CAC CCA GAG CAG CTA CAA TCA C
Q8: 5'-AAG CAT CTC GGC TGT GTC GGA CT
Q9a: 5'-TAT GCC CTG GTT CCA CGG CAA GAT
Q9b: 5'-TGT TCC TGG TGC GGG AAA GCA CCA
Q10a: 5'-CCA GTC ACA GTT TGC GGG GAC AT
Q10b: 5'-CCA GGG GGT CTG ACC ACA AGA TG
Q11: 5'-TGC CTC CAA GTG CCG GAA AAG GAA
Q12: 5'-CCG GGT CTG GTT TCA AAA CAA GAG
Q13: 5'-ATT TGG GAC ACA GCA GGG CAG GA
Q14: 5'-TCG GTT TCC ATC TGC AGA TCT ACC
Q15: 5'-TTC CAA GCT GGA GAA GGC AGA CAT
Q16: 5'-TGT GTG GAA CGA GAC GCT GCA GTA
Q17: 5'-GCA GCT GAG CTT CAA GAA CAT GTG
Q18a: 5'-ATC ATC GGA GCC CTC TTC TCA GTC
Q18b: 5'-CAT CCA TTC CAC TCT CGC CGT AAT

Abbildung 3.3.: Sequenzen der Q-Primer: 1-18 gibt die Zugehörigkeit zu jeweils einer bestimmten Genfamilie an

3.6.3. DD-PCR

Durchführung

Für jede einzelne Differential Display-PCR wurde in einem 15 µl Reaktionsvolumen 3,5 µl der verdünnten cDNA mit jeweils 1,25 µM der ausgewählten Primer, 40 mM Tricin-KOH, pH 9,2, 15 mM KOAc, 3,5 mM Mg(OH)₂, 75 µg/ml Rinderserumalbumin, jeweils 0,05 mM von dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 0,3 µl 3000Ci/mmol [α -³³P]dATP (DuPont NEN, USA) und 1x Polymerase Mix, der Taq-1 DNA Polymerase und TaqStart Antikörper (1,1 µg/µl) in 1 % Glycerol, 0,8 Tris-HCl, pH 8, 1 mM KCl, 0,5 mM (NH₄)₂SO₄, 2 µM EDTA, 0,1 mM β -Mercaptoethanol und 0,005 % Thesit enthält (Clontech, USA), vermischt. Die DD-PCR wurde eingeleitet durch einen Zyklus mit geringer Anlagerungstemperatur (94 °C für 5 min, 40 °C für 5 min, 68 °C für 5 min) gefolgt von 25 Zyklen bei hoher Anlagerungstemperatur (94 °C für 1 min, 60 °C für 1 min, 68 °C für 2 min) und durch einen zusätzlichen Schritt bei 68 °C für 7 min beendet.

3.6.4. Elektrophorese und Autoradiographie

Reagenzien

5 %iges Polyacrylamidgel: 18 g Harnstoff
5 ml 10xTBE
27 ml ddH₂O
5 ml Long Ranger
35 µl TEMED
10 % APS

10xTBE (1 l) [89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM Na₂EDTA•2H₂O]:

108g Tris
55g Borsäure
7,4g Na₂EDTA•2H₂O

Durchführung

Bevor die einzelnen Proben in die Taschen des 0,2 mm dicken 5 %igen Polyacrylamidgeles geladen wurden, fand ein Vorlauf (Feather VoltTM3000, Stratagene,USA) bei 40 Watt für 30 min

statt, um die Glasplatten auf eine gleichmäßige Temperatur von 40-50 °C zu erwärmen. 3 µl der bei 94 °C für 2 min denaturierten DD-PCR-Gemisches wurden in die Taschen des Geles geladen. Der Lauf wurde bei 60 Watt für 4-6 h durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf Löschpapier (Whatman 3MM filter paper, USA) transferiert, mit Klarsichtfolie (Fisher Scientific Company, USA) bedeckt und unter Vakuum bei 70-80 °C für 50 min getrocknet (Gel Dreyer Model 583, Bio-Rad, USA). Das Gel wurde auf radiographisches Material (X-OmatTMBlue XB-I, Kodak, USA) mit einem die Strahlung verstärkenden Schirm bei -80 °C für 5 Tage exponiert.

3.6.5. Eluierung und Reamplifizierung der DD-PCR-Produkte

Durchführung

Der Röntgenfilm wurde nach 5 Tagen entwickelt und das dargestellte Bandenmuster jeder Primerkombination auf Unterschiede zwischen den einzelnen Ausgangsmaterialien SHRSP+ und SHRSP-, SHR+ und SHR- untersucht. Wurde eine Bande unterschiedlicher Intensität identifiziert, so wurde sie aus dem Gel ausgeschnitten. Nur solche Banden, die in beiden Duplikaten desselben Ausgangsmaterials, aber nicht in den zu vergleichenden Proben sichtbar waren, wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Die ausgeschnittenen Banden wurden in 200 µl 1 mM Tris und 0,1 mM EDTA bei 37 °C über Nacht inkubiert, bei 95 °C für 3 min denaturiert und auf Eis gestellt. Zu der Flüssigkeit wurde 1/10 des Volumens an 3 M Natriumacetat, pH 5,2, und das 2,5 fache dieses Volumens an 100%igem Ethanol gegeben, kräftig vermischt und über Nacht bei -80 °C gelagert. Nach Zentrifugieren für 45 min bei 14.000 rpm wurde der Niederschlag mit 500 µl 75 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, der Niederschlag getrocknet und in 20 µl ddH₂O gelöst.

Für die Reamplifikation wurden in einer 25 µl Reaktion 1 µl des Eluats, jeweils 0,6 µM beider Primer, die für die DD-PCR verwendet wurden, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9, 0,1 % Triton[®]X-100, 0,2 mM dNTP, 2 mM MgCl₂ und 0,5 Einheiten der Taq-DNA-Polymerase (Promega, USA) verwendet. Es wurden jeweils 8 Reaktionen für die gleiche Probe durchgeführt, deren Produkte später vereinigt wurden. Die PCR wurde durch einen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 2 min eingeleitet, gefolgt von 35 Zyklen (94 °C für 30 s, 60 °C für 1 min, 72 °C für 2 min) und durch einen abschließenden Anlagerungsschritt bei 72 °C für 5 min beendet. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 %igen, Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel der Größe nach aufge-

trennt. Die PCR-Produkte wurden verifiziert durch Übereinstimmung ihrer Migrationsdistanz mit der aus dem DD-Gel ausgeschnittenen Bande. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, USA) aufgereinigt.

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten (100 bp-10 kb) wurden spin-Säulen mit Silica-Gel Membranen, die die selektive Bindung der PCR-Produkte und Trennung von Kontaminationen wie Primern, nicht inkorporierten Nukleotide, Polymerase, Salzen, usw. ermöglichen, verwendet.

Das PCR-Produkt wurde aus dem Agarosegel unter ultraviolettem Licht mit einer Rasierklinge ausgeschnitten, auf ein Filterpapier in ein am Boden mit einem Loch versehenen 0,5 ml Eppendorfröhrchen plaziert und bei 6.000 rpm für 20 min in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Die Lösung wurde in einem 1,5 ml Eppendorfröhrchen aufgefangen, mit dem fünffachen Volumen von Puffer PB vermischt, auf die spin-Säule gegeben und bei 4.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Mit 750 µl PE wurde die Säule anschließend gewaschen und erneut bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die an die silica-Gel Membran gebundene DNA wurde in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, eluiert.

3.6.6. Klonierung der DD-Produkte

Prinzip

Das zu klonierende DNA-Fragment wird mittels eines Vektors in Bakterien eingeschleust. Vektoren wie die hier verwendeten Plasmide sind ringförmige DNA-Moleküle, die sich in Bakterien unabhängig vom Bakterien-Chromosom replizieren können und sich so zur Herstellung von DNA in großen Mengen eignen.

Die verwendeten pGem[®]-T und pGem[®]-T Easy Vektoren (Promega, USA) werden durch den Verdau von pGem[®]-5Zf(+) und pGem[®]-T Easy Vektoren durch EcoR V und durch das Anfügen eines Thymidin am 3'-Ende beider Enden hergestellt. Diese 3'-T Überhänge an der Integrationsstelle verhindern eine Rezirkularisation des Vektors, stellen einen kompatiblen Überhang für die von thermostabiler Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte dar, da diese Polymerase ein einzelnes Deoxyadenosin an das 3'-Ende des amplifizierten Fragmentes anhängt, und erhöhen so die Effizienz der Ligation von PCR-Produkten in die Plasmide. Um ein Wachstum nicht transformierter Bakterien zu verhindern, enthalten Vektoren zusätzlich ein oder mehrere Gene, die eine Resistenz gegenüber Antibiotika vermitteln, z.B. das β-Lactamase-Gen. Beide Vektoren

enthalten außerdem T7- und SP6-RNA Polymerase Promotoren, die die sogenannte multiple cloning site (MCS) in der codierenden Sequenz für das Enzym β -Galactosidase flankieren. Die Inaktivierung dieses Peptids durch Ligation eines DNA-Fragmentes erlaubt die direkte Identifizierung von rekombinanten Klonen durch Farbveränderung auf der mit IPTG und X-Gal behandelten Agarplatte. Die Restriktionsseiten in der MCS erlauben durch Verdau mit einem einzelnen Enzym oder durch Verwendung von zwei unterschiedlichen Enzymen die Freilassung des DNA-Fragmentes aus dem Vektor. Außerdem können mit Hilfe von Promotor-spezifischen RNA-Polymerasen in vitro RNA Stränge transkribiert werden. Mit T7- oder SP6-Primer eignet sich der Vektor auch zur Sequenzierung des DNA-Fragmentes.

Für die Transformation stehen sogenannte kompetente Bakterien zur Verfügung. Kompetente Zellen besitzen die Fähigkeit, Plasmid-DNA aufzunehmen. Der E.coli-Stamm DH5 α stammt aus einem modifizierten Verfahren von Hanahan (Hanahan, 1983) ab, ist Ampicillin-empfindlich und eignet sich daher für die selektive Propagierung als Wirtsorganismus von großen Plasmiden, die aufgrund der Anwesenheit des β -Lactamase Gens erfolgreich transformierte Bakterien Ampicillin-Resistenz vermitteln.

Ligation

Durchführung

Für die Ligation wurden in einem Gesamtvolumen von 10 μ l das aus dem Gel aufgereinigte PCR-Produkt, T4 DNA Ligase Puffer (300 mM Tris-HCl, pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP), 50 ng pGEM-T oder pGEM-T Easy Vektor, 3 Einheiten T4 DNA Ligase (Ligase in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA) bei 14°C über Nacht inkubiert.

Transformation

Reagenzien

Kompetente Zellen	Max Efficiency DH5 α TM Competent Cells (Gibco BRL, USA)
Lurai-Bertani broth Medium (20 l)	200 g Natriumchlorid 200 g Trypton 100 g Hefe-Extrakt, autoklaviert 100 μ g/ml Ampicillin
LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Platten (1 l)	15 g Agar 10 g Natriumchlorid 10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt, autoklaviert 0,1 g Ampicillin 30 μ l 100 mM IPTG /Petrischale 30 μ l 50 mg/ml X-Gal /Petrischale
0,1 M IPTG	2 g Isopropylthio- β -D-Galaktose aufgelöst in 8 ml ddH ₂ O, Aufbewahrung bei 4 °C
X-Gal	100 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Inodyl- β -D-Galactose aufgelöst in 2 ml N,N'Dimethylformamide, Aufbewahrung bei -20 °C an ei- nem lichtgeschützten Ort

Durchführung

Nach Auftauen der bei -80 °C gelagerten kompetenten Zellen auf Eis wurden je 5 μ l Ligationsprodukt (1-10 ng Plasmid-DNA) zu 50 μ l Aliquots pipettiert und auf Eis für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden für 45 s einem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad ausgesetzt und anschließend für 2 min auf Eis gestellt: Nach Zugabe von 900 μ l bei Raumtemperatur aufbewahrten LB Medium wurden die Röhren für 1 h bei 37 °C in einem Schüttler-Inkubator (Incubator Shaker, New Brunswick Scientific CO., USA) bei 225 rpm inkubiert. 100 μ l dieser Zelllösung wurden auf den vorbereiteten ampicillinhaltigen Agarplatten, die mit X-Gal und IPTG behandelt wurden, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.6.7. Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Prinzip

Reine Plasmid-DNA wird in mehreren Schritten durch Präparation eines gereinigten Lysats von allen zellulären Bestandteilen, Adsorption der DNA an eine Silicagel-Membran (QIAprep Spin Miniprep Kit, Deutschland), Waschen und Eluierung der Plasmid-DNA hergestellt. Das Verfahren basiert auf einer modifizierten Methode der alkalischen Extraktion von Plasmid DNA von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) und der Adsorption von DNA an eine Silicagel-Membran bei hoher Salzkonzentration (Vogelstein and Gillespie, 1979). Die Bakterien werden unter alkalischen Bedingungen in NaOH/SDS und in Anwesenheit von RNase A lysiert. SDS löst die Phospholipide und Proteine der Zellmembran auf, so dass die Zellkomponenten freigesetzt werden, die alkalischen Bedingungen führen zur Denaturierung der chromosomalen DNA. Die RNase baut die RNA ab. Durch die Zugabe von Puffer N3 wird das Lysat neutralisiert und die Bedingungen für eine hohe Salzbindung geschaffen, die zur Präzipitierung der denaturierten Proteine, chromosomalen DNA, SDS und von weiteren zellulären Bestandteilen führen, während die kürzeren Plasmid DNA renaturiert und in Lösung bleibt. Anschließend wird die Plasmid-DNA mit Hilfe der Silicagel-Membran isoliert und aufgereinigt.

Durchführung

Für die Plasmid Präparation wurde nach Inkubation der Agarplatte bei 37 °C über Nacht mit einer ausgeglühten Platinöse abgenommene Kolonien für 12-16 h in 5 ml LB Medium bei 37 °C im Schüttler-Inkubator vermehrt. Nach Zentrifugieren bei 3.000 rpm für 20 min wurde der Niederschlag der bakteriellen Zellen in 250 µl Puffer P1 des QIAprep Spin Miniprep Kits suspendiert, nach Zugabe von 250µl Puffer P2 und 350µl Puffer N3 des Kits war ein weißer Niederschlag sichtbar. Nach anschließendem Zentrifugieren (Eppendorf 5415C, Deutschland) bei 13.000 rpm für 20 min wurde die klare Lösung auf die QIAprep Spin-Säulen gegeben. Durch kurzes Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit durch die Membran filtriert, so dass die DNA an die Silicagel-Membran adsorbiert wurde. Mit Hilfe von jeweils 500 µl Puffer PB und PE des Kits wurde die an der Membran gebundene DNA von Salzen, noch vorhandener RNA und zellulären Proteinen gereinigt und die reine Plasmid DNA von der Membran mit 50-100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, eluiert. Durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280nm wurde die Kon-

zentration und Reinheit der DNA nach der Formel: $(OD_{260nm} - OD_{280nm}) \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{DNA [ng/}\mu\text{l]}$, $OD_{260nm/280nm} \approx 1,8$ ermittelt.

Die Plasmid-Aufreinigung wurde durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Dazu wurden 10 μl des Eluates mit jeweils zwei Restriktionsenzymen verdaut. Die Enzyme wurden so gewählt, dass das eingebaute DNA-Fragment aus dem zirkulären Plasmid herausgeschnitten wurde. Die Identität des Klons konnte anhand der Fragmentgröße nach Elektrophorese im Agarosegel bestätigt werden. Eine deutliche Bande im erwarteten Größenbereich war erkennbar, gleichzeitig waren keine Banden im niedermolekularen Bereich vorhanden, die RNase A resistente RNA darstellen würde.

3.6.8. Sequenzieren der PCR-Produkte

Prinzip

Für das Sequenzieren der PCR-Produkte wurde das ABI Prism™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, USA) verwendet. Es beinhaltet die mit Farbstoff markierten Abbruchnukleotide, Deoxynukleosidtriphosphate, Enzym, Magnesiumchlorid und den Puffer in einer gebrauchsfertigen Lösung.

Das Enzym AmpliTaq® DNA Polymerase, FS stammt von der *Thermus aquaticus* DNA Polymerase ab und beinhaltet eine Punktmutation im aktiven Zentrum, die zu einer geringeren Diskriminierung gegenüber Dideoxynukleotiden führt. Eine zweite Mutation am aminoterminalen Ende führt zu einem Verlust der 5' \rightarrow 3' Nukleaseaktivität der AmpliTaq® DNA Polymerase.

Vier verschiedene Dichlorrhodamin (dRhodamin)-Abbruchnukleotide mit einem jeweils definierten Emissionsspektrum werden für die Reaktion verwendet. Abbruchnukleotid A ist gekennzeichnet mit Farbstoff R6G, Abbruchnukleotid C mit TAMRA, Abbruchnukleotid G mit R110 und Abbruchnukleotid T mit ROX. Durch den Einbau dieser Abbruchnukleotide an Stelle von normalen Nukleotiden entstehen Fragmente, die sich in ihrer Größe jeweils nur um eine Base unterscheiden. Diese Fragmente werden auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel der Länge nach aufgetrennt, sie passieren dabei zu einer bestimmten Zeit abhängig von ihrer Länge einen Bereich, der von dem Laser des ABI 377 DNA Sequenziergerätes abgetastet wird. Dies führt zu einer bestimmten Farbregistrierung (grün, gelb, blau oder rot) auf dem ABI Prism 377 Gel Image.

Mit Hilfe des Blast-Module, gcg8-Software werden die Sequenzen analysiert. Homologien zu bekannten Genen können so die Sequenzen näher charakterisieren.

Reagenzien

Dye Terminator Cycle Sequencing RR Mix (PE Applied Biosystems, USA)

5 %iges Polyacrylamidgel Long Ranger Singel™pack (FMC Bio Products, USA)

10 x TBE 108 g 890 mM Tris

55 g 890 mM Borsäure

7,44 g 20 mM Na₂EDTA•2 H₂O

Durchführung

In einem Reaktionsvolumen von 8,7 µl befanden sich 3 ng/100 bp DNA, 0,3 µM Primer T7 bzw. SP6 und 3,2 µl des Dye Terminator RR Mixes. Die PCR wurde durch einen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 2 min eingeleitet. 30 Zyklen bestehend aus dem Denaturierungsschritt bei 96°C für 20 s, der Anlagerung des Primers bei 50 °C für 5 s und der Kettenverlängerung bei 60°C für 4 min folgten. Die PCR wurde durch einen zusätzlichen Schritt bei 4 °C beendet.

Diese PCR-Produkte wurden durch Ethanol-Präzipitation aufgereinigt. Nach Zugabe von 1 µl Linearem Acrylamid, 17 µl 0,35 M Natriumacetat, pH 5,2, und 50 µl 95 %igem Ethanol wurden die Proben gut gevortext. Nach Zentrifugieren der Proben in der GS-6R Zentrifuge (Beckman, USA) bei 3.250 rpm für 40 min wurde der Überstand abgesaugt, das Präzipitat mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen, und die Proben erneut bei 3.250 rpm für 15 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde der Niederschlag unter Vakuum getrocknet (Integrated SpeedVac® System 100, Savant, Forma Scientific, Marietta, OH, USA) und anschließend in 2,2µl Ladepuffer (1 x ABI, 4 x Formamid) aufgelöst und in die Taschen des 5 %igen Polyacrylamidgels, das nach Anweisung unter der Benutzung des Long Ranger Singel™packs gegossen wurde, geladen.

3.7. Hybridisierung von Membranen

3.7.1. Membranen mit transferierten menschlichen cDNA-Fragmenten

Prinzip

Die verwendeten Atlas Arrays (Atlas™ Human cDNA Expression Array I, Clontech, USA) umfassen 588 menschliche cDNAs, die in Duplikaten auf einer positiv geladenen Nylonmembran in einer Fragmentlänge von 200-500 bp aufgetragen sind. Plasmid und Bakteriophagen DNA sind als negative Kontrollen integriert, um Spezifität der Hybridisierung zu überprüfen sowie neun "Housekeeping-gene" cDNAs als positive Kontrollen. "Housekeeping-genes" sind Gene, deren Produkte für den Metabolismus einer jeden Zelle notwendig sind und deren Expression in unterschiedlichen Zelltypen, Gewebearten, Entwicklungs- und Krankheitsstadien relativ konstant ist. Durch den Vergleich der Intensität der Hybridisierungssignale dieser Gene können mögliche Unterschiede in der Konzentration der beiden cDNA Populationen, die für die Hybridisierung verwendet wurden, ausgeglichen und normalisiert werden.

Die auf die Membranen transferierten Gene spielen Schlüsselrollen in vielen unterschiedlichen biologischen Prozessen und stehen unter enger transkriptioneller Kontrolle. Sie sind nach ihrer Funktion in verschiedenen Klassen zusammengefasst. Eine einzige Hybridisierung spiegelt das Expressionsprofil dieser 588 Gene wieder, durch das Vorliegen von zwei identischen Membranen kann das Expressionsprofil zweier unterschiedlicher mRNA-Populationen simultan verglichen werden.

Nach reverser Transkriptase der mRNA von zwei zu vergleichenden Geweben werden diese radioaktiv markierten komplexen Sonden mit der Atlas Membran hybridisiert. Das Hybridisierungsmuster kann durch Autoradiographie analysiert und/oder durch einen Phosphorimager quantifiziert werden. Durch Vergleich der Hybridisierungsintensität bestimmter Gensequenzen auf den beiden Membranen kann das Expressionsmuster der beiden unterschiedlichen Proben relativ zueinander bestimmt werden.

3.7.2. Membranen mit transferierter DD-PCR-Produkten

Prinzip

Durch Northern Blot Analyse wird die Expression eines Gens in mehreren Geweben simultan nachgewiesen. Durch Hybridisierung der gesamten cDNA-Population eines spezifischen Gewebes mit einer Membran, auf der eine große Anzahl von Gensequenzen aufgetragen sind, kann dagegen die Expression dieser vielen Gene in diesem Gewebe ad hoc analysiert werden. Unter Verwendung von zwei identischen Membranen kann das Expressionsmuster dieser Gene in zwei unterschiedlichen cDNA-Populationen verglichen werden.

Um jene cDNA-Fragmente im Differential Display zu identifizieren, die wirklich unterschiedlich exprimierte mRNAs repräsentieren, werden die in Vektoren ligierten DD-Fragmente mit SP6- und T7-Primern, die die ligierte Sequenz flankieren, reamplifiziert und diese PCR-Produkte in dreifacher Wiederholung auf jeweils zwei Membranen transferiert. Beide Nylonmembranen werden jeweils mit einer hoch spezifischen cDNA-Sonde, die durch reverse Transkription der zu vergleichenden mRNAs aus dem Gehirn von SHRSP+ und SHRSP- in Anwesenheit von radioaktiv markierten Nukleotiden synthetisiert werden, hybridisiert. Die Ergebnisse werden mit Hilfe eines Phosphorimagers ausgewertet. Mit dieser Methode können eine große Anzahl unterschiedlicher cDNA-Fragmente, die durch Differential Display gewonnen wurden und potentiell unterschiedlich exprimierte mRNAs darstellen, auf ihre unterschiedliche Expression in den zu vergleichenden Geweben untersucht werden.

Reagenzien

10 x dNTP	jeweils 5mM dCTP, dGTP, dTTP 50 µM dATP
5 x Reaktionspuffer	250 mM TrisHCl, pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂
10 x Termination Mix	0,1 M EDTA, pH 8 1 µg/µl Glycogen
10 x Denaturierungs-Puffer	1 M NaOH 10 mM EDTA
2 x Neutralisierungs-Puffer	1 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7

Wasch-Puffer 1	2 x SSC 1 % SDS
Wasch-Puffer 2	0,1 % SSC 0,5 % SDS
20 x SSC	300 mM NaCl 30 mM NaCitrat
20 % SDS (1 l)	200 g SDS

Durchführung

Für die Präparation der Membranen mit transferierten DD-PCR-Produkten wurden die DD-Fragmente unter Standard-PCR-Bedingungen in einem 2 x 55µl Reaktionsvolumen aus 400 ng Plasmid-DNA mit jeweils 0,4 µM der SP6- und T7-Primer, 0,18 mM aller 4 dNTPs, 1,8 mM MgCl₂, 1,1 Einheiten der Taq-Polymerase in 1 x Standard-Puffer (Taq DNA Polymerase in PufferA, Promega, USA) amplifiziert. 2 µl des PCR-Produkts wurden auf ein 1 % Ethidiumbromid enthaltendes Agarosegel geladen, um anhand der Größe des PCR-Produktes die Identität zu bestätigen und Kontaminationen und Artefakte auszuschließen.

Die beiden Reaktionsvolumina wurden gemischt und mit dem gleichen Volumen an 0,8 N NaOH, 4 M NaCl, 50 µM EDTA vermischt. Nach Denaturierung bei 94 °C für 2 min wurden jeweils 3 x 30 µl dieser Lösung auf zwei 8 x 12 cm große Nylon-Membranen (GeneScreen Hybridisation Transfer Membrane, NEN Research Products, USA) transferiert, um zwei identische Membranen mit jeweils dreifach aufgetragenen DD-PCR-Produkten zu erhalten. Vor dem Transferieren der PCR-Produkte wurden die Membranen zuerst mit dd H₂O und anschließend mit 10 x SSC befeuchtet. Als positive Kontrollen wurden auf diese Membranen β-Aktin und GAPDH in der gleichen Weise transferiert, als negative Kontrolle diente Plasmid-DNA. Die Membranen wurden 30 s lang ultravioletter Strahlung in einem UV Linker (UV Stratalinker 1800, Stratagene, USA) ausgesetzt, um die DD-PCR-Produkte auf der Membran zu immobilisieren.

Für die Synthese der einzelsträngigen, hoch spezifischen cDNA-Sonden wurden jeweils 2 µg poly(A)mRNA, 0,5 µl 50 µM oligo(dT), 100 ng Hexamere und 1 µl RNase Inhibitor in einem Volumen von 6 µl für 5 min bei 70 °C inkubiert und nachfolgend auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 2 µl 10 x dNTP, 35 mCi [³²P]dATP, 3.000Ci/mmol (NEN™Life Science Products, USA), 1 µl 100 mM DTT, 100 Einheiten reverser Transkriptase (MMLV Reverse Transcriptase, Clontech, USA) erfolgte die Inkubation bei 50 °C für 45 min. Die Reaktion

wurde beendet durch Zugabe von 2 µl von 10 x Termination Mix. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden über speziellen Säulen (Chroma Spin-200 DEPC-H₂O, Clontech, USA) nach Empfehlung des Herstellers entfernt. Die Sonden wurden mit einer Aktivität von 5-10 x 10⁶ cpm in einem Zehntel des Volumens 10 x Denaturierungs-Puffer bei 68 °C für 20 min inkubiert. Nach Hinzufügen von 5 µg Cot-1 DNA (Clontech, USA) sowie 225 µl 2 x Neutralisierungs-Puffer und Inkubation bei 68 °C für 20 min wurde die Hybridisierung der Membranen in 5 ml Hybridisierungsflüssigkeit (ExpressHyb™Hybridisierungsflüssigkeit, Clontech, USA) bei 68 °C über Nacht durchgeführt. Nach Waschen der Membranen unter stringenten Bedingungen drei Mal mit Wasch-Puffer 1 bei 68 °C für jeweils 20 min und zwei Mal mit Wasch-Puffer 2 bei 68 °C für jeweils 20 min wurden die Membranen in Klarsichtfolie gewickelt, die Membranen mit transferierten DD-PCR-Produkten in einer Phosphor-Imager-Kassette bzw. die Atlas Arrays in einer Röntgenkassette (Kodak Bio Max MS, USA) exponiert und nach 24-72 h ausgewertet.

3.8. Northern Blotting

3.8.1. Herstellung des Northern Blots

Prinzip

Northern Blotting ist eine Technik zur qualitativen/semi-quantitativen Analyse von RNA. Sie wird zur Bestimmung der Expression eines bestimmten Gens in verschiedenen Geweben verwendet. Die gesamte RNA oder poly(A)RNA verschiedener Gewebe wird elektrophoretisch der Größe nach in einem Agarosegel aufgetrennt. Die RNA-Moleküle in dem Gel werden anschließend durch osmotische Kräfte auf eine Nylonmembran transferiert, an der sie spiegelbildlich zum Gel haften bleiben. Die RNA, die durch Bestrahlung mit UV-Licht auf der Nylonmembran immobilisiert wird, kann in situ mit einer spezifisch für das zu untersuchende Gen radioaktiv markierten Sonde inkubiert werden. Die markierte Sonde hybridisiert mit dem spezifischen Gen, das in der Sequenz komplementär zu ihr ist. Durch Exposition der Nylonmembran auf strahlenempfindliche Träger kann anschließend autoradiographisch die relative Menge und die Größe der zu untersuchenden RNA bestimmt werden.

Reagenzien

1 %iges Agarosegel	1 % Agarose 1 x Formaldehydgellaufpuffer 2,2 M Formaldehyd 80 µg Ethidiumbromid
5 x Formaldehydgellaufpuffer (1 l)	20,6 g 0,1 M MOPS 13,3 ml 3 M Natriumacetat 10 ml 500 mM EDTA Einstellung des pH-Wertes auf pH 7 mit 10 N NaOH
Formaldehydgelladepuffer	50 % Glycerin 1 mM EDTA, pH 8 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylen Cyanol FF
20 x SSC (1 l)	175,3 g Natriumchlorid 88,2 g Natriumcitrat Einstellung des pH-Wertes auf pH 7 mit 10 N NaOH, Zugabe von 250 µl/500 ml DEPC und Autoklavierung

Durchführung

Für den Northern Blot wurden jeweils 4 µg poly(A)RNA aus dem Gehirn der mit der speziellen Diät bzw. mit normaler Nahrung gefütterten SHRSP, jeweils 2 µg poly(A)RNA, extrahiert aus den Aorten und der Nebenniere derselben Tiere, sowie jeweils 100 µg von Gesamt-RNA, extrahiert aus Herz, Niere, Leber, Hoden, Intestinum und Embryo, verwendet.

In einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurde die jeweilige RNA mit 2 µl 5 x Formaldehydgellaufpuffer, 3,5 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid vermengt. Nach Inkubation bei 70 °C für 5 min und Zugabe von 2 µl des Formaldehydgel-Ladepuffers wurde das gesamte Volumen jeweils in die Taschen des 1 %igen Agarosegels geladen. Ein RNA-Marker (RNA-Marker, 0,28-6.58 kb, Promega, USA) diente als Größenstandard, von dem 2 µg in eine Tasche des Gels geladen wurde. Im elektrischen Feld wurde die RNA bei 180 V der Größe nach aufgetrennt (EC250-90, E-C Apparatus Corporation, USA).

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in DEPC-H₂O zur Reinigung von Formaldehyd gewaschen. Nach einem 20 minütigen Waschvorgang in 0,05 N Natriumhydroxid wurde das Gel ab-

schließlich erneut in DEPC-H₂O und in 10 x SSC gewaschen. Über Nacht fand die Transferierung der RNA-Moleküle auf die Nylonmembran statt. Unter UV-Lichteinstrahlung wurde die RNA auf der Nylonmembran fixiert.

3.8.2. Herstellung der radioaktiv markierten Sonde

Prinzip

DNA-Fragmente werden für den Gebrauch als Hybridisierungs-Sonde hoch spezifisch markiert indem sie mit 9er-Oligodeoxyribonukleotiden, mit willkürlicher Sequenz, in Anwesenheit von radioaktiv markierten Nukleotiden inkubiert werden. Die Oligomere lagern sich willkürlich an das zuvor denaturierte DNA-Fragment an und dienen so als Primer für die DNA Synthese durch DNA-Polymerase, wodurch in Anwesenheit von radioaktiv markierten Nukleotiden hoch spezifische DNA-Fragmente synthetisiert werden.

Reagenzien

10 % SDS (1 l)	100 g SDS
	Erwärmung der Lösung auf 68 °C, Einstellung des pH-Wertes auf pH 5,2 mit HCl
Lösung 1 (2 x SSC/0,1 % SDS)	
	100 ml 20 x SSC
	10 ml 10 % SDS
	890 ml DEPC-H ₂ O
Lösung 2 (0,1 x SSC/0,1 % SDS)	
	5 ml 20 x SSC
	10 ml 10% SDS
	985 ml DEPC-H ₂ O

Durchführung

In einem Volumen von 45 µl wurden 80-100 ng der zu untersuchenden cDNA bei einer Temperatur von 95 °C für 5 min denaturiert und nachfolgend auf Eis gestellt. Für die Markierung der DNA zu einer hoch spezifischen, für die Hybridisierung geeigneten Sonde wurden spezielle Partikel (DNA Labelling Beads, Pharmacia Biotech, USA) verwendet, die sich in einem Puffer mit

Oligodeoxyribonukleotiden, DNA-Polymerase sowie dATP, dGTP und dTTP befanden. Diese beads wurden unter Vermeidung von Luftblasen in 45 µl Reaktionsvolumen suspendiert, 5 µl [α -³²P]dCTP, 3.000Ci/mmol (NENTMLife Science Products, USA), hinzugegeben, gut geschüttelt, zentrifugiert und bei einer Temperatur von 37 °C für 45 min inkubiert. Die Sonde wurde von nicht inkorporierten Nukleotiden mit dafür geeigneten Säulen (Probe QuantTMG-50 Micro Columns, Pharmacia Biotech, USA) gereinigt, indem die vorliegenden 50 µl auf die Säule gegeben und bei 5.500 rpm für 5 min zentrifugiert wurden.

Die Nylonmembran wurde in 10 ml QuickHyb Hybridisierungsflüssigkeit (Stratagene, USA) und 100 µl Heringssperma-DNA bei einer Temperatur von 68 °C prähybridisiert. Nach Denaturierung der Sonde bei 94 °C für 5 min und Hinzufügen der Sonde zur Nylonmembran wurde die Hybridisierung bei 68 °C über Nacht durchgeführt.

Nach Ablauf von mindestens 12 h wurde die Membran drei Mal mit Lösung 1 für 15 min und anschließend in Lösung 2 für 30 min bei 60 °C gewaschen. Die feuchte Membran wurde in Klarsichtfolie eingeschlagen und auf einen Röntgenfilm bei -80 °C autoradiographiert.

3.9. In vitro Transkription

Prinzip

In den verwendeten pGem[®]-T und pGem[®]-T Easy Vektoren sind die cDNA-Sequenzen eingebrachter Gensequenzen von den Bakteriophagenpromotoren SP6 und T7 flankiert. Durch eine Standard-PCR wird das cDNA-Fragment selektiv mit SP6- und T7-Primern, frei von Vektorsequenz amplifiziert. Die amplifizierten cDNA-Fragmente können mit einer Restriktionsendonuklease im Bereich des 3'-Endes des cDNA-Fragmentes auf eine definierte Länge gekürzt werden. Durch promoterspezifische SP6- und T7-RNA-Polymerasen werden synthetische cRNAs mit definierter Länge hergestellt. In Anwesenheit radioaktiv markierter Nukleotide können so Sonden mit hoher spezifischer Aktivität hergestellt werden, die für Hybridisierungsexperimente geeignet sind.

Reagenzien

Puffer 1 (1 x) 10 mM Bis Tris Propan-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM DTT, pH 7 bei 25 °C

Puffer 2 (1 x) 10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
50 mM NaCl
1 mM DTT, pH 7,9 bei 25 °C

Puffer 3 (1 x) 50mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
100 mM NaCl
1 mM DTT, pH 7,9 bei 25 °C

Puffer 4 (1 x) 20 mM Tris-Acetat
10 mM Magnesiumacetat
50 mM Kaliumacetat
1 mM DTT, pH 7,9 bei 25°C

1 x BSA 100 µg/ml Rinderserumalbumin

Restriktionsenzyme, Erkennungssequenz und Puffer (BB)-Nummer

AluI (10.000 U/ml)	5' AG [^] CT	BB2
AlwI (2.000 U/ml)	5' GGATC(N) ⁴	BB4
AvaII (4.000 U/ml)	5' G [^] GA/TCC	BB4
BglI (10.000 U/ml)	5' GCCNNN [^] NGGC	BB3
Cac8I (3.000 U/ml)	5' GCN [^] NGC	BB3
HhaI (20.000 U/ml)	5' GCG [^] C	BB4
HindIII (20.000 U/ml)	5' A [^] AGCTT	BB2
NlaIII (10.000 U/ml)	5' CATG [^]	BB4
NlaIV (1.000 U/ml)	5' GGN [^] NCC	BB4
RsaI (10.000 U/ml)	5' GT [^] AC	BB1
XbaI (20.000 U/ml)	5' T [^] CTAGA	BB2

Phenolchloroformisoamylalkohol: 50 % Phenol

48 % Chloroform

2 % Isoamylalkohol

Rnase-Inaktivator 40 U/µl

Durchführung

Für die in-vitro Transkription wurde unter Standard-PCR-Bedingungen das zu transkribierende Fragment mit T7- und SP6-Primern amplifiziert. 1500 ng des amplifizierten Fragmentes wurden für den Verdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym eingesetzt. Der Verdau wurde in 100 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, bestehend aus 10 µl des jeweiligen Enzyms, 1 x Reaktionspuffer und 1 x BSA, und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Durch Phenolchloroform-Isoamylalkohol wurde das Reaktionsprodukt aufgereinigt. Dazu wurden gleiche Volumina an Phenolchloroform-Isoamylalkohol und der verdauten DNA-Lösung versetzt, kräftig geschüttelt und nach kurzem Zentrifugieren der wässrige Überstand in ein RNase freies Röhrchen überführt. Nach Zugabe von einem Zehntel des Volumens an 3 M Natriumacetat, pH 5,2, und dem 2,5 fachen Volumen an 100 %igem Ethanol wurde die DNA bei -80 °C für mindestens eine Stunde gelagert. Nach Zentrifugieren bei 14.000 rpm für 30 min wurde der Überstand abgenommen, 500 µl 70 %iges Ethanol hinzugegeben und erneut bei 14.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde an der Luft getrocknet, in 50 µl DEPC-H₂O aufgelöst und photometrisch quantifiziert.

Für die in-vitro Transkription wurden in einem Volumen von 20 µl 300 ng jeder DNA mit 2U T7/SP6-RNA-Polymerase (MAXIscript SP6/T7™Kit, Ambion, USA), jeweils 0,5 mM von dATP, dGTP, dCTP, 5 mM DTT, 40 U RNase-Inaktivator, 1 x Transkriptionspuffer und 5 µCi [α -³²P]dUTP (NEN™Life Science Products, USA) vermengt und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl RNase freier DNase und Inkubation für weitere 10 min bei 37 °C wurden die Sonden über Chroma Spin-Säulen (Chroma Spin-100 DEPC-H₂O Columns, Clontech Laboratories, USA) nach Beschreibung des Herstellers aufgereinigt. Die Aktivität von einem 1µl-Aliquot der aufgefangenen Flüssigkeit wurde verdünnt in 2 ml mit einem β -Counter gemessen, damit jeweils 600.000 cpm der spezifischen Sonde und 60.000 cpm der β -Aktin-Sonde als Kontrolle für die Hybridisierung eingesetzt werden konnten.

3.10. Ribonuclease Protection Assay

Prinzip

Der RNase Protection Assay, RPA, ist eine extrem sensitive Methode zur Detektion und Quantifizierung einer spezifischen mRNA im Kontext komplexer zellulärer RNA. Eine radioaktiv markierte RNA-Sonde wird in-vitro wie beschrieben hergestellt, welche komplementär zu der zu analysierenden mRNA ist, und im Folgenden mit der gesamten zellulären RNA inkubiert, so dass sich zwischen komplementären Abschnitten doppelsträngige Hybride bilden. Nach Behandlung dieses Reaktionsgemisches mit Ribonuklease wird einzelsträngige, nicht-hybridisierte RNA abgebaut, während markierte, mit komplementärer RNA hybridisierte mRNA vor Abbau geschützt ist und über ein Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht werden kann. Liegt die RNA-Sonde im Reaktionsgemisch im Überschuss gegenüber der spezifischen, zu detektierenden mRNA vor, so ist die Intensität des doppelsträngigen Fragmentes direkt proportional zu der Menge der spezifischen mRNA in der gesamten zellulären RNA. Wird die Expression dieser spezifischen mRNA mit der eines sogenannten housekeeping-Gens wie β -Aktin, das in jeder Zelle konstant exprimiert wird, verglichen, so kann die Expression semi-quantitativ bestimmt werden.

Reagenzien

Hybridisierungspuffer	80 % Formamid 100 mM Natriumcitrat, pH 6,4 300 mM Natriumacetat, pH 6,4 1 mM EDTA
RNase-Mix	250 U/ml RNase A 10.000 U/ml RNase T1
8 M Harnstoff-Polyacrylamidgel (60 ml)	28,8 mg Harnstoff 6 ml 10 x TBE 7,5 ml 40 % Acrylamid-Bisacrylamid (=19:1) 560 μ l 10 % Ammoniumpersulfat 28 μ l Tetramethyldiamin

10 x TBE (1 l)	108 g 89 mM Tris
	55 g 89 mM Borsäure
	7,4 g 2 mM Na ₂ EDTA•2 H ₂ O
Lade-Puffer	80 % Formamid
	0,1 % Xylencyanolblau
	0,1 % Bromphenolblau
	2 mM EDTA
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat
	1 mM EDTA
DEPC-H ₂ O (0,05 %, 1 l)	0,5 ml Diethylpyrocarbonat

Durchführung

In 0,9-2,2 µg Poly(A)RNA bzw. 35-75 µg Gesamt-RNA wurden jeweils 600.000 cpm einer radioaktiv markierten cRNA und 60.000 cpm der β-Aktin-cRNA als interne Kontrolle zu 20 µl Hybridisierungspuffer hinzugefügt, bei 95 °C für 2 min denaturiert und anschließend für 18 h im Wasserbad bei 45 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl RNase Puffer Bx (RPA™Kit, Ambion, USA) und 2 µl des RNase-Mixes, und nach Inkubation bei 37 °C über 30 min, erfolgte der Abbau nicht hybridisierter RNA. Die RNasen wurden durch die Zugabe von 300 µl eines Inaktivierungs- und Präzipitierungs-Mixes Dx (RPA™Kit, Ambion, USA) inaktiviert. Nach kräftigem Schütteln erfolgte die Inkubation bei -80 °C für 1 h und anschließend Zentrifugation bei 14.000rpm für 30 min. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 5 µl Lade-Puffer resuspendiert. Nach Denaturierung bei 95 °C über 3 min wurden die Proben in die Taschen des 8M Polyacrylamidgels geladen und bei 60 V elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde nach einer Laufzeit von 2 h auf Filterpapier transferiert, letzteres mit Klarsichtfolie abgedeckt und in einer Phosphor-Imager-Kassette je nach Intensität des Signales für 24-72 h exponiert. Mit Hilfe eines Phosphor-Imagers wurden die Schirme der Kassetten eingelesen und mit dem Computerprogramm die Intensität der einzelnen Banden gemessen. Durch Bildung des Quotienten aus den Werten der spezifischen mRNA und des β-Aktin-Gens wurde die relative mRNA-Konzentration bestimmt.

4. Resultate

4.1. Differential Display-PCR

Die von Peng Liang und Arthur Pardee 1992 erstmals beschriebene Methode des Differential Display von mRNA und von Michael McClelland 1994 abgewandelte Strategie, genannt RNA Fingerprinting, erlaubt es, die Genexpression in bestimmten Zelltypen oder Geweben unter verschiedenen Bedingungen simultan zu vergleichen (Liang and Pardee, 1992; McClelland *et al.*, 1994). Ziel dieser Methode ist die Isolierung und Identifizierung von unterschiedlich exprimierten Genen in diesen Zelltypen oder Geweben. Das Ergebnis dieser auf einer PCR-basierenden Methode mit arbiträren Primern, für die im Laufe der vergangenen Jahre unterschiedlichste Alternativen für jeden einzelnen Schritt entwickelt wurden, ist ein spezifisches Bandenmuster von amplifizierten cDNA-Fragmenten, wenn über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Vergleich dieser Bandenmuster in zu vergleichenden Ausgangsmaterialien erlaubt die Identifikation von unterschiedlich exprimierten Sequenzen aufgrund unterschiedlicher Bandenmuster. Unterschiedlich amplifizierte cDNAs können so isoliert, sequenziert und über Gen-Datenbank-Analyse auf Homologien zu bekannten Genen untersucht werden.

Um Gene zu identifizieren, die bei der Pathogenese des Schlaganfalls in einem Tiermodell eine Rolle spielen, wurde diese Methode in abgewandter Form verwendet. Als Studienpopulation dienten zwei verschiedene Ratteninzuchtstämme, die spontan hypertensive Ratte (SHR) und die zum Schlaganfall neigende spontan hypertensive Ratte (SHRSP), die durch selektive Inzucht individueller Tiere mit Neigung zum Schlaganfall aus dem SHR-Stamm hervorgegangen war. Beide Rattenstämme entwickeln in den ersten Lebenswochen Bluthochdruck. Nach Verfütterung einer natriumreichen, kaliumarmen Diät treten nur bei SHRSP, nicht aber bei SHR nach Ablauf von ca. fünf Wochen regelmäßig Schlaganfälle auf. Unter Verwendung von Differential Display wurde im Gehirn, Gehirngefäßen und der Aorta nach möglichen Unterschieden in der Genexpression gesucht, welche dann potentiell Rückschlüsse auf die an den zu einem Schlaganfall führenden, an der Veränderungen der Gefäßwände beteiligten Mechanismen erlauben könnten. Hierzu wurden SHR und SHRSP im Alter von vier Wochen mit einer natriumreichen, kaliumarmen Diät behandelt (SHRSP+ und SHR+). Unbehandelte Tiere dienten als Kontrollen (SHRSP- und SHR-). Im Alter von zehn Wochen wurde mRNA aus Gehirn, Gehirngefäßen und der Aorta der Ratten der vier zu vergleichenden Gruppen (SHRSP+, SHRSP-, SHR+, SHR-) extrahiert. Im ersten Schritt von Differential Display erfolgte jeweils die Synthese von cDNA aus mRNA der

Gewebe von den einzelnen, zu vergleichenden Gruppen. Um in den folgenden Schritten reproduzierbare Ergebnisse erhalten und das Bandenmuster der amplifizierten DD-PCR-Fragmente richtig auswerten zu können, war es von äußerster Wichtigkeit, mRNA Ausgangsmaterial von hoher Qualität und jeweils gleicher Konzentration einzusetzen. Anderenfalls könnten Unterschiede im Bandenmuster eher Unterschiede in Konzentration, Quantität und Qualität der Ausgangsmaterialien widerspiegeln, als wirklich unterschiedlich exprimierte Sequenzen im Sinne biologisch relevanter Phänomene. Um dies zu erzielen, wurden mRNA aus den Gehirnen, Gehirngefäßen bzw. der Aorta von Versuchstieren der vier zu vergleichenden experimentellen Gruppen getrennt extrahiert, mit Hilfe von reverser Transkriptase und oligo(dT), wie im Methodenkapitel beschrieben, in cDNA umgeschrieben, wobei die gesamte mRNA als Matrize für die Synthese der cDNA diente, und für die DD-PCR im Duplikat eingesetzt.

Für die Differential Display-PCR mit transkribierter mRNA aus Gehirn, Gehirngefäßen und Aorta von den vier verschiedenen experimentellen Gruppen - mit der speziellen Diät behandelte SHRSP und SHR (SHRSP+ und SHR+), sowie die beiden Kontrollgruppen (SHRSP- und SHR-) - wurden unterschiedliche Primerkombinationen von 9 oligo(dT) Primern, genannt T-Primer, 10 arbiträren, genannt P-Primer, und 18 sequenz-spezifischen Primern, genannt Q-Primer, verwendet. Im Methodenkapitel in Abbildung 3.1.-3. ist die Struktur dieser Primer im Einzelnen dargestellt. Die in der DD-PCR amplifizierten DNA-Fragmente der vier verschiedenen Ausgangsmaterialien, jeweils im Duplikat, wurden, wie im Methodenkapitel beschrieben, auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. In der Abbildung 4.1. ist ein Beispiel eines Bandenmusters von radioaktiv markierten Differential Display-PCR-Produkten dargestellt.

Unter Verwendung der T-, P- und Q-Primer für die DD-PCR konnten verschiedene Bandenmuster von bis zu 60 amplifizierten cDNA-Fragmenten in den zu vergleichenden Ausgangsmaterialien in der Größe von 100-1600 Basen dargestellt werden, wobei eine bestimmte Primerkombination jeweils ein spezifisches, reproduzierbares Bandenmuster ergab. Die Zahl der PCR-Fragmente, die während der Differential Display-PCR amplifiziert wurden, war abhängig von den gewählten Primern; einige Primer produzierten zahlreiche PCR-Fragmente (siehe Abbildung 4.1.), andere erzeugten ein relativ übersichtliches Bandenmuster mit weniger als 30 Banden. Obwohl die Basenfolge der Q-Primer jeweils eine nahezu hundertprozentige Übereinstimmung in ihrer spezifischen Sequenz zu Mitgliedern einer Genfamilie aufwies, funktionierten sie wie arbiträre Primer und führten während der DD-PCR zur Amplifizierung von cDNA-Fragmenten zu einer vergleichbaren Anzahl von 30-60 Banden, wie die P- und T-Primer. Bei hoher Reproduzierbarkeit und Sensitivität der verwendeten T-, P- und Q-Primer konnten 72 Unterschiede im Bandenmuster und demgemäß potentiell unterschiedlich exprimierte Sequenzen identifiziert werden.

Dabei wurden 30 unterschiedliche cDNA-Banden in Gehirn-mRNA, 13 unterschiedliche cDNA-Banden in mRNA aus Gehirngefäßen und 29 unterschiedliche cDNA-Banden in mRNA von den Aorten der Tiere identifiziert.

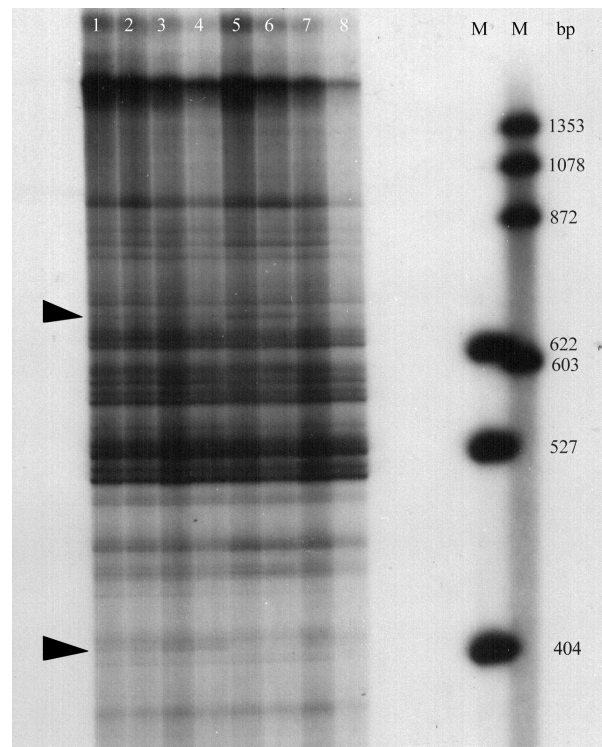


Abbildung 4.1.: Bandenmuster von radioaktiv markierten PCR-Differential Display-Produkten. Acht RNA Proben aus dem Gehirn von SHRSP, mit normalem Rat-chow gefüttert, (SHRSP-, Spur 1, 2), versus SHRSP auf natriumreicher, kaliumarmer Diät (SHRSP+, Spur 3, 4) und SHR auf natriumreicher, kaliumarmer Diät (SHR+, Spur 5, 6) versus SHR, mit normalem Futter ernährt, (SHR-, Reihe 7, 8) wurden unter Verwendung von Differential Display verglichen. Jeweils 0,5mg von Gehirn poly(A) RNA wurden für die reverse Transkriptase mit oligo(dT)₁₂ eingesetzt, um einzelsträngige cDNA zu synthetisieren. Eine Primerkombination aus einem arbiträren Primer (P-Primer) und einem oligo(dT) Primer (T-Primer) wurde für die DD-PCR unter Gebrauch von ³³P-a-dATP, wie beschrieben, verwendet. Die cDNA Fragmente wurden über ein Polyacrylamidgel nach Größe aufgetrennt. Zwei Banden, die potentiell unterschiedlich exprimierten Sequenzen entsprechen, sind jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Spur M stellt DNA-Größenstandards (in Basen) dar.

4.2. Unterschiede im Bandenmuster

Bei der Betrachtung von Tieren des Rattenstammes SHRSP, die entweder normales Trockenfutter erhielten oder mit der natriumreichen, kaliumarmen Diät behandelt wurden, fanden wir unterschiedliche Regulation von Genen in 9 verschiedenen Kategorien (3^2). Als Referenz-Genexpression definieren wir die Genexpression in SHR, die normales Futter erhielten. Abbildung 4.2. stellt die Unterschiede in Tieren der beiden SHRSP-Gruppen verglichen mit der Referenzgruppe dar. Wird die Zahl der Versuchsgruppen erhöht, so nimmt die Anzahl der Kategorien, in denen sich Unterschiede ergeben, dramatisch zu. In Abbildung 4.3. wurde die Gen-expression im Gehirn von Tieren des SHRSP-Stammes mit Tieren des SHR-Stammes verglichen, wobei Tiere beider Gruppen entweder normales Trockenfutter oder die natriumreiche, kaliumarme Diät erhielten, (SHRSP+, SHRSP-, SHR+ und SHR-). Zieht man auch quantitative Unterschiede in der Genexpression in Betracht, so steigt die Zahl der beobachteten Unterschiede weiter an.

	SHRSP+	SHRSP-
1	↑	0
2	↓	0
3	0	↑
4	0	↓
5	↑	↓
6	↓	↑
7	0	0
8	↑	↑
9	↓	↓

Abbildung 4.2.: Zwei unterschiedliche Behandlungen bei SHRSP, Haltung mit regulärem Futter (-) oder mit natriumreicher, kaliumarmer Diät (+), resultieren in verschiedenen Genexpressionsmustern innerhalb von 9 Genkategorien: 0=keine Veränderung, ↑=erhöhte Expression, ↓=verminderte Expression.

Unter Verwendung von mRNA Differential Display Methode zeigte sich im Vergleich der Bandenmuster von den verschiedenen Ausgangsmaterialien, mRNA aus dem Gehirn, Gehirngefäßen und Aorta von SHRSP+ und SHRSP- sowie SHR+ und SHR-, bei gleicher Primerkombination ein jeweils reproduzierbares Muster von differentiell exprimierten cDNAs (mit einigen wenigen Inkonsistenzen). Insgesamt konnten 72 Banden identifiziert werden, die sichtbare Intensitäts-Unterschiede aufwiesen und somit potentiell unterschiedlich exprimierte Gene repräsentierten/identifizieren.

DD-Gel	Bande	DD-Primer	Länge	SHRSP+ Gehirn	SHRSP- Gehirn	SHR+ Gehirn	SHR- Gehirn
1.	A.1.	P1/T8	240		—	—	—
	A.2.	P1/T8	200		—	—	—
	B.1.	P1/T9	450	—	—		
	B.2.	P1/T9	450	—	—		
	B.3.	P1/T9	310		—	—	—
	B.5.	P1/T9	200		—	—	—
	B.6.	P1/T9	180		—		
	C.1.	P2/T8	350	—			
	C.2.	P2/T8	400			—	
	D.1.	P2/T9	400	—	—	—	—

Abbildung 4.3.: Schematische Darstellung des DD-Bandenmuster für die vier verschiedenen experimentellen Gruppen: mRNA aus dem Gehirn von SHRSP+, SHRSP-, SHR+ und SHR-. 10 potentiell unterschiedlich exprimierte cDNA-Fragmente, erkennbar an der unterschiedlichen Intensität der Banden. Die prominenten Banden (—) zeigen diejenigen interessanten Banden an, die sich in Intensität deutlich von ihren Nachbarbanden unterscheiden, somit potentiell unterschiedlich exprimierte cDNA-Fragmente repräsentieren und daher für Reamplifizierung und Klonierung der cDNA aus dem Gel ausgeschnitten wurden. Die dünnen Banden (—) kennzeichnen das Vorhandensein von Banden in dem zu vergleichenden Ausgangsmaterial mit deutlich schwächerer Intensität. Neben der DD-Polyacrylamidgel-Identifikation und der Banden-Identifikation ist die für die DD-PCR verwendete Primerkombination und die jeweilige Länge der Bande in Basen angegeben.

In Abbildung 4.3.-7. sind alle 72 inter-Gruppen-unterschiedlichen Bandenmuster tabellarisch aufgeführt, welche potentiell unterschiedlich exprimierten cDNA-Fragmenten entsprechen. Dabei wird neben der verwendeten Primerkombination und der Länge der Banden in Basen das Bandenmuster verschiedener Ausgangsmaterialien aufgeführt, das Hinweise auf Unterschiede in der Genexpression gibt. Die jeweils prominenteste Bande wurde aus dem getrockneten Polyacrylamidgel ausgeschnitten und für weitere Untersuchungen zuerst mit der für die DD-PCR verwendeten Primerkombination reamplifiziert, kloniert und sequenziert. Publierte Differential Display Studien beschreiben mehrfach das Problem der Heterogenität der cDNA-Fragmente, die innerhalb einer Bande vorliegen; daher nahmen wir von einem direkten Sequenzieren der Bande Abstand und führten statt dessen die arbeitsintensive Reamplifizierung und Klonierung als Zwischenschritt durch, in der Hoffnung auf bessere Ergebnisse der dann folgenden Arbeitsschritte. Daraus ergaben sich Vorteile sowohl für das Sequenzieren als auch für die spätere Verwendung klonierter cDNA-Fragmente für Analysen zur Bestätigung unterschiedlicher Expressionsbefunde (z. B. aus Northern-Blot-Analysen und Rnase Protection Assays). Für jede reamplifizierte und

klonierte Bande wurden vier bis sechs Klone für die Sequenzierung ausgewählt. In der Tat fanden wir signifikante Heterogenität unter den aus einer Bande reamplifizierten und klonierten Sequenzen. Wenngleich die Inserts aus einer Bande alle die jeweilige Länge des aus dem Gel ausgeschnittenen cDNA-Fragmentes besaßen, so dass Verunreinigungen ausgeschlossen werden konnten, so war es a-priori unklar, welcher der aus dem entsprechenden Insert amplifizierten Klone für die Unterschiede der Intensität im Bandenmuster verantwortlich war. Aus den 72 identifizierten Banden resultierten so ca. 120 Klone, die weiteren Untersuchungen unterzogen werden mussten, um die wenigen wirklich unterschiedlich exprimierten cDNA-Fragmente identifizieren zu können. (Die ausgeschnittenen Banden erhielten eine bestimmte Kennziffer, wobei die erste Zahl bzw. Buchstabe Hinweise auf die verwendete Primerkombination gab, die zweite Zahl die jeweiligen Banden einer gleichen Primerkombination durchnumerierte. Zur Kennzeichnung der Klone wurden jeweils die Klone, isoliert aus einer Bande, mit der Kennziffer dieser Bande und einer dritten Zahl für den spezifischen Klon versehen.)

DD-Gel	Bande	DD-Primer	Länge	SHRSP+			SHRSP-		
				Gehirn	Gehirngefäße	Aorta	Gehirn	Gehirngefäße	Aorta
7.	1.1.	Q1/T8	800				—		
	1.2.	Q1/T8	550						—
	2.1.	Q5/T8	800		—				
8.	2.2.	Q5/T8	750				—		
	3.1.	Q8/T8	800						—
	4.1.	Q9b/T8	320	—					
10.	13.1.	Q7/T8	1000	—					
	5.1.	Q18a/Q18b	800				—		
	5.2.	Q18a/Q18b	450				—		
11.	6.1.	Q5/T5	1100		—				
	6.2.	Q5/T5	1100		—				
	7.1.	Q6/T5	350				—		
12.	8.1.	Q9a/T5	550	—					
	9.1.	Q12/T5	620					—	
	9.2.	Q12/T5	300	—					
13.	10.1.	P14/T5	1300			—			
	10.2.	P14/T5	900			—			
	10.3.	P14/T5	650			—			
14.	11.1.	P1/T7	600						—
	11.2.	P1/T7	600					—	
	11.3.	P1/T7	500		—				
	12.1.	P1/T5	600					—	
	14.1.	P3/T5	750	—					
15.	15.1.	Q8/T1	900			—		—	—
16.	16.1.	Q1/P6	500			—			
20.	17.1.	P3/T8	400					—	
	17.2.	P3/T8	400					—	
21.	18.1.	P4/T1	550						—
	19.1.	P4/T3	800		—	—		—	—
	19.2.	P4/T3	700			—			
22.	20.1.	P2/T8	1000			—			

Abbildung 4.4.: Schematische Darstellung des DD-Bandenmuster von mRNA aus dem Gehirn, Gehirngefäßen und Aorta von SHRSP+ versus SHRSP-. Die als prominent gekennzeichneten Banden (—) zeigen diejenigen Banden an, deren Intensität deutlich höher als die der Referenzbanden war, und die somit potentiell vermehrt exprimierte cDNA-Fragmente repräsentieren und daher für Reamplifizierung und Klonierung der cDNA aus dem Gel ausgeschnitten wurden. Die als vermindert signalstark gekennzeichneten Banden (—) identifizieren das Vorhandensein von Banden in dem zu vergleichenden Material mit deutlich schwächerer Intensität. Neben der DD-Polyacrylamidgel-Spur-ID und der Banden-ID ist die für die DD-PCR verwendete Primerkombination und die jeweilige Länge der Bande in Basen angegeben.

DD-Gel	Bande	DD-Primer	Länge	SHRSP+		SHRSP-	
				Gehirngefäße	Aorta	Gehirngefäße	Aorta
24.	21.1.	P6/T1	1200				—
	21.2.	P6/T1	800		—		
	21.3.	P6/T1	700		—		
	21.4.	P6/T1	500	—			—
	22.1.	P6/T4	900	—	—		—
	23.1.	P6/T6	500	—		—	—
	24.1.	P6/T8	700	—			
	25.1.	P7/T1	700				—
	26.1.	P7/T3	1100	—	—		—
	26.2.	P7/T3	600		—		
26.3.	P7/T3	550		—			

Abbildung 4.5.: Schematische Darstellung des DD-Bandenmuster von mRNA aus Gehirngefäßen und Aorta von SHRSP+ versus SHRSP-, Erläuterungen s. Abbildung 4.4.

DD-Gel	Bande	DD-Primer	Länge	SHRSP+		SHRSP-	
					Aorta		Aorta
31.	27.1.	P2/T8	400		—		
	27.2.	P2/T8	600				—
	27.3.	P2/T8	800				—
	28.1.	P2/T8	400		—		
	28.2.	P2/T8	400				—
	28.3.	P2/T8	450				—
	28.4.	P2/T8	500				—
	28.5.	P2/T8	500		—		
	28.6.	P2/T8	600				—

Abbildung 4.6.: Schematische Darstellung des DD-Bandenmuster von mRNA aus Aorta von SHRSP+ versus SHRSP-, Erläuterungen s. Abbildung 4.4.

DD-Gel	Bande	DD-Primer	Länge	SHRSP+		SHRSP-	
				Gehirn		Gehirn	
36.	29.1.	Q1/T1	720			—	
	30.1.	Q6/T3	530			—	
	31.1.	Q9a/T9	500			—	
37.	32.1.	P5/T4	700	—			
	33.1.	P5/T5	525			—	
	33.2.	P5/T5	500			—	
	34.1.	P5/T8	450			—	
38.	35.1.	P1/T5	650			—	
39.	36.1.	P3/T3	550	—			
	37.1.	P3/T8	500			—	
40.	38.1	Q11/T3	700	—			

Abbildung 4.7.: Schematische Darstellung des DD-Bandenmuster von mRNA aus Gehirn von SHRSP+ versus SHRSP-, Erläuterungen s. Abbildung 4.4.

4.3. Charakterisierung der isolierten DD-PCR-Produkte

4.3.1. Sequenzierung der klonierten DD-PCR-Produkte

Von der aus den Banden isolierten DNA wurden nach Reamplifizierung und Klonierung jeweils mindestens vier Klone zur Sequenzierung der Inserts ausgewählt. In der überwiegenden Zahl wurde festgestellt, dass unter den vier klonierten Produkten zumindest eines nicht identisch mit den anderen war. Um Klonierungsartefakte auszuschließen, wurde in den PCR-Fragmenten nach der Sequenz der für die DD-PCR verwendeten Primer gesucht und diese in nahezu 100% nachgewiesen. Alle PCR-Fragmente, in denen die Primersequenz eindeutig vorlag, wurden weiteren Untersuchungen unterzogen. Die Sequenzen wurden mit Gen-Datenbanken verglichen. In einigen wenigen Fällen zeigte sich eine nahezu hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenz zu bekannten Genen, sodass angenommen werden konnte, dass die isolierte Sequenz dieses Gen repräsentiert. Bei weniger starker Übereinstimmung zu bekannten Genen wurde besonders nach Homologien zu Genfamilien gesucht, um erste Hinweise auf Zugehörigkeit der isolierten Sequenz zu erhalten. Eine große Zahl an Sequenzen gehörte jedoch zu der Gruppe, bei der sich keine Übereinstimmung zu bekannten Genen oder Genfamilien in den Gen-Datenbanken finden ließ (NB: der experimentelle und bioinformatische Anteil der vorliegende Arbeit wurde vor Fertigstellung des Rattengenomsequenzierungsprojektes abgeschlossen). Einige davon könnten zu den noch nicht sequenzierten Bereichen von Genen oder Mitgliedern von Genfamilien gehören, andere bislang noch unbekannte Gene darstellen, obwohl dies durch das Sequenzieren größerer Abschnitte, die aus cDNA-Bibliotheken gewonnen werden könnten, bewiesen werden müsste. In den Fällen, in denen Homologien zu bekannten Genen festgestellt werden konnten, zeigte sich, dass viele der PCR-Fragmente, die durch DD-PCR entstanden waren, von dem 3'Ende der mRNA abstammten. Es wurden jedoch auch PCR-Fragmente isoliert, die nicht vom 3'Ende des jeweiligen Transskriptes stammten. Dabei wurde das Fragment nicht immer von den beiden in der DD-PCR verwendeten Primern, zum Beispiel einem Q- und einem T-Primer flankiert, siehe Abbildung 4.8., sondern mitunter nur vom Q-Primer, so dass die Sequenz dieses Primers an Anfang und Ende des PCR-Fragmentes darstellbar war.

ctgttgattc atatggaaat gggaaaaagc tgcataaaaa taccacggaa aaagta-
cagt gatgtaatga aagtactaaa ttcttccaat gagcatgtca

Primer Q6: caggggtgtcttccagattctcatc

ttagcattgg agcaagtttc agtacagaag cagattctcatctagctctgtatac**agaatg**
atggaattta tgaaacacag gccaacagtg ccaactggcca tcctagaaaa gtga-
caggtg caagttttgt ggtattcaat ggagctctaa aaacatcttc aggatttctt
gctaagtcca gcatagttga agatggctta atggtacaaa taactccaga gaccat-
gaat ggcttgcggc tagctttaag agaacagaaa gactttaaaa ttacatgtgg
gaaagttgat gcagtagacc tgagagaata cgtggatata tgctgggtag atgctgaa-
ga aaaaggaaacaaaggagttta

cctttttttttt = Primer T5

tcagttcagt ggatggaata tcattacaag gatttccaag tgaaaaaata
aaactggaag cagattttga aaccgatgag aagattgtaa aatgtaccga

Abbildung 4.8.: Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz des Gens KIAA0305, eines nicht näher charakterisierten Gens isoliert aus dem Gehirn des Homo sapiens (Gen KIAA0305, Accession-Nr. ab002303, CDS 249-4868, o. a. 3981-4540). Die beiden unterstrichenen Regionen repräsentieren die Sequenzen, an denen sich die DD-Primer Q6 und T7 anlagerten und ein ca. 350 Basen langes radioaktiv markiertes DD-PCR-Produkt amplifizierten. Im Vergleich des Differential Display-Bandenmuster, generiert aus mRNA aus dem Gehirn von (SHRSP+) und (SHRSP-), zeigten sich Intensitätsunterschiede in einer ca. 350 Basen langen Bande. Diese wurde aus dem Gel ausgeschnitten, das gewonnene PCR-Fragment 7.1. mit dem DD-Primerpaar reamplifiziert, kloniert, sequenziert und ein Blast-Untersuchung durchgeführt. Es zeigte sich eine nahezu hundertprozentige Übereinstimmung des ca. 350 Basen langen DD-PCR-Produktes zu der o. a. Sequenz, KIAA0305, die aus dem Gehirn des Menschen isoliert worden war.

4.3.2. Hybridisierung von Membranen mit transferierter DD-PCR-Produkten

Die Methode des Differential Display of mRNA wird als eine exzellente Methode zur Identifizierung von unterschiedlich exprimierten Genen beschrieben. Üblicherweise resultieren DD-PCRs mit über 100 Primerkombinationen allerdings in ca. 50-100 unterschiedlich dargestellten Banden, von denen sich über 50 % als falsch-positiv erweisen können. Das Problem der Heterogenität von PCR-Produkten innerhalb einer Bande, die aus dem DD-Gel eluiert werden, ist seit Beginn von Differential Display in diversen Veröffentlichungen beschrieben worden. Aus den 72 in dieser Arbeit identifizierten Banden resultierten ca. 120 unterschiedliche Klone. Daher ist eine schnelle und einfache Durchführung von Analysen zur Verifizierung einer unterschiedlichen Expression essentiell.

Um jene cDNA Fragmente einer Bande einfach und schnell identifizieren zu können, welche tatsächlich unterschiedlich exprimierte mRNAs entsprechen würden, wurden Membranen mit transferierten DD-PCR-Produkten hergestellt. Dabei wurden die PCR-Produkte aller 120 isolierten Klone im Triplikат auf jeweils zwei Filtermembranen transferiert und jeweils gegen die gleiche insgesamt Menge radioaktiv markierter Gehirn-RNA hybridisiert, die einerseits aus von der mit der speziellen Diät gefütterten SHRSP (SHRSP+) stammte, andererseits von der Gruppe der mit Standarddiät gefütterten Tiere (SHRSP-). Es wurden zwei Klone identifiziert, die große quantitative Unterschiede zwischen SHRSP+ und SHRSP- zeigten. Dabei waren die Signale des einen Klons, Klon 13.1.2., bei SHRSP+ sehr viel intensiver als bei SHRSP-, was auf eine höhere Expression dieser Sequenz bei SHRSP+ hinwies. Der andere Klon, Klon 17.2.1., zeigte hingegen bei SHRSP- ein deutlicheres Signal, was auf eine höhere Expression dieser Sequenz bei SHRSP- hindeutet. Das dem Klon 13.1.2. entsprechende Gen scheint daher unter der Schlaganfall-fördernden Diät vermehrt transkribiert zu werden, während das dem Klon 17.2.1. entsprechende Gen umgekehrt in Anwesenheit dieser Diät vermindert exprimiert zu sein scheint. Mit Hilfe von Houskeeping-Gen-Expressions-normalisiertem RNase Protection Assay wurde jeweils die unterschiedliche Expression der Klone bestätigt. Eine Reihe von weiteren Klonen, die Unterschiede in ihrer Intensität vermuten ließen, wurden für Northern Blot Analysen und RNase Protection Assays ausgewählt.

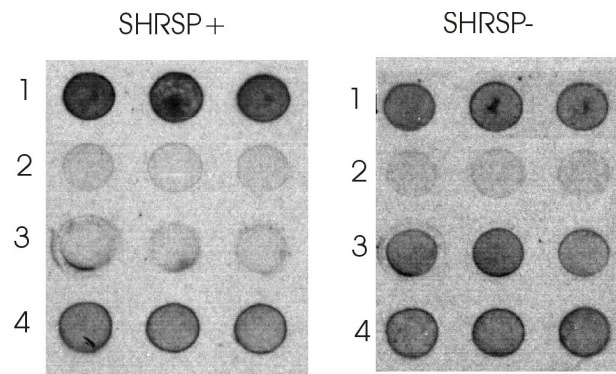


Abbildung 4.9.: Screening von cDNA-Fragmenten, die aus den differentiell präsenten Banden der Differential Display-Gele nach Reamplifizierung und Klonierung isoliert wurden. Die PCR-Produkte der klonierten cDNA-Fragmente wurden jeweils dreifach auf zwei Membranen transferiert und mit radioaktiv markierter cDNA von identischen Mengen von zwei mRNA Proben, mRNA aus dem Gehirn von SHRSP, die die Schlaganfall induzierende Diät erhielten (SHRSP+) und mRNA aus dem Gehirn von SHRSP, die normales Trockenfutter erhielten (SHRSP-) hybridisiert. Erste Reihe: rat mRNA für thyrotropin releasing hormone receptor (1), dritte Reihe: unbekannte Sequenz (3), zweite und vierte Reihe: negative Kontrollen (2, 4). Die cDNA-Fragmente in Reihe 1 und 3 zeigen quantitative Unterschiede zwischen SHRSP+ und SHRSP-. Die negativen Kontrollen in Reihe 2 und 4, cDNA-Fragmente mit gleich hoher Expression in beiden Geweben, ergaben Signale gleicher Intensität der jeweils dreifach aufgetragenen PCR-Produkte für beide cDNA-Proben und wiesen so auf gleich hohe Konzentrationen der markierten Proben hin.

4.3.3. Hybridisierung von Membranen mit menschlichen cDNA-Fragmenten

Die Hybridisierung von Membranen mit transferierten menschlichen cDNA-Fragmenten gegen radioaktiv markierte RNA aus Gehirn der SHRSP+ bzw. der SHRSP- Gruppe ergab keine signifikanten Befunde.

4.3.4. Northern Blot Analyse ausgewählter DD-PCR-Produkte

Anhand der Hybridisierung der Membranen mit transferierten DD-PCR-Produkten konnten einige cDNA-Fragmente identifiziert werden, die Unterschiede in ihrer Expression im Gehirn von SHRSP+ versus SHRSP- vermuten ließen und die für anschließende Northern Blot Analysen ausgewählt wurden. Dabei wurde jeweils dasjenige cDNA-Fragment, das nach Sequenzierung die größte Homologie unter den Klonen einer Bande aufwies, als Sonde für eine Northern Blot Analyse ausgewählt, um zu überprüfen, ob das dem Klon entsprechende Gen tatsächlich unterschiedlich exprimiert war, und nicht nur eine nicht differentiell exprimierte Sequenz darstellte, die zufällig aufgrund ihrer Länge in der ausgeschnittenen Bande im DD-Gel ko-migrierte. Es wurde darauf geachtet, dass die für die Northern Blot Analyse ausgewählten cDNA-Fragmente keine repetitiven Sequenzen enthielten, um eindeutige Ergebnisse erhalten zu können.

In Abbildung 4.10. sind die für eine Northern Blot Analyse ausgewählten Klone tabellarisch aufgelistet. Für keinen der Klone, die meßbare Signale auf dem Northern Blot zeigten, konnte eine unterschiedliche Expression bestätigt werden. Für eine Reihe von Klonen, die für die Northern Blot Analyse ausgewählt wurden, konnte keinerlei Signal gefunden werden; möglicherweise weil die Menge an exprimierter RNA zu gering war, um diese Sequenz mit einem Northern Blot zu detektieren.

Klon	Bande	Ergebnis der Northern Blot Analyse
A.2.2.	SHRSP-B	Differentielle Expression nicht bestätigt
B.6.4.	SHRSP-B	nicht detektierbar
D.1.2.	SHR+B	Differentielle Expression nicht bestätigt
1.1.4.	SHRSP-B	Differentielle Expression nicht bestätigt
2.1.1.	SHRSP+V	nicht detektierbar
2.1.4.	SHRSP+V	nicht detektierbar
8.1.2./3./4.	SHRSP+B	Differentielle Expression nicht bestätigt
9.1.4.	SHRSP-V	nicht detektierbar
12.1.2.	SHRSP-V	nicht detektierbar
13.1.1./3./4.	SHRSP+B	Differentielle Expression nicht bestätigt

Abbildung 4.10.: Auflistung aller für eine Northern Blot Analyse ausgewählten Klone sowie Herkunft der DD-Bande, aus der das cDNA-Fragment isoliert, reamplifiziert und kloniert wurde. SHRSP = zum Schlaganfall neigende spontan hypertensive Ratte, SHR = spontan hypertensive Ratte, + = natriumreiche, kaliumarme Diät, - = normales Futter, B = Gehirn, V = Gehirngefäße, A = Aorta.

4.3.5. Expressionsanalyse mit RNase Protection Assay

Im Vergleich zur Northern Blot Analyse ist der RNase Protection Assay eine wesentlich sensitive Methode, um Unterschiede in der Genexpression an zu vergleichenden RNA-Proben zu detektieren und zu quantifizieren. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass nur geringe Mengen an mRNA benötigt werden.

Von den auf zwei Nylon-Membranen transferierten DD-PCR-Fragmenten wurden nach Hybridisierung gegen die zu vergleichenden RNA-Proben von SHRSP+ und SHRSP- eine Gruppe von 21 Fragmenten identifiziert, welche Unterschiede in der Intensität zwischen SHRSP+ und SHRSP- erkennen ließen. Diese 21 Fragmente sind in Abbildung 4.9. eingehender beschrieben, und die Ergebnisse der Suche nach Homologien zu bekannten Genen aufgeführt. Interessante Ergebnisse zeigte z. B. Klon 2.1.1., dessen Sequenz hohe Homologie zu einem ZinkFinger-Motiv aufwies. Proteine mit konservierten ZinkFinger-Motiven repräsentieren eine Gruppe von DNA-bindenden Proteinen, die eine fundamentale Rolle in der Regulation von Genexpression spielen und die teilweise bei hereditären und malignen Erkrankungen im Menschen involviert sind.

Von dieser großen Anzahl potentiell unterschiedlich exprimierter Sequenzen konnten zwei Sequenzen identifiziert werden, die auch unter Verwendung des RNase Protection Assays einen deutlichen Unterschied in der Expression in den Gehirnen der zu vergleichenden Tiergruppen zeigten. Vergleiche beider Sequenzen mit Gen-Datenbanken ergaben, dass der eine Klon die 3'UTR der mRNA für den TRH-Rezeptor der Ratte, den Thyreotropin Releasing Hormon-Rezeptor, repräsentiert. Der zweite Klon zeigte keine Homologie zu bekannten Genen in Gen-Datenbanken und stellt so eine bislang unbekannte Sequenz dar. Sie konnte mit Hilfe eines Somatic Cell Hybrid Panels auf Chromosom 4 der Ratte lokalisiert werden.

Klon	Bande	GenBank Accession-Nr.	Identität/Homologie
1.1.4.	SHRSP-B	m73049	R. alpha-Internexin (Gehirn)
2.1.1.	SHRSP+V	s52507	H. Zink Finger-Motif=ZNF
5.2.4.	SHRSP-B	u59672	R. 5HT3-Rezeptor
7.1.1.	SHRSP-B	ab002303	H. KIAA0305-Gen (Gehirn)
10.3.1.	SHRSP+A	u19511	R. Initiationsfaktor 2Be
13.1.2.	SHRSP+B	d17469	R. TRH-Rezeptor
14.1.1.	SHRSP+B	u38810	H. mab-21 (Gehirn)
14.1.4.	SHRSP+B	u49240	H. symplekin
17.2.1.	SHRSP+A	-	Unbekannt
21.1.1.	SHRSP-A	-	Unbekannt
28.2.3.	SHRSP-A	-	Unbekannt
28.4.1.	Shrsp-A	-	Unbekannt
32.1.1.	SHRSP+B	u43189	H. NERF (Niere, Leber, Gehirn)
33.1.3.	SHRSP-B	y12319	R. RSCA Typ 3-Gen
33.2.1.	SHRSP-B	af009326	M. orphan nuclear hormone receptor
33.2.4.	SHRSP-B	m24105	R. VAMP-2-Gen
36.1.1.	SHRSP+B	u73525	R. Thioredoxin
36.1.4.	SHRSP+B	d14908	R. PACAP-Rezeptor (Gehirn)
38.1.4.	SHRSP+B	m64429	M. B-raf Onkogen
A.2.2.	SHRSP-B	m19312	R. Calmodulin (Gehirn)
D.1.1.	SHR+B	118889	R. Calnexin, Ca 2+-bindendes Protein

Abbildung 4.11.: Auflistung der 21 potentiell unterschiedlich exprimierten Sequenzen zur Verifizierung der unterschiedlichen Genexpression durch RNase Protection Assay. Auswahl erfolgte nach erkennbaren Unterschieden in der Intensität der auf jeweils zwei Membranen transferierten PCR-Fragmenten der Klone nach Hybridisierung mit der jeweiligen Probe SHRSP+ und SHRSP-. Angegeben sind neben der Kennziffer des ausgewählten Klons und der DD-Bande, aus der aufgrund unterschiedlicher Intensität der zu vergleichenden Banden die cDNA zur Reamplifizierung und Klonierung isoliert wurde, sowie Ergebnisse von Vergleichen zu bekannten Genen in Gen-Datenbanken mit der Accession-Nummer.

B = Gehirn, V = Gehirngefäße, A = Aorta, H = human, R = rat, M = mouse.

5HT = Neurotransmitter Serotonin; KIAA0305 = nicht weiter identifiziertes Gen aus Gehirn des Menschen; TRH = Thyreotropin Releasing Hormon; mab-21 = Zelltod regulierendes Protein; NERF = new Ets-related factor, r = Transkriptionsfaktor; RSCA = rat spinocerebellar ataxia; VAMP = vesicle associated membrane protein; PACAP = pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, Neuropeptid der VIP (vasoactive intestinal peptide) –Familie zur Regulierung der Freisetzung u. a. von Wachstumshormonen im Hypothalamus.

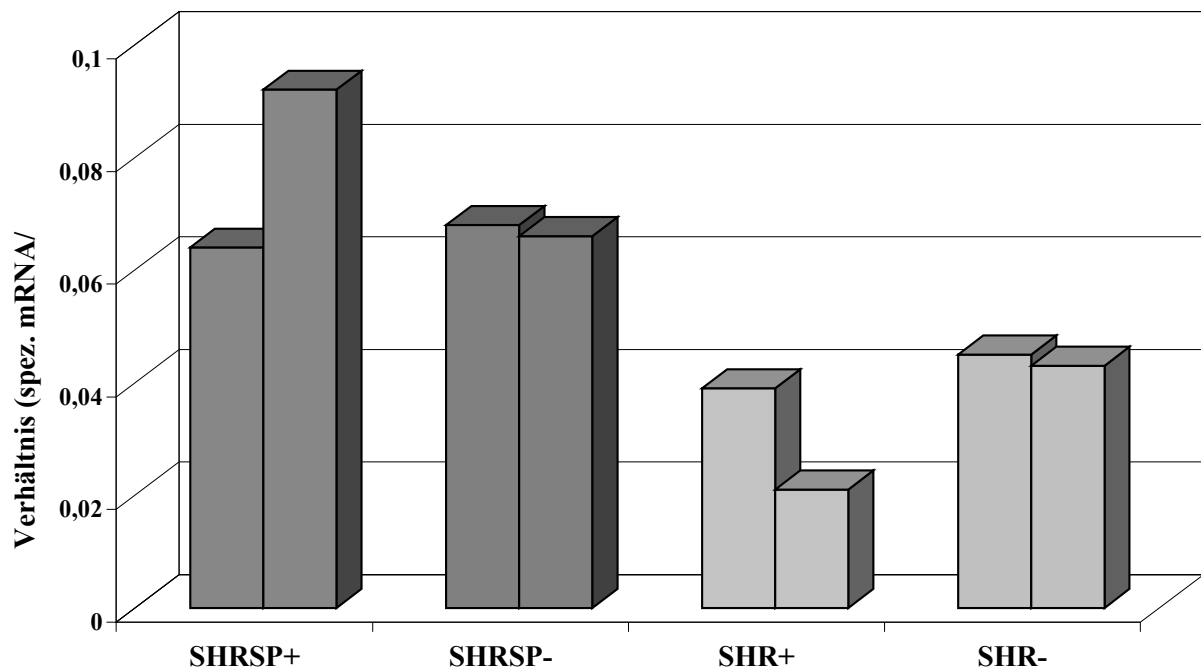


Abbildung 4.12.: Ergebnis des Housekeeping-Gen-normalisierten RPA. Untersuchungen in Gen-Datenbanken ergaben, dass das DD-Produkt von Klon 13.1.2. die 3'UTR der Rat mRNA für den TRH-Rezeptor, Thyreotropin Releasing Hormon-Rezeptor, repräsentiert. Jede Säule stellt ein normalisiertes Expressions-Level eines Tieres dar.

Die Menge an mRNA für den TRH-Rezeptor im Gehirn von SHRSP- waren fast doppelt so hoch wie im Gehirn von SHR, sowohl SHR- als auch SHR+, und zeigten in einem von zwei analysierten Tieren höhere Expression bei der SHRSP+, dargestellt in Abbildung 4.12.

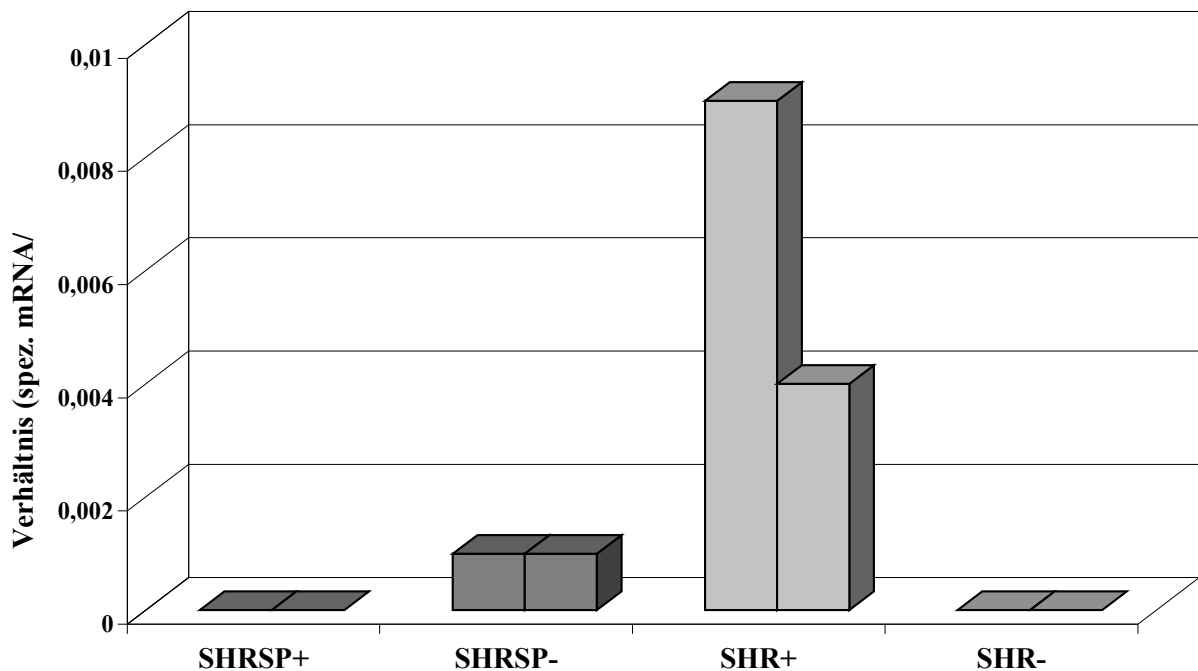


Abbildung 4.13.: Ergebnis des Housekeeping-Gen-normalisierten RPA. Das DD-Produkt von Klon 17.2.1. ist eine neue, nicht charakterisierte Sequenz, es lassen sich keine Homologien zu bekannten Sequenzen in Gen-Datenbanken finden. Jede Säule stellt ein normalisiertes Expressions-Level eines Tieres dar.

Das zur Zeit noch unbekannte Gen, das dem Klon 17.2.1 entspricht, konnte im Gehirn von SHR- nicht nachgewiesen werden, war jedoch nach Fütterung von SHR mit der schlaganfallinduzierenden Diät (SHR+) exprimiert. Während geringe Mengen dieser unbekanntes mRNA im Gehirn von SHRSP- gefunden wurden, konnten jedoch nicht in SHRSP+ nachgewiesen werden, dargestellt in Abbildung 4.13.

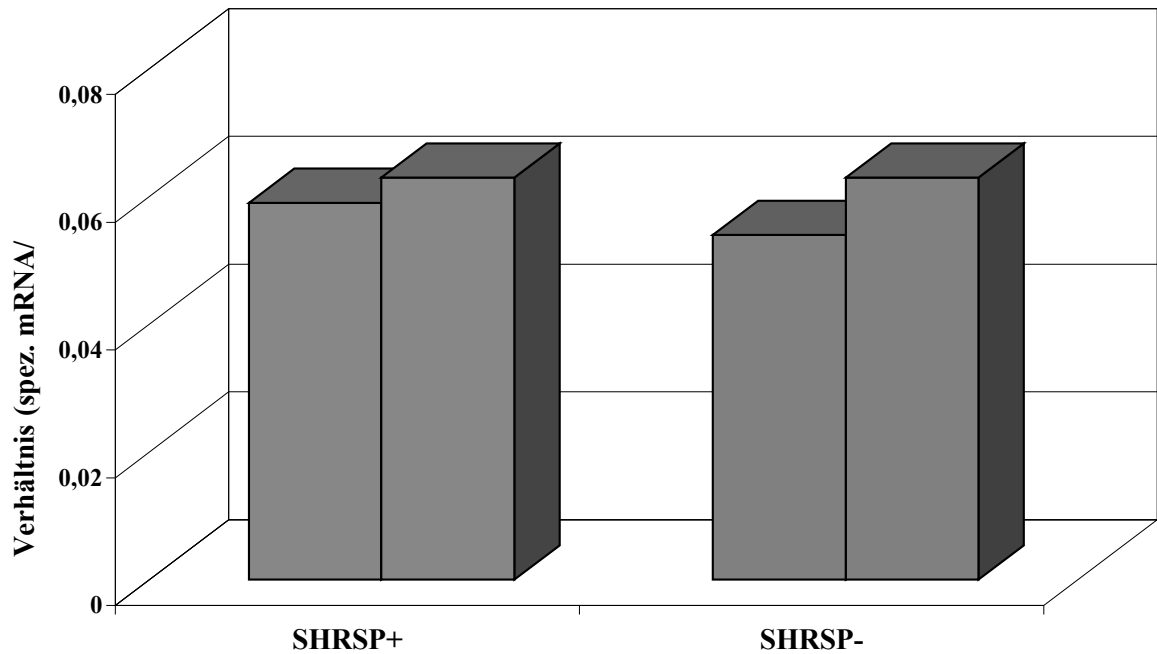


Abbildung 4.14.: Ergebnis des Housekeeping-Gen-normalisierten RPA. Für das DD-Produkt von Klon 7.1.1. konnte kein Unterschied in der Expression im Gehirn von SHRSP+ im Vergleich zu SHRSP- nachgewiesen werden. Gen-Datenbank-Untersuchungen ergaben, dass diese Sequenz eine nahezu hundertprozentige Übereinstimmung mit einer aus dem Gehirn des Menschen isolierten Sequenz KIAA0305 zeigt. Jede Säule stellt ein normalisiertes Expressions-Level eines Tieres dar.

Für die Sequenz des Klons 7.1.1., die ebenfalls im Gehirn des Menschen exprimiert wird, KIAA0305, konnte kein Unterschied in der Expression detektiert werden. Mit Hilfe des RNase Protection Assays wurden gleich hohe Level dieser Sequenz im Gehirn von SHRSP+ in Vergleich zu SHRSP- nachgewiesen, dargestellt in Abbildung 4.14. Für alle weiteren in Abbildung 4.11. aufgelisteten DD-Produkte konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Expression dieser Sequenzen im Gehirn der zu vergleichenden Ratten festgestellt werden.

5. Diskussion

5.1. Genetischer Hintergrund von Schlaganfall im Tiermodell SHRSP

Um Unterschiede in der Genexpression aufzudecken, die im Zusammenhang mit der Entwicklung des Schlaganfalls bei SHRSP stehen, wurden zwei eng verwandte Ratteninzuchtstämme, die zum Schlaganfall neigende spontan hypertensive Ratte (SHRSP) und die spontan hypertensive Ratte (SHR) verwendet. Beide Rattenstämme entwickeln im Alter von fünf Wochen eine Hypertonie, nach Erhalt einer natriumreichen, kaliumarmen Diät treten bei SHRSP, jedoch nicht bei SHR, regelmäßig Schlaganfälle auf. Durch selektive Inzucht wurde der hypertensive Phänotyp sowohl bei SHRSP als auch SHR als vererbbar etabliert, und gleichermaßen das Auftreten von Schlaganfall (allerdings abhängig von Erhalt der speziellen Diät) bei SHRSP.

Frühere Untersuchungen an diesem Rattenstamm, unter Verwendung einer Kreuzung zwischen SHR und SHRSP und moderner molekulargenetischer Methoden, konnten drei Regionen im Erbgut der Ratte einkreisen, die zu einem Teil bei der Entstehung des Schlaganfalls beteiligt sind (Rubattu *et al.*, 1996). Die Ausdehnung dieser Regionen lässt jedoch bislang noch keine weiteren Aussagen über die beteiligten Gene zu, grenzt aber die möglichen kausalen Gene auf jene ein, die in dieser Region liegen. Diese Ergebnisse, dass einige genetische Loci die Prädisposition für Schlaganfall beeinflussen, demonstrieren die Bedeutung von SHRSP als ein geeignetes Tiermodell für diese komplexe, polygenetische und multifaktorielle Erkrankung.

Ziel der gegenwärtigen Studie war die Identifizierung von Genen deren relative Expression im Gehirn, den Gehirngefäßen und der Aorta der SHRSP nach Erhalt einer natriumreichen, kaliumarmen Diät differentiell reguliert wird, was auf eine Beteiligung dieser Gene an der Pathogenese des Schlaganfalls in diesen Tieren hinwies. Dazu wurde eine systematische Analyse der Genexpression im Gehirn, den Gehirngefäßen und der Aorta von SHRSP und SHR durchgeführt, die jeweils entweder die spezielle Diät oder normales Futter erhielten.

5.2. Vor- und Nachteile von Differential Display of mRNA

Die Möglichkeiten, Gene zu identifizieren, die in verschiedenen Zelltypen oder Geweben unter bestimmten Bedingungen und zu bestimmten Zeiten unterschiedlich exprimiert werden, ist mit der Entwicklung von auf PCR-basierenden Methoden unter Verwendung von arbiträren Primern

wie Differential Display of mRNA bei der Aufklärung komplexer Fragestellungen in den vergangenen zehn bis fünfzehn Jahren erheblich gewachsen. Diese Methoden sind erfolgreich für die Analyse von mRNAs aus zu vergleichenden Geweben eingesetzt worden, um unterschiedlich exprimierte Gene zu identifizieren, die die biologischen Prozesse in der Zelle oder dem Gewebe potentiell nachhaltig beeinflussen. Viele fundamentale biologische Prozesse in Zellen bzw. Geweben hängen maßgeblich von dem Programm der exprimierten Gene dieses Zelltyps bzw. Gewebes ab und können durch Veränderung der Expression bestimmter Gene in diesem Zelltyp oder Gewebe verändert werden. Die auf PCR-basierenden Methoden, unter Verwendung von arbiträren Primern (Liang and Pardee, 1992; McClelland *et al.*, 1994), zeigen substantielle Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren wie Differential Hybridization und Subtractive Library Construction (Sargent and Dawid, 1983). Ein großer Vorteil liegt darin, dass durch den simultanen Vergleich von mehreren verschiedenen Ausgangsmaterialien viele unterschiedlich exprimierte Gen-Fragmente identifiziert werden und dabei sowohl Über- als auch Unterregulationen von exprimierten Genen detektiert werden können. Frühere Strategien ließen nur einen Vergleich von zwei RNA-Proben zu, wobei diese jeweils nur in eine Richtung verglichen werden konnten. Die auf PCR-basierende Methode stellt sich so im Gegensatz zu früheren Strategien als äußerst flexibel und effizient dar. Ein weiterer Vorteil liegt in der Notwendigkeit von nur geringen Mengen von RNA als Ausgangsmaterial, wobei jedoch zu bedenken ist, dass für die Bestätigung potentiell unterschiedlich exprimierter Sequenzen als wirklich unterschiedlich exprimierte Gene eine zusätzliche Menge an RNA für spätere Northern Blot Analysen oder RNase Protection Assays zur Verfügung stehen muss. Unter anderem wird die Methode als wenig arbeitsintensiv sowie einfach und schnell in ihrer Durchführung beschrieben, so dass sie sich in kürzester Zeit zur Methode der Wahl bei der Suche und Isolierung von unterschiedlich exprimierten Genen in zu vergleichenden Geweben entwickelte.

Die Methode Differential Display of mRNA wurde erstmals von Peng Liang und Arthur Pardee im Jahre 1992 als eine auf einer PCR-basierenden Methode zum Vergleich von Genexpressionen zweier unterschiedlicher Gewebe beschrieben (Liang and Pardee, 1992). Die hier verwendete Vorgehensweise zur Isolierung und Identifizierung von Genen, die in der zum Schlaganfall neigenden spontan hypertensiven Ratte (SHRSP) unter permissiven Bedingungen, verglichen mit drei Kontrollen, unterschiedlich exprimiert sind, basiert auf der von McClelland weiterentwickelten Strategie von 1994 zur Identifizierung von Genen, deren Expression durch bestimmte experimentelle Bedingungen verändert wird (McClelland *et al.*, 1994). Die Forschungsarbeit konzentrierte sich auf die Identifizierung von cDNA-Fragmenten im Gehirn, den Gehirngefäßen und

der Aorta von SHRSP und SHR, die unter normaler bzw. einer natriumreichen, kaliumarmen Diät gehalten wurden.

5.2.1. Differential Display-PCR

Die verwendeten Primer wurden aufgrund von bestimmten Kriterien als Primer für die Differential Display-PCR ausgewählt. Die T-Primer weisen eine einheitliche Struktur von 5'(N)₁₉(T)₉NM (N = A, G, C oder T; M = A, G oder C) auf und stellen aufgrund ihrer Länge von 30 Basen optimale Primer für die DD-PCR dar, wie sie für hohe Spezifität während der 25 Zyklen PCR bei hoher Anlagerungstemperatur benötigt werden. Außerdem wird durch nur 9 (dT) im Gegensatz zu 11 (dT), wie bei Liang, der Einfluss der folgenden zwei Basen NM am 3'Ende erhöht, was größte Bedeutung bei der Anlagerung des Primers an die zu amplifizierende Sequenz besitzt.

Am 3'Ende der arbiträren P-Primer befinden sich mehrere Basen, die gemeinschaftliche Motive von Sequenzen, die in codierenden Regionen von eukaryotischen mRNAs gefunden wurden, bevorzugen. Die zusätzlichen Basen am 5'Ende werden, wie schon beschrieben, für die 25 Zyklen mit hoher Anlagerungstemperatur benötigt. Ihr Design lässt die Bildung von stabilen Sekundärstrukturen nicht zu.

Q-Primer wurden als sequenzspezifische Primer mit Hilfe von publizierten cDNA Sequenzen angefertigt, die für Gene codieren, die bestimmten Genfamilien angehören und in der Zelle wichtige Funktionen übernehmen. Hierzu zählen Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren, sowie bestimmte Enzyme und Rezeptoren. Aufgrund ihrer Sequenz, die unter den Mitgliedern einer Genfamilie konserviert ist, lagern sie sich so besonders an diese Gruppe von Genen einer Genfamilie an und favorisieren so die Amplifizierung dieser Gene während der DD-PCR (Stone and Wharton, 1994).

Während des ersten Zyklus der DD-PCR, bei niedriger Anlagerungstemperatur, lagern sich die ausgewählten Primer in den verschiedenen Ausgangsmaterialien mit der gleichen Wahrscheinlichkeit willkürlich an verschiedenen Orten in der cDNA an. Liegt ein Unterschied in der Menge einer bestimmten cDNA, die auf unterschiedlichen mRNA-Spiegel in den Ausgangsmaterialien beruht, vor, so ergeben sich Unterschiede im Bandenmuster dieses Genes. T-Primer bestanden aus 30 Basen, P-Primer aus 25 Basen und Q-Primer aus 23-25 Basen. Diese Primer waren somit sehr viel länger als die Primer, die in früheren Methoden verwendet wurden. Liang beschrieb den Gebrauch von T₁₁CA in Kombination mit 10 Basen langen arbiträren Primern, wobei unter PCR-

Parametern bei 94 °C während 30 s, 42 °C Anlagerungstemperatur während 1 min und 30 s dauernder Elongationszeit bei 72 °C und 40 Zyklen für diese Primer optimale Bedingungen geschaffen wurden, um hohe Menge an cDNA Fragmenten zu amplifizieren. Unter diesen Bedingungen erhielt Liang ca. 75-100 Banden für eine durchgeführte DD-PCR und errechnete die Anzahl der Primerkombinationen, die nötig wären, um die ca. 15.000 mRNAs einer Zelle als Banden sichtbar zu machen, auf 240 (Liang and Pardee, 1992). Diese niedrig stringenten PCR-Bedingungen lieferten jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit einige fälschlich als unterschiedlich exprimiert identifizierte Banden (Zhao *et al.*, 1995).

McClelland entwickelte diese Methode weiter, indem er bis zu 18 Basen lange arbiträre Primer verwendete und für die DD-PCR einen Zyklus bei 94 °C während 5 min, 40 °C während 5 min und 72 °C während 5 min gefolgt von 40 Zyklen bei 94 °C während 1 min, einer Anlagerungstemperatur bei 60 °C während 1 min und Elongationstemperatur bei 72 °C während 2 min wählte. So wurde die Spezifität dadurch erhöht, dass sich nur im ersten Zyklus der DD-PCR bei niedriger Anlagerungstemperatur die Primer zufällig bei nicht hundertprozentiger Übereinstimmung an die cDNA anlagerten, wohingegen in den folgenden, hoch stringenten Zyklen nur diese Fragmente amplifiziert wurden. Neben der hohen Spezifität wurde ein geringeres störendes Hintergrund-Rauschen bei großer Reproduzierbarkeit erzielt (Zhao *et al.*, 1995). Die hier angewandten DD-PCR-Parameter, ein niedrig stringenter Zyklus gefolgt von hoch stringenten Zyklen, wurden aus diesem Grund anhand der Methode von McClelland gewählt, wobei die auf den ersten Zyklus folgenden 40 Zyklen auf 25 vermindert wurden, um kleine Unterschiede in der Expression nicht durch Überamplifizierung oder Sättigung zu verwischen. Durch Reduktion der Anzahl der Zyklen konnte gezeigt werden, dass die Zahl der unterschiedlich exprimierten Banden pro DD-PCR zunahm (Guimaraes *et al.* 1995). Diese semi-quantitative Analyse unterstützt das Auffinden interessanter Banden für weitere Untersuchungen.

5.2.2. Heterogenität der DD-Banden

Für die Untersuchungen wurde mRNA aus Gehirn, Gehirngefäßen und Aorta von mit der Schlaganfall induzierenden Diät behandelten SHRSP und SHR (SHRSP+ und SHR+) sowie mit normalem Trockenfutter ernährte SHRSP und SHR (SHRSP- und SHR-) extrahiert. Nach reverser Transkription der gesamten vorliegenden mRNA der verschiedenen Ausgangsmaterialien unter Verwendung von oligo(dT) zu cDNA wurden aus der cDNA der zu vergleichenden Proben

mit verschiedenen Primerkombinationen unter bestimmten DD-PCR-Parametern, wie im Methodenkapitel beschrieben, cDNA-Fragmente amplifiziert, die auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen ein bestimmtes Bandenmuster ergaben. Der Vergleich der Bandenmuster erlaubte die Identifizierung von unterschiedlich exprimierten Fragmenten. Für die Differential Display-PCR standen insgesamt 37 Primer zur Verfügung, 10 arbiträre P-Primer, 9 oligo(dT)-Primer und 18 sequenzspezifische Q-Primer, von denen jeweils zwei miteinander in über 100 DD-PCR-Reaktionen kombiniert wurden. Es wurden so bis zu 60 Banden pro DD-PCR produziert, die jeweils auf den Polyacrylamidgelen der Größe (Länge) nach aufgetrennt und separiert wurden. Die meisten Banden, die auf den Röntgenfilmen dargestellt waren, zeigten in den zu vergleichenden Reihen von SHRSP+, SHRSP-, SHR+ und SHR- dieselbe Intensität. In 72 Fällen wurden deutlich erkennbare Unterschiede in der Intensität der dargestellten Banden detektiert. Im Einzelnen wurden 30 unterschiedliche cDNA-Banden von mRNA extrahiert aus Gehirn der Ratten, 13 unterschiedliche cDNA-Banden von mRNA extrahiert aus den Gehirngefäßen und 29 unterschiedliche cDNA-Banden von mRNA extrahiert aus den Aorten der Tiere identifiziert. Die cDNA-Fragmente dieser 72 Banden wurden reamplifiziert und kloniert, 4-6 Klone einer Bande wurden arbiträr für weitere Untersuchungen ausgewählt. Dabei wurde eine enorme Heterogenität der Klone innerhalb der einzelnen Banden festgestellt, wie es schon von den Erstbeschreibern erwähnt und in vielen weiteren Veröffentlichungen kritisiert wurde (Mou *et al.*, 1994; Blanchard and Cousins, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Eine Rolle spielte dabei die Größe der ausgeschnittenen Bande und die Qualität des Polyacrylamidgels in Hinsicht auf die aufgetrennten Banden. Bei Überlagerungen der einzelnen Banden war die Wahrscheinlichkeit hoch, neben dem cDNA-Fragment der differentiell exprimierten mRNA auch mitgewanderte Fragmente nicht unterschiedlich exprimierter mRNAs zu isolieren. Frühere Untersuchungen zeigten, dass kein Bereich des DD-Gels ganz frei war von solchen zusätzlichen PCR-Produkten, die nicht das interessante unterschiedlich amplifizierte Produkt repräsentierten (McClelland *et al.*, 1995). Aus diesem Grund war die direkte Verwendung der reamplifizierten Bande ohne Klonierung für weitere Untersuchungen, wie von den Erstbeschreibern empfohlen, problematisch, da ein Mix aus verschiedenen cDNA-Fragmenten vorlag und damit eine Verifizierung durch Northern Blot Analyse oder RNase Protection Assay direkt nicht möglich war. Die Klonierung der reamplifizierten cDNA-Fragmente war daher unabdingbar, brachte aber weitere Probleme mit sich, da je nach Grad der Kontaminierung aus der großen Zahl an klonierten Fragmenten die jeweils richtigen, wirklich unterschiedlich exprimierten identifiziert werden mussten. Ein Screening aller klonierten Fragmente durch Northern Blot Analyse oder RNase Protection Assay war nicht durchführbar, da die Menge der zur Verfügung stehenden mRNA limitiert war. Es wurde so nach Strategien gesucht,

um das korrekte PCR-Produkt, die wirklich unterschiedlich exprimierte Sequenz, unter den vielen falsch-positiven PCR-Produkten für weitere Untersuchungen auszuwählen.

Der oft gelobte Vorteil von Differential Display, eine wenig arbeitsintensive Methode zur Identifizierung unterschiedlich exprimierter Gene in Geweben unter verschiedenen Bedingungen bei Vorliegen von geringen Mengen an mRNA als Ausgangsmaterial darzustellen, trifft daher nur bedingt zu, und vernachlässigt den Arbeitsaufwand und die Komplexität des Aufarbeitens der falsch positiven Subklone/Ergebnisse.

5.2.3. Verifizierung potentiell unterschiedlich exprimierter Sequenzen

Nach Ausschneiden der Bande aus dem Differential Display-Gel, die das unterschiedlich amplifizierte Produkt enthält, Reamplifizierung mit der DD-Primerkombination und Klonierung sind unterschiedlichste Verfahren zur Verifizierung beschrieben worden. Durch Southern Blotting eines Re-Runs des Differential Display Gels und anschließender Hybridisierung mit dem Klon kann eine Bestätigung des richtigen Klons erzielt werden. Eine andere Möglichkeit besteht in der Durchführung von quantitativen reverse transcription-PCRs. Um jedoch viele PCR-Produkte simultan in kurzer Zeit zu testen, erweist sich die Verwendung von auf jeweils zwei Membranen transferierte PCR-Produkte und deren Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA von den zwei zu vergleichenden RNA-Proben als äußerst effizient (Chalifour *et al.*, 1994). Hierdurch kann bei hohem Durchfluss, hoher Sensitivität und Genauigkeit schnell eine Selektion der Klone erreicht werden und anschließend gezielt mit Northern Blot Analysen oder RNase Protection Assays die quantitative Verifizierung durchgeführt werden.

Die aus den 72 Banden reamplifizierten und klonierten cDNA-Fragmente wurden auf zwei Nylonmembranen, wie im Methodenkapitel beschrieben, transferiert und jeweils mit der radioaktiv markierten Sonde von SHRSP+ und SHRSP- hybridisiert. Beim Vergleich der einzelnen Signale wurden alle die Klone mit sichtbaren Unterschieden in der Intensität der Signale für folgende Northern Blot Analysen und RNase Protection Assays ausgewählt.

Aus früheren Arbeiten mit Differential Display war bekannt, dass zum Teil mRNAs in so geringen Mengen exprimiert werden, dass sie nicht durch Northern Blot Analyse detektiert werden können (Liang *et al.*, 1993; Utans *et al.*, 1994). Es war daher nicht überraschend, dass einige der klonierten cDNA-Fragmente, die für die Verifizierung mit Northern Blot ausgewählt wurden, keine Signale auf dem Blot erkennen ließen. Eine vergleichbare Studie, bei der die Regulation

der Genexpression von intestinaler mRNA der Ratte durch Zink-Zufuhr mit Differential Display untersucht wurde, konnte 47 DD-Banden identifizieren, von denen 19 reamplifizierte und klonierte cDNA-Fragmente für Northern Blot Analysen ausgewählt wurden (Blanchard and Cousins, 1996). Davon waren nur 11 Fragmente auf dem Northern Blot detektierbar und nur vier wurden als wirklich unterschiedlich exprimiert bestätigt. In dieser wie in der vorliegenden Arbeit war die Frequenz an falsch-positiven Klonen ausgesprochen hoch und korrelierte mit der niedrigen Erfolgsquote hinsichtlich der Verifizierung von isolierten cDNA-Fragmenten durch Northern Blot Analysen ähnlicher Studien mit Differential Display.

Da der limitierende Faktor meist die Menge der mRNA ist, die für die Durchführung von Differential Display und der anschließenden Verifizierung identifizierter cDNA-Fragmente zur Verfügung steht, sollte die Methode für die Verifizierung sensitiv genug sein, um auch geringste Mengen an mRNA zu detektieren. Northern Blot Analysen sind relativ einfach in ihrer Durchführung und liefern zuverlässige Ergebnisse, sind jedoch nicht sehr sensitiv und daher weniger geeignet für den Nachweis kleinster Mengen an mRNA, wie schon vorher beschrieben. Außerdem werden für den Nachweis einer großen Zahl an möglicherweise unterschiedlich exprimierten Genen mehrere Northern Blots benötigt und so auch eine große Menge an mRNA.

Mit Hilfe der Membranen mit transferierten DD-PCR-Fragmenten konnten alle identifizierten Klone in Hinsicht auf eine unterschiedliche Expression bei SHRSP+ und SHRSP- untersucht werden und so eine Vorauswahl für eingehendere Prüfungen getroffen werden. Als eine äußerst sensitive Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von mRNAs in unterschiedlichen mRNA-Proben gilt das Verfahren RNase Protection Assay. Der RNase Protection Assay ist eine relativ einfache und schnelle Methode zur Verifizierung einer unterschiedlichen Genexpression in zu vergleichenden mRNA-Proben.

Durch RNase Protection Assays konnten zwei im Differential Display unterschiedlich exprimierte Sequenzen identifiziert werden, die einen deutlichen Unterschied in der Expression in den Gehirnen von SHRSP+ versus SHRSP- zeigte. Die eine Sequenz repräsentiert den Thyrotropin Releasing Hormon-Rezeptor der Ratte, die andere zeigte keine Homologien zu bekannten Genen in Gen-Datenbanken und stellt so eine neue Sequenz dar. Mit Hilfe eines Somatic Cell Hybrid Panels konnte diese Sequenz auf Chromosom 4 der Ratte lokalisiert werden.

Vergleicht man die Expression dieser beiden Gene im Gehirn von SHRSP+ und SHRSP- mit der Expression im Gehirn von SHR+ und SHR-, so lassen sich Rückschlüsse auf die Art der Regulierung ziehen.

Für den TRH-Rezeptor der Ratte war die Menge an mRNA im Gehirn von SHRSP- nahezu doppelt so hoch wie im Gehirn von SHR und zeigte einen weiteren Anstieg im Gehirn von SHRSP+.

Im Gehirn von SHR+ sowie SHR- konnten fast gleiche Mengen dieser mRNA nachgewiesen werden. Die natriumreiche, kaliumarme Diät scheint so keine Auswirkungen auf die Expression des TRH-Rezeptors im Gehirn von SHR zu haben, führt dagegen im Gehirn von SHRSP+ zu einer Überregulierung.

Die andere, bislang unbekannt Sequenz konnte im Gehirn von SHRSP- nur in geringem Maße nachgewiesen werden und war nicht exprimiert im Gehirn von SHRSP+. Im Gehirn von SHR- war die neue Sequenz ebenfalls nicht detektierbar, wurde bei Erhalt der speziellen Diät aber in hohem Maße im Gehirn von SHR+ exprimiert. Man kann annehmen, dass die spezielle Diät zu einer Hochregulierung dieses unbekanntes Gens im Gehirn von SHR führt, aber keinen Einfluss auf die Expression dieses Gens im Gehirn von SHRSP ausübt.

Es können jedoch keine Aussagen darüber getroffen werden, ob diese Gene direkt durch die Zufuhr der natriumreichen, kaliumarmen Diät in ihrer Expression beeinflusst werden oder sekundäre Veränderungen darstellen. Dessen ungeachtet liefert Differential Display of mRNA zwei neue Kandidatengene, die durch diätische Veränderungen beeinflusst werden und möglicherweise bei der Ätiologie des Schlaganfalls in SHRSP eine fundamentale Rolle spielen.

Weitere, funktionelle Studien werden nötig sein, um die Relevanz dieser Befunde zu untersuchen und zu erhärten.

5.3. Bedeutung des TRH-Rezeptors auf die Blutdruckregulation

Neben der endokrinen Funktion von TRH, dem Thyreotropin Releasing Hormon, einem kleinen Neuropeptid, das unter anderem die Synthese und Sekretion von TSH, dem Thyreoidea stimulierendem Hormon, im Rahmen des TRH-TSH-Regelkreislaufs stimuliert (Burgus *et al.*, 1970), dient TRH auch als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Morley, 1979). Frühere Studien zeigen, dass die intrathekale Gabe von TRH zu einer Aktivierung des Sympathikus und einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks führt (Yusof and Coote, 1988; Helke and Phillips, 1988). Die Über-Expression des TRH-Vorläufers in Ratten induziert eine lang anhaltende Erhöhung des arteriellen Blutdrucks neben dem Anstieg der im Dienzaphalon gemessenen Menge von TRH (Garcia *et al.*, 1997).

Andere Studien unterstreichen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen TRH und Bluthochdruck. Die TRH-Rezeptor-Dichte im Gehirn von SHR ist höher als im Gehirn von normotensiven WKY, und parallel zum Anstieg der TRH-Rezeptor-Dichte kann ein Anstieg des arteriellen

Blutdrucks dokumentiert werden (Bhargava *et al.*, 1987). Die Konzentration von TRH liegt in bestimmten Hirnregionen bei 16-Wochen alten SHR um das zweifache höher als bei gleichaltrigen, normotensiven WKY, die TRH-Vorläufer-mRNA sogar um das dreifache, so dass von einer erhöhten Syntheserate von TRH bei SHR ausgegangen wird (Garcia *et al.*, 1995). Weitere Untersuchungen dieser Studie belegen eine erhöhte Zahl an TRH-Bindungsstellen bei SHR im Vergleich zu WKY mit gleicher Affinität zu dem TRH-Rezeptor. Nach Behandlung von SHR und WKY mit dem blutdrucksenkenden Medikament Enalapril, einem ACE-Hemmer (Angiotensin Converting Enzym), konnte bei SHR sowohl der Blutdruck als auch die TRH-Konzentration auf den Level von normotensiven WKY signifikant gesenkt werden, bei den normotensiven WKY kam es lediglich zu einer Senkung des Blutdrucks ohne signifikante Veränderung der TRH-Konzentration (Garcia *et al.*, 1995). Zudem entwickeln SHR durch die Gabe von TRH eine Supersensitivität mit gesteigerter, hypertensiver Regulation (Bansinath *et al.*, 1987).

Weitere Untersuchungen zeigen, dass eine Blockierung der TRH-Rezeptor-mRNA in SHR, die durch intrathekale Gabe von Antisense-Oligonukleotiden gegenüber der TRH-Rezeptor-mRNA erfolgt, zu einem signifikanten Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks führt, nicht jedoch bei WKY (Suzuki *et al.*, 1995). Die anschließende intrathekale Gabe von TRH nach Blockierung der TRH-Rezeptor-mRNA mit Antisense-Oligonukleotiden in SHR zeigt im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Blockierung der TRH-Rezeptor-mRNA einen signifikant geringeren Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks. Die fT_4 -Konzentration, die Konzentration des biologisch aktiven Schilddrüsenhormons freies L-Tetraiodthyronin, im Plasma ist sowohl vor als auch nach Gabe in den Versuchs- und Kontrollgruppen gleich, so dass eine Änderung des Schilddrüsenhormonstatus als Ursache der veränderten Blutdruckregulation durch Blockierung der TRH-Rezeptor-mRNA und anschließender intrathekaler Gabe von TRH nicht in Betracht kommt. Obwohl der Beweis aussteht, dass die verwendeten Antisense-Oligonukleotide zu einem Abfall der TRH-Rezeptor-Protein-Menge führt, wird dieser als möglicher Mechanismus diskutiert und als ursächlich für den signifikanten Abfall des Blutdrucks nach Blockierung der TRH-Rezeptor-mRNA und signifikant geringeren Anstieg nach anschließender intrathekaler Gabe von TRH in SHR beschrieben (Suzuki *et al.*, 1995).

So ist nicht nur TRH bei der Entstehung von Bluthochdruck in der Ratte beteiligt (Garcia *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2001a), sondern auch der TRH-Rezeptor scheint eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung von hohen Blutdruckwerten in SHR zu spielen (Suzuki *et al.*, 1995).

Bei hypertensiven Patienten wird nach intravenöser TRH-Injektion ein abgeschwächter Anstieg von TSH dokumentiert, der auf einen Defekt im TRH-Rezeptor zurückgeführt wird (Lupi *et al.*, 1988). Weiterführende Untersuchungen stellen in zwei Populationen in Argentinien eine Asso-

ziation zwischen zwei Markern in der Promotorregion des TRH-Rezeptors, einer polymorphen TG-Dinukleotid-Wiederholung (polymorphic dinucleotide repeat, STR) und einer G-C-Konversion (single nucleotide polymorphism, SNP), und Bluthochdruck fest, die die Bedeutung des TRH-Rezeptor-Gens in der Pathogenese von Bluthochdruck auch beim Menschen unterstreichen (Garcia *et al.*, 2001b).

Sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte spielt so das TRH-TSH-System eine bedeutende Rolle in der Blutdruckregulation. Die hiesigen Ergebnisse der Genexpressionsstudie unterstreichen die Bedeutung des TRH-TSH-Systems im Rahmen der cerebrovaskulären Regulation bei der Ratte. Sie zeigen eine erhöhte Konzentration der TRH-Rezeptor-mRNA im Gehirn bei SHR-SP im Vergleich zu SHR und zeigen einen weiteren Anstieg im Gehirn von SHRSP+. Im Vergleich werden im Gehirn von SHR+ sowie SHR- fast gleiche Mengen dieser mRNA nachgewiesen, so dass es scheint, dass die natriumreiche, kaliumarme Diät keine Auswirkungen auf die Expression des TRH-Rezeptors im Gehirn von SHR hat, jedoch im Gehirn von SHRSP+ zu einer Überregulierung des TRH-Rezeptors führt. Man kann vermuten, dass diese Überregulierung des TRH-Rezeptors bei SHRSP durch die natriumreiche, kaliumarme Diät bei der Ätiologie des Schlaganfalls in SHRSP eine Rolle spielt. Bei SHR hat die natriumreiche, kaliumarme Diät keine Auswirkungen auf die Expression des TRH-Rezeptors und scheint so einen positiven, schützenden Effekt im Auftreten von Schlaganfällen bei SHR zu haben. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die Überregulierung des TRH-Rezeptors direkt durch die natriumreiche, kaliumarme Diät erfolgt oder sekundäre Veränderungen vorliegen.

6. Zusammenfassung

Differential Display of mRNA stellt in der molekularen Medizin eine alternative Methode für die Erforschung komplexer polygenetisch und multifaktoriell bedingter Erkrankungen dar. Differential Display erlaubt den simultanen Vergleich der Genexpression mehrerer unterschiedlicher Gewebe auf einer PCR-basierenden Methode mit dem Ziel der Identifizierung und Isolierung von quantitativ unterschiedlichen Transkripten und damit potentielle Hinweise auf die Beteiligung der entsprechenden Gene an der Pathogenese komplexer Erkrankungen, wie in unserem Falle des Schlaganfalls.

Häufigste Ursache zentraler neurologischer Ausfälle sind Durchblutungsstörungen des Gehirns. Bei dem Schlaganfall, „stroke“, auch „Apoplexie“, unterscheidet man Hirninfarkte (85 %), insbesondere zerebrale Ischämien als Folge von Thrombembolien der Hirngefäße oder kardiogener Embolien, von vaskulären Hirnblutungen (15 %) aufgrund von Gefäßläsionen bei Arteriosklerose und Hypertonie sowie amyloide Angiopathien oder Gefäßfehlbildungen. Der bedeutendste Risikofaktor des Schlaganfalls ist die arterielle Hypertonie. Genetisch-epidemiologische Beobachtungen ergeben, dass Schlaganfall aufgrund von familiärer Häufung sowie erhöhter Konkordanz der Erkrankung bei eineiigen Zwillingen zum Teil genetisch bedingt ist. Der Schlaganfall beim Menschen stellt so eine komplexe Erkrankung mit einer multifaktoriellen und (wahrscheinlich) polygenetischen Ätiologie dar, die die führende Ursache dauernder Invalidität einnimmt und an dritter Stelle der Mortalitätsstatistik westlicher Länder liegt. Obwohl Morbidität und Mortalität in den letzten Jahren hauptsächlich aufgrund besserer Erkennung und Behandlung zugrunde liegender Kreislauferkrankungen, vor allem des Hypertonus, leicht rückläufig sind, muss mit einem erneuten Anstieg gerechnet werden, da die Inzidenz von Schlaganfall im höheren Alter zunimmt und so eine Bevölkerungsgruppe betroffen ist, die in den Industrienationen rapide wächst. Die Identifizierung von Faktoren, die primär an der Pathogenese des Schlaganfalls beteiligt sind, ist daher von besonderer Bedeutung für präventive und therapeutische Bemühungen, um die Inzidenz von Schlaganfall weiter zu senken.

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit war die Identifizierung und Isolierung von Genen, die bei der Pathogenese des Schlaganfalls in einem Tiermodell eine potentielle Rolle spielen. Um die genetischen Faktoren aufzudecken und den molekularen Mechanismus zu verstehen, der zum Schlaganfall führt, wurde die zum Schlaganfall neigende spontan hypertensive Ratte (SHRSP) als ingezüchtetes Tiermodell für eine komplexe cerebrovaskuläre Form von Schlaganfall verwendet, die der komplexen Erkrankung im Menschen ähnelt. Als Vergleich diente die eng ver-

wandte spontan hypertensive Ratte (SHR), die resistent gegenüber der cerebrovaskulären Erkrankung ist. Bluthochdruck, von dem beide Rattenstämme in ähnlichem Ausmaß betroffen sind, und eine natriumreiche und kaliumarme Diät sind Faktoren, die das Auftreten von Schlaganfall in SHRSP bedingen, aber keinen Einfluss auf SHR ausüben. Die Schlaganfall-induzierende Diät wird so als Ursache für krankheitsrelevante Veränderungen in der Genexpression im Gehirn und/oder in den Gehirngefäßen bei SHRSP vermutet. Um die Unterschiede in der Genexpression in diesen Geweben aufzudecken und Gene zu identifizieren, die aufgrund der speziellen Diät über- und/oder unterexpressiert werden, wurde die Methode Differential Display of mRNA verwendet. Für die Differential Display-PCR wurde mRNA aus Gehirn, Gehirngefäßen und Aorta von vier verschiedenen Untersuchungsgruppen eingesetzt, und zwar von mit der natriumreichen und kaliumarmen Diät behandelten SHR und SHRSP (SHR+ und SHRSP+) und von unbehandelten Geschwistertieren (SHR- und SHRSP-), die normales Futter erhielten. Es wurde eine große Zahl an potentiell unterschiedlich exprimierten Gensequenzen isoliert, von denen zwei mit „housekeeping-gene“ normalisiertem RNase Protection Assay als wirklich unterschiedlich exprimiert verifiziert werden konnten. Eine der Sequenzen repräsentiert die mRNA für den Thyreotropin Releasing Hormon-Rezeptor (TRH-Rezeptor) der Ratte, die andere ein bislang unbekanntes Gen. Die Menge an mRNA für den TRH-Rezeptor im Gehirn von SHRSP- war fast doppelt so hoch wie im Gehirn von SHR, und zwar sowohl SHR- als auch SHR+, und zeigte teilweise einen weiteren Anstieg auf über das Doppelte im Gehirn von SHRSP+. Dies deutet darauf hin, dass der TRH-Rezeptor möglicherweise aufgrund einer Überregulation an der Pathogenese des Schlaganfalls bei mit der natriumreichen, kaliumarmen Diät behandelten SHRSP beteiligt ist. Bereits frühere Untersuchungen zum TRH-Rezeptor zeigen, dass das TRH-TSH-System eine bedeutende Rolle in der Blutdruckregulation beim Menschen und bei der Ratte spielt. Die hiesigen Ergebnisse der Genexpressionsstudie unterstreichen die Bedeutung des TRH-TSH-Systems im Rahmen der cerebrovaskulären Regulation bei der Ratte. Das unbekannte Gen, die neue Sequenz, konnte nicht im Gehirn von SHR- nachgewiesen werden, war jedoch deutlich exprimiert in SHR+, also jenen SHR, die die Schlaganfall-induzierende Diät erhielten. Niedrige Mengen dieser unbekanntes mRNA wurden im Gehirn von SHRSP- gefunden, konnten jedoch nicht in SHRSP+, also den mit der Schlaganfall-induzierenden Diät behandelte SHRSP, nachgewiesen werden. Möglicherweise hat dieses Gen eine schützende Funktion, denn es wird in hohem Maße bei mit der Schlaganfall-induzierenden Diät behandelten SHR exprimiert, ist aber nicht nachweisbar in ebenfalls mit der Schlaganfall-induzierenden Diät behandelten SHRSP, die regelmäßig einen Schlaganfall erleiden. Mit Hilfe eines Somatic Cell Hybrid Panels konnte diese neue Sequenz auf Chromosom 4 der Ratte lokalisiert werden.

Unsere Untersuchungen dokumentieren sowohl die Möglichkeiten als auch die Herausforderungen von Differential Display of mRNA für die Erforschung komplexer polygenetisch und multifaktoriell bedingter Erkrankungen wie den Schlaganfall. Es gelang, zwei Gene zu identifizieren, die möglicherweise funktionell relevant für die Ausbildung von Schlaganfall in diesem Tiermodell sind. Differential Display of mRNA repräsentiert damit eine effektive Methode, um Abschnitte im Genom zu identifizieren, die im Gehirn von SHRSP in Abhängigkeit mit einer natriumreichen, kaliumarmen Diät transkriptionell reguliert werden.

Frühere Ergebnisse von Untersuchungen an diesem Tiermodell heben drei Regionen auf Chromosom 1, 4 und 5 der Ratte hervor, die ursächlich für den Schlaganfall in diesem Tiermodell verantwortlich sind. Die noch unbekannt Sequenz stellt so ein neues Kandidatengen für die Genregion auf Chromosom 4 der Ratte dar. Die genauere Erforschung der Natur der unterschiedlichen Expression dieses unbekanntes Gens und des ebenfalls identifizierten TRH-Rezeptors sowie die Beschreibung möglicher Mechanismen, die zu Änderungen in der Genexpression führen, sollten Ziel folgender Untersuchungen sein. Eine eingehende Charakterisierung der Gene, die potentiell verantwortlich sind für das Auftreten von Schlaganfall in diesem Tiermodell, wird neue Erkenntnisse über die an der Pathophysiologie des Schlaganfalls beteiligten genetischen Faktoren bringen. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen mag dann schlussendlich dazu beitragen, ursächlich verantwortliche Gene für den Schlaganfall auch im Menschen zu identifizieren.

7. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Detlev Ganten und Professor Dr. med. Klaus Lindpaintner danke ich für die freundliche Überlassung der Bearbeitung dieses Forschungsthemas, für die wissenschaftliche Betreuung und die hilfreichen Diskussionen während des Projektes.

Herrn Professor Lindpaintner danke ich im besonderen für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe am Brigham and Women's Hospital in Boston, für die stete Diskussionsbereitschaft, für die vielen anregenden Gespräche über Durchführung und Interpretation der experimentellen Ergebnisse und für das Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Frau Dr. med. MinAe Lee-Kirsch danke ich für Ihre exzellente Einführung und Unterstützung dieser Arbeit aufgrund Ihres umfangreichen Wissens auf dem Gebiet der Molekularbiologie.

Frau Dr. med. Ursula Ganten danke ich für die Bereitstellung des tierexperimentellen Materials, das die wertvolle Basis dieser Arbeit darstellte.

Ich danke allen Mitarbeitern im Labor von Herrn Professor Lindpaintner, insbesondere Herrn Dr. med. Berthold Struck, Frau Dr. med. Speranza Rubattu und Frau Dr. med. Li Cai. Durch deren stete Diskussionsbereitschaft wurde mein wissenschaftliches Denken in hohem Maße gefördert.

Besonderen Dank gebührt Frau Dr. med. Bruna Gigante-Varrone, die mir während der Zeit in Boston nicht nur fachliche Anregungen gab, sondern auch auf ihre liebenswürdige Art viele gute Ratschläge für den weiteren Lebensweg. Meinen Eltern möchte ich für ihre umfangreiche Unterstützung und Förderung in hohem Maße danken.

Der Gottlieb Daimler- und Karl Benz-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung des Forschungsaufenthaltes an der Harvard Medical School, Boston, USA, in der wesentliche Untersuchungen für diese Arbeit vorgenommen wurden.

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. Selbständigkeitserklärung

Ich, Christina Pellnitz, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Untersuchungen zur gewebsspezifischen Genexpression in einem Tiermodell für Schlaganfall“ 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.

10. Literaturverzeichnis

1. MRC Trial of Treatment of Mild Hypertension: Principal Results. Medical Research Council Working Party. (1985) *Br Med J (Clin Res Ed)* **291**: pp 97-104.
2. Alberts MJ (1991) Genetic Aspects of Cerebrovascular Disease. *Stroke* **22**: pp 276-280.
3. Amery A, Birkenhager W, Brixko P, et al. (1985) Mortality and Morbidity Results From the European Working Party on High Blood Pressure in the Elderly Trial. *Lancet* **1**: pp 1349-1354.
4. Arribas SM, Gordon J F, Daly C J, Dominiczak A F and McGrath J C (1996) Confocal Microscopic Characterization of a Lesion in a Cerebral Vessel of the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat. *Stroke* **27**: pp 1118-1122.
5. Bansinath M, Das S and Bhargava H N (1987) Spontaneously Hypertensive Rats Exhibit Supersensitivity to the Hypertensive and Hyperthermic Effects of Thyrotropin Releasing Hormone. *Peptides* **8**: pp 227-230.
6. Bauer D, Muller H, Reich J, et al. (1993) Identification of Differentially Expressed mRNA Species by an Improved Display Technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res* **21**: pp 4272-4280.
7. Bhargava HN, Das S and Bansinath M (1987) Proliferation of Thyrotropin Releasing Hormone Receptors in Specific Brain Regions During the Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Peptides* **8**: pp 231-235.
8. Birnboim HC and Doly J (1979) A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: pp 1513-1523.
9. Blanchard RK and Cousins R J (1996) Differential Display of Intestinal MRNAs Regulated by Dietary Zinc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: pp 6863-6868.

10. Brass LM, Isaacsohn J L, Merikangas K R and Robinette C D (1992) A Study of Twins and Stroke. *Stroke* **23**: pp 221-223.
11. Burgus R, Dunn T F, Desiderio D, Ward D N, Vale W and Guillemin R (1970) Characterization of Ovine Hypothalamic Hypophysiotropic TSH-Releasing Factor. *Nature* **226**: pp 321-325.
12. Chalifour LE, Fahmy R, Holder E L, et al. (1994) A Method for Analysis of Gene Expression Patterns. *Anal Biochem* **216**: pp 299-304.
13. Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* **162**: pp 156-159.
14. Dawber T (1980) *The Framingham Study. The Epidemiology of Atherosclerotic Disease*. Harvard University Press, Cambridge.
15. Ducros A, Nagy T, Alamowitch S, et al. (1996) Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy, Genetic Homogeneity, and Mapping of the Locus Within a 2-CM Interval. *Am J Hum Genet* **58**: pp 171-181.
16. Ganten D and Ritz E (1985) *Lehrbuch Der Hypertonie - Pathophysiologie, Klinik, Therapie, Epidemiologie*. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York.
17. Garcia SI, Alvarez A L, Porto P I, Garfunkel V M, Finkielman S and Pirola C J (2001a) Antisense Inhibition of Thyrotropin-Releasing Hormone Reduces Arterial Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* **37**: pp 365-370.
18. Garcia SI, Dabsys S M, Martinez V N, et al. (1995) Thyrotropin-Releasing Hormone Hyperactivity in the Preoptic Area of Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* **26**: pp 1105-1110.
19. Garcia SI, Porto P I, Alvarez A L, et al. (1997) Central Overexpression of the TRH Precursor Gene Induces Hypertension in Rats: Antisense Reversal. *Hypertension* **30**: pp 759-766.

20. Garcia SI, Porto P I, Dieuzeide G, et al. (2001b) Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor (TRHR) Gene Is Associated With Essential Hypertension. *Hypertension* **38**: pp 683-687.
21. Garraway WM, Whisnant J P, Furlan A J, Phillips L H, Kurland L T and O'Fallon W M (1979) The Declining Incidence of Stroke. *N Engl J Med* **300**: pp 449-452.
22. Gibbs RA, Weinstock G M, Metzker M L, et al. (2004) Genome Sequence of the Brown Norway Rat Yields Insights into Mammalian Evolution. *Nature* **428**: pp 493-521.
23. Gifford AJ (1966) An Epidemiological Study of Cerebrovascular Disease. *Am J Public Health Nations Health* **56**: pp 452-461.
24. Goldstein M (1986) Cerebrovascular Research: the Opportunity Has Never Been Better. *Stroke* **17**: pp 1067-1068.
25. Hanahan D (1983) Studies on Transformation of Escherichia Coli With Plasmids. *J Mol Biol* **166**: pp 557-580.
26. Helke CJ and Phillips E T (1988) Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor Activation in the Spinal Cord Increases Blood Pressure and Sympathetic Tone to the Vasculature and the Adrenals. *J Pharmacol Exp Ther* **245**: pp 41-46.
27. Herman B, Leyten A C, van Luijk J H, Frenken C W, Op de Coul A A and Schulte B P (1982) An Evaluation of Risk Factors for Stroke in a Dutch Community. *Stroke* **13**: pp 334-339.
28. Hilbert P, Lindpaintner K, Beckmann J S, et al. (1991) Chromosomal Mapping of Two Genetic Loci Associated With Blood-Pressure Regulation in Hereditary Hypertensive Rats. *Nature* **353**: pp 521-529.
29. Iwai N, Kurtz T W and Inagami T (1992) Further Evidence of the SA Gene As a Candidate Gene Contributing to the Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rat. *Biochem Biophys Res Commun* **188**: pp 64-69.

30. Iwai N, Yamano Y, Chaki S, et al. (1991) Rat Angiotensin II Receptor: CDNA Sequence and Regulation of the Gene Expression. *Biochem Biophys Res Commun* **177**: pp 299-304.
31. Jacob HJ and Kwitek A E (2002) Rat Genetics: Attaching Physiology and Pharmacology to the Genome. *Nat Rev Genet* **3**: pp 33-42.
32. Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln S E, et al. (1991) Genetic Mapping of a Gene Causing Hypertension in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat. *Cell* **67**: pp 213-224.
33. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, et al. (1996) Notch3 Mutations in CADASIL, a Hereditary Adult-Onset Condition Causing Stroke and Dementia. *Nature* **383**: pp 707-710.
34. Kannel WB, Wolf P A, Verter J and McNamara P M (1970) Epidemiologic Assessment of the Role of Blood Pressure in Stroke. The Framingham Study. *JAMA* **214**: pp 301-310.
35. Kase CS, Mohr J P and Caplan L R (1998) Intracerebral hemorrhage, in *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis and Management* (Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM and Yatsu FM eds) pp 649-700, Churchill Livingstone, New York.
36. Kiely DK, Wolf P A, Cupples L A, Beiser A S and Myers R H (1993) Familial Aggregation of Stroke. The Framingham Study. *Stroke* **24**: pp 1366-1371.
37. Kurtz TW, Simonet L, Kabra P M, Wolfe S, Chan L and Hjelle B L (1990) Cosegregation of the Renin Allele of the Spontaneously Hypertensive Rat With an Increase in Blood Pressure. *J Clin Invest* **85**: pp 1328-1332.
38. Levy E, Carman M D, Fernandez-Madrid I J, et al. (1990) Mutation of the Alzheimer's Disease Amyloid Gene in Hereditary Cerebral Hemorrhage, Dutch Type. *Science* **248**: pp 1124-1126.
39. Liang P, Averboukh L and Pardee A B (1993) Distribution and Cloning of Eukaryotic MRNAs by Means of Differential Display: Refinements and Optimization. *Nucleic Acids Res* **21**: pp 3269-3275.

40. Liang P and Pardee A B (1992) Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction. *Science* **257**: pp 967-971.
41. Lindpaintner K, Hilbert P, Ganten D, Nadal-Ginard B, Inagami T and Iwai N (1993) Molecular Genetics of the SA-Gene: Cosegregation With Hypertension and Mapping to Rat Chromosome 1. *J Hypertens* **11**: pp 19-23.
42. Lindpaintner K, Takahashi S and Ganten D (1990) Structural Alterations of the Renin Gene in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats: Examination of Genotype-Phenotype Correlations. *J Hypertens* **8**: pp 763-773.
43. Lupi SN, Lutzky C A, de Yampey E W, Finkielman S and Nahmod V E (1988) Low TRH-TSH Responses in Human Essential Hypertension. *Clin Exp Hypertens A* **10**: pp 381-390.
44. MacMahon S, Peto R, Cutler J, et al. (1990) Blood Pressure, Stroke, and Coronary Heart Disease. Part 1, Prolonged Differences in Blood Pressure: Prospective Observational Studies Corrected for the Regression Dilution Bias. *Lancet* **335**: pp 765-774.
45. McClelland M, Mathieu-Daude F and Welsh J (1995) RNA Fingerprinting and Differential Display Using Arbitrarily Primed PCR. *Trends Genet* **11**: pp 242-246.
46. McClelland M, Ralph D, Cheng R and Welsh J (1994) Interactions Among Regulators of RNA Abundance Characterized Using RNA Fingerprinting by Arbitrarily Primed PCR. *Nucleic Acids Res* **22**: pp 4419-4431.
47. Morley JE (1979) Extrahypothalamic Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) -- Its Distribution and Its Functions. *Life Sci* **25**: pp 1539-1550.
48. Mou L, Miller H, Li J, Wang E and Chalifour L (1994) Improvements to the Differential Display Method for Gene Analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: pp 564-569.
49. Nagaoka A, Iwatsuka H, Suzuoki Z and Okamoto K (1976) Genetic Predisposition to Stroke in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Physiol* **230**: pp 1354-1359.

50. Ogata J, Fujishima M, Tamaki K, Nakatomi Y, Ishitsuka T and Omae T (1982) Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats As an Experimental Model of Malignant Hypertension. A Pathological Study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* **394**: pp 185-194.
51. Okamoto K (1969) Spontaneous Hypertension in Rats. *Int Rev Exp Pathol* **7**: pp 227-270.
52. Okamoto K, Yamano Y and Nagaoka A (1974) Establishment of the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat (SHR). *Circulation Res Suppl* **34-35**: pp 143-153.
53. Ostfeld AM, Shekelle R B, Klawans H and Tufo H M (1974) Epidemiology of Stroke in an Elderly Welfare Population. *Am J Public Health* **64**: pp 450-458.
54. Palsdottir A, Abrahamson M, Thorsteinsson L, et al. (1988) Mutation in Cystatin C Gene Causes Hereditary Brain Haemorrhage. *Lancet* **2**: pp 603-604.
55. Panza JA, Casino P R, Kilcoyne C M and Quyyumi A A (1993) Role of Endothelium-Derived Nitric Oxide in the Abnormal Endothelium-Dependent Vascular Relaxation of Patients With Essential Hypertension. *Circulation* **87**: pp 1468-1474.
56. Phillips SJ and Whisnant J P (1990) Hypertension and stroke, in *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management* (Laragh JH and Brenner BM eds) pp 417-431, Raven Press, New York.
57. Rapp JP, Wang S M and Dene H (1989) A Genetic Polymorphism in the Renin Gene of Dahl Rats Cosegregates With Blood Pressure. *Science* **243**: pp 542-544.
58. Rubattu S, Giliberti R, Russo R, Gigante B, Ganten U and Volpe M (2000) Analysis of the Genetic Basis of the Endothelium-Dependent Impaired Vasorelaxation in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat: a Candidate Gene Approach. *J Hypertens* **18**: pp 161-165.
59. Rubattu S, Volpe M, Kreutz R, Ganten U, Ganten D and Lindpaintner K (1996) Chromosomal Mapping of Quantitative Trait Loci Contributing to Stroke in a Rat Model of Complex Human Disease. *Nat Genet* **13**: pp 429-434.

60. Salonen JT, Puska P, Tuomilehto J and Homan K (1982) Relation of Blood Pressure, Serum Lipids, and Smoking to the Risk of Cerebral Stroke. A Longitudinal Study in Eastern Finland. *Stroke* **13**: pp 327-333.
61. Samani NJ, Lodwick D, Vincent M, et al. (1993) A Gene Differentially Expressed in the Kidney of the Spontaneously Hypertensive Rat Cosegregates With Increased Blood Pressure. *J Clin Invest* **92**: pp 1099-1103.
62. Sargent TD and Dawid I B (1983) Differential Gene Expression in the Gastrula of *Xenopus Laevis*. *Science* **222**: pp 135-139.
63. Shimkets RA, Warnock D G, Bositis C M, et al. (1994) Liddle's Syndrome: Heritable Human Hypertension Caused by Mutations in the Beta Subunit of the Epithelial Sodium Channel. *Cell* **79**: pp 407-414.
64. Smeda JS (1989) Hemorrhagic Stroke Development in Spontaneously Hypertensive Rats Fed a North American, Japanese-Style Diet. *Stroke* **20**: pp 1212-1218.
65. Stone B and Wharton W (1994) Targeted RNA Fingerprinting: the Cloning of Differentially-Expressed cDNA Fragments Enriched for Members of the Zinc Finger Gene Family. *Nucleic Acids Res* **22**: pp 2612-2618.
66. Suzuki S, Pilowsky P, Minson J, Arnold L, Llewellyn-Smith I and Chalmers J (1995) Antisense to Thyrotropin Releasing Hormone Receptor Reduces Arterial Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Circ Res* **77**: pp 679-683.
67. Takeya Y, Popper J S, Shimizu Y, Kato H, Rhoads G G and Kagan A (1984) Epidemiologic Studies of Coronary Heart Disease and Stroke in Japanese Men Living in Japan, Hawaii and California: Incidence of Stroke in Japan and Hawaii. *Stroke* **15**: pp 15-23.
68. Tanaka H, Ueda Y, Hayashi M, et al. (1982) Risk Factors for Cerebral Hemorrhage and Cerebral Infarction in a Japanese Rural Community. *Stroke* **13**: pp 62-73.

69. Tobian L, Lange J, Ulm K, Wold L and Iwai J (1985) Potassium Reduces Cerebral Hemorrhage and Death Rate in Hypertensive Rats, Even When Blood Pressure Is Not Lowered. *Hypertension* **7**: pp 1110-1114.
70. Tournier-Lasserre E, Joutel A, Melki J, Weissenbach J, et al. (1993) Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy Maps to Chromosome 19q12. *Nat Genet* **3**: pp 256-259.
71. Utans U, Liang P, Wyner L R, Karnovsky M J and Russell M E (1994) Chronic Cardiac Rejection: Identification of Five Upregulated Genes in Transplanted Hearts by Differential MRNA Display. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: pp 6463-6467.
72. Vane JR, Anggard E E and Botting R M (1990) Regulatory Functions of the Vascular Endothelium. *N Engl J Med* **323**: pp 27-36.
73. Vogelstein B and Gillespie D (1979) Preparative and Analytical Purification of DNA From Agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: pp 615-619.
74. Volpe M, Camargo M J, Mueller F B, et al. (1990) Relation of Plasma Renin to End Organ Damage and to Protection of K⁺ Feeding in Stroke-Prone Hypertensive Rats. *Hypertension* **15**: pp 318-326.
75. Volpe M, Iaccarino G, Vecchione C, et al. (1996) Association and Cosegregation of Stroke With Impaired Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Stroke Prone, Spontaneously Hypertensive Rats. *J Clin Invest* **98**: pp 256-261.
76. Wallace CA and Aitman T J (2004) The Rat Comes Clean. *Nat Genet* **36**: pp 441-442.
77. Ward R (1990) Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure, in *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management* (Laragh JH and Brenner BM eds) pp 81-100, Raven Press, New York.
78. Welin L, Svardsudd K, Wilhelmsen L, Larsson B and Tibblin G (1987) Analysis of Risk Factors for Stroke in a Cohort of Men Born in 1913. *N Engl J Med* **317**: pp 521-526.

79. Wolf PA, Kannel W B and Verter J (1983) Current Status of Risk Factors for Stroke. *Neurol Clin* **1**: pp 317-343.
80. Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M and Fukase M (1976) Pathogenetic Similarity of Strokes in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats and Humans. *Stroke* **7**: pp 46-53.
81. Yamori Y, Horie R, Tanase H, Fujiwara K, Nara Y and Lovenberg W (1984) Possible Role of Nutritional Factors in the Incidence of Cerebral Lesions in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* **6**: pp 49-53.
82. Yusof AP and Coote J H (1988) A Comparison of the Effects of Intrathecally Administered 5-Hydroxytryptamine and Thyrotropin-Releasing Hormone on Renal and Muscle Sympathetic Nerve Activity. *J Auton Nerv Syst* **23**: pp 181-187.
83. Zhang H, Zhang R and Liang P (1996) Differential Screening of Gene Expression Difference Enriched by Differential Display. *Nucleic Acids Res* **24**: pp 2454-2455.
84. Zhao S, Ooi S L and Pardee A B (1995) New Primer Strategy Improves Precision of Differential Display. *Biotechniques* **18**: pp 842-6, 848, 850.