

Genexpressionsanalyse Neurodegenerativer Erkrankungen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich
Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kim Vogel

aus Berlin

Februar, 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup

2. Gutachter: PD Dr. Thomas Bunte

Disputation am: 10.05.2007

Danksagung

Als erstes möchte ich Dr. Thomas Dyrks für seine vielen Bemühungen und seine Unterstützung in den verschiedenen Abschnitten der Arbeit danken. Er gab mir die Möglichkeit in seiner Gruppe diese Arbeit durchzuführen und ermöglichte es mir, mit seinen hilfreichen Vorschlägen meine Arbeit zu planen. Weiterhin danke ich ihm für sein Engagement während der schriftlichen Phase der Arbeit.

Ich danke Dr. Anja Hoffmann für ihre Hilfe bei der Umsetzung der Ergebnisse in eine schriftliche Fassung. Auch die Gespräche mit ihr, während der verschiedenen Höhen und Tiefen der Arbeit, waren mir stets eine große Hilfe und Freude.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gerd Multhaup für die Übernahme des Erstgutachtens und seine Unterstützung bei der Erstellung der wissenschaftlichen Arbeit. Ich danke auch Herrn PD Thomas Bunte für seine Unterstützung als Zweitgutachter.

Ich danke den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe die mir stets zur Seite standen und immer wieder bereit waren, mich beim Erlernen neuer Methoden zu unterstützen. Die entspannte Stimmung der Gruppe und die vielen verschiedenen Fachrichtungen der Mitarbeiter, schenken mir eine wunderbare Zeit mit vielen neuen Erfahrungen. Insbesondere danke ich Claudia Kamfenkel, die mich von Anfang an begleitete und mich auf den vielen Stationen der Arbeit unterstützt hat.

Ich danke meinen Eltern für die Unterstützung während der Zeit der praktischen Arbeit und die konstruktiven Gesprächen, die mir oft den Weg geebnet haben und mich in meinen Zielen bekräftigten. Ich danke insbesondere meiner Mutter die mir mit Rat und Tat bei der Vollendung der schriftlichen Form zur Seite stand.

Ganz besonders Danke ich Heike Wolff, die bereit war meine verschiedenen glücklichen aber auch die frustrierenden Momente mit mir zu teilen. Sie half mir in tristen Momenten durchzuhalten und fest an meine Ziele und meine Arbeit zu glauben. Ich danke ihr auch für die Freude die sie mit mir teilt, diese Arbeit zu Ende gebracht zu haben.

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	11
A. Neurodegeneration	11
B. Spezielle Formen der Neurodegeneration	11
B. 1. Alzheimer Erkrankung	11
B. 2. Ischämie des Gehirns	15
C. Wichtige Mechanismen der Neurodegeneration	16
C. 1. Neuroinflammation	17
C. 2. Zelltod/ Apoptose	21
C. 3. Neuroregeneration	21
C. 4. Zelladhäsion	22
C. 5. Signaltransduktion	22
D. Zusammenhänge der analysierten neurodegenerativen Erkrankungen	22
E. Aufgabenstellung	24
II. MATERIAL	25
A. Lösungen	25
B. Substanzen	25
C. Kommerzielle Test Systeme (Kits)	26
D. Geräte	26
E. Antikörper	26
F. ELISA Kits	27
G. Software	28
H. Verbrauchsmaterialien	28
I. qRT-PCR Primer für die Analyse der muriner Genexpression	28
J. qRT-PCR Primer für die Analyse der humanen Genexpression	29
III. METHODEN	31

A. Durchführung der MCAO	31
B. Molekularbiologische Methoden	31
B. 1. RNA Extraktion	31
B. 2. Analyse der RNA-Proben	34
B. 3. DNA-Methoden	35
B. 4. Qualitative 'Real time' – PCR (qRT-PCR)	36
C. Proteinchemie	39
C. 1. Proteinextraktion	39
C. 2. Western Blot	40
D. Immunhistochemie	42
IV. ERGEBNISSE	44
A. Beschreibung der grundlegenden Analysen der Genexpression	44
B. Genexpressionsanalyse der MCAO - Ischämie	46
B. 1. Versuchsablauf	46
B. 2. Genexpressionsanalyse mittels Mikroarray technology	48
B. 3. Überprüfung der Mikroarraydaten	55
B. 4. Proteinchemische Validierung der Genexpressionsdaten	58
C. Genexpressionsanalyse der Cyto- und Chemokine Beteiligung nach MCAO	63
C. 1. qRT-PCR Analyse der Chemokine und Cytokine	63
C. 2. Kontralaterale Gegenregulation	66
C. 3. Zellspezifische Genexpression	69
D. Genexpressionsanalyse der Alzheimer Erkrankung	71
D. 1. Probengewinnung und Projektdesign	71
D. 2. Qualitätskontrolle der extrahierten RNA	74
D. 3. Genexpressionsanalyse mittels Microarray Technology	75
D. 4. Validierung der Mikroarray-Daten mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR)	82
D. 5. Proteinchemische Validierung der Genexpressionsdaten	83
E. Genexpressionsanalyse von angereicherten Endothelzellen von Alzheimerpatienten	89
E. 1. Etablierung der Laser Capture Microdissection (LCM) Methode	90
E. 2. Genexpressions Analyse	93
F. Vergleich der beiden Erkrankungen AD und MCAO	96
F. 1. Vergleich der differenziell exprimierten Prozesse in der MCAO und der AD	96
F. 2. Vergleich der frühen und späten Phase nach der MCAO mit der AD	98

V. DISKUSSION	101
A. Grundlagen	101
B. Genregulation nach Ischämie	102
B. 1. Analyse der Genregulation nach Ischämie	102
B. 2. Genregulation der Entzündungsmediatoren – Chemo- und Cytokine	105
C. Genregulation in der Alzheimer Erkrankung	107
C. 1. Genexpressionsveränderung im Temporallappen in der Alzheimer Erkrankung	107
C. 2. Genexpressionanalyse von Endothel-Zellen in Alzheimer Erkrankung	112
D. Vergleich der Genexpressionsveränderungen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen	113
VI. ZUSAMMENFASSUNG	116
VII. SUMMARY	118
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	119
IX. ANHANG	124
XI. ABKÜRZUNGEN	138

