

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der RNA Expressionsmuster in den Blut-Hirnschrankenkapillaren von SHRSP und SHR

4.1.1 *Präparation der zerebralen Mikrokapillaren und RNA-Extraktion*

4.1.1.1 Kapillarpräparation

In dieser Arbeit sollten die Genexpressionsprofile in den Blut-Hirnschrankenkapillaren von SHRSP und SHR untersucht werden. Dazu mußte zuerst eine geeignete Methode etabliert werden, um die Kapillaren anzureichern. In einem ersten Versuch wurden die Kapillaren mit Hilfe von Glasperlen isoliert (Kapitel 3.1.1). Obwohl diese Anreicherungsmethode einen hohen Reinheitsgrad der Kapillaren aufwies, stellte sie aufgrund der geringen Menge an erhaltenem Material (1 µg Gesamt-RNA pro Gehirn) keine zufriedenstellende Lösung dar. Zusätzlich erhöhte die lange Präparationsdauer von über sechs Stunden erheblich das Risiko einer Degradation der RNA.

Mit einer alternativen Aufreinigungsmethode (Kapitel 3.1.2) konnten wesentlich größere Mengen an Hirnkapillaren gewonnen werden. Bei dieser Methode erfolgte die Isolierung der Mikrogefäße durch einen Kollagenaseverdau des Hirnhomogenats und einer Zentrifugation in einem BSA-Dichtegradienten. Da alle Schritte bei + 4°C durchgeführt werden konnten und die Präparationszeit nach Entnahme der Hirne weniger als zwei Stunden betrug, verminderte sich die Möglichkeit eines Abbaus der RNA wesentlich.

4.1.1.2 RNA Extraktion aus den Kapillaren

Für die Isolierung der RNA aus den Kapillarpräparationen wurden ebenfalls verschiedene Methoden ausgetestet. Dabei stellte sich ein Protokoll als optimal heraus, das eine Extraktion der RNA durch Trizol mit einer nachgeschalteten Aufreinigung über RNeasy-Minisäulen kombinierte. Die mit dieser Methode extrahierte RNA war sauberer und die Ausbeute höher als bei einer Extraktion, die nur auf Guanidiniumthiocyanat-haltigen Puffern basierte. Auch eine Aufreinigung allein über RNeasy-Säulen ergab nicht dieselbe Ausbeute an RNA, da wahrscheinlich der von Qiagen verwendete Lysepuffer die relativ kompakten Kapillarfragmente nicht mit der gleichen Effizienz wie das Trizol-Reagenz aufschloß. Ein weiterer Vorteil der Kombination der beiden Methoden bestand darin, daß der notwendige DNase-Verdau

4. Ergebnisse

von kontaminierender genomischer DNA während der Aufreinigung erfolgte. Dadurch wurde die degradierte DNA während des folgenden Waschschruttes entfernt und beeinträchtigte nicht die sich anschließende Quantifizierung der RNA. Die Integrität und Reinheit der extrahierten RNA wurde photometrisch bestimmt bzw. durch Messung im Bioanalyzer analysiert (Abb. 4.1). Im Durchschnitt konnten aus fünf Hirnen ca. 10 bis 12 µg Gesamt-RNA extrahiert werden.

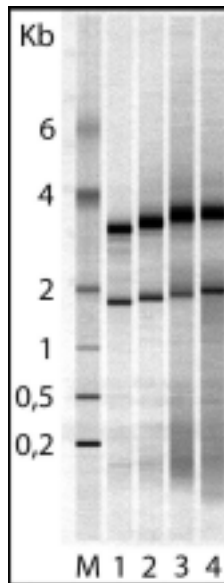


Abb. 4.1: Kontrolle der präparierten Gesamt-RNA im Bioanalyzer.

Für die Analyse im Bioanalyzer wurden zwischen 50 und 250 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Als interner Standard wurde die RNA 6000 Leiter von Ambion verwendet. Die entsprechenden Größen der Leiter sind angegeben.

4.1.2 Subtraktive Hybridisierung

Auch nach der Optimierung der Kapillarpräparation und der RNA-Extraktion war die Menge an verfügbarer RNA so gering ($< 15 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA), daß eine Isolierung von Poly(A⁺)-RNA als Ausgangsmaterial für die subtraktive Hybridisierung (SSH) nicht sinnvoll war. Statt dessen wurde durch die Verwendung des SMART cDNA Synthesekits ein weiterer Amplifizierungsschritt vorweggenommen. Diese Präamplifizierung erlaubte es, nur 1 µg Gesamt-RNA als Startmaterial für die subtraktive Hybridisierung einzusetzen (siehe auch 3.4.2.1).

4.1.2.1 Analyse der Ligationseffizienz

Eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Subtraktion lag in einer effektiven Ligation der Adaptoren an die 5'-Hydroxylenden der cDNA-Fragmente (siehe 3.4.3.1). Die Schwierigkeit dieses Schrittes bestand darin, daß es sich um eine Ligation von glatten Enden handelte, die generell unvollständiger abläuft als eine Reaktion, bei der die Ligationspartner überlappende Enden tragen. Die Effizienz der Ligation konnte mit einer einfachen PCR-Reaktion beurteilt werden, bei der zwei verschiedene Primerpaar-Kombinationen eingesetzt

4. Ergebnisse

wurden (Kapitel 3.4.3.2). Die PCR mit dem zweiten Primerpaar konnte nur bei einer erfolgreichen Ligation ablaufen, da anderenfalls keine Bindungsstelle für den einen Primer (PCR Primer 1) existierte (Abb. 4.2).

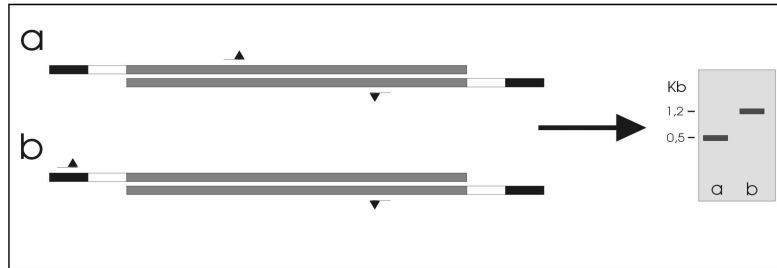


Abb. 4.2: Schema der Analyse der Effizienz der Adaptorligation.

Um die Effizienz der Adaptorligation zu beurteilen, werden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. Im ersten Ansatz (a) werden GAPDH Oligonukleotide als Primer eingesetzt, die ein Fragment von 452 Bp ergeben. Im zweiten Ansatz (b) wird das 5'-GAPDH Oligonukleotid durch den PCR Primer 1 ersetzt, der sowohl an Adaptor 1 als auch an Adaptor 2R bindet. Das mit Hilfe dieser Oligonukleotide amplifizierte Fragment besitzt eine Größe von 1,2 Kb.

Das Verhältnis von adaptorspezifischem Produkt zu dem GAPDH-Amplifikat sollte generell nicht weniger als ca. 1:4 betragen, da anderenfalls zu wenig cDNA-Fragmente an einen Adaptor gebunden vorliegen. Wie in Abb. 4.3 zu erkennen ist, wurden beide PCR-Produkte gebildet. Das Fragment, das mit dem adaptorspezifischen PCR Primer 1 generiert wurde, lag auch in hinreichender Menge vor, so daß von einer erfolgreich abgelaufenen Ligation ausgegangen werden konnte.

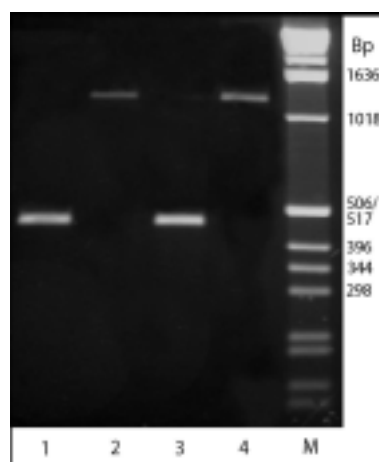


Abb. 4.3: Analyse der Ligationseffizienz.

Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung der Ligation der Adaptoren an die fragmentierte cDNA. Jeweils 1 μ l aus den Ligationsansätzen wurde mit 9 μ l H₂O verdünnt und 2 μ l der Verdünnung für einen 25 μ l-PCR-Ansatz eingesetzt. In den Ansätzen 1 und 3 wurden die 3'- und 5'-GAPDH Primer, in den Ansätzen 2 und 4 neben dem 3'-GAPDH-Primer der PCR Primer 1 verwendet. 8 μ l der PCR-Ansätze wurden auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Spur 1 und 2: PCR aus dem Ligationsansatz mit Adaptor 1; Spur 3 und 4: PCR aus dem Ligationsansatz mit Adaptor 2R. M bezeichnet die als Größenstandard eingesetzte Kb-Leiter.

4.1.2.2 Test der Effizienz der subtraktiven Hybridisierung

Um den erfolgreichen Verlauf der subtraktiven Hybridisierung zu überprüfen, wurde die Verteilung der GAPDH in der subtrahierten Probe und in der nicht-subtrahierten Kontrolle untersucht. Dieser Test gab darüber Auskunft, mit welcher Effizienz die Subtraktion abgelaufen war. Eine niedrige Effizienz der Subtraktion bedeutete eine sehr hohe Anzahl an falsch positiven cDNA-Fragmenten in der subtrahierten Probe, die in den nachfolgenden Schritten erst eliminiert werden müßten.

Das Ergebnis der Effizienzanalyse ist in Abb. 4.4 dargestellt. Wie auf dem Gelbild zu sehen ist, erscheint die GAPDH-Bande der subtrahierten Probe neun bis zehn Zyklen später, verglichen mit der nicht-subtrahierten Kontrolle. Bei Annahme einer 100%-igen Effizienz der PCR würde dies eine Reduktion der GAPDH Transkripte in der subtrahierten Probe um den Faktor 2^9 bzw. 2^{10} bedeuten. Damit war gezeigt, daß die Subtraktion erfolgreich ablief.

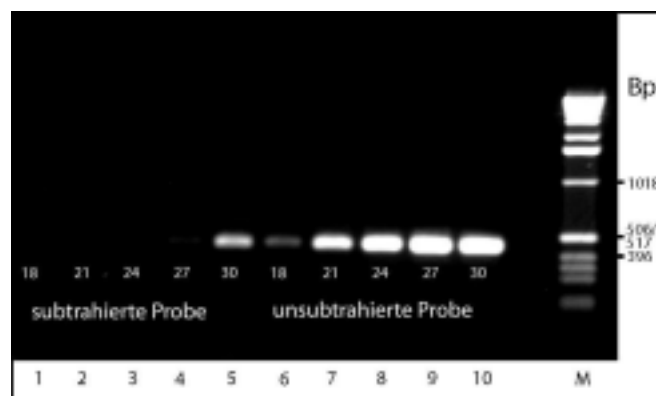


Abb. 4.4: Reduktion der GAPDH-Expression nach erfolgter cDNA-Subtraktion.

Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel. Die Konzentration der PCR-Produkte der subtrahierten und der nicht-subtrahierten Probe wurde photometrisch bestimmt und die Proben auf eine Konzentration von 100 ng/ μ l eingestellt. Jeweils 1 μ l dieser Verdünnung wurde für einen 100 μ l PCR-Ansatz eingesetzt. Als Oligonukleotide wurden die GAPDH-Primer verwendet. Nach jeweils 18, 21, 24, 27 und 30 Zyklen wurden 15 μ l PCR-Ansatz entnommen und bei + 4°C gelagert. Nach Beendigung der PCR wurden jeweils 10 μ l der bei den verschiedenen Zyklen entnommenen Proben auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Spuren 1 -5: subtrahierte Probe, Spuren 6 -10: nicht-subtrahierte Probe, M: Kb-Leiter.

Die vorwärts- und rückwärts-subtrahierten cDNA-Bibliotheken wurden in *E.coli* Bakterien transformiert und Einzelklone isoliert. Insgesamt wurden jeweils 200 Bakterienklone aus den beiden transformierten Bibliotheken angezogen. Ein kleiner Teil der Klone wurde sequenziert, um einen ersten Eindruck über die Art der isolierten cDNAs zu erhalten (Tab. 4.1). Dabei zeigte sich, daß ein Großteil der sequenzierten cDNA-Fragmente keinerlei Homologien zu bekannten Genen oder EST-Klonen aufwies. Die cDNA-Fragmente, für die Homologien mit bekannten Genen gefunden wurden, lagen sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich der entsprechenden Gene.

Klon	Länge (Bp)	Datenbankanalyse
BM108	615	Mss4
BM225	540	Thrombospondin-1
BM227	602	unbekannt (Serin/Threonin-Kinase-Ähnlichkeit)
BM254	469	Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)
BM268	454	mitochondriale ATPase Untereinheit 6
BM269	518	Sulfonylharnstoffrezeptor 2B (SUR2B)
BM274	534	Selenoprotein P
BM290	675	Tubulin folding cofactor E
BM417	365	Ribophorin II
BM456	516	Protocadherin 2c

Tab. 4.1: Datenbankanalyse der sequenzierten Klone aus der SSH.

Aus den entsprechenden Bakterienklonen wurden die Plasmide mit dem Qiagen Minipräparationskit isoliert und unter Verwendung der M13 Primer sequenziert. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mittels der Geneworks Software und des *BLAST* Programms des *National Institutes of Health (NIH)*.

4.1.2.3 Überprüfung der differentiell exprimierten cDNA Fragmente im Dot Blot

Um eine quantitative Aussage über den Grad der differentiellen Expression der isolierten cDNAs zu erhalten, wurden die nach der Subtraktion erhaltenen Klone mit markierter cDNA aus den Hirnkapillaren von SHRSP und SHR hybridisiert (Abb. 4.5). Durch diesen Test zeigte sich, daß von den ca. 400 getesteten Klonen nur vier cDNAs identifiziert werden konnten, die nach der Normalisierung unterschiedliche Signalintensitäten zeigten. Die restlichen Signale waren entweder zu schwach oder die Intensitätsunterschiede fielen zu gering aus, um auf eine differentielle Expression schließen zu können. Als differentiiell exprimiert angesehen wurden die Klone BM247, BM259 und BM269, die stärkere Signale nach der Hybridisierung mit der cDNA aus den Kapillaren von SHRSP zeigten, und der Klon BM254, der nach der Hybridisierung mit der SHR-Probe ein stärkeres Signal lieferte.

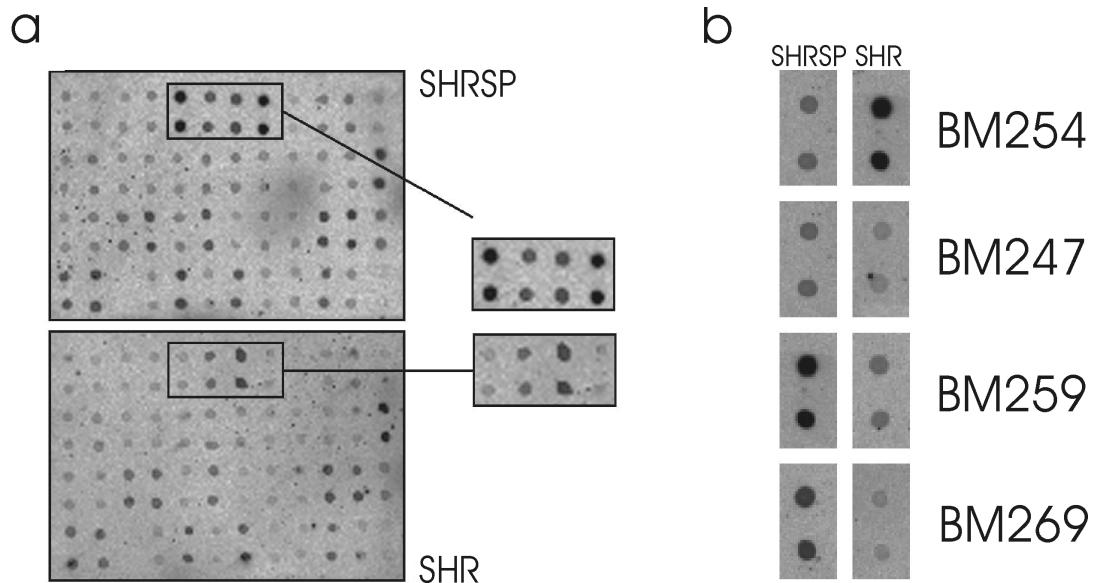


Abb. 4.5: Vergleich der Hybridisierungsintensitäten im Dot Blot.

Die bei der Subtraktion erhaltenen cDNA-Fragmente wurden in den pCRII-Vektor ligiert und in *E.coli* Top 10-Zellen kloniert. Die inserierten cDNA-Fragmente wurden per PCR mit Hilfe von adaptorspezifischen Primern, die an den Flanken der cDNA-Fragmente binden, amplifiziert und die PCR-Produkte als Doppelspots auf Nylonmembranen pipettiert. Die Doppelproben wurden untereinander aufgebracht. Als Normalisierungshilfe wurden ribosomale 18S Proben eingesetzt. Gesamt-RNA aus zerebralen Kapillarpräparationen von SHR und SHRSP wurde mittels Randomhexameren in cDNA umgeschrieben, mit $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP markiert und über Nacht mit den Nylonmembranen hybridisiert. Die Intensitäten der Signale wurden mit einem Phosphoimager detektiert und verglichen. (a) Beispiel eines Dot Blots. In der Ausschnittsvergrößerung sind exemplarisch vier Doppelspots nach der Hybridisierung mit cDNA von SHR (oben) und SHRSP (unten) dargestellt. (b) Doppelspots der vier Klone, die nach der Normalisierung unterschiedliche Intensitäten aufweisen.

4.1.2.4 Nukleotidsequenzanalyse der differentiell exprimierten cDNA-Fragmente

4.1.2.4.1 BM247 und BM259

Für BM247 und BM259 konnten keine Homologien mit bereits bekannten Genen in der Datenbank gefunden werden. Eine Translation der Nukleotidsequenz in Aminosäuren ergab für BM247 einen offenen Leserahmen von 133 Aminosäuren und für BM259 einen von 137 Aminosäuren (Abb. 4.6). Beide cDNA-Fragmente wiesen kein Start- oder Stopkodon auf.

a	BM247	
ACDMAAGTAT ACNAGAGSCT GAAGGNGTIT GCTCMAATG GAGACAATT CTGCANGCAG ATCACATCCG TTCTT	75	
N K V Y K S L K E F A Q N G D N F C K Q I T S V L		
CAGCAAGGG CCNACTTGA GATCAGCTAT GCCAAGGGC TTCAGAACT GGCAGTCAG CTCAGCMAAG CACTA	150	
Q Q R A N L E I S Y A K G L Q K L A V K L S K A L		
CAGAGCCAA AGMAAACTG TCTCAGCACT GCTTGGGCT GGGCCTCMA GAGCATGMAA TCCGCGCAG ATCTC	225	
Q S T K K N C L S T A W A W A S E S N K S A A D L		
CATCAAAAC TTGGCAAGC AATTGNGTIG GAGCAATA AGCCACACA CCAGTCCIG AGTATGCAAG AGAAG	300	
H Q K L G K A I E L E A I K P T H Q V L S M Q E K		
AGAGGAGT CGCTCGATA TGAAGTGGAA AAGTCAGCA ATCTGTITAT TAATACTGG AATCAGCAAA TAAAG	375	
K R K S L D N E V E K S A N L V I N N W N Q Q I K		
GCTAAGAAA AATTAATGAT GAGT	399	
A K K K L M M S		
b	BM259	
ACGAAGMA ATGACTTAT AGCCAGAGA GAGAACIGA TTTTGGAAAT AGAAAAGAG TCGCGCCCA TGGAG	75	
T K E N E L I A K R E K L I L E I E K E S R R M E		
GAGTTCACAG AGTTTCAGA ACTGGACCC ATGCAACGT ATGTTGCCA TGTAGACAT CTCAGAAC GIAT	150	
E F T E F A E L D R M Q Q Y V A D V R H L Q K R I		
CAGGATCCG AAGAGCTGT CCAGTITAIT AATAAAGAG AGGACTITT CAATGGGAA TIGACAAAGT ATCT	225	
Q D S E E A V Q F I N K E E E L F K W E L T K Y P		
GAACTGGAA AATTAAGT CACCAITGAA CCCIACCAGA AGTITTCAA TTTTGTCTG AAGTGGCAGC GAACA	300	
E L E K L K V T I E P Y Q K F F N F V L K N Q R T		
GAANAAGGT GGATGGATG AGGTTTCTG GACITTAAG GAGAAGCAT GGAAGCTGAT ATGATGAGT TITOC	375	
E K R W M D G G F L D L N G E S M E A D I D E F S		
CGAGAGTTI TTAGACTT GAAGTCTC CRAAC	411	
R E V F K T L K F F Q T		

Abb. 4.6: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Klone BM247 und BM259.

Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen und die entsprechenden Aminosäuren der aus der Subtraktion isolierten Klone BM247 (a) und BM259 (b). Die Aminosäuren sind entsprechend ihres Einbuchstaben Codes abgekürzt und stehen unter der ersten der drei Basen, die das entsprechende Kodon bilden.

Für diese Klone wurde eine Suche in den EST-Datenbanken durchgeführt. Für den Klon BM247 wurde ein EST-Eintrag gefunden (Genbank Zugangsnummer AL550371), der auf Proteinebene eine Identität von 87% aufweist. Beide Peptide enthalten eine sog. Fes/CIP4 (FCH) Domäne. Das entsprechende Alignment ist in Abb. 4.7 aufgeführt.

Eine Suche nach eventuellen EST-Homologien oder Domänenstrukturen für BM259 brachte keine weiteren Ergebnisse. Eine Proscan-Analyse identifizierte potentielle PKC-Bindungsstellen an Aminosäureposition 21, 100 und 131 und eine Phosphorylierungsstelle für die cAMP und cGMP-abhängige Proteinkinase an Position 145. Beide Klone wurden in die Datenbank des *National Institutes of Health (NIH)* eingegeben (Genbank Zugangsnummern: AY032855 für BM247 und AY032856 für BM259).

4. Ergebnisse

BM247	-----	NKVKYKSLKE PAQNGDNFCK QITPSVLQORA NLEISYAKGL QKLA	KLSKA LQSTKKNCLLS TAWAW	64
AL550371	NMRDPLTDCP	YKVKYKSLKE FSNQNGDNFCK QITPSVLQORA NLEISYAKGL QKLA	KLSKA LQNTKKNCLLS TAWAW	75
BM247		ASESMKSNAD LHQKLGKATE LEAIKPTHOV LSMDEKKRKS LDNEVEKSN	LVINNWNQOI KAKKKLMMS	133
AL550371		ASESMKSNAD LHQKLGKATE LEAIKPTHOV LNVDEKKRKS LDNEVEKSN	LVISNWNQOI KAKKKLMVST KKHEA	150
BM247	-----	LPQLVSSKQ SMTEKEKRKL LNKLTKSTEK LEKEDENYYQ KXMAGYSTRL	KWENTLENCY QSILELEKER IQLLC	133
AL550371		LPQLVSSKQ SMTEKEKRKL LNKLTKSTEK LEKEDENYYQ KXMAGYSTRL	KWENTLENCY QSILELEKER IQLLC	225
BM247	-----	NNLNQYSQHI SLFGQTLTTC HTQIHCAISK IDIEKDIQAV MEETAILSTE	NKSEFLITDY FEEDPNSAMD KERRK	133
AL550371		NNLNQYSQHI SLFGQTLTTC HTQIHCAISK IDIEKDIQAV MEETAILSTE	NKSEFLITDY FEEDPNSAMD KERRK	300
BM247	-----			133
AL550371	XLLKP			305

Abb. 4.7: Alignment des Klonen BM247 mit dem EST-Klon AL550371.

Dargestellt ist das Alignment der Aminosäuren des Klonen BM247 mit dem EST-Klonen AL550371. BM247 enthält, ebenso wie der EST-Klon, eine FCH-Domäne, die durch den schwarzen Balken gekennzeichnet ist.

4.1.2.4.2 BM254

BM254 wies eine Homologie von ca. 160 Bp zu dem 3'-nicht translatierten Bereich der cDNA auf, die für das Regulator of G-Protein Signaling 5 (RGS5) Protein aus der Maus kodiert. Eine entsprechend vollständige Sequenz für RGS5 aus der Ratte war zu der Zeit nicht in den Datenbanken verfügbar. Lediglich ein EST-Eintrag konnte gefunden werden, der allerdings außerhalb von BM254 im 5'-Bereich der kodierenden Region von RGS5 lag, so daß er für die Charakterisierung des Klonen nicht verwendet werden konnte. Das Alignment mit Maus RGS5 cDNA ist in Abb. 4.8. dargestellt.

BM254	-----	TAC AGCATCC	CC	TAGGCACTG CACAT	TTCTC CATAGCAGCT TTGCTCCAG	51
M. musculus RGS5 3'-Ende	GTAGCAAC	AGCATCC	CC	TAGGCACTG CACAT	TTCTC CATAGCAGCT TTGCTCCAG	
BM254		ATACCAAAC ATAGGC	TAAC CACAGGC	GT GTTGCTAACT CTTTC	CTCA TGTG	111
M. musculus RGS5 3'-Ende	ATACCAAAC ATAGGC	TAAC CACAGGC	GT GTTGCTAACT CTTTC	CTCA TGTG	111	
BM254		GTTTGTGGG TCTGTGTCT	AAGCCCTC AC	TTTCT TTTTCTTTT	CGACAGCT	168
M. musculus RGS5 3'-Ende	GTTTGTGGG TCTGTGTCT	AAGCCCTC AC	TTTCT TTTTCTTTT	CGACAGCT	168	
BM254		TGTAATAAAG ATTTTAC	CAAT GTTACTTCA	TCTAAGCT	ACAG	215
M. musculus RGS5 3'-Ende	-----	CAAT GTTACTTCA	TCTAAGCT	ACAG	215	
BM254	-----	GCT CTGT	TAAA CAT	AA	GTT	247
M. musculus RGS5 3'-Ende	ACTGGCGCT	CTGTCTTAAA CAT	AA	GTT	247	
BM254		AAT	AGTCTTCAAG	A	CTGCTT TGA	274
M. musculus RGS5 3'-Ende	AATCTCTCTC	AGTCTTCAAG	A	CTGCTT TGA	274	

Abb. 4.8: Alignment des Klonen BM254 mit M. musculus RGS5.

Dargestellt ist das Alignment von BM254 mit dem 3'-nicht translatierten Bereich von Mus musculus RGS5.

4. Ergebnisse

4.1.2.4.3 BM269

Bei dem vierten Klon, BM269, handelte es sich um den Sulfonylharnstoffrezeptor 2B (SUR2B), für den ein entsprechender Genbank-Eintrag vorhanden war (Zugangsnummer AF019628).

4.1.3 Verwendung hochdichter cDNA-Filter zur Expressionsanalyse

4.1.3.1 Aufbau der cDNA-Filter

Die cDNA-Filter enthielten insgesamt je 57.600 cDNAs, die auf eine 22 x 22 cm große Nylonmembran aufgebracht wurden. Basis für die cDNA Filter war eine Rattenhirn cDNA-Bank, die vom Ressourcenzentrum in Berlin zur Verfügung gestellt wurde. Diese Bank enthielt 27.648 nicht-sequenzierte cDNAs. Jede dieser cDNAs wurde als Doppelspot in einer speziellen Anordnung aufgebracht, zusätzlich wurde Lachssperma-DNA als Markierungshilfe für die spätere Analyse verwendet. Anhand der Muster der doppelt gespotteten cDNAs und der Markierungshilfen konnten positive Klone schnell identifiziert werden (Abb. 4.9).

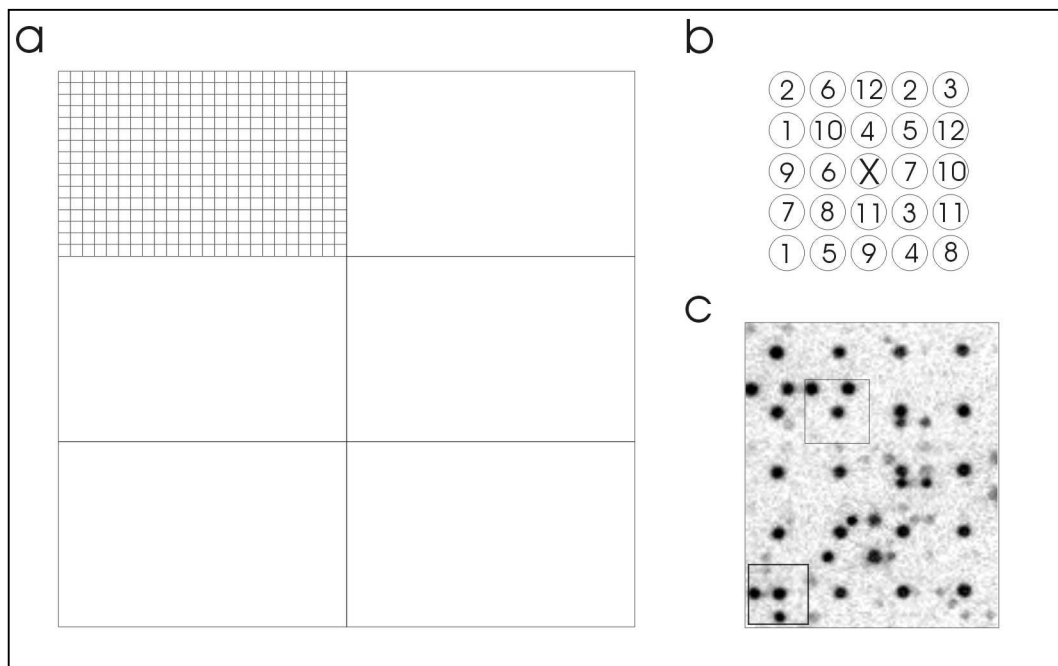


Abb. 4.9: Schema des Aufbaus eines hochdichten cDNA-Filters.

Der cDNA-Filter ist unterteilt in sechs Felder, wobei jedes Feld aus 384 Blöcken besteht (a). Jeder Block enthält 25 Spots, die sich aus einem sog. Guidespot in der Mitte (X, Lachssperma-DNA) und aus 12 Doppelspots zusammensetzen (die einzelnen cDNAs). Die Doppelspots werden in einem spezifischen Muster pipettiert (b). Ausschnitt eines Bereichs des hybridisierten Filters. Anhand der Position der Guidespots können die Blöcke mit den Doppelspots identifiziert werden (c).

4.1.3.2 Beurteilung der Qualität der Hybridisierung

Eine sehr gute Qualität der Hybridisierung der cDNA-Filter mit der radioaktiv markierten Probe war ausschlaggebend für die weitere Auswertung. So mußten die Signale der Lachsperma DNA klar erkennbar sein, um ein Gitter über den Filter legen und die Position der einzelnen Signale den entsprechenden cDNA-Klonen der Bank zuordnen zu können. Ein weiteres Kriterium bestand in einer geringen Abweichung der Signalintensitäten der Doppelspots. Während der Auswertung wurde ein Plot für jeden Filter angelegt, in dem die Intensitäten der beiden Signale einer gespotteten cDNA gegeneinander aufgetragen wurden (Abb. 4.10). Im Idealfall sollte eine Extrapolation der Meßpunkte eine gleichmäßige Gerade ergeben. Lag der durch das Analyseprogramm berechnete Korrelationskoeffizient zu niedrig ($< 0,87$), so wurde der Filter nicht weiter ausgewertet. In einer zweiten Darstellung wurde die Qualität der Doppelsignale für jeden einzelnen Block ausgerechnet und die gemittelte Qualität eines jeden Blocks mittels einer Farbskala dargestellt (Abb. 4.11). Diese Darstellung gab Auskunft darüber, ob die Hybridisierung in einzelnen Bereichen des Filters nicht optimal ablief. Solche fehlerhaften Bereiche entstanden z. B. dadurch, daß der Filter in den Hybridisierungsflaschen übereinanderlag und die Hybridisierungslösung die Oberfläche an dieser Stelle nicht benetzen konnte.

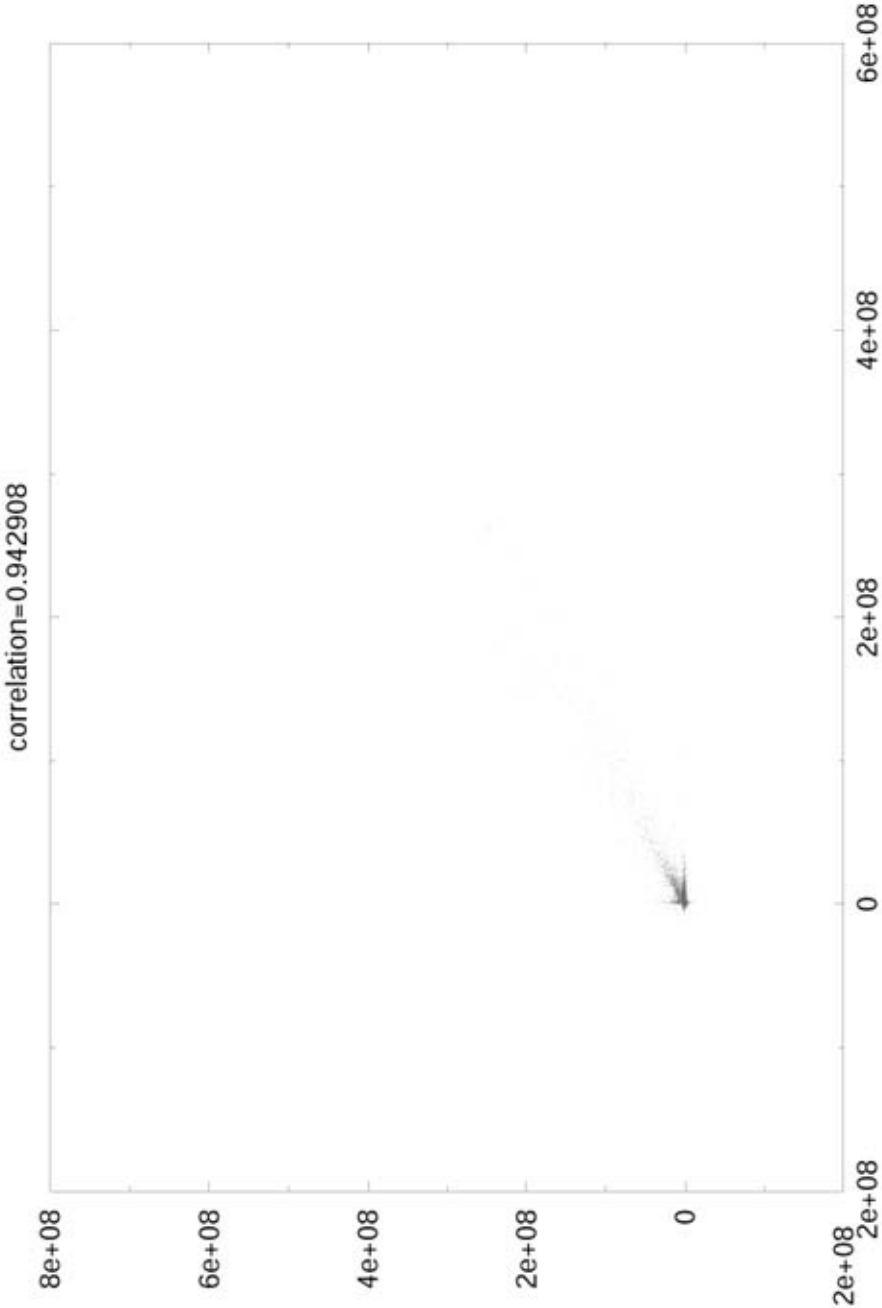


Abb. 4.10: Qualität der Doppelspots eines cDNA-Filters.

In diesem Plot wurden jeweils die Intensitäten der Doppelspots gegeneinander aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient gibt die Qualität der Hybridisierung wieder.

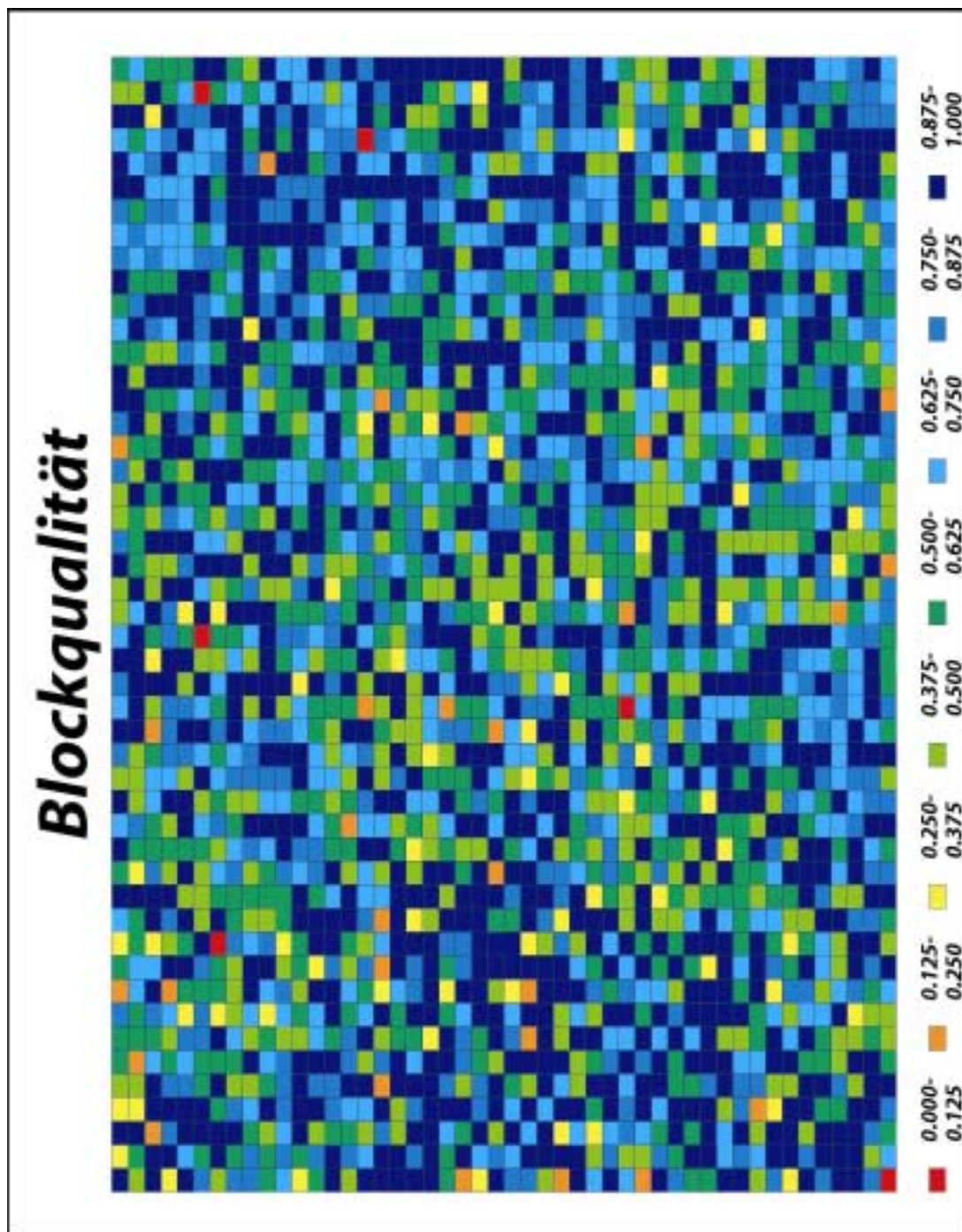


Abb. 4.11: Hybridierungsqualität der einzelnen Blöcke eines cDNA-Filters.
 Die Intensitätsunterschiede der Doppelspots der einzelnen Blöcke wurden gemittelt. Die Farbe der jeweiligen Blöcke gibt den Korrelationskoeffizienten an.

4.1.3.3 Auswertung der cDNA-Filterexperimente

Für die Hybridisierung wurden sowohl RNA-Proben aus den Kapillarpräparationen von SHRSP und SHR als auch die in der Subtraktion erstellten cDNA-Banken eingesetzt. Ein Beispiel eines hybridisierten cDNA-Filters ist in Abb. 4.12 dargestellt.

Die Positionen auf den Filtern, die nach der Hybridisierung mit den subtraktiven Proben eindeutige Signalunterschiede zeigten, wurden mit den entsprechenden Positionen auf jenen Filtern verglichen, die mit den nativen RNAs aus den Kapillaren von SHR und SHRSP hybridisiert wurden.

Zwei Aspekte fielen dabei auf. Zum einen konnten viele Positionen, die auf den subtrahierten Filtern starke Signale zeigten, auf den Filtern mit den nativen Proben nicht analysiert werden, da die Intensitäten so gering waren, daß selbst nach verlängerter Exposition auf den Phosphoimagerplatten keine Quantifizierung der Spots möglich war.

Zum anderen war es in den meisten Fällen auch nicht möglich, die deutlichen Signalunterschiede, die bei den subtrahierten Filtern gemessen wurden, in den nativen Filtern wiederzufinden. Dieses Problem lag in der geringeren Sensitivität der Filter im Vergleich zu der cDNA-Subtraktion begründet. cDNA-Filter können kleine Unterschiede in der Expression nur schwer detektieren.

Insgesamt wurden acht Positionen als eindeutig differierend in ihren Signalintensitäten identifiziert, wobei alle acht Signale stärker auf den Filtern aufleuchteten, die mit Proben von SHRSP hybridisiert wurden. Die entsprechenden Plasmide aus der cDNA Bank wurden isoliert und sequenziert. Die analysierten cDNAs sowie die gemessenen Unterschiede in der Expression zwischen SHRSP und SHR sind in Tabelle 4.2. aufgelistet.

Interessanterweise stellte sich nach der Sequenzierung heraus, daß die acht cDNAs nur für vier verschiedene Proteine kodieren. Dieses wiederholte Auftreten der selben cDNAs zeigte, daß die Hybridisierung erfolgreich abgelaufen war.

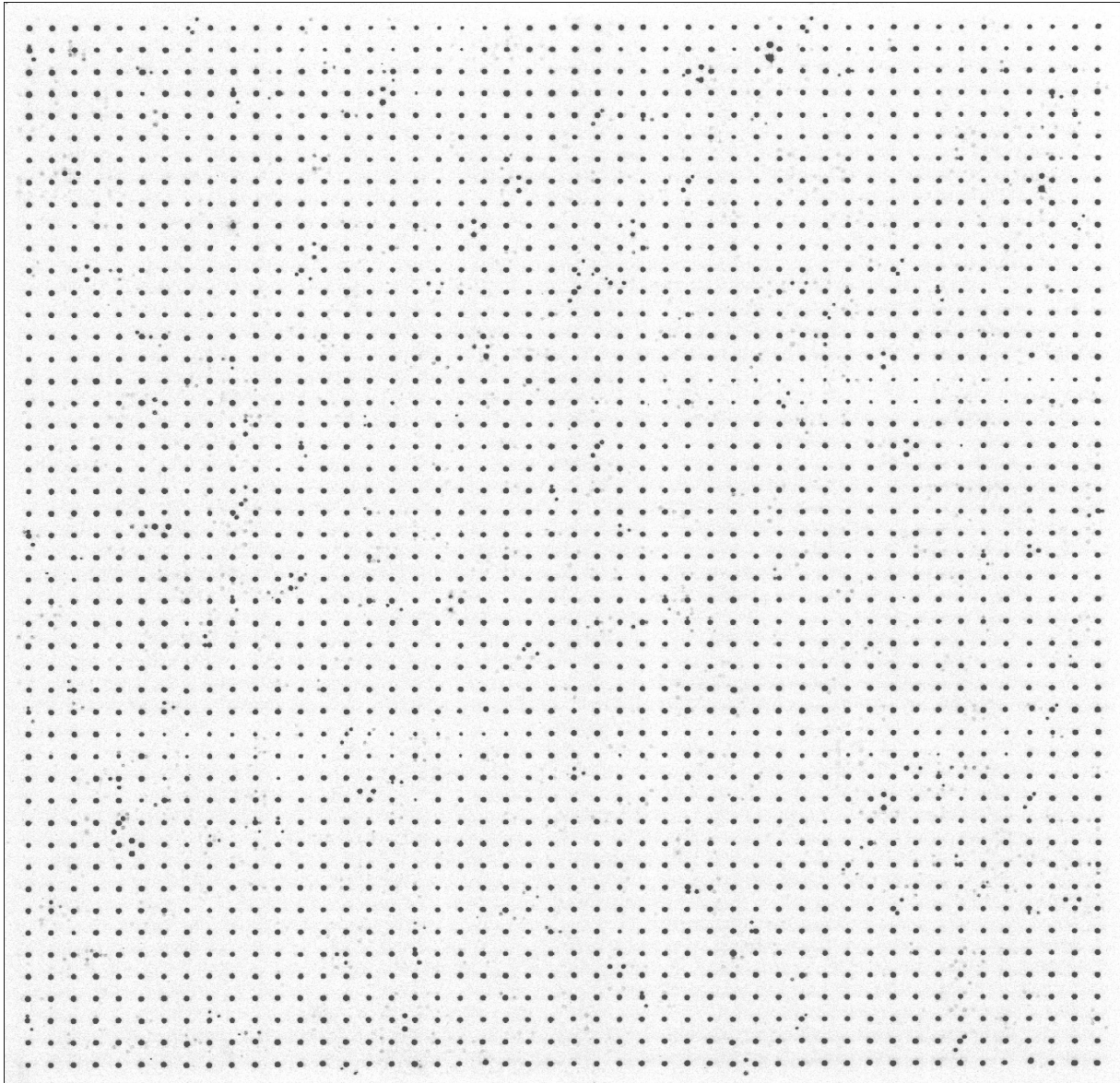


Abb. 4.12: Beispiel eines hybridisierten cDNA Filters.

Gesamt-RNA aus einer Kapillarpräparation wurde mittels Randomhexameren und Poly-(dT)-Oligonukleotiden in cDNA umgeschrieben. Für die radioaktive Markierung wurde die cDNA mit Randomprimern und $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP für 30 min bei 37°C inkubiert und über G-50 Säulen aufgereinigt. Die markierte cDNA wurde 5 min denaturiert, mit Hybridisierungspuffer versetzt und auf die Filter gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 16 Stunden bei 65°C. Anschließend wurden die Filter zweimal mit Waschpuffer 1 und einmal mit Waschpuffer 2 für jeweils 20 min bei 65°C gewaschen und anschließend 12 Stunden auf einer Phosphoimagerplatte inkubiert. Die Platte wurde eingelezen und die Signale graphisch ausgewertet.

Klonnummer	Genname	Δ subtrahierte Probe	Δ native Probe
10D13	Cyclophilin A	10,2	3,9
1D21	Cyclophilin A	14,8	4,1
35G13	Cyclophilin A	12,9	4,2
67P3	Cystatin- β	8,7	3,1
54C20	Galectin-9	25,3	5,4
5L14	Galectin-9	28,4	6,7
48G20	Ubiquitin B	16,9	3,4
4P8	Ubiquitin B	19,2	5,1

Tab. 4.2: Die aus dem cDNA-Filterversuch isolierten differentiell exprimierten Gene.

In der Tabelle sind die Klonnummern, die Ergebnisse der Datenbankanalyse und die gemessenen Expressionsunterschiede dargestellt. Dabei sind unter Δ subtrahierte Probe die Unterschiede dargestellt, die bei den Hybridisierungsexperimenten mit den subtrahierten cDNA-Proben ermittelt wurden und unter Δ native Probe jene Differenzen, die bei den Hybridisierungsexperimenten mit der nativen RNA gemessen wurden. Die Sequenzdaten wurden mit den BLAST-Algorithmen des NIH analysiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

4.1.4 Quantitative RT-PCR der differentiell exprimierten cDNAs

Die Sensitivität liegt bei Hybridisierungsexperimenten mit cDNA-Filtern zu niedrig, um eine akkurate Bestimmung der tatsächlichen Expressionshöhen der einzelnen cDNAs zu ermöglichen. Überdies können sehr geringe Differenzen in der Expression (< 2) mit den Filtern nicht mehr detektiert werden.

Aus diesem Grund wurden die Expressionsunterschiede der oben beschriebenen RNA Spezies durch eine *real-time* RT-PCR überprüft. Dabei wurden fluorogene Sonden eingesetzt, die spezifisch an die einzelnen Gene hybridisierten. Die Sonden wurden nach Möglichkeit so plaziert, daß ihre Bindungsstellen in der kodierenden Region lagen.

Als Normalisierungskontrolle wurde zunächst eine Sonde für GAPDH verwendet. Allerdings zeigte sich in einem Vorversuch, daß die Expression von GAPDH in SHRSP reguliert wurde und somit als Normalisierungskontrolle nicht geeignet war (Abb. 4.13). In den folgenden Versuchen wurde deshalb die Verteilung der ribosomalen 18S RNA als Bezugspunkt gewählt.

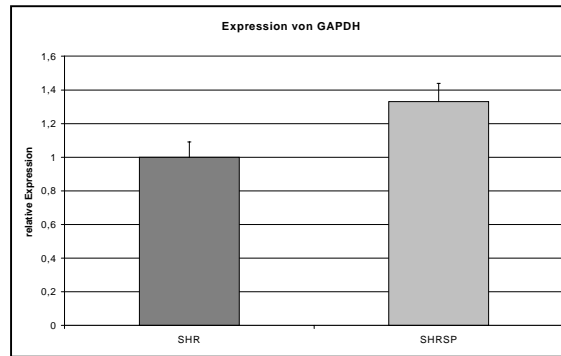


Abb. 4.13: Verteilung der GAPDH in den zerebralen Kapillaren von SHRSP und SHR.

GAPDH zeigte eine um 30% höhere Expression in den zerebralen Kapillaren von SHRSP verglichen mit SHR. Für die quantitative RT-PCR wurden jeweils 10 ng Gesamt-RNA aus drei unabhängigen Kapillarpräparationen verwendet. Als Normalisierungskontrolle wurde die Expression ribosomaler 18S RNA bestimmt.

Auch wurde im Verlauf der Untersuchungen von einem Ein-Schritt RT-PCR Protokoll (EZ-RT-PCR Kit von ABI) zu einem Protokoll gewechselt, das reverse Transkription und nachfolgende quantitative PCR trennt. Die in diesen getrennten Reaktionen eingesetzten Enzyme für die reverse Transkription (Superscript II reverse Transkriptase) und AmpliTaq Gold (DNA Polymerase) zeigten eine vielfach höhere Sensitivität als die im EZ-RT-PCR Kit verwendete rTth-Polymerase. Damit war es möglich, die Menge der einzusetzenden RNA für die PCR-Reaktion um mehr als die Hälfte auf 5 bis 20 ng Gesamt-RNA zu reduzieren.

4.1.4.1 Vergleich der Expressionshöhen der cDNAs aus der Subtraktion

Für die vier in der Subtraktion isolierten cDNAs wurden Primer und TaqMan-Sonden hergestellt. Die sehr restriktiven Anforderungen des TaqMan-Systems an die Sonden benötigten eine sehr sorgfältige Auswahl der verwendeten Primer/Sonden-Kombinationen (3.6.3). Um die optimalen Reaktionsbedingungen zu ermitteln, wurde in einem Vorversuch die optimale Magnesiumkonzentration austitriert (Kapitel 3.6.5). Für die Quantifizierung wurde 1 µg der entsprechenden DNase-behandelten RNA mit Randomprimern in cDNA umgeschrieben und 1/100 für die PCR-Reaktion eingesetzt.

Die Auswertung der Versuche erfolgte über die Standardkurvenberechnung (3.6.7), die in ihrer Aussage bereits Informationen über die Effizienz der abgelaufenen PCR-Reaktion beinhaltet.

Durch die quantitative RT-PCR konnten die Ergebnisse der Dot-Blot Analyse (4.1.2.3) im wesentlichen bestätigt werden. So wurde BM254 in SHRSP um 40% herunterreguliert, während die restlichen Klone in SHRSP hochreguliert wurden. SUR2B zeigte den höchsten Unterschied mit einer 3,6-fach stärkeren Expression in SHRSP. Die Expression von BM247

4. Ergebnisse

wurde um das 1,8-fache und diejenige von BM259 um das 2,8-fache in SHRSP hochreguliert.

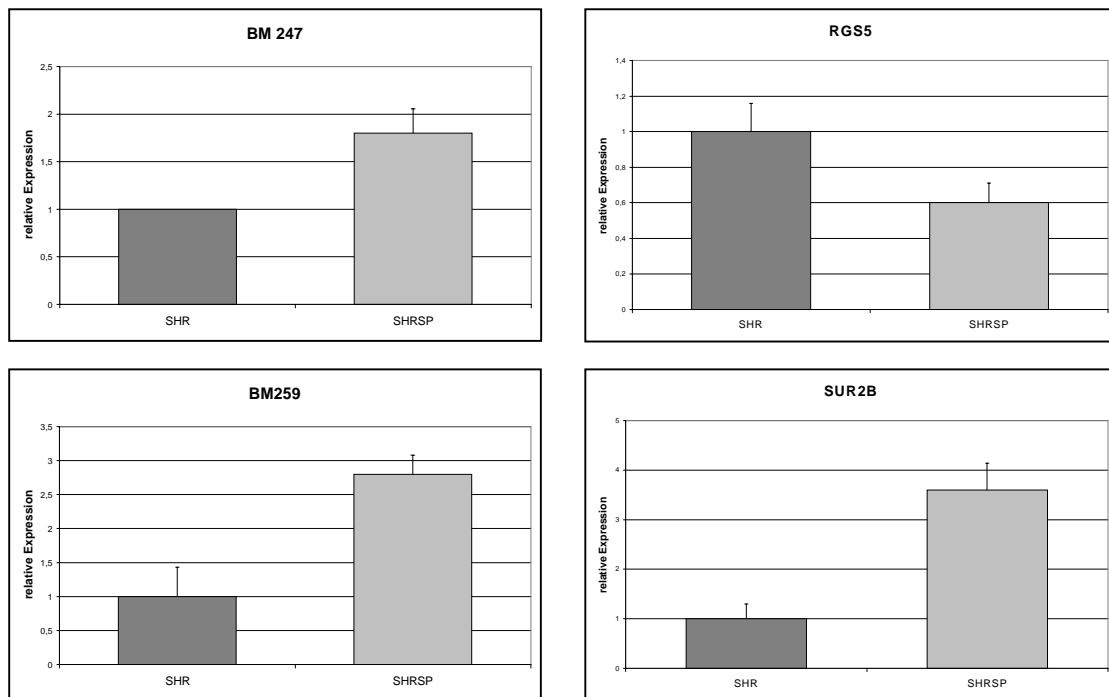


Abb. 4.14: Expressionshöhen der in der Subtraktion isolierten cDNAs.

Die Expressionshöhen wurden mit *real-time* quantitativer RT-PCR bestimmt. Aus jeweils drei Kapillarpräparationen von SHR und SHRSP wurde Gesamt-RNA isoliert und ein DNase-Verdau durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Für die zu testenden cDNA-Fragmente wurden jeweils ein Primerpaar und eine fluoreszenzmarkierte Sonde synthetisiert und die korrekte Magnesiumkonzentration ermittelt. Für die quantitative RT-PCR wurden jeweils 10 ng umgeschriebene Gesamt-RNA eingesetzt. Als Normalisierungskontrolle wurde die Expression der 18S RNA bestimmt. Die Expressionshöhen der einzelnen RNAs wurden auf die Expression der 18S RNA normalisiert, und die Verteilung als relative Expression angegeben. Dargestellt sind die Expressionsunterschiede für BM247, BM259, RGS5 (BM254) und SUR2B (BM269).

4.1.4.2 Vergleich der Expressionshöhen der cDNAs aus den Hybridisierungsexperimenten mit den hochdichten cDNA-Filtern

Um die cDNA-Filterversuche zu verifizieren, wurden TaqMan-Sonden für Galectin-9, Cyclophilin A, Cystatin- β und Ubiquitin B eingesetzt. Auch hier konnten die Tendenzen der Ergebnisse der cDNA Filterversuche durch die quantitative RT-PCR bestätigt werden. So wurde Galectin-9 in den SHRSP um das 3,2-fache stärker exprimiert. Auch die drei anderen cDNAs wurden in den SHRSP häufiger transkribiert als in den SHR. Für Cystatin- β wurde eine Expressionssteigerung um den Faktor 1,7 gemessen, für Cyclophilin A um den Faktor 1,6 und für Ubiquitin B um den Faktor 1,9 (Abb.4.15).

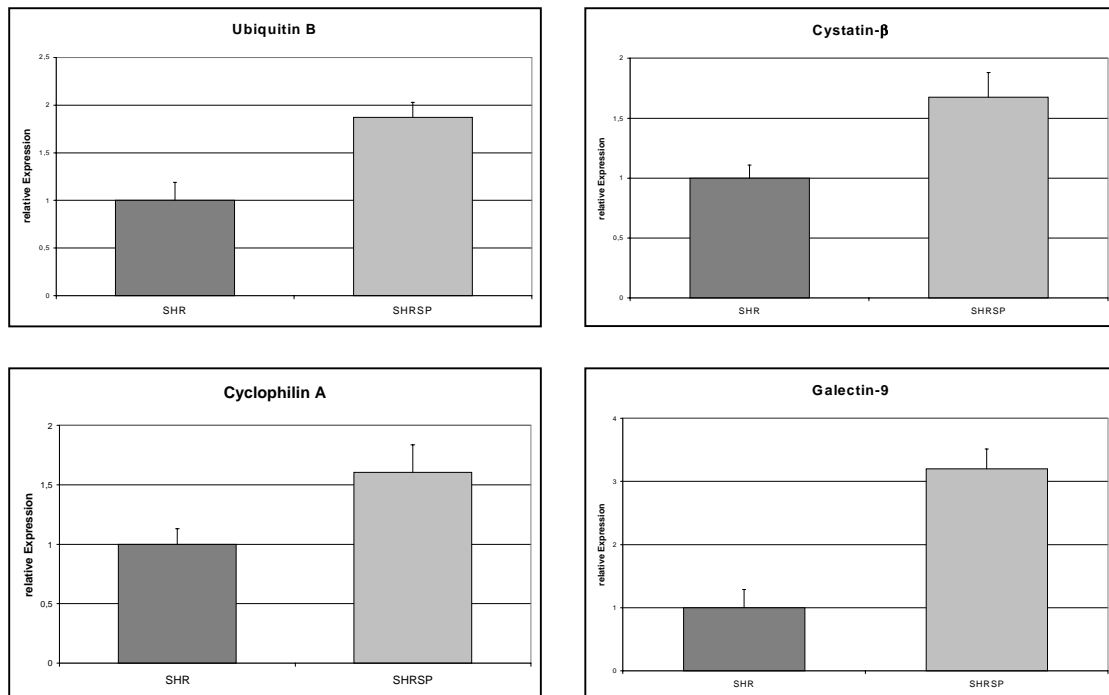


Abb. 4.15: Expressionshöhen der im Filterversuch isolierten cDNAs.

Die Expressionshöhen wurden mittels *real-time* RT-PCR bestimmt. Für die quantitative RT-PCR wurden jeweils 10 ng in cDNA umgeschriebene Gesamt-RNA eingesetzt. Als Normalisierungskontrolle wurde die 18S RNA gemessen. Die Expressionshöhen der einzelnen RNAs wurden auf die Verteilung der 18S RNA normalisiert und die Verteilung als relative Expression angegeben. Abgebildet sind die Expressionsvergleiche für Ubiquitin B, Cystatin-β, Cyclophilin A und Galectin-9.

4.2 Charakterisierung von RGS5

4.2.1 Klonierung der kodierenden Sequenz von RGS5 aus der Ratte

Die Sequenzanalyse des Klonen BM254 ergab eine leichte Homologie mit dem 3'-Bereich der cDNA für Maus RGS5. Weitergehende Informationen über die kodierende Sequenz waren mit Ausnahme eines kurzen unvollständigen EST-Klons nicht bekannt, noch konnte mit Sicherheit gesagt werden, ob es sich tatsächlich um das Rattenhomolog zu Maus RGS5 handelte. Aus diesem Grund sollte die vollständige kodierende Sequenz aus der Ratte kloniert werden. Die hierfür durchgeführte RACE-PCR stellt eine häufig verwendete Methode dar, um die Enden einer cDNA zu amplifizieren, da für eine RACE-PCR nur ein sehr kleines Stück an Geninformation (30 Basenpaare reichen aus) zur Verfügung stehen muß.

Die RACE-PCR lieferte ein 1,2 Kb großes cDNA Fragment, das nach einer Gelaufreinigung in den pCRII Vektor ligiert und in *E.coli* transformiert wurde. Das Plasmid wurde sequenziert und die Sequenzen gegen BM254 und die aus Mensch bzw. Maus isolierte RGS5 cDNA

4. Ergebnisse

abgeglichen (Abb. 4.17a). Die Sequenz wurde unter der Zugangsnummer AF241259 in die *NIH* Gendatenbank eingegeben.

RGS5 aus der Ratte (rRGS5) besitzt eine kodierende Sequenz von 546 Bp inklusive des Stopkodons. Übersetzt in Aminosäuren ergibt sich daraus ein Protein von 181 Aminosäuren. rRGS5 enthält die charakteristische RGS5-Domäne (Aminosäure-Position 64-180), des weiteren trägt es zwei Phosphorylierungsstellen für die PKC. Im aminoterminalen Bereich befindet sich außerdem ein mögliches Kernexportsignal, das aus der Konsensussequenz LXXLXXXXL (X bezeichnet eine beliebige Aminosäure) besteht (Abb. 4.16).

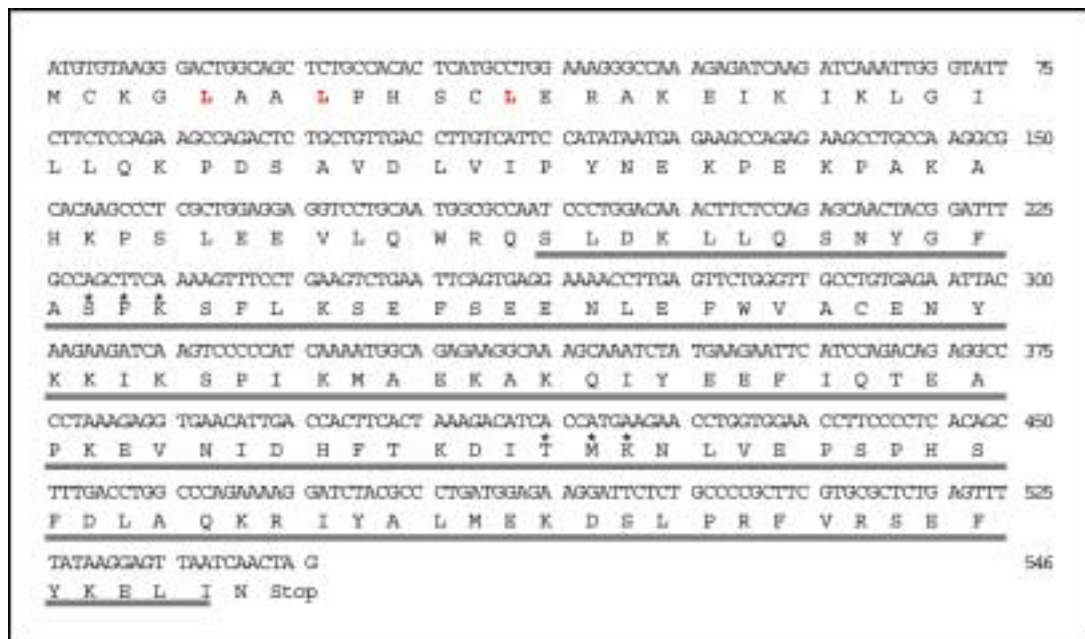


Abb. 4.16: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von RGS5 aus der Ratte.

Dargestellt sind die cDNA Sequenz des kodierenden Bereiches und die entsprechenden Aminosäuren. Die RGS5-Domäne ist mit einem Balken markiert und die Kernexportsequenz durch rote Buchstaben gekennzeichnet. Potentielle Phosphorylierungsstellen für PKC sind durch Sterne über den entsprechenden Aminosäuren bezeichnet.

Die Aminosäuresequenz in Ratte, Maus und Mensch ist hoch konserviert. Verglichen mit dem entsprechenden humanen bzw. Maus-Protein weist rRGS5 eine Identität von 91,7% bzw. 96,7% auf (Abb. 4.17b). Um eine Mutation in der Sequenz von SHRSP auszuschließen, die für die differentielle Expression in den Schlaganfallratten verantwortlich sein könnte, wurden die kodierenden Bereiche von SHRSP, SHR und den normotensiven WKY Ratten miteinander verglichen. Die Analyse der Sequenzen ergab jedoch keinerlei Abweichungen in der Aminosäuresequenz innerhalb der drei Stämme.

4. Ergebnisse

a			
R. norvegicus RGS5 cds	ATGTGTAAGG GACTGGCAGC TTGGCCAC TCATGCCTGG AAAGGGCCAA AGAGATCAAG		60
M. musculus RGS5 cds	ATGTGTAAGG GACTGGCAGC TTGGCCAC TCATGCCTGG AAAGGGCCAA AGAGATCAAG		
H. sapiens RGS5 cds	ATGTGTAAGG GACTGGCAGC TTGGCCAC TCATGCCTGG AAAGGGCCAA AGAGATCAAG		
R. norvegicus RGS5 cds	ATCAAAATTGG GATATTCTCT CCAGAAGCCA GACTCTGCTG TTGACCTTGT CATTCCATAT		120
M. musculus RGS5 cds	ATCAAAATTGG GATATTCTCT CCAGAAGCCA GACTCTGCTG TTGACCTTGT CATTCCATAT		
H. sapiens RGS5 cds	ATCAAAATTGG GATATTCTCT CCAGAAGCCA GACTCTGCTG TTGACCTTGT CATTCCATAT		
R. norvegicus RGS5 cds	AATGAGAAGC CAGAGAACC TGCCAAAGCG CAAAGGCCT CACTGGAAGA GGCCTGCAG		180
M. musculus RGS5 cds	AATGAGAAGC CAGAGAACC TGCCAAAGCG CAAAGGCCT CACTGGAAGA GGCCTGCAG		
H. sapiens RGS5 cds	AATGAGAAGC CAGAGAACC TGCCAAAGCG CAAAGGCCT CACTGGAAGA GGCCTGCAG		
R. norvegicus RGS5 cds	TGGCCCAAT CCCTGGACAA ACTTCTCAG AACACTAG GATTTGCCAG GTTCAAAGT		240
M. musculus RGS5 cds	TGGCCCAAT CCCTGGACAA ACTTCTCAG AACACTAG GATTTGCCAG GTTCAAAGT		
H. sapiens RGS5 cds	TGGCCCAAT CCCTGGACAA ACTTCTCAG AACACTAG GATTTGCCAG GTTCAAAGT		
R. norvegicus RGS5 cds	TTCTGAAGT CTGAATTCAG TGAGAAAAC CTTGAGTTCT GGTTCCTG TGAGAATTAC		300
M. musculus RGS5 cds	TTCTGAAGT CTGAATTCAG TGAGAAAAC CTTGAGTTCT GGTTCCTG TGAGAATTAC		
H. sapiens RGS5 cds	TTCTGAAGT CTGAATTCAG TGAGAAAAC CTTGAGTTCT GGTTCCTG TGAGAATTAC		
R. norvegicus RGS5 cds	AAGAAGATCA AGTCCCCT CAATATGGCA GAGAAGGCAA AGCAAATTA TGAAGAATTC		360
M. musculus RGS5 cds	AAGAAGATCA AGTCCCCT CAATATGGCA GAGAAGGCAA AGCAAATTA TGAAGAATTC		
H. sapiens RGS5 cds	AAGAAGATCA AGTCCCCT CAATATGGCA GAGAAGGCAA AGCAAATTA TGAAGAATTC		
R. norvegicus RGS5 cds	ATTCAGACAG AGGCCCTAA AGAGGTGAAC ATTGACCACT TCACTAAGA CATCACATG		420
M. musculus RGS5 cds	ATTCAGACAG AGGCCCTAA AGAGGTGAAC ATTGACCACT TCACTAAGA CATCACATG		
H. sapiens RGS5 cds	ATTCAGACAG AGGCCCTAA AGAGGTGAAC ATTGACCACT TCACTAAGA CATCACATG		
R. norvegicus RGS5 cds	AAGAACCTGG TGGAACCTC CCTCAGCAG TTTGACTGG CCCAGAAAAG GATCAAGCC		480
M. musculus RGS5 cds	AAGAACCTGG TGGAACCTC CCTCAGCAG TTTGACTGG CCCAGAAAAG GATCAAGCC		
H. sapiens RGS5 cds	AAGAACCTGG TGGAACCTC CCTCAGCAG TTTGACTGG CCCAGAAAAG GATCAAGCC		
R. norvegicus RGS5 cds	CTGATGGAGA AGGATTCTCT GCCCGCTTC GTGCGCTCTG AGTTTATPA GGAGTAATC		540
M. musculus RGS5 cds	CTGATGGAGA AGGATTCTCT GCCCGCTTC GTGCGCTCTG AGTTTATPA GGAGTAATC		
H. sapiens RGS5 cds	CTGATGGAGA AGGATTCTCT GCCCGCTTC GTGCGCTCTG AGTTTATPA GGAGTAATC		
R. norvegicus RGS5 cds	AACTAG		546
M. musculus RGS5 cds	AACTAG		
H. sapiens RGS5 cds	AACTAG		
b			
R. norvegicus RGS5	MCKGLAALPH SCLERAKEIK IKLGILLQKP DSAVDLVIPIY NEKPEKPAKA		50
M. musculus RGS5	MCKGLAALPH SCLERAKEIK IKLGILLQKP DSAVDLVIPIY NEKPEKPAKA		
H. sapiens RGS5	MCKGLAALPH SCLERAKEIK IKLGILLQKP DSAVDLVIPIY NEKPEKPAKA		
R. norvegicus RGS5	HKESLEEMLQ WRSLDKLLQ NSYGHAFKFS FLKSEFSEEN LEFWACENY		100
M. musculus RGS5	HKESLEEMLQ WRSLDKLLQ NSYGHAFKFS FLKSEFSEEN LEFWACENY		
H. sapiens RGS5	QKISLEEMLQ WRSLDKLLQ NNYGLAFKFS FLKSEFSEEN LEFWACEDY		
R. norvegicus RGS5	KKIKSPKMA EKAKQIYEEF IQTEAPKEVN IDHFTKDIM KNLVPSPHS		150
M. musculus RGS5	KKIKSPKMA EKAKQIYEEF IQTEAPKEVN IDHFTKDIM KNLVPSPRS		
H. sapiens RGS5	KKIKSPKMA EKAKQIYEEF IQTEAPKEVN IDHFTKDIM KNLVPSLS		
R. norvegicus RGS5	FDLAQKRIFA LMEKDSLPRF VRSEFYKELI N		181
M. musculus RGS5	FDLAQKRIFA LMEKDSLPRF VRSEFYKELI K		
H. sapiens RGS5	FDVAQKRIFA LMEKDSLPRF VRSEFYKELI K		

Abb. 4.17: cDNA- und Aminosäuresequenzen von RGS5 aus Mensch, Maus und Ratte

Die kodierenden Bereiche der cDNAs (a) und die Aminosäuresequenzen (b) von Ratte, Maus und Mensch wurden gegeneinander abgeglichen. Identische Nukleotide bzw. Aminosäuren sind durch eine Box markiert.

4.2.2 Verifizierung der differentiellen Expression für RGS5

Die TaqMan-Sonde, die für die Analyse der Expression von BM254 eingesetzt wurde, lag im 3'-Bereich von rRGS5. Um auszuschließen, daß die beobachteten Expressionsunterschiede aus eventuellen strukturellen Veränderungen im 3'-nicht-kodierenden Bereich von SHRSP hervorgehen, wurde eine zweite Sonde eingesetzt, die ihre Bindungssequenz im kodierenden Bereich von rRGS5 hatte (rRGS5 TaqMan-Set). Die Ergebnisse, die aus einer *real-time* RT-PCR unter Verwendung dieses Sondensets resultierten, waren identisch zu denen, die mit der TaqMan-Sonde BM254 erhalten wurden. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß unterschiedliche Splice-Vorgänge im 3'-nicht-kodierenden Bereich die Ursachen für die unter 4.1.4.1 gemessenen Expressionsunterschiede darstellten.

4.2.3 RGS5 wird im Gehirn vorwiegend in den Kapillargefäßen exprimiert

Um zu überprüfen, ob es sich bei RGS5 um ein Protein handelte, das spezifisch in den Hirnkapillaren vorlag, oder aber ob die Expression von RGS5 ubiquitär im Gehirn erfolgte, wurde der RNA-Gehalt von RGS5 in Präparationen aus Gesamthirn und aus den angereicherten Hirnkapillaren durch eine *real-time* RT-PCR bestimmt. Würde RGS5 vor allem in den Kapillaren exprimiert werden, so sollte das Verhältnis zwischen RGS5 und 18S RNA in den Kapillarpräparationen höher ausfallen als in der Gesamthirnpräparation.

Wie in Abb. 4.18 zu erkennen ist, konnte in den Kapillarpräparationen eine ca. fünffach höhere Konzentration an RGS5-Transkript nachgewiesen werden. Somit scheint RGS5 überwiegend in den zerebralen Mikrokapillaren exprimiert zu werden.

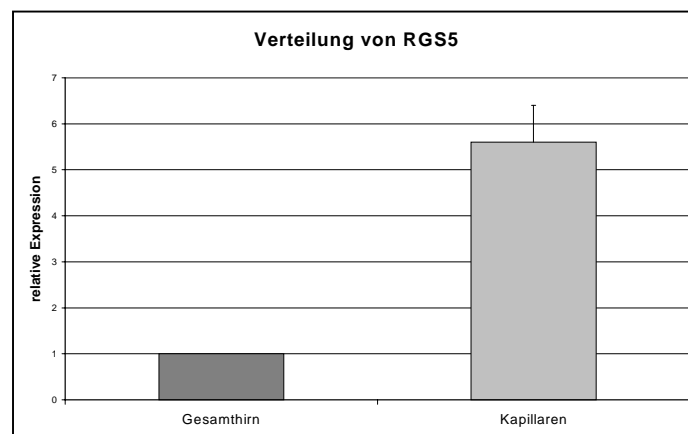


Abb. 4.18: RNA-Verteilung von RGS5 im Gehirn und in den zerebralen Kapillaren.

Um die Verteilung von RGS5 im Gesamthirn und in den Kapillaren zu vergleichen, wurde RNA aus Gehirn und Kapillarpräparationen von SHRSP isoliert. Jeweils 10 ng in cDNA umgeschriebene Gesamt-RNA wurden für eine RT-PCR mit dem rRGS5 TaqMan Set eingesetzt. Für die Normalisierung wurde die Expression der 18S RNA gemessen.

4. Ergebnisse

Um die Ergebnisse der RT-PCR zu überprüfen und die Verteilung von RGS5 genauer zu lokalisieren, wurde eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Als Vorlage für die Synthese der Probe diente dabei die vollständige kodierende Sequenz der Ratten RGS5 cDNA. Wie in Abb. 4.19 zu sehen ist, konnte die Expression von RGS5 in den Blut-Hirnschrankenkapillaren des Gehirns und in den Gefäßen des Plexus choroideus nachgewiesen werden. Dabei wird die RGS5 mRNA vorwiegend in den Endothelzellen gebildet.

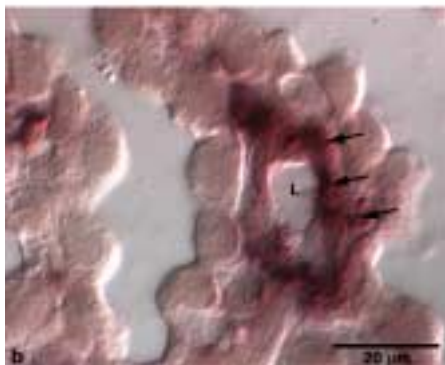
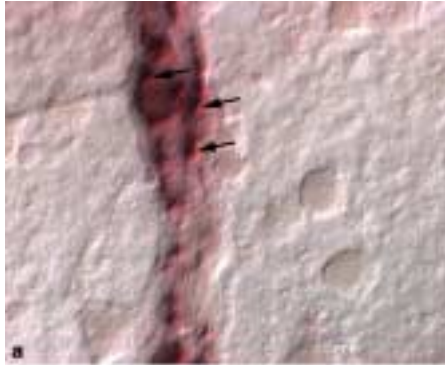


Abb. 4.19: Nachweis der RGS5 mRNA im Rattenhirn.

Die Verteilung der RGS5 mRNA wurde durch nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung untersucht. RGS5 ist in den Hirnkapillaren (a) und dort speziell in den Endothelzellen lokalisiert (Pfeile). RGS5 konnte ebenfalls in den Endothelzellen der fenestrierten Kapillaren des Plexus choroideus nachgewiesen werden (b). L: Lumen

4.2.4 Pertussistoxin-spezifische Hemmung der inhibitorischen heterotrimeren G-Proteine

RGS5 fungiert als negativer Regulator heterotrimerer inhibitorischer G-Proteine, wobei RGS5 u.a. mit den $G\alpha_{i1-3}$ und $G\alpha_o$ Untereinheiten interagiert. Um den Einfluß dieser G-Proteine auf die Expression von RGS5 zu untersuchen, wurden sie mit dem spezifischen Inhibitor Pertussistoxin (PTX) gehemmt. *In vitro* zeigte sich nach 72 Stunden Behandlung von HUVE Zellen mit PTX eine Erniedrigung der Expression von RGS5 um 60% (Abb. 4.20a). Da *in vitro* Versuche mitunter andere Verhältnisse widerspiegeln als die tatsächlichen im Organismus ablaufenden Vorgänge, wurde der Einfluß von PTX auf RGS5 *in vivo* untersucht. Hierzu wurden WKY Ratten für 5 Tage mit PTX behandelt (10 µg/Kg Körpergewicht) und anschließend die Expressionshöhen von RGS5 in den zerebralen Kapillaren bestimmt. Wie aus Abb. 4.20b

4. Ergebnisse

hervorgeht, wurde auch *in vivo* die Expression von RGS5 durch Inaktivierung von PTX-sensitiven G-Proteinen gehemmt. Verglichen mit den *in vitro* erhaltenen Daten erfolgte die Inhibition der Expression *in vivo* jedoch moderater (25% im Vergleich zu 60% bei den *in vitro* Versuchen).

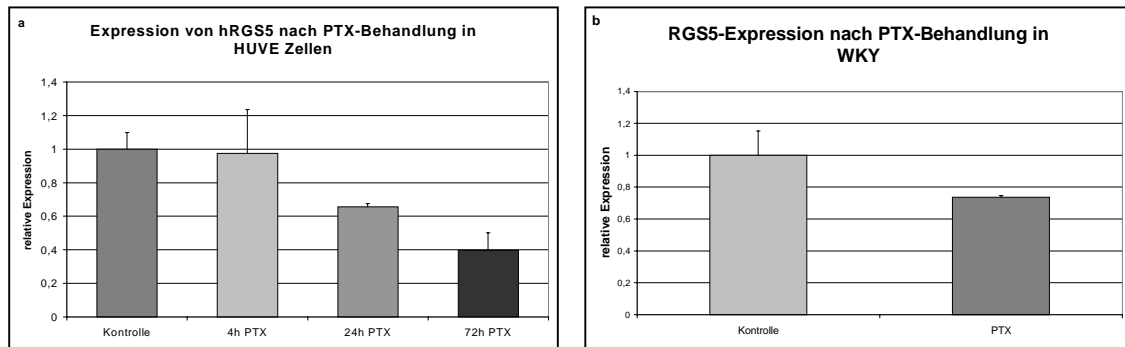


Abb. 4.20: RNA-Expression von RGS5 nach PTX-Behandlung.

Bestimmung der Expressionslevel von RGS5 nach PTX-Behandlung durch quantitative RT-PCR. (a) HUVE Zellen wurden mit PTX (100 mM) für 4, 24 und 72 Stunden inkubiert und anschließend geerntet. Die Zellen wurden lysiert und die RNA extrahiert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Expression von RGS5 durch quantitative PCR bestimmt. (b) WKY-Ratten wurden fünf Tage mit 10 µg PTX/Kg Körpergewicht behandelt. Anschließend wurden die Gehirne entnommen und die zerebralen Kapillaren isoliert. Aus den Präparationen wurde RNA extrahiert und die Expression von RGS5 durch quantitative PCR bestimmt. Für die quantitative RT-PCR wurden jeweils 10 ng in cDNA umgeschriebene Gesamt-RNA eingesetzt.

4.2.5 Angiotensin II reguliert die Expression von RGS5 *in vivo*

Durch die Behandlung von SHRSP mit pharmazeutischen Wirkstoffen, die das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE) blockieren bzw. durch die spezifische Inhibierung des Angiotensin II Typ 1 Rezeptors (AT₁R), kann die Ausbildung der neurologischen Schäden in den Tieren vermieden werden. Um zu untersuchen, inwieweit diese präventative Behandlung Einfluß auf die Expression von RGS5 hat, wurden 6 Wochen alte SHRSP mit dem AT₁R Rezeptorantagonisten Candesartan (10 mg/Kg Körpergewicht) bzw. mit dem ACE-Hemmer Cilazapril (1 mg/Kg Körpergewicht) behandelt. Anschließend wurde die Expression von RGS5 in den zerebralen Kapillaren gemessen. Wie aus Abb. 4.21 ersichtlich wird, führte die Hemmung des ACE zu einer signifikanten Zunahme der Menge an Transkript. Im Vergleich zu den salzbehandelten Kontrolltieren stieg die Expression um mehr als das fünffache an. Die Inhibition des AT₁R resultierte in einer nicht ganz so hohen Expressionssteigerung, allerdings konnte auch hier eine ca. dreifache Erhöhung der Menge an RGS5-Transkript nachgewiesen werden.

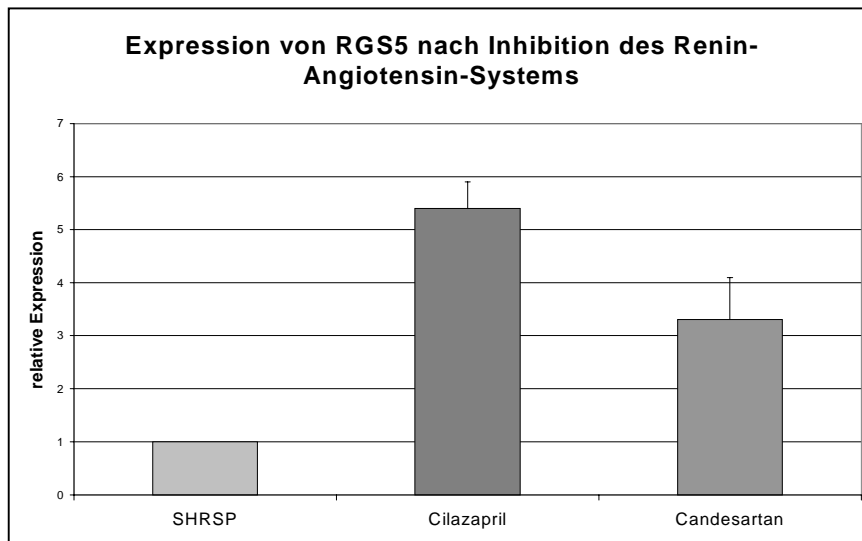


Abb. 4.21: Einfluß des Renin-Angiotensin-Systems auf die Expression von RGS5.

6 Wochen alte SHRSP wurden mit Candesartan (10 mg/Kg Körpergewicht) bzw. Cilazapril (1 mg/Kg Körpergewicht) behandelt. Die Kontrolltiere erhielten eine 1%-ige Kochsalzlösung. Die Blut-Hirnschrankenkapillaren wurden isoliert und RNA extrahiert. Für die Quantifizierung der Expression von RGS5 wurden jeweils 10 ng in cDNA umgeschriebene Gesamt-RNA für eine *real-time* RT-PCR eingesetzt. Als Normalisierungskontrolle wurde die Verteilung der 18S RNA bestimmt.

4.2.6 Beeinflussung der Expression von RGS5 durch Proteinkinase C

In einem weiteren Versuch sollte der Einfluß der PKC auf RGS5 in HUVE Zellen untersucht werden. Die Zellen wurden mit dem Phorbolster Phorbolmyristolacetat (PMA) bzw. dem Phorbolsterderivat Phorboldibutyrat (PDBu) inkubiert. Beide Substanzen aktivieren PKC innerhalb kurzer Zeit. Nach Aktivierung der PKC erfolgt eine rasche Degradation der Kinasen, so daß die PKC nach 24 Stunden annähernd keine Aktivität mehr zeigt.

Wie in Abb. 4.22 zu sehen ist, bewirkte eine Aktivierung der PKC nach vier Stunden Behandlung mit den Phorbolestern keine unmittelbare Veränderung der Expressionshöhe von RGS5. Nach 24 Stunden Inkubation mit PDBu sank die RGS5-Expression jedoch auf 13% des Kontrollwertes und blieb auch die nächsten 24 Stunden auf diesem niedrigen Wert. PMA bewirkte nach 24 Stunden eine geringere Reduktion der RGS5-Expression als PDBu (50% Verminderung im Vergleich zur Kontrolle), jedoch verringerte sich die nachweisbare Menge an Transkript in den folgenden 24 Stunden noch erheblich, so daß nach 48 Stunden nur noch 3% der ursprünglichen Menge an RGS5 RNA vorhanden war.

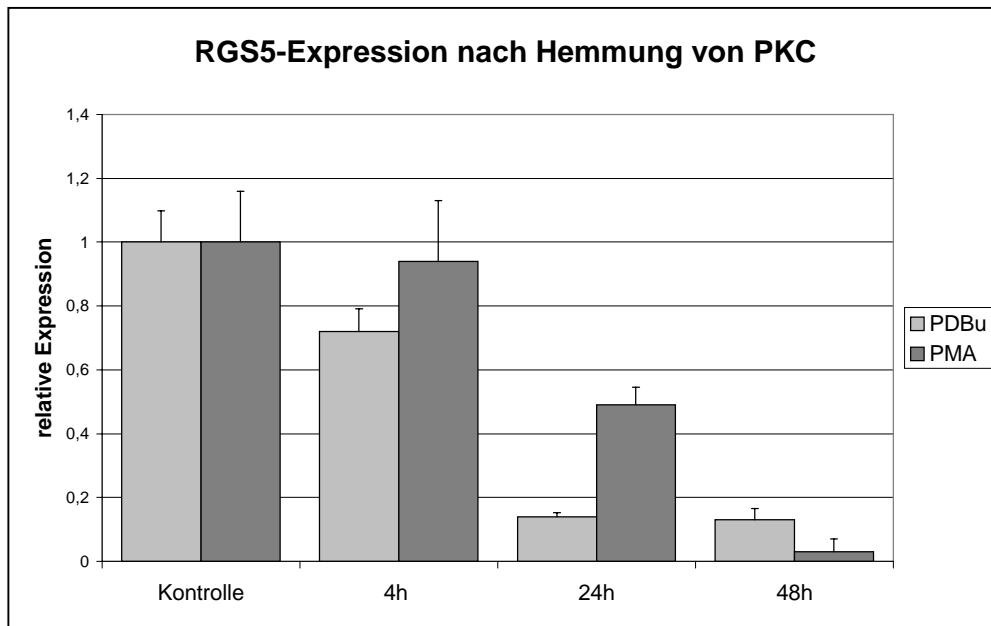


Abb. 4.22: RGS5-Expression nach Inkubation von HUVE Zellen mit PMA bzw. PDBu.

HUVE Zellen wurden mit PMA (100 nM) bzw. PDBu (200 nM) behandelt. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden die Zellen geerntet, RNA extrahiert und die Expression von RGS5 durch quantitative RT-PCR bestimmt. Als Normalisierungskontrolle wurde die Verteilung der GAPDH gemessen.

4.2.7 Zelluläre Lokalisierung von RGS5 mit Hilfe eines RGS5-GFP-Fusionsproteins

4.2.7.1 Klonierungsstrategie

Da das Fusionskonstrukt in HUVE Zellen transfiziert werden sollte, mußte in einem ersten Schritt die kodierende Sequenz des humanen RGS5 kloniert werden. Für die PCR wurden die Oligonukleotide hRGS5cds fw und hRGS5cds rv verwendet, die ein 651 Bp großes cDNA-Fragment amplifizierten, das kloniert (pHRGS5) und anschließend sequenziert wurde. Die Sequenz ergab einen Basenaustausch von A nach G an Position 222, allerdings führte dieser Austausch zu einer stillen Mutation, so daß mit diesem Konstrukt weitergearbeitet werden konnte. Als nächstes wurden zwei Oligonukleotide hergestellt, die die vollständige kodierende Sequenz einschlossen, allerdings ohne das Stopkodon mit zu amplifizieren. Zusätzlich trug das 5'-Oligonukleotid eine *HindIII* Schnittstelle und das 3'-Oligonukleotid eine *BamHI* Schnittstelle mit einem zusätzlichen Basenstretch von neun Nukleotiden, um das Konstrukt in den GFP Vektor klonieren zu können, ohne den offenen Leserahmen des GFP zu unterbrechen. Die korrekte Insertion von RGS5 wurde durch eine Sequenzierung mit einem GFP-spezifischen Primer kontrolliert. Das Klonierungsschema ist in Abb. 4.23 dargestellt.

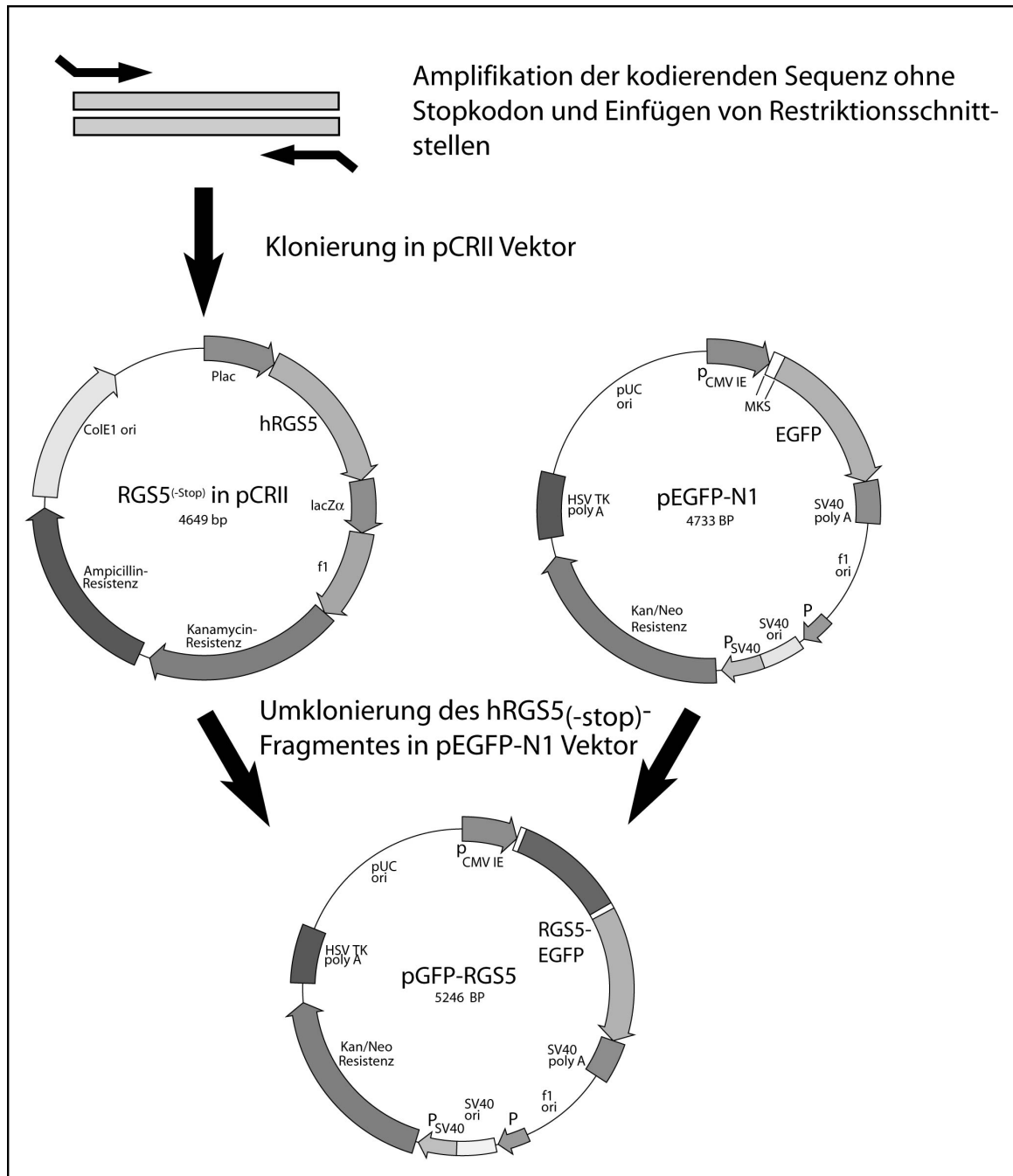


Abb. 4.23: Klonierungsschema des rekombinanten RGS5-GFP-Konstruktes.

Die humane cDNA für RGS5 wurde aus HUVE Zellen kloniert. Der nativen cDNA wurde das Stopkodon durch eine PCR entfernt, am 5'-Ende eine *Hind*III und am 3'-Ende eine *Bam*HI Schnittstelle eingefügt, und das Konstrukt in-frame in den *Hind*III- *Bam*HI geschnittenen pEGFP-Vektor kloniert.

4.2.7.2 RGS5 ist im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert

Nach der Transfektion des Konstruktes in HUVE Zellen wurden die Zellen für mindestens 24 Stunden inkubiert, so daß genügend rekombinantes Protein gebildet wurde. Anschließend wurden die transfizierten Zellen unter dem konfokalen Lasermikroskop betrachtet.

Als Negativkontrolle wurde der GFP Vektor ohne Insertion transfiziert. Dadurch konnte auch eine eventuelle Toxizität des GFP Proteins für HUVE Zellen kontrolliert werden. Die Synthese des GFP schien in den HUVE Zellen generell keine toxischen Effekte hervorzurufen, allerdings wurden die Zellen durch das für die Transfektion eingesetzte Superfect stark beeinträchtigt. Nach 24 Stunden waren nur noch ca. 30% der Zellen vital. Auch eine Erniedrigung der Konzentration an Superfect konnte diese hohe Mortalitätsrate der Zellen nicht verhindern.

Wie die Abb. 4.24 zeigt, konnten sowohl GFP als auch das RGS5-Fusionsprotein im Zytoplasma der Zelle lokalisiert werden. Die Zellen, die mit dem RGS5-GFP-Vektor transfiziert wurden, bildeten allerdings weniger Fusionsprotein als die Zellen, die nur den GFP-Vektor enthielten.

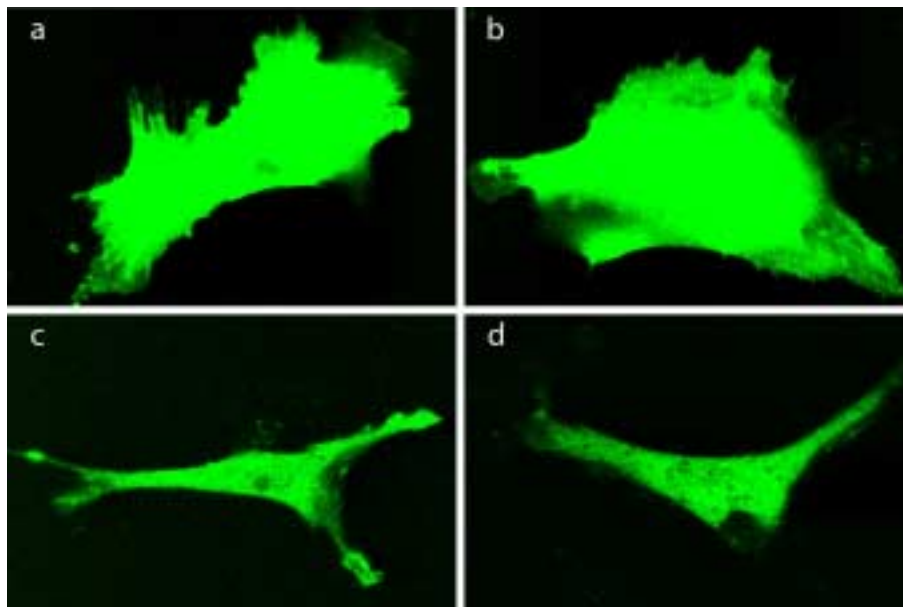


Abb. 4.24: Transfektion von HUVE Zellen mit einem RGS5-GFP-Konstrukt.

HUVE Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und mit dem pEGFP-Vektor bzw. mit dem pGFP-RGS5-Vektor transfiziert. Für die Transfektion wurden pro Well 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Als Träger wurde Superfect verwendet. (a,b) Der pEGFP-Vektor wurde als Kontrolle transfiziert, um eine mögliche Toxizität des EGFP Proteins in HUVE Zellen zu untersuchen. (c,d) Das RGS5-EGFP Fusionsprotein konnte im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert werden.

4.2.7.3 cAMP verursacht eine Translokation von RGS5 an die Membran

HUVE Zellen wurden mit dem Fusionskonstrukt transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden sie mit 250 μM CPT-cAMP für drei Stunden inkubiert und im konfokalen Mikroskop untersucht. CPT-cAMP bewirkte eine Translokation eines kleinen Teils des rekombinanten RGS5 an die Membran (Abb. 4.25). Der größte Teil des Proteins sammelte sich jedoch im Zytoplasma im Bereich des Kerns an. Im submembranen Bereich hingegen war annähernd kein Protein mehr zu erkennen. Überdies scheint ein verstärkter Kernimport stattgefunden zu haben.

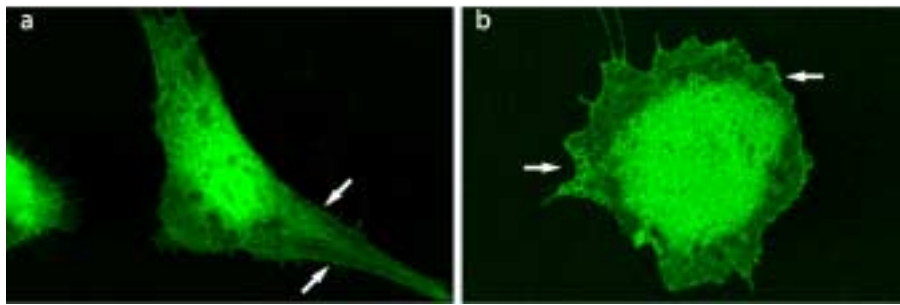


Abb. 4.25: cAMP induzierte Translokation von RGS5.

HUVE Zellen wurden nach der Transfektion mit dem pGFP-RGS5 Vektor 24 Stunden inkubiert und anschließend für 3 Stunden mit 250 μM CPT-cAMP inkubiert. CPT-cAMP induzierte eine Translokation von RGS5 an die Zellmembran (Pfeile in a und b). Gleichzeitig wurde eine Konzentration des Fusionsproteins im und um den Zellkern erkennbar.