

### 5 Diskussion

Die Zahl der zerebrovaskulären Erkrankungen hat in den Industrieländern in den letzten Jahren erheblich zugenommen, wobei der Schlaganfall eine der schwerwiegendsten Komplikationen ist. Die Gesellschaft muß sich nicht nur mit den hohen ökonomischen Problemen auseinandersetzen, sondern auch die sozialen Folgen mittragen. Dabei erschweren fehlende Erkenntnisse der molekulare Ursachen, die für die Pathogenese des Schlaganfalls verantwortlich sind, die Vorhersagen und Präventionschancen.

In dieser Arbeit sollten die molekularen Veränderungen in den Blut-Hirnschrankegefäßen von SHRSP, einem genetischen Schlaganfallmodell, vor dem Auftreten des Schlaganfalls durch einen Vergleich der Genexpressionsprofile untersucht werden.

Anhand dieser Untersuchungen sollten Signalwege identifiziert werden, die für die Ausbildung des Infarktes eine wichtige Rolle spielen und möglicherweise eine verbesserte Diagnostik und pharmakologische Therapie des Schlaganfalls erlauben.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit acht Gene identifiziert werden, die eine differentielle Expression in den Blut-Hirnschrankenkapillaren aufweisen. Diese Kandidaten spielen in verschiedenen Stoffwechselwegen eine Rolle, z.B. in Signaltransduktionsprozessen, bei der Degradation von Proteinen und bei Umordnungen des Zytoskelettes.

#### 5.1 Analyse der Expressionsprofile

Die Suche nach Schlaganfall-assoziierten Genen beschränkte sich bis heute zum größten Teil auf die Identifizierung von chromosomalen Bereichen (QTL), die mit hoher Wahrscheinlichkeit die gesuchten Gene enthalten (Rubattu *et al.*, 1996; Jeffs *et al.*, 1997). Diese Ansätze zielen auf die Identifizierung möglicher Mutationen hin bzw. untersuchen dominant-rezessive Vererbungsmuster. Allerdings ist die gezielte Klonierung der auf Basis dieser Untersuchungen identifizierten Gene häufig sehr arbeits- und zeitaufwendig.

Ein alternativer Weg, um genetische Zusammenhänge zu untersuchen, beschäftigt sich mit der Analyse der gewebspezifischen Expression von Genen. In den letzten Jahren wurden neue Techniken entwickelt, die einen Vergleich der Expressionsprofile zweier oder mehrerer Gewebe ermöglichen. Neben Differential Display PCR (Liang und Pardee, 1992 ;1995) und elektronischer Subtraktion (Michalski und Weil, 1999; Olesen *et al.*, 2001) finden vor allem cDNA Subtraktionen (Hedrick *et al.* 1984; Pikielny *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 2001) und DNA Mikroarrays (Lockhart *et al.*, 1996; Marshal und Hodgson, 1998) eine weite Anwendung.

### 5.2 Präparation der Mikrogefäße

Da sich die vorliegende Arbeit auf die Analyse der Genexpressionsprofile in den Blut-Hirnschrankenkapillaren konzentrierte, wurden diese Gefäße durch Gradientenzentrifugation angereichert. Dieser Schritt war insofern entscheidend, da Verunreinigungen der Proben mit neuronalen Zellen keine distinkte Untersuchung der kapillarspezifischen Expression erlauben würde.

Im Zuge der Aufreinigung konnte nicht ausgeschlossen werden, daß neben den Endothelzellen auch Astrozyten und Perizyten mit präpariert wurden, da diese Zellen in den relativ kompakten Kapillaren eng mit den Endothelzellen assoziiert vorliegen. Beide Zelltypen nehmen in der Aufrechterhaltung der speziellen Blut-Hirnschrankenfunktion der Endothelzellen eine wichtige Rolle ein. Werden zerebrale Endothelzellen in Kultur gebracht, verlieren sie, wie andere Endothelzellen auch, eine Vielzahl ihrer spezifischen Funktionen (Mebius *et al.*, 1991). Dieses gilt insbesondere für ihre Barriereigenschaften (Wolburg *et al.*, 1994)

Andererseits können Endothelzellen, die nicht zerebralen Ursprungs sind, nach Implantation in das Gehirn spezielle Blut-Hirnschrankenfunktionen aufbauen (Akiyama *et al.*, 2000). Damit scheinen offensichtlich weitere Faktoren, die nicht endothelialen Ursprungs sind, die Spezialisierung des Blut-Hirnschrankenendothels zu induzieren.

Weitergehende Experimente zeigten, daß humorale Faktoren der Astrozyten einige der speziellen Merkmale der Blut-Hirnschranke induzieren können (Janzer und Raff, 1987; Abott und Revest, 1991; Tontsch und Bauer, 1991). Die wichtige Rolle dieser Zellen für die Ausbildung der Blut-Hirnschranke betonen auch Versuche von Yamagata und Kollegen, in denen aus SHRSP-Gehirnen isolierte Astrozyten *in vitro* nicht in der Lage sind, eine intakte Blut-Hirnschranke zu induzieren (1997). Damit scheint in den Astrozyten ein Defekt vorzuliegen, der möglicherweise für das Auftreten des Schlaganfalls in diesen Tieren verantwortlich ist.

Da allerdings auch Kokulturen von Endothelzellen und Astrozyten nicht alle *in vivo* beobachteten Merkmale aufweisen, müssen noch weitere Zellen oder Faktoren in die Ausbildung der Blut-Hirnschranke involviert sein. Möglicherweise spielen hierbei die Perizyten, die in direktem Kontakt zu den Endothelzellen stehen, eine Rolle. Bis heute ist allerdings eine potentielle Funktion der Perizyten an der Aufrechterhaltung der Blut-Hirnschranke noch nicht untersucht worden.

### 5.3 Beurteilung der für die Expressionsanalyse eingesetzten Techniken

In dieser Arbeit wurde von der Hypothese ausgegangen, daß in den SHRSP langsame und kontinuierliche Veränderungen in den Blut-Hirnschrankenkapillaren ablaufen, und es nicht zu einer abrupten Beeinträchtigung der Barriere kommt. Daher war zu erwarten, daß die Veränderungen in der Genexpression der Kapillaren sehr moderat ausfallen und keine extrem hohen Differenzen auftreten, wie sie z.B. in Krebsmodellen oder in Zellkulturversuchen gemessen wurden. Somit ergab sich die Notwendigkeit, eine sehr sensitive Methode für den Vergleich der Expressionsprofile zu wählen.

#### 5.3.1 *Suppression Subtractive Hybridization*

Die SSH ist eine PCR-basierte cDNA Subtraktion, die in vielen Studien erfolgreich eingesetzt wurde (Girard *et al.*, 1999; Johnatty *et al.*, 2000; Ye und Connor, 2000; Zanders *et al.*, 2000; Kirsch *et al.*, 2001a; b). Bei der SSH können noch sehr kleine Unterschiede nachgewiesen werden, die z.B. bei DNA Mikroarrays nicht mehr meßbar sind. Die SSH hat den weiteren Vorteil, daß durch einen Normalisierungsschritt, der im Verlauf der Hybridisierung erfolgt, die Expressionshöhen der einzelnen RNA-Spezies angeglichen und auch noch cDNAs detektiert werden können, die nur in sehr geringer Konzentration in der Zelle vorhanden sind (Diatchenko *et al.*, 1996).

Ein Nachteil der subtraktiven Hybridisierung besteht darin, daß durch den notwendigen Verdau der cDNAs während der Subtraktion eine Vielzahl von kleinen nicht-überlappenden Fragmenten mit einer durchschnittlichen Länge von 600 Bp erhalten wird. Da die Aufschlüsselung des Rattengenoms zeitlich mit großem Abstand hinter der des humanen bzw. des Mausgenoms folgt, konnten für eine Vielzahl der isolierten cDNA-Fragmente keine Homologien in den Datenbanken gefunden werden. Auch eine Identifizierung potentieller offener Leserahmen war in vielen Fällen aufgrund der Kürze der Fragmente nicht möglich.

Ein weiteres Problem, das während der Subtraktion auftrat, lag in der Generierung einer großen Anzahl von „falsch positiven“ cDNAs, also Fragmenten, die scheinbar differentiell exprimiert vorlagen, allerdings bei näherer Analyse keinerlei Unterschiede in ihren Expressionsprofilen erkennen ließen. Dieses scheint allerdings ein grundlegendes methodisches Problem der Subtraktion zu sein, wobei der Grad der Anreicherung falsch positiver cDNAs mit steigender Verwandtschaft der eingesetzten RNA Populationen zunimmt (Diatchenko *et al.*, 1999). Möglicherweise sind die Unterschiede dieser falsch positiven cDNAs in den zu vergleichenden RNA-Proben auch so gering, daß sie selbst mit der sehr sensitiven *real-time* RT-PCR nicht mehr nachweisbar sind. Durch einen Kontrollschritt, wie z.B. dem in dieser

Arbeit durchgeführte Dot-Blot Versuch (Kap. 4.1.2.3), können solche cDNAs aussortiert werden.

### **5.3.2 cDNA-Filter**

Die ursprüngliche Idee der cDNA Hybridisierung geht auf Brown und Kollegen zurück, die die ersten cDNA Arrays einsetzten (Schena *et al.*, 1995; Shalon *et al.*, 1996; DeRisi *et al.*, 1997). Die cDNA-Filter haben gegenüber der subtraktiven Hybridisierung den Vorteil, daß anhand der Signalintensitäten der einzelnen cDNAs auf dem Chip eine grobe Abschätzung der Höhe der Expressionsdifferenzen möglich ist. Ein weiterer Vorteil der Array-Methode liegt in der großen Anzahl von Genen, die gleichzeitig untersucht werden können. Bei der Herstellung von Nylonfiltern werden bis weit über 50.000 cDNAs aufgebracht, und auch bei kommerziell erhältlichen Glaschips können über 10.000 Nukleotidsequenzen gespottet werden. Damit ermöglichen die Arrays die Analyse vollständiger Stoffwechselwege. Überdies können spezielle Arrays für bestimmte Fragestellungen konzipiert werden, z.B. für Untersuchungen von Signaltransduktionswegen und des Zellmetabolismus oder der Zellteilung.

In dieser Arbeit wurde mit einer vom Ressourcenzentrum Berlin zur Verfügung gestellten normalisierten Rattenhirn cDNA Bibliothek als Ausgangsbasis für die hochdichten cDNA-Filter gearbeitet. Ein Nachteil dieser Bibliothek bestand darin, daß sie noch nicht sequenziert war, so daß jeder Klon, der nach der Hybridisierung ein differentielles Signal aufwies, angezogen und sequenziert werden mußte.

Ein weiterer Nachteil der cDNA-Filter lag in der eingeschränkten Sensitivität. Sehr geringe Differenzen zwischen zwei Signalen konnten nur schwer detektiert werden, da sie häufig als Hintergrund angesehen und in der Analyse nicht berücksichtigt wurden. Bei Mikroarrays liegt die Toleranzgrenze, abhängig vom System (radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierte Proben) und vom verwendeten Medium (Nylonmembranen oder Glasträger), bei einem zwei- bis vierfachen Unterschied in der Expression. Da in dieser Arbeit allerdings auch die subtrahierten Proben aus der SSH, die schon präamplifizierte, differentiell exprimierte cDNAs enthielten, für die Filterhybridisierungen eingesetzt wurden, konnte das Problem der geringeren Sensitivität der cDNA-Filter umgangen werden.

## **5.4 Isolierung differentiell exprimierter cDNAs**

In beiden Expressionsstudien (Kap. 4.1.2 und 4.1.3) konnten cDNAs identifiziert werden, die in den Blut-Hirnschrankenkapillaren von SHRSP im Vergleich zu SHR differentiell exprimiert wurden.

Die Quantifizierung der Transkripte durch *real-time* RT-PCR konnte die differentielle Expression der isolierten cDNAs bestätigen, wobei sich die Unterschiede im Bereich von 0,5 bis 3,5-facher Differenz bewegten. Um äußere Faktoren auszuschließen, die die Messung beeinflussen könnten, wurden für die Bestimmung der Expression mindestens drei verschiedene RNA-Proben aus unabhängigen Kapillarpräparationen eingesetzt. Eine RNA-Probe wurde dabei im Durchschnitt aus fünf Tieren gewonnen. Im Gegensatz zu Zellkulturexperimenten, die in der Regel sehr homogene Kulturen verwenden, stellte sich in den hier durchgeführten Experimenten immer die Frage nach der genetischen Heterogenität der untersuchten Tiere und ihren Einfluß auf die erhaltenen Ergebnisse. Da hier allerdings Geschwistertiere für die einzelnen Untersuchungen verwendet wurden, sollte die genetische Heterogenität keinen Einfluß auf die Ergebnisse haben.

### **5.4.1 Sulfonylharnstoffrezeptor 2B**

Eines der Gene, dessen Expression in den Blut-Hirnschrankenkapillaren von SHRSP stark erhöht ist, wurde als der Sulfonylharnstoffrezeptor SUR2B identifiziert.

Sulfonylharnstoffrezeptoren bilden die regulatorische Untereinheit von ATP-sensitiven einwärts gleichgerichteten Kaliumkanälen (inward rectifying potassium channels, Kir) (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; Clement *et al.*, 1997; Quayle *et al.*, 1997). Kaliumkanäle treten in einer Vielzahl von Organen und Geweben auf. Sie stellen die umfangreichste Gruppe der Ionenkanäle dar und sind an Funktionen wie der Regulation des Membranpotentials, Signaltransduktion, Osmoregulation und an sekretorischen Prozessen beteiligt (Coetzee *et al.*, 1999).

Der hier isolierte Sulfonylharnstoffrezeptor SUR2B stellt die akzessorische Untereinheit des Kir6.2 Kanals dar (Chutkow *et al.*, 1996) und wird in einer Reihe von Organen und Geweben exprimiert, während z.B. die SUR1-Isoform und Kir6.2 nur in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas nachgewiesen wurden und dort für die Sekretion von Insulin verantwortlich sind (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; Sakura *et al.*, 1995; Schnitzler *et al.*, 2000).

Die Frage, ob ATP-sensitive Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ) im Endothel exprimiert werden, wurde lange kontrovers diskutiert. In kultivierten makrovaskulären Zellen wurden keine Kanäle gefunden (Nilius, 1997), während in Primärkulturen oder in frisch isolierten Endothelzellen von Hirnkapillaren, Aorta oder Koronargefäßen  $K_{ATP}$ -Kanäle nachgewiesen werden konnten (Janigro *et al.*, 1993; Katnik und Adams, 1995; 1997; Langheinrich und Daut, 1997; Schnitzler *et al.*, 2000).

Die  $K_{ATP}$ -Kanäle koppeln die Erregbarkeit der Membran an den zellulären Metabolismus der Zelle, indem sie die intrazellulären Konzentrationsveränderungen von ATP und ADP messen (Babenko *et al.*, 1998; Yokoshiki *et al.*, 1998). Für  $K_{ATP}$ -Kanäle wurde unter anderem eine Rolle in der Regulation des zerebralen Blutflusses vorgeschlagen (Janigro *et al.*, 1993). Die-

se Befunde konnten durch Untersuchungen bestärkt werden, die zeigten, daß die Aktivität der  $K_{ATP}$ -Kanäle durch vasoaktive Substanzen wie z.B. Angiotensin II (Ang II) beeinflusst wird, wobei diese Regulation durch PKC vermittelte Prozesse abläuft (Bonev und Nelson, 1996; Kubo *et al.*, 1997). Der Einfluß des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) auf die Funktion spezieller Kaliumkanäle zeigt sich auch in den SHRSP. Die Tiere reagieren mit einer gestörten Antwort auf einen spezifischen Kaliumkanalöffner (Y-26763). Diese veränderte Antwort kann jedoch durch eine Langzeitbehandlung mit einem ACE Inhibitor verhindert werden. (Takaba *et al.*, 1996).

Darüber hinaus zeigen SHRSP auch eine gesenkte Sensitivität ihrer  $K_{ATP}$ -Kanäle gegenüber zellulärem ATP (Furspan und Webb, 1993). Weitere Untersuchungen konnten bestätigen, daß der Kaliumhaushalt in den Tieren gestört ist (Tobian *et al.*, 1984, Volpe *et al.*, 1990). Möglicherweise wird die Erhöhung der Konzentration an SUR2B Transkript in den SHRSP ebenfalls durch den defekten Kaliumstoffwechsel ausgelöst. Da eine Quantifizierung des entsprechenden Kaliumkanals Kir6.2 keine ersichtlichen Expressionsunterschiede zwischen SHR und SHRSP erbrachte (Daten nicht gezeigt), scheint der veränderte Kaliumstoffwechsel in den Tieren allerdings nicht mit einer simplen Erhöhung der Anzahl der Kir6.2/SUR2B-Kanäle einherzugehen. Eher ist anzunehmen, daß SUR2B oder Kir6.2 funktionelle Änderungen aufweisen, die durch die erhöhte Expression kompensiert werden sollen. Eine weitere Erklärung für die erhöhte Expression von SUR2B könnte darin liegen, daß SUR2B mit noch einem weiteren, bis heute unbekanntem Kaliumkanal interagieren kann, dessen Expression in den SHRSP ebenfalls erhöht ist. Um weitere Einsichten zu erhalten, müßten elektrophysiologische Untersuchungen an den Kapillaren der SHRSP durchgeführt werden. So wäre es sicherlich interessant,  $K_{ATP}$ -spezifische Kanalöffner oder -blocker in den SHR und den SHRSP einzusetzen und die Reaktion in den beiden Tierstämmen zu untersuchen.

### 5.4.2 BM247

Der Klon BM247, dessen RNA um den Faktor 1,8 in SHRSP hochreguliert wird, gehört neben dem Klon BM259 zu den näher untersuchten cDNA-Fragmenten, die keine Homologie zu bekannten Genen aufweisen. Im Gegensatz zu BM259 konnte für BM247 allerdings ein EST-Eintrag gefunden werden, der wahrscheinlich das humane Homolog zu diesem cDNA-Fragment darstellt. Auf Proteinebene zeigen beide Klone eine Identität von 87%.

Im aminoterminalen Bereich trägt BM247 eine Fes/CIP4 (FCH) Domäne. Diese Domäne wurde zuerst von Pontus Aspenström beschrieben, der nach potentiellen Zielproteinen von CDC42, einem Mitglied der Rho Familie der kleinen GTPasen, suchte (Aspenström, 1997).

Ein weiteres Protein, das eine FCH-Domäne trägt (MAYP), wurde aus Makrophagen isoliert. Eine Aktivierung der Makrophagen mit dem Koloniestimulierungsfaktor CSF-1 führt zu einer

Phosphorylierung von MAYP, worauf es zu Umordnungen im Aktin-Zytoskelett der Makrophagen kommt (Yeung *et al.*, 1998).

Solche Umstrukturierungen des Zytoskelettes können neben CSF-1 auch durch den *Platelet derived Growth factor* (PDGF) oder den epidermalen Wachstumsfaktor EGF induziert werden (Chinkers *et al.*, 1979; Mellström *et al.*, 1988). Dabei stellen die Rho-GTPasen die Verbindung zwischen transmembranen Signalprozessen und der Umordnung des Aktin-Filament-Systems her (Hall, 1994). Wahrscheinlich laufen diese Regulationsmechanismen über die Phosphorylierung von mehreren Zielproteinen ab, da Rho-Proteine durch die Induktion einer Reihe von sequentiellen Phosphorylierungen z.B. die Jun N-terminale Kinase/Stress-aktivierte Protein Kinase (JNK/SAPK) aktivieren können (Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995; Olson *et al.*, 1995).

Auch *tight junctions*, die in der Lage sind, Rho-GTPasen zu rekrutieren (Joberty *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2000), sind direkt von Veränderungen des Zytoskelettes betroffen (Madara, 1998). Dabei spielen Signalereignisse, die über Rho-GTPasen vermittelt werden, eine wichtige Rolle (Hirase *et al.*, 2001). Wird Rho z.B. durch das Botulinus C3 Toxin inaktiviert, so hat diese Hemmung eine direkte Auswirkung auf das perijunctionale Aktin-Zytoskelett von Epithelzellen. Als Folge ergeben sich Störungen in den *tight junctions* und eine Erhöhung der transmembranen Permeabilität (Nusrat *et al.*, 1995). Derselbe Effekt wird auch durch inaktive RhoA und Rac1 Mutanten vermittelt (Jou und Nelson, 1998).

In unserer Gruppe konnte gezeigt werden, daß in den SHRSP schon vor dem Auftreten von neurologischen Schäden Veränderungen in der Morphologie der *tight junctions* der Blut-Hirnschranke erkennbar sind (Lippoldt *et al.*, 2000b). Hierbei scheint die Assoziation der *tight junction* Komplexe mit dem Zytoskelett schwächer zu sein als in den SHR. Da FCH-Domänen wahrscheinlich die Interaktion ihrer Proteine mit Rho-GTPasen bzw. Rho-kontrollierten Signalwegen induzieren, könnte BM247 ebenfalls an einer Umordnung des Aktin-Zytoskelettes beteiligt sein und dadurch eine Modulation der *tight junctions* bewirken. Somit könnte die in SHRSP beobachtete morphologische Veränderung der *tight junctions* mit der Erhöhung der Menge an BM247-Transkript in Verbindung stehen.

Da allerdings bis zum heutigen Zeitpunkt noch keine genauen Untersuchungen bezüglich der Veränderungen des Zytoskelettes in den Blut-Hirnschrankkapillaren von SHRSP vor dem Auftreten eines Infarktes durchgeführt wurden, und überdies die vollständige Sequenz von BM247 nicht bekannt ist, kann über eine Funktion des Proteins nur spekuliert werden.

### **5.4.3 BM259**

BM259 wird in den SHRSP um den Faktor 2,8 stärker exprimiert und stellt den zweiten Klon dar, dessen cDNA zwar für einen durchgängigen offenen Leserahmen kodiert, für den es

allerdings keine Informationen in den öffentlichen Datenbanken gibt. Lediglich ein im Rahmen des humanen Genomprojektes generierter Klon weist eine Teilhomologie auf und stellt vermutlich das humane Homolog dar (Zugangskode AC016923, Alignment nicht gezeigt). Da es sich aber bei diesem Klon um die genomische Sequenz inklusive aller Introns handelt, sind aus dem Eintrag keine weitere Informationen über das entsprechende Protein erhältlich. Ebenso wie für BM247 wurde für BM259 eine Suche in den EST-Datenbanken und nach möglichen Proteindomänen durchgeführt, doch auch hier blieb die Analyse erfolglos.

BM259 trägt potentielle Phosphorylierungsstellen für PKC und cAMP- bzw. cGMP-abhängige Proteinkinasen. Da das Motiv für PKC-Substrate jedoch in der nicht sehr restriktiven Sequenzfolge RXXSXR bzw. RXXTXR (X steht dabei für eine beliebige Aminosäure) liegt (Nishikawa *et al.*, 1997), lassen sich auch hieraus keine weiteren Informationen über mögliche Interaktionen von BM259 mit distinkten PKC-Isoformen herauslesen. Zur Zeit wird versucht, die vollständige kodierende Sequenz von BM259 zu klonieren. Möglicherweise können dadurch detailliertere Informationen über das unbekannte Protein erhalten werden.

### 5.4.4 RGS5

#### 5.4.4.1 Regulatoren für G-Proteine vermittelte Signalprozesse

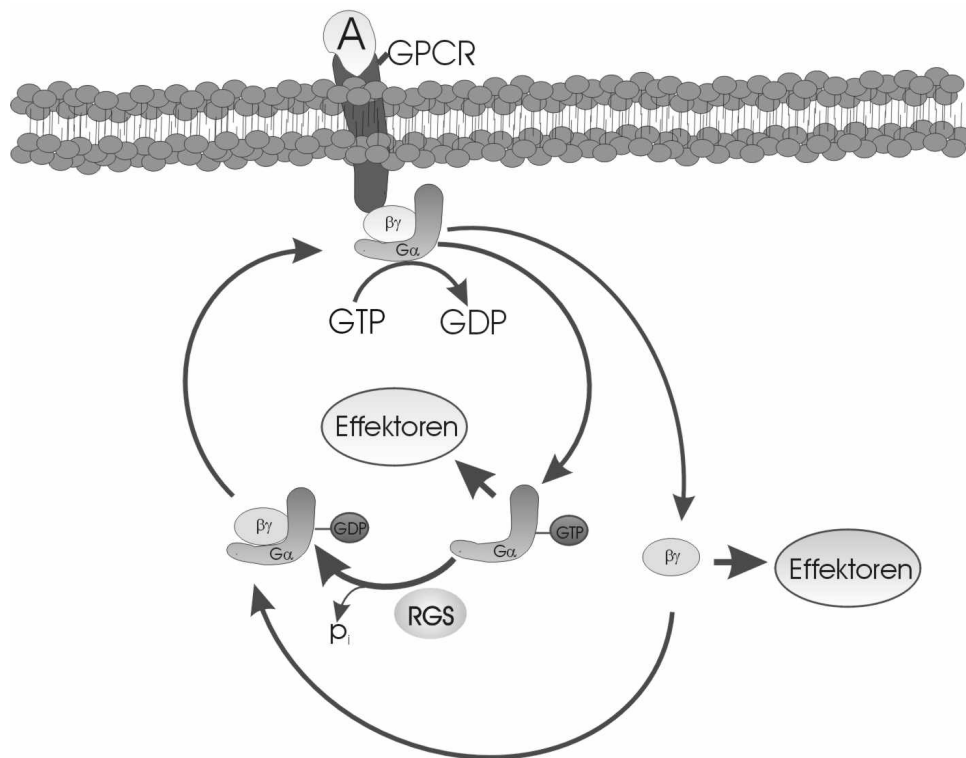
RGS5 wird in den SHRSP um 40% herunterreguliert und stellt damit das einzige der isolierten Gene dar, das in den SHR eine höhere Expression zeigt.

RGS5 gehört zu einer Proteinfamilie, deren Mitglieder als Regulatorelemente für G-Protein-vermittelte Signalprozesse fungieren. Bis heute konnten über 25 Mitglieder dieser Familie identifiziert werden (für einen Überblick: De Vries *et al.*, 2000). RGS Proteine interagieren spezifisch mit den  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine und inaktivieren das durch das G-Protein vermittelte Signal (Berman *et al.*, 1996a; b).

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta\gamma$ -Untereinheit und binden an den zytoplasmatischen Teil von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die Spezifität der heterotrimeren G-Proteine wird hierbei durch eine Vielzahl von Kombinationen verschiedener Untereinheiten erreicht. Aufgrund ihrer Sequenzhomologien wurden die  $\alpha$ -Untereinheiten in die vier Gruppen i, s, q und 12 eingeteilt. Das  $\beta\gamma$ -Dimer kann durch Kombination aus fünf  $\beta$ - und sieben  $\gamma$ -Untereinheiten gebildet werden (Morris und Malbon, 1999). Nach Aktivierung des Rezeptors erfolgt ein Guanosinnukleotidaustausch, der die Dissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit vom Rezeptor und der  $\beta\gamma$ -Untereinheit auslöst. In diesem Zustand können sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit verschiedene Signalprozesse induzieren (Neer und Clapham, 1988). Die Dauer des Signals hängt von der GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit



ab, die von dem gebundenen Guanosin triphosphat eine Phosphatgruppe abspaltet, worauf sich die beiden Untereinheiten wieder zusammenfügen und das Signal beendet ist. RGS-Proteine beschleunigen durch ihre intrinsische GTPase Funktion die Abspaltung der Phosphatgruppe und terminieren das vom Rezeptor induzierte Signal (Berman *et al.*, 1996a; b). Durch diese Funktion als GTPase aktivierendes Protein (GAP) wirken sie als negative Regulatoren von G-Protein-vermittelten Signalprozessen.



### Abb. 5.1: Hypothetisches Modell der durch RGS-Proteine vermittelten Signalprozesse

Nach hormoneller Aktivierung induziert der G-Protein-gekoppelte Rezeptor einen Austausch des an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundenen GDP durch GTP. Die beiden Untereinheiten dissoziieren voneinander und aktivieren verschiedene Signalwege. Die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit führt zu einer Phosphatabspaltung am GTP. Dadurch finden die Untereinheiten wieder zusammen, und das Signal ist beendet. RGS katalysiert die Abspaltung der Phosphatgruppe vom GTP und beschleunigt die Beendigung des Signals. GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor, A: Aktivator des GPCR, G  $\alpha$ :  $\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine,  $\beta\gamma$ :  $\beta\gamma$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine, GDP: Guanosindiphosphat, GTP: Guanosin triphosphat, P<sub>i</sub>: Phosphatrest, RGS: Regulator of G-Protein Signaling. (abgeändert nach Kehrl *et al.*, 1998).

#### 5.4.4.2 Charakterisierung von RGS5

Der Klon BM254 zeigte nur über einen sehr kurzen Bereich eine Homologie zu der cDNA von Maus RGS5. Überdies befand sich die betreffende Teilsequenz in der 3'-nicht translatierten Region von Maus RGS5. Für solche nicht-kodierenden Sequenzabschnitte ist bekannt, daß sie innerhalb der verschiedenen Spezies variieren können. Somit ließ sich nicht

eindeutig klären, ob es sich bei BM254 tatsächlich um das RGS5 Homolog aus der Ratte handelte. Erst durch die anschließende RACE-PCR konnte dieser Nachweis zweifelsfrei erbracht werden. Ein Vergleich der Sequenz des RGS5 Proteins aus der Ratte mit dem entsprechenden Protein aus der Maus und dem inzwischen klonierten humanen Protein ergab eine sehr hohe Identität von über 90%. Diese starke Homologie könnte möglicherweise auf konservierte Funktionen für RGS5 innerhalb dieser drei Organismen hinweisen.

RGS5 repräsentiert mit 181 Aminosäuren eines der kleineren RGS-Proteine. Aufgrund der großen Homologie des aminoterminalen Bereiches, der für die Translokation des Proteins an die Membran notwendig ist, wird RGS5 mit RGS4 und RGS16 in eine separate Untergruppe eingeordnet (Zheng *et al.*, 1999).

Auch wenn erste funktionelle Charakterisierungen von RGS5 vorliegen, fehlen bis heute noch Erkenntnisse über direkte Bindungspartner *in vivo*. Zwar konnten durch *in vitro* Bindungsstudien die  $\alpha$ -Untereinheiten von  $G_{i1}$ ,  $G_{i2}$ ,  $G_{i3}$ ,  $G_o$  und  $G_q$  als Interaktionspartner ermittelt werden (Chen *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2001), jedoch wurden diese Ergebnisse *in vivo* noch nicht verifiziert. Untersuchungen in Oozyten von *Xenopus laevis* zeigten, daß RGS5 in die Modulation von Kaliumkanälen involviert ist (Herlitzte *et al.*, 1999), und Zhou *et al.* konnten in *in vitro* Versuchen nachweisen, daß RGS5 Kalziumsignale, die durch Ang II oder Endothelin-1 ausgelöst werden, unterdrücken kann (2001).

Inhibitorische G-Proteine spielen auch im Aufbau und Unterhalt der *tight junctions* in Endothel- und Epithelzellen eine wichtige Rolle (Balda *et al.*, 1991; Denker und Nigam, 1998; Saha *et al.*, 1998), und eine Störung von  $G_i$ -vermittelten Signalprozessen führt *in vitro* zu einer Erhöhung der Permeabilität der *tight junctions* (Denker *et al.*, 1996). Da in den SHRSP die Architektur der *tight junction* gestört ist, wurde RGS5 als ein spezifischer Interaktionspartner von  $G_{\alpha_i}$ -Untereinheiten in dieser Arbeit näher charakterisiert.

### 5.4.4.3 Lokalisation der RGS5 mRNA durch *in situ* Hybridisierung

Die Arbeiten von Gold und Kollegen, die die Expression von verschiedenen RGS Mitgliedern im Gehirn durch *in situ* Hybridisierungen untersuchten, lieferten erste Erkenntnisse über das Verteilungsmuster von RGS5. Laut dieser Studie scheint RGS5 neben dem paraventriculären und dem suproptischen Kern des Hypothalamus in den Gefäßen und diffus in der Glia verteilt zu sein (Gold *et al.*, 1997).

Durch die Bestimmung der relativen Mengen an RGS5-Transkript in Mikrogefäßpräparationen und Gesamthirnproben konnte gezeigt werden, daß RGS5 verstärkt in den Kapillaren exprimiert wird (Kap. 4.2.3). Mit Hilfe einer nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierung wurde die Verteilung noch weitergehend untersucht. Demnach wird die mRNA für RGS5 vor allem in den Endothelzellen der Kapillaren exprimiert. Diese Verteilung von RGS5 wurde auch durch

eine kürzlich veröffentlichte Arbeit verifiziert, die Blut-Hirnschranken-spezifische Gene untersuchte (Li *et al.*, 2001).

### 5.4.4.4 Regulation der Expression von RGS5

#### 5.4.4.4.1 G-Protein-abhängige Regulationsmechanismen

Die Menge an synthetisiertem RGS5-Transkript ist in den Blut-Hirnschrankenkapillaren von SHRSP um 40% im Vergleich zu den SHR verringert. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf gestörte G-Protein-vermittelte Signalprozesse, wobei eine Abnahme der verfügbaren Menge an RGS5 eine unzureichende Regulation des G-Proteins und damit verbunden eine Signalverlängerung zur Folge haben könnte. Andererseits kann es sich bei diesem Effekt auch um eine negative Rückkopplung handeln, die durch eine verminderte Aktivität des entsprechenden G-Proteins ausgelöst wird. Für RGS-Proteine sind solche Regulationsmechanismen der Expression bekannt (Dietzel und Kurjan, 1987).

Um einen möglichen Einfluß der G-Proteine zu untersuchen, wurden die Expressionshöhen der  $\alpha$ -Untereinheiten der  $G_i$  Proteine durch quantitative RT-PCR untersucht, wobei jedoch keine eindeutigen Unterschiede in der Expression zwischen SHR und SHRSP gemessen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Allerdings sagen die Transkriptmengen eines G-Proteins nichts über seinen Aktivitätsstatus aus. Aus diesem Grund wurde ein aus *Bordetella pertussis* isoliertes Enterotoxin (PTX) eingesetzt, das spezifisch die  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_t$  und  $G\alpha_g$  Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine hemmt, wobei  $G\alpha_t$  und  $G\alpha_g$  nur in der Retina bzw. in den Geschmacksknospen vorkommen (McLaughlin *et al.*, 1992; Morris und Malbon, 1999). PTX katalysiert die ADP-Ribosylierung eines spezifischen Cysteinrestes in der  $\alpha$ -Untereinheit, wodurch  $G\alpha$  in der inaktiven, GDP-gebundenen Form verbleibt.

In einem zuerst durchgeführten *in vitro* Versuch konnte in HUVE Zellen nach PTX Inkubation eine Reduktion der Expression um 60% nachgewiesen werden. *In vivo* erniedrigte sich die Expressionsrate von RGS5 in den Blut-Hirnschrankenkapillaren von WKY Ratten nach PTX-Administration auf 75%. Diese Versuche zeigten, daß die Expression von RGS5 durch die spezifische Aktivität der PTX-sensitiven G-Proteine beeinflusst wird.

#### 5.4.4.4.2 Einfluß von Angiotensin II auf die Expression von RGS5

Ang II ist ein vasokonstriktorisch wirkendes Oktapeptid, das durch das ACE aus Angiotensin I gebildet wird. Neben dem hauptsächlichen Wirkungsort, der Niere, wird Ang II auch im Gehirn gebildet (Hermann *et al.*, 1984).

SHRSP zeigen eine signifikante Erhöhung des Ang II Plasmaspiegels verglichen mit SHR und WKY (Hübner *et al.*, 1995), die wahrscheinlich auf eine erhöhte ACE-Aktivität zurückzu-

führen ist (Krieger *et al.*, 1992). Somit könnten erhöhte Ang II-Konzentrationen eine Rolle in der Ausbildung des Schlaganfalls spielen.

Diese Vermutung wird auch durch pharmakologische Untersuchungen gestützt, wonach durch Hemmung des ACE bzw. durch eine Ang II-Rezeptorblockade die Ausbildung der neurologischen Symptome verhindert wird. Dieser zerebroprotektive Effekt kann auch ohne eine Verminderung des Blutdruckes erreicht werden (Inada *et al.*, 1997; Nishikawa, 1998; Bennai *et al.*, 1999; Takemori *et al.*, 2000). Diese Versuche zeigen, daß das Auftreten des Schlaganfalls in den SHRSP primär nicht von der Hypertonie abhängt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von Ang II auf RGS5 *in vivo* untersucht. Dazu wurde den SHRSP der ACE-Hemmer Cilazapril verabreicht bzw. in einem weiteren Versuch der AT<sub>1</sub>-Rezeptor durch Candesartan blockiert. In beiden Versuchen stieg die Konzentration des RGS5 Transkriptes erheblich an, wobei Werte ermittelt wurden, die über den in den SHR gemessenen Konzentrationen lagen. Dieses Ergebnis belegt, daß die Expression von RGS5 durch das RAS kontrolliert wird. Interessanterweise erfolgt nach Hemmung des RAS eine Erhöhung der RGS5-Transkriptkonzentration, die deutlich über das Niveau hinausgeht, das in den Infarkt-resistenten SHR gemessen wurde. Da die verstärkte Synthese der RGS5 mRNA nicht mit einer Senkung des Blutdruckes korreliert, scheint die RAS-abhängige Regulation der Expression von RGS5 unabhängig vom Blutdruck abzulaufen.

Die Erhöhung an RGS5 Transkript geht mit der erfolgreichen Prävention des Infarktes einher. Daher könnte RGS5 möglicherweise einen protektiven Effekt auf die Tiere ausüben. Sicherlich müßten aber zur Unterstützung dieser Hypothese noch weitere Studien angefertigt werden. So werden zur Zeit Tiere mit alternativen ACE-Hemmern und AT<sub>1</sub>R-Inhibitoren behandelt (Lisinopril und Olmesartan), um den Einfluß des RAS auf die Expression von RGS5 in den Blut-Hirnschrankenkapillaren zu bestätigen.

### 5.4.4.3 Proteinkinase C reguliert die Expression von RGS5

Die oben diskutierten Versuche zeigten, daß RGS5 durch Ang II-induzierte Signalprozesse in der Expression reguliert wird. Ein wichtiger intrazellulärer Mediator rezeptorvermittelter Signale ist die PKC. PKC ist eine Serin/Threoninkinase mit bis heute 11 bekannten Isoenzymen, die in drei Unterfamilien eingeteilt werden; neben den konventionellen PKC existieren noch die neuartigen und die atypischen Isoformen (Newton, 1995; Newton und Johnson, 1998).

Neben einer Vielzahl von Funktionen ist PKC auch an der Regulation der Permeabilität von Endothelzellen beteiligt (Ferro *et al.*, 2000; Metha *et al.*, 2001). Darüber hinaus bewirkt die Aktivierung der PKC im Plexus choroideus eine Veränderung in der Immunreaktivität von *adherens* und *tight junction*-spezifischen Proteinen (Lippoldt *et al.*, 2000b).

Um eine mögliche Beeinflussung der RGS5 Expression durch PKC zu untersuchen, wurden HUVE Zellen mit PMA bzw. PDBu induziert. Phorbolster und seine Derivate gehören zu einer Gruppe von Tumorpromotoren und agieren als direkte Aktivatoren der konventionellen und der neuartigen PKC (Castagna *et al.*, 1982; Kikkawa *et al.*, 1983). Im Zuge der Aktivierung der Kinase erfolgt eine Konformationsänderung, die das Protein zugänglich für Proteasen macht. Nach zwei bis vier Stunden wird die maximale Aktivierung der Kinase beobachtet und nach 24 Stunden liegt annähernd keine aktivierte PKC mehr vor.

Die Inkubation von HUVE Zellen mit PMA oder PDBu brachte nach vier Stunden, also einem Zeitpunkt, an dem ein großer Pool an aktivierter PKC vorlag, keine Veränderungen in der Expression. Allerdings konnte nach 24 Stunden eine drastische Reduktion beobachtet werden, die sich bei Inkubation mit PMA während der nächsten 24 Stunden noch verstärkte und auf unter 5% des Kontrollwertes fiel. Diese Regulation der Expression von RGS5 durch die PKC verläuft genau entgegengesetzt zu der PKC-regulierten verstärkten Transkription von RGS16, das mit RGS5 eine Unterfamilie bildet (Fong *et al.*, 2000). Zur Zeit werden Untersuchungen mit isoform-spezifischen Inhibitoren durchgeführt, um die PKC Isoform zu identifizieren, die für diesen Effekt verantwortlich ist.

### 5.4.4.5 Intrazelluläre Verteilung von RGS5

Für verschiedene Mitglieder der RGS Familie konnte gezeigt werden, daß sie nach Aktivierung von G-Proteinen an die Membran translozieren (Druey *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999). Mit Hilfe eines RGS5-GFP-Fusionsproteins sollten die zelluläre Verteilung und mögliche Translokationsprozesse in HUVE Zellen untersucht werden. Da RGS Proteine, die im aminoterminalen Bereich modifiziert werden, nicht mehr an die Membran gelangen, scheint dieser Bereich für den Membrantransport verantwortlich zu sein (Druey *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurde RGS5 an das N-terminale Ende des GFP-Proteins fusioniert.

RGS5 ist im unstimulierten Zustand im Zytosol und im Kern verteilt. Da sich im N-Terminus eine mutmaßliche Kernexportsequenz befindet (Abb. 4.16), ist die nukleäre Lokalisation des Fusionsproteins auch zu erwarten. Eine Shuttlefunktion zwischen Kern und Zytoplasma wird für mehrere RGS Subtypen beschrieben, wobei die Hemmung des entsprechenden nukleären Exporters durch den spezifischen Inhibitor Leptomycin B eine Akkumulation der RGS-Proteine innerhalb des Kerns zur Folge hat (Wolff *et al.*, 1997; Chatterjee *et al.*, 2000; Heximer *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Damit scheint ein kontinuierlicher Transport der RGS-Proteine in den Kern und ein aktiver Export aus dem Kern zu existieren. Der Bereich des Proteins, der für den Kernimport verantwortlich ist, konnte jedoch noch nicht identifiziert werden.

Da RGS5 primär im Zellkern angereichert wird, stellt sich die Frage, ob die hauptsächliche Aufgabe des Proteins nicht in der Regulation von Transkriptionsprozessen innerhalb des Kerns liegt. Da der Export aus dem Kern Energie verbraucht, wäre eine vorwiegend an der Plasmamembran stattfindende Aktion von RGS5 für die Zelle unökonomisch. Für die Beantwortung dieser Frage wird zur Zeit ein RGS5-GFP-Konstrukt hergestellt, dessen Transport aus dem Kern durch eine modifizierte Exportsequenz nicht mehr möglich ist.

### 5.4.4.6 Translokation von RGS5 durch cAMP

RGS5 wird im Gehirn vorwiegend im Blut-Hirnschrankenendothel exprimiert und durch PTX in seiner Expression reguliert. In unserer Gruppe konnte gezeigt werden, daß die Behandlung von normotensiven WKY mit PTX morphologische Veränderungen innerhalb der *tight junctions* der Blut-Hirnschranke induziert. Die Morphologie der veränderten *tight junctions* ähnelt der in den SHRSP beobachteten Situation (Lippoldt *et al.*, eingereicht). Demnach scheinen PTX-sensitive heterotrimere G-Proteine sowohl die Expression von RGS5 als auch die Integrität der *tight junctions* zu kontrollieren. Möglicherweise sind diese beiden Abläufe auch miteinander verbunden, d.h. eventuell modifiziert RGS5 über seine Interaktion mit den G-Proteinen die *tight junction* Morphologie.

Um diese Hypothese näher zu untersuchen, sollte der Einfluß von Substanzen, die die Barriereigenschaften von Endothel- und Epithelzellen verbessern, auf die Translokation von RGS5 untersucht werden. Im Falle einer Interaktion von RGS5 mit *tight junction*-spezifischen Proteinen sollte eine Umverteilung von RGS5 an die Membran zu beobachten sein. Zu den Verbindungen, die die Barrieren verstärken können, gehört zyklisches AMP (cAMP), das unter anderem eine Erhöhung der Anzahl der *tight junctions* induziert (Adamson *et al.*, 1998; Wegener *et al.*, 2000).

Nach dreistündiger Behandlung von HUVE Zellen mit cAMP konnte tatsächlich eine Translokation des GFP-markierten RGS5 an die Zellmembran beobachtet werden. Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß es zu einer Interaktion von RGS5 mit *tight junction*-Proteinen oder *tight junction*-assoziierten Proteinen kommt. Allerdings fehlen noch weiterführende Versuche, wie z.B. die Messung der transendothelialen elektrischen Resistenz und der Permeabilität sowie die Identifizierung von weiteren Bindungspartnern, um diese Hypothese zu bekräftigen.

### 5.4.5 Cyclophilin A

Die Expression von Cyclophilin A (CyPA) wird in den Blut-Hirnschrankkapillaren von SHRSP um das 1,6-fache induziert. Cyclophiline stellen die Rezeptoren für Cyclosporin A dar, das als Immunsuppressivum, z.B. nach Organtransplantationen und bei Autoimmuner-

krankungen, eingesetzt wird (Harding *et al.*, 1986a; b). CyPA gehört zu der Klasse der Immunophilinen und liegt als lösliches zytoplasmatisches Protein vor, das in nahezu jedem Organ exprimiert wird. CyPA ist eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase, die Zielproteine durch ihre cis-trans Isomerasefunktion aktivieren kann und eine Funktion in der Proteinfaltung und im intrazellulären Proteintransport ausübt (Danielson *et al.*, 1988; Fischer *et al.*, 1989). Durch die Interaktion mit Peroxydasen nimmt CyPA eine wichtige Rolle in der Protektion vor Peroxyverbindungen ein (Lee *et al.*, 2001). Eine weitere Gruppe konnte zeigen, daß CyPA in die Pathogenese von vaskulären Krankheiten involviert ist, wobei dieser Prozeß über die Aktivierung der extrazellulären ERK1/2 Kinase läuft und durch oxidativen Stress induziert wird (Jin *et al.*, 2000). Den Nachweis einer Verbindung zwischen erhöhter Sauerstoffperoxidmenge und ERK Aktivierung einerseits und veränderter Integrität der *tight junctions* und daraus resultierenden Permeabilitätserhöhungen andererseits konnte eine Arbeit von Kevil und Kollegen erbringen. Diese Gruppe zeigte, daß eine durch Sauerstoffperoxid vermittelte Permeabilitätserhöhung in vaskulärem Endothel mit einer untypischen Lokalisation des *tight junction* Proteins Occludin einhergeht, und daß diese Veränderungen durch erhöhte ERK1/ERK2 Aktivierung vermittelt werden (Kevil *et al.*, 2000). Inwieweit CyPA in solche Vorgänge involviert ist, wurde noch nicht untersucht, doch kann spekuliert werden, daß eine Erhöhung der Menge an CyPA-Transkript möglicherweise als Antwort auf veränderte vaskuläre Konzentrationen an Sauerstoffperoxid erfolgt, und daß CyPA durch seine Rolle als Aktivator von Peroxiredoxinen einen protektiven Einfluß auf das vaskuläre Endothel in SHRSP ausübt.

### 5.4.6 Galectin-9

Galectin-9 zeigt eine 3,2-fach stärkere Expression in den zerebralen Mikrogefäßen von SHRSP. Galectin-9 gehört zur Familie der Galaktose-bindenden Lektine (Wada und Kanwar, 1997; Cooper und Barondes, 1999). Diese Proteine adhären an Glykokonjugate, die auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden und beeinflussen das Migrationsverhalten von Zellen bzw. deren Adhäsion an die extrazelluläre Matrix (Cooper und Barondes, 1990; Massa *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1993). Darüber hinaus sind sie in die Regulation von Chemotaxis, Proliferation und Apoptose involviert (Barondes *et al.*, 1994; Puche *et al.*, 1996; Hughes, 1997; Matsumoto *et al.*, 1998). Obwohl Galectine sowohl extrazellulär als auch im Zytoplasma vorliegen, besitzen sie kein Signalpeptid. Statt dessen werden sie über alternative Mechanismen sezerniert (Hughes, 1997). Die von Galectinen induzierte Reaktion kann in unterschiedlichen Zelltypen genau die gegensätzlichen Effekte haben. So verhindert Galectin-1 die Adhäsion von Myoblasten an Laminin, während die Bindung von Melanomzellen an Laminin durch Galectin-9 begünstigt wird (Cooper *et al.*, 1991; Van den Brule *et al.*, 1995).

Galectin-9 wird von einer Reihe von Geweben exprimiert. Neben einer potentiellen Beteiligung an der Immunantwort (Perrillo *et al.*, 1995; Allione *et al.*, 1998; Novelli *et al.*, 1999) wird auch eine Funktion für Galectin-9 als Harnstoff-Transporter vorgeschlagen (Leal-Pinto *et al.*, 1997; Lipkowitz *et al.*, 2001). Die Aufgabe, die Galectin-9 in den Blut-Hirnschrankenkapillaren ausübt, ist bis heute unbekannt. Da Galectin-9 allerdings die Bindung von eosinophilen Granulozyten protegiert, deren Granula überwiegend aus Lysosomen besteht (Matsumoto *et al.*, 1998; Lahm *et al.*, 2000), könnte die gesteigerte Expression des Galectin-9 Transkriptes möglicherweise eine erhöhte Akkumulation von Lysosomen nach sich ziehen und damit eine gesteigerte Aktivität von lysosomalen Proteasen in den Blut-Hirnschranken induzieren.

### **5.4.7 Cystatin- $\beta$**

Cystatin- $\beta$  agiert als endogener Inhibitor der Cathepsine L und B. Cathepsine sind Cystein-Proteasen, die in hoher Konzentration in den Lysosomen endothelialer Gewebe und inflammatorischer Zellen vorkommen (Lah *et al.*, 1993; Mikkelsen *et al.*, 1995). Cathepsine sind z.B. für den Tod neuronaler Zellen nach experimentell verursachter globaler oder fokaler zerebraler Ischämie verantwortlich (Kominami *et al.*, 1985; Hill *et al.*, 1997). In SHRSP ist die Menge an Cathepsinen in Bereichen des Gehirns, die ischämische oder hypertensive Schäden aufweisen, stark erhöht (Chue *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1994).

Möglicherweise liegen auch bereits in den jungen SHRSP erhöhte Cathepsinkonzentrationen vor. Da die Expression von Cystatin- $\beta$  durch die Menge an Cathepsinen reguliert wird (Ebisui *et al.*, 1995), könnte die gesteigerte Transkription der Cystatin- $\beta$  RNA (Faktor 1,7) in den Blut-Hirnschrankenkapillaren von SHRSP durch solch erhöhte Cathepsinkonzentrationen erklärt werden. Damit wäre der Anstieg von Cystatin- $\beta$  mRNA ein Hinweis darauf, daß es bereits vor nachweisbaren morphologischen Veränderungen der Hirngefäße und vor der Ausbildung des Schlaganfalls zu erhöhten Cathepsinaktivitäten kommt, die autophagische oder nekrotische Prozesse in den Blut-Hirnschrankenkapillaren auslösen könnten.

### **5.4.8 Ubiquitin B**

Ubiquitin ist ein kleines, hoch konserviertes Signalpeptid, das universell in jeder eukaryotischen Zelle vorkommt und einen wichtigen Bestandteil der intrazellulären Proteindegradationskaskade darstellt. Im Verlauf der Degradation wird Ubiquitin durch die Interaktion mehrerer Enzyme kovalent an Substratproteine gebunden (Hochstrasser, 1995). Durch die Ubiquitinierung werden diese Proteine zu großen Proteasen dirigiert. Diese 26S Proteasomen be-



stehen aus vielen Untereinheiten und sind für den Abbau der Proteine verantwortlich. In der Vergangenheit wurde die Degradation der Proteine als ein notwendiger Schritt betrachtet, der keinen besonderen Regulationsmechanismen unterlag. Diese Einstellung änderte sich erst, als eine Vielzahl von Isoenzymen entdeckt wurden, die für die Ubiquitinierung von verschiedenen Proteinen verantwortlich sind (Willems *et al.*, 1996). Mit dieser Entdeckung wurde klar, daß es sich bei der Degradation der Proteine um sehr stark kontrollierte zelluläre Vorgänge handelt. Zur Zeit wird in klinischen Studien die Wirksamkeit von Proteasomeninhibitoren in der Behandlung von Schlaganfallpatienten getestet (Kisselev und Goldberg, 2001). Die in SHRSP gemessene gesteigerte Expression von Ubiquitin B (Faktor 1,9) könnte möglicherweise in Zusammenhang mit der erhöhten Expression von Cystatin- $\beta$  und Galectin-9 stehen. All diese Proteine üben eine Funktion in der Regulation von Proteindegradationsprozessen aus, wobei die Induktion von Ubiquitin als kausale Folge erhöhter proteasomaler Aktivität erklärt werden könnte.