

Differentielle Proteomanalyse porciner Hirnkapillarendothelzellen

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
genemigte Dissertation

von

Armin Raab

aus Krefeld

Berichterstatter: Prof. Dr. H. G. Gassen

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Pfeifer

Tag der Einreichung: 15.05.2003

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2003

Darmstadt 2003

D17

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Abkürzungsverzeichnis	1
1	Zusammenfassung	3
2	Einleitung	5
2.1	Die Blut-Hirn-Schranke	5
2.1.1	Aufbau und Funktion	5
2.1.2	Blut-Hirn-Schranke Marker.....	7
2.1.3	Transportvorgänge an der Blut-Hirn-Schranke.....	8
2.2	Molekularbiologische Methoden zur Identifizierung Blut-Hirn-Schranke-spezifischer Proteine	10
2.3	Proteomanalyse	13
2.3.1	Methoden der Proteomanalyse.....	18
2.3.1.1	Probenvorbereitung.....	18
2.3.1.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	21
2.3.1.3	Visualisierung und Quantifizierung.....	23
2.3.1.4	Proteinidentifizierung.....	25
2.4	Aufgabenstellung	28
3	Materialien	29
3.1	Geräte	29
3.2	Chemikalien	30
3.3	Enzyme	32
3.4	Synthetische Oligonukleotide	32
3.5	Sonstige Materialien	33
3.6	Proteindatenbanken und Computerprogramme	33
3.7	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	34

4	Methoden	35
4.1	Präparation und Kultivierung von Endothelzellen	35
4.1.1	Präparation von Hirnkapillarendothelzellen.....	35
4.1.2	Zellzahlbestimmung.....	37
4.1.3	Überprüfung der Zellvitalität.....	37
4.1.4	Benzidin-Färbung von Erythrozyten.....	38
4.1.5	Präparation und Kultivierung von Aortaendothelzellen.....	39
4.2	Proteinanalytik	41
4.2.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	41
4.2.2	Acetonfällung von Proteinen.....	41
4.2.3	Zellaufschluss und Proteinfractionierung.....	42
4.2.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	45
4.2.4.1	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung.....	45
4.2.4.2	Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	47
4.2.5	Visualisierung von Proteinen im Polyacrylamidgel.....	48
4.2.6	Partielle Hydrolyse von Proteinen im Polyacrylamidgel.....	49
4.2.7	Massenspektrometrie.....	49
4.2.7.1	Probenvorbereitung.....	49
4.2.7.2	MALDI-Analyse.....	50
4.3	Nukleinsäureanalytik	52
4.3.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	52
4.3.1.1	PCR zur Durchmusterung von Bakterienkolonien.....	53
4.3.2	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	54
4.3.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	55
4.3.4	Präparation von RNA.....	56
4.3.5	Herstellung von cDNA.....	56
4.3.6	Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> Zellen.....	56
4.3.7	Reinigung von Nukleinsäuren.....	56
4.3.8	Klonierung von DNA.....	57
4.3.9	Plasmidisolierung.....	58
4.3.10	Extinktionsmessung von Nukleinsäuren.....	58

4.3.11	Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	58
4.3.12	Herstellung radioaktiv markierter Nukleinsäuren.....	60
4.3.13	Transfer von RNA auf Nylonmembranen.....	60
4.3.14	RNA/DNA-Hybridisierung.....	60
5	Ergebnisse.....	62
5.1	Präparation und Charakterisierung von Hirnkapillarendothelzellen.....	62
5.2	Fraktionierender Aufschluss von Hirnkapillarendothelzellen und Darstellung der Subproteome in zweidimensionalen Polyacrylamidgelen.....	63
5.3	Proteomanalyse.....	73
5.3.1	Analyse der detergenzreichen Phase des fraktionierenden Aufschlusses.....	73
5.3.1.1	Differentieller Vergleich mit Aortaendothelzellen.....	78
5.3.2	Analyse des SDS-Lysates des fraktionierenden Aufschlusses.....	82
5.3.2.1	Differentieller Vergleich mit Aortaendothelzellen.....	85
5.4	Identifizierung einer gehirnspezifischen Isoform des CaMKII bindenden Proteins α-KAP.....	89
5.4.1	Sequenzanalyse der mRNA.....	91
5.4.2	Bestimmung der Gewebespezifität.....	94
6	Diskussion.....	99
6.1	Präparation und Charakterisierung der Endothelzellen.....	99
6.2	Fraktionierender Aufschluss.....	100
6.3	Proteomanalyse.....	102
6.3.1	Differentiell exprimierte Proteine.....	105
6.4	Identifizierung von α-KAP₂.....	107
7	Literaturverzeichnis.....	112
8	Anhang.....	131
8.1	Massenfingerprints, detergenzreiche Phase.....	131
8.2	Massenfingerprints, SDS-Lysat.....	136

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenanteil pro Volumen
2-D PAGE	zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
A	Ampere; Adenin
AOEC	Aortaendothelzellen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMEC	Hirnkapillarendothelzellen
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylamino]-Propansulfat
Da	Dalton, Einheit der relativen Atommasse
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
FBS	fötale Rinderserum
FDA	Fluorescein-diacetat
G	Guanin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
h	Stunde
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinoethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionisation
mRNA	messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
PBS	Phosphate-buffered saline

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)-dinatriumsalz
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TBP	Tributylphosphine
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TES	N-tris[Hydroxymethyl]methyl-2-aminoethansulfonsäure
TLCK	N α -p-Tosyl-L-lysin-chlormethylketon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Aminosäuren

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

1 Zusammenfassung

Das cerebrale Kapillarendothel stellt die anatomische Basis für den Stofftransport zwischen Blut und Gehirn dar. Diese als Blut-Hirn-Schranke bezeichnete Barriere schützt das Gehirn vor metabolischen Schwankungen der Blutzusammensetzung und vor dem Eindringen neurotoxischer Substanzen. Gleichzeitig erfolgt über die Blut-Hirn-Schranke der Austausch von Nährstoffen, Ionen und Metaboliten zwischen Blut und Gehirn.

Die funktionellen Besonderheiten der Blut-Hirn-Schranke spiegeln sich in der Proteinausstattung der Hirnkapillarendothelzellen - ihrem Proteom - wieder. Zum Verständnis der Schrankenfunktion ist daher die Identifizierung von Proteinen notwendig, die spezifisch in Hirnkapillaren exprimiert werden (differentielle Proteomanalyse).

Eine Methode zur Darstellung von Proteomen ist die 2-D Gelelektrophorese. Dabei erfolgt die Separierung in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung aufgrund der Ladung der Proteine. Als zweite Dimension schließt sich senkrecht dazu eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese an, welche die Proteine nach ihrem Molekulargewicht trennt. Nach Trennung im 2-D Gel erfolgt die Identifizierung der Proteinspots mit Hilfe der Massenspektrometrie.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die differentielle Proteomanalyse porciner Hirnkapillarendothelzellen durchgeführt. Die Zellen wurden aus schlachtfrischen Schweinehirnen präpariert. Die Präparationsschritte wurden dabei optimiert, so dass Zellmaterial mit der für die Proteomanalyse notwendigen hohen Vitalität und Reinheit erhalten wurde.

Zum fraktionierenden Aufschluß der Zellen wurde ein Verfahren etabliert, das im wesentlichen aus der sequentiellen Extraktion des Probenmaterials mit verschiedenen detergentenhaltigen Puffern bestand. In den dabei erhaltenen Proteinfractionen waren cytosolische Proteine, Membranproteine und Kernproteine angereichert. Mittels MALDI-Analyse wurden zunächst 45 Proteine aus der Membranfraktion und 23 Proteine aus der Kernfraktion identifiziert. Für die Detektion von Blut-Hirn-Schranke-spezifischen Proteinen, wurden die Proteinmuster der 2-D Gele aus Hirnkapillarendothelzellen mit denen aus Aortaendothelzellen, die keine Schrankenfunktion besitzen, verglichen.

Insgesamt wurden 11 Proteine identifiziert, die in Hirnkapillarendothelzellen nicht aber in Aortaendothelzellen exprimiert werden. 3 der identifizierten Proteine wurden in Hirnkapillarendothelzellen mindestens zweimal stärker exprimiert.

Unter den differentiell exprimierten Proteinen war eine bisher nicht beschriebene Isoform der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase α (αCamKII). Das Protein ist neben dem CamKII-assoziierten Protein α -KAP die einzige bisher beschriebene Isoform, die keine Kinaseaktivität aufweist und wird wahrscheinlich gehirnspezifisch exprimiert. Der wesentliche Unterschied zu α -KAP ist das Fehlen einer 11 AS-Sequenz, die ein potentielles Kernlokalisierungssignal enthält. Das Protein spielt vermutlich ebenso wie α -KAP eine Rolle beim intrazellulären Targeting der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase und hätte damit eine indirekte Funktion bei der Weiterleitung zahlreicher extrazellulärer Signale.