

6 Diskussion

Das Kapillarendothel im Gehirn stellt die anatomische Basis der Blut-Hirn-Schranke dar und deren funktionelle Besonderheiten spiegeln sich in seiner Proteinausstattung wieder. Zum Verständnis der Schrankenfunktion ist daher die Identifizierung von Proteinen notwendig die spezifisch in den Hirnkapillaren exprimiert werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Proteomanalyse von Hirnkapillarendothelzellen. Um Vergleiche zur Blut-Hirn-Schranke des Menschen zu ermöglichen, wurde als phylogenetisch naher Verwandter des Menschen, das Hausschwein für die Analyse ausgewählt, da hier große Homologien auf Protein- und DNA-Ebene vorhanden sind. Zudem sind Gehirne unmittelbar *post mortem* in der für die Proteomanalyse notwendigen großen Anzahl aus dem Schlachthof erhältlich.

6.1 Präparation und Charakterisierung der Endothelzellen

Die Isolierung microvaskulärer Endothelzellen wurde bereits 1981 von Bowman et al. beschrieben und beruht auf der stufenweisen enzymatischen Freisetzung der Endothelzellen aus der Gefäßmatrix und anschließender Dichtegradientenzentrifugation. In dieser Arbeit kam eine modifizierte Methode von Mischeck et al. (1998) zur Anwendung, die hinsichtlich der Anforderungen an die Proteomanalyse weiter verbessert wurde. Während die bisher durchgeführten Präparationen in erster Linie zum Zwecke der Kultivierung der Zellen erfolgten, muss die Präparation von Hirnkapillarendothelzellen für die Proteomanalyse anderen Anforderungen genügen. Die Vitalität der Zellen war dabei von besonderer Bedeutung, da apoptotische oder nekrotische Zellen das Proteinmuster verfälschen würden. Darüber hinaus ist eine möglichst schonende Präparation notwendig, um die Induktion von Stressproteinen zu verhindern, die ebenfalls das Proteom verändern.

Die Charakterisierung der präparierten Zellen erfolgte mit Standardmethoden der Arbeitsgruppe. Sie erfolgte entweder mit Hilfe von Enzymaktivitätstests, bei denen die Aktivitäten bestimmter BHS-Marker (γ -Glutamyltranspeptidase, Alkalische-Phosphatase) gemessen wurden, oder durch den immunologischen Nachweis von BHS-spezifischen Proteinen auf der Zelloberfläche.

Im Gegensatz zu Präparationen, die mit dem Ziel der Kultivierung der Zellen durchgeführt werden, ist es bei Präparationen die für die Proteomanalyse vorgesehen sind außerdem

notwendig, Erythrozyten zu entfernen, da diese sich nicht vollständig durch die Dichtegradientenzentrifugation trennen lassen. Zu diesem Zweck wurden die Präparationen mit Erythrozyten-Lysepuffer behandelt, der ein osmotisches Zerplatzen der Erythrozyten verursacht und so ihre Trennung von den Endothelzellen ermöglicht.

6.2 Fraktionierender Aufschluss

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ermöglicht eine gut reproduzierbare, parallele Trennung von mehreren tausend Proteinen mit hoher Auflösung. Da jedoch die Trennkapazität eines 2-D Gels begrenzt ist, ist vor allem zur Analyse von komplexen eukaryotischen Zellen eine Fraktionierung des Probenmaterials sinnvoll. Auf diese Weise kann die Komplexität der Proteinmuster reduziert und ein Maximum an Spots in verschiedenen Gelen getrennt werden.

In dieser Arbeit stand die Anreicherung von Membranproteinen im Vordergrund. Die Plasmamembran der Hirnkapillarendothelzellen bildet eine entscheidende Barriere der Blut-Hirn-Schranke. Hier sind Transporter, Rezeptoren, Enzyme und Ionenpumpen lokalisiert, die die Durchlässigkeit für bestimmte Substanzen steuern und die funktionellen Besonderheiten von Hirnkapillarendothelzellen ausmachen.

Für die Fraktionierung wurde ein Verfahren etabliert, das im wesentlichen aus der sequenziellen Extraktion des Probenmaterials mit drei verschiedenen detergenzhaltigen Puffern besteht. Die Methode basiert auf dem von Ramsby und Makowski (1999) veröffentlichten Protokoll und wurde modifiziert, um eine verstärkte Anreicherung von Membranproteinen zu erreichen.

Die differentielle Fraktionierung mit Detergenzien (*differential detergent fractionation*, DDF) von Ramsby und Makowski, beginnt mit der Permeabilisierung der Zellmembran durch die stereoide Verbindung Digitonin. Sie führt zur Freisetzung cytosolischer Komponenten und lässt das Zellgerüst mit permeabilisierter Membran, intaktem Cytoskelett und Zellorganellen zurück. Der zweite Schritt ist die Behandlung mit dem nichtionischen Detergenz Triton X-100, die zur Solubilisierung der Plasmamembran und der Organellen führt (Membranfraktion). Die Triton X-100 unlöslichen Rückstände werden dann mit Tween-40 und Deoxycholat behandelt um Kernproteine in Lösung zu bringen. Der detergenzresistente Rückstand besteht aus Proteinen des Cytoskeletts und kann mit einem SDS-haltigen Puffer gelöst werden.

Bei dem in dieser Arbeit angewendeten, modifizierten Aufschluss wurde die Solubilisierung mit Triton X-100 durch die Phasenseparierung mit Triton X-114 ersetzt. Die Phasenseparierung mit Triton X-114 wurde erstmals von Bordier (1981) vorgestellt. Sie beruht auf der Eigenschaft wäßriger Triton X-114 Lösungen, die bei Temperaturen unterhalb von 4°C homogen sind, oberhalb von etwa 30°C in eine wäßrige Phase und in eine detergenzreiche Phase zu separieren.

Es wurde mehrfach gezeigt, dass es bei der Phasenseparierung zu einer Anreicherung von hydrophilen Proteinen in der detergenzarmen, wäßrigen Phase kommt, während sich hydrophobe Proteine in der detergenzreichen Phase anreichern (Bordier, 1981; Vachon et al., 1991; Wissing et al., 2000). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Kombination der Digitonin-Extraktion mit der anschließenden Triton X-114 Phasenseparierung zu einer deutlichen Verbesserung bei der Anreicherung von Membranproteinen. Die Phasenseparierung stellt gewissermaßen einen „Waschschritt“ für hydrophile Proteine dar, die durch die Digitonin-Extraktion nicht vollständig entfernt wurden.

In Abbildung 5.5 sind 2-D Gele der einzelnen Fraktionen dargestellt. Die mit Digitonin extrahierten Proteine und die Proteine der detergenzarmen Phase der Phasenseparierung mit Triton X-114 zeigen eine große Ähnlichkeit in ihren Proteinmustern, während die Gele der detergenzreichen Phase und des SDS-Lysates sowohl untereinander als auch gegenüber den beiden ersten Fraktionen deutliche Unterschiede im Proteinmuster aufweisen.

Die Anreicherung von löslichen Proteinen in der Digitonin-Fraktion wurde bereits in der Arbeitsgruppe bestätigt. Aus der großen Ähnlichkeit der Proteinmuster der beiden ersten Fraktionen resultiert daher eine verstärkte Anreicherung von Membranproteinen in der detergenzreichen Phase der Phasenseparierung, im Gegensatz zu der Fraktion die durch die Solubilisierung mit Triton X-100 erhalten worden wäre.

Triton X-114 besteht, wie Triton X-100, aus einem Gemisch von p-tert-Octylphenyl-polyoxyethylen (Abbildung 6.1). Kommerziell erhältliche Triton X-114 Präparationen sind jedoch nicht vollkommen homogen (Ganong und Delmore, 1991). Da die Länge der Polyoxyethylenketten einen Einfluss auf die Temperatur hat, bei der die Phasentrennung stattfindet, wurde von Wissing et al. (2000) die Vorkondensierung der Lösung empfohlen um die hydrophileren Triton-Moleküle zu entfernen. Diese Maßnahme führte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu einer deutlichen Verbesserung der Phasenseparierung. In Vorversuchen, bei denen mit nicht vorkondensierten Lösungen gearbeitet wurde, wurde dagegen eine unschärfere und damit schlechtere Phasentrennung erhalten.

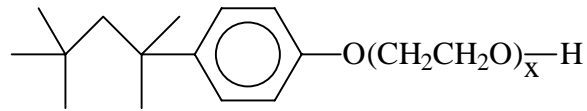


Abbildung 6.1: Strukturformel von Triton X-100 ($x = 9 - 10$) und Triton X-114 ($x = 7 - 8$).

Die von Ramsby und Makowski vorgesehene Behandlung des Triton X-100 unlöslichen Materials mit Tween-40/Deoxycholat, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Statt dessen wurde der Rückstand der Triton X-114 Behandlung ohne weitere Fraktionierung direkt mit SDS-haltigem Puffer gelöst. Prinzipiell besteht jedoch auch nach der Verwendung von Triton X-114 noch die Möglichkeit, durch Solubilisierung mit Tween-40/Deoxycholat eine weitere, mit Kernproteinen angereicherte Fraktion, zu erhalten.

6.3 Proteomanalyse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Anreicherung und Identifizierung von Membranproteinen aus porcinen Hirnkapillarendothelzellen.

Insgesamt wurden 68 Proteine identifiziert. Davon waren 45 Proteine aus der detergentreichen Phase des fraktionierenden Aufschlusses und 23 Proteine aus dem SDS-Lysat.

In der detergentreichen Phase des Aufschlusses konnten insgesamt 15 Proteine identifiziert werden, die entweder in der Cytoplasmamembran, der Mitochondrienmembran oder in membranumschlossenen Zellorganellen lokalisiert sind. 10 Proteine sind im Cytosol lokalisiert, die übrigen 20 Proteine bilden Bestandteile des Cytoskeletts. Da das Cytoskelett den größten Anteil der Proteine in einer Zelle ausmacht, konnte keine vollständige Fraktionierung seiner Bestandteile erreicht werden. Diese Beobachtung wurde auch bei vergleichbaren Aufschlüssen gemacht, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Wenn man den Anteil der Cytoskelett-Bestandteile bei der Beurteilung des Aufschlusses nicht berücksichtigt, beträgt der Anteil der identifizierten Membranproteine 60 % gegenüber 40 % cytosolische Proteine.

Membranproteine sind aufgrund ihres hydrophoben Charakters schlecht in den für die isoelektrische Fokussierung geeigneten Lösungsmitteln löslich. Da ionische Detergenzien nicht mit der IEF kompatibel sind, muss auf ungeladene oder zwitterionische Detergenzien zurückgegriffen werden. Bei den meisten Anwendungen, wie auch in dieser Arbeit, wird das

Sulfobetain CHAPS verwendet, das gegenüber nichtionischen Detergenzien Proteine wesentlich besser solubilisiert.

In der Literatur sind weitere, sehr effiziente, Sulfobetaine wie beispielsweise C8 Φ oder die Amidosulfobetaine ASB-14 und Obas (4-Octylbenzyl-Amidosulfobetain) beschrieben (Chevallet et al., 1998; Henningsen, 2002) mit denen erfolgreich integrale Membranproteine solubilisiert wurden. Durch die Verwendung dieser Detergenzien könnten weitere integrale Membranproteine aus Hirnkapillarendothelzellen einer Analyse zugänglich gemacht werden.

In dieser Arbeit wurde die isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich 4 – 7 durchgeführt. Eine Möglichkeit für die Darstellung weiterer Proteine wäre die Verwendung von alkalischeren pH-Bereichen. Allerdings wird diese Möglichkeit durch das Auftreten von endosmotischen Effekten bei der isoelektrischen Fokussierung erschwert, so dass eine Etablierung der Fokussierungsbedingungen sehr zeitaufwendig ist. Von Görg et al. (1997) wurde eine Methode für die Fokussierung von Proteinen aus Hela-Zellen im pH-Bereich 9 - 12 beschrieben. Zur Optimierung der Fokussierungsbedingungen wurde unter anderem die Gelzusammensetzung durch Substitution von Acrylamid durch Dimethylacrylamid verändert, sowie zur Unterdrückung endosmotischer Effekte Isopropanol bei der Rehydrierung der IPG-Streifen zugesetzt. Die Methode wäre ein guter Ansatzpunkt für die Etablierung der Fokussierung von basischen Proteinen aus Hirnkapillarendothelzellen.

Durch den Vergleich von Hirnkapillarendothelzellen mit Endothelzellen ohne Schrankeneigenschaften sollten die Proteine eingegrenzt werden, die möglicherweise eine Funktion bei der Bildung der Blut-Hirn-Schranke haben. In kultivierten Hirnkapillarendothelzellen ist die Expression von Blut-Hirn-Schranke-Markern wie beispielsweise γ -Glutamyltranspeptidase oder Alkalische-Phosphatase reduziert (Meyer et al., 1990). Aber auch der für Hirnkapillarendothelzellen charakteristische hohe transendotheliale Widerstand nimmt während der Kultivierung ab. Aus dem Verschwinden der Blut-Hirn-Schranke-Marker kann man schließen, dass kultivierte Hirnkapillarendothelzellen zumindest einen Teil ihrer Schrankeneigenschaften verlieren. Zellkulturen von Hirnkapillarendothelzellen sollten sich daher gut als Vergleichsgewebe zur Identifizierung Blut-Hirn-Schranke-spezifischer Proteine eignen.

Im Rahmen dieser Arbeit war es allerdings nicht möglich eine Reinkultur der im Gegensatz zu Aortaendothelzellen schwierig kultivierbaren Hirnkapillarendothelzellen zu etablieren. Das Wachstum der Pericyten, die einen unvermeidbaren Anteil von etwa 5 % der frisch präparierten Zellen ausmachen, konnte nicht ausreichend unterdrückt werden, so dass es zu

Mischkulturen kam, bevor die Zellen ausreichend differenziert waren. Als Vergleichsgewebe für die differentielle Analyse wurden daher porcine Aortaendothelzellen, die keine Schrankenfunktion besitzen, verwendet. Da die Zellausbeute bei der Präparation von Aortaendothelzellen im Vergleich zu frischen Hirnkapillarendothelzellen gering ist, wurden Kulturen der Aortaendothelzellen angelegt, um die für die Analyse notwendige Menge an Probenmaterial zu erhalten.

Bei der differentiellen Analyse wurde dann das Proteinmuster der Aortaendothelzellen mit dem der Hirnkapillarendothelzellen verglichen, um so Proteine zu identifizieren, denen eine Funktion in der Blut-Hirn-Schranke zugeordnet werden kann. Es wurden jeweils drei 2-D Gele mit Proteinen aus dem SDS-Lysat von Hirnkapillarendothelzellen mit drei Gelen mit Proteinen aus Aortaendothelzellen verglichen. Für den Vergleich der detergentreichen Phase des Aufschlusses wurden jeweils fünf Gele miteinander verglichen.

Beim Vergleich der Proteinmuster ließen sich jeweils nur ca. 10 % der Proteine auf den AOEC-Gelen mit denen aus dem BMEC-Referenzgel zur Deckung bringen. Die BMEC-Gele ließen sich allerdings auch untereinander nur zu durchschnittlich 42 % (detergentreiche Phase) bzw. 59 % (SDS-Lysat) decken. Die Unterschiede lagen vor allem im Randbereich der Gele, wo durch das Auftreten von horizontalen- und vertikalen Streifen ein Matchen erschwert wird. Im Kernbereich der Gele, konnte eine größere, jedoch nicht quantifizierte Übereinstimmung festgestellt werden. Um eine zuverlässigere Aussage machen zu können, ob ein Protein spezifisch in Hirnkapillaren exprimiert wird, wären jedoch auch hier größere übereinstimmende Bereiche wünschenswert.

Beim Vergleich der Gele aus der detergentreichen Phase kommt erschwerend hinzu, dass die Spots in den AOEC- und BMEC-Gelen unterschiedlich weit gelaufen sind. Ein Grund hierfür können geringfügig unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen gewesen sein. Dieser Fehler kann durch die verwendete Detektionssoftware in gewissem Maße ausgeglichen, aber nicht vollständig beseitigt werden.

Die Beobachtung, dass sich 2-D Gele aus Membranfraktionen schlecht zur Deckung bringen lassen, wurde auch beim Vergleich der Membranfraktion von kultivierten und frisch präparierten Hirnkapillarendothelzellen gemacht (mündliche Mitteilung M. Jäger). Die Zellen wurden nach der Methode von Ramsby und Makowski (1999) aufgeschlossen. Während sich die cytosolischen Fraktionen gut zur Deckung bringen ließen, gab es kaum Übereinstimmungen beim Vergleich der Membranfraktion.

Die Ursache für die schlechte Übereinstimmung der Proteinmuster kann in der Wahl des Vergleichsgewebes zu finden sein. Weder der Vergleich von mikrovaskulärem Endothel mit

makrovaskulärem Endothel, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, noch der Vergleich von kultivierten mit frisch präparierten Hirnkapillarendothelzellen hat sich als ideal geeignet herausgestellt. Eine weitere Möglichkeit wäre der Vergleich von BMEC-Primärkulturen mit differenzierten BMEC-Kulturen. Primärkulturen besitzen noch ihre Blut-Hirn-Schranke-Eigenschaften, während sie sich bereits weitgehend den Kulturbedingungen angepaßt haben. Sie eignen sich daher möglicherweise gut als Vergleichsgewebe mit differenzierten Hirnkapillarendothelzellen, die ihre Blut-Hirn-Schranke-Eigenschaften verloren haben.

6.3.1 Differentiell exprimierte Proteine

Insgesamt wurden 11 unterschiedliche Proteine identifiziert, die in Hirnkapillarendothelzellen, nicht aber in Aortaendothelzellen exprimiert wurden. Von diesen Proteinen wurden 3 (Calpain, Serin-Threonin-Phosphatase, Tropomyosin) in der detergentreichen Phase des Aufschlusses identifiziert und 8 im SDS-Lysat (Rbm3, 2x α -KAP₂, Enhancer of rudimentary homolog, BTF3, HnRNP 2H9B, Aktin, HMG-1).

Außerdem wurden 3 Proteine (Stomatin like 2, β -Aktin, α -SNAP) in der detergentreichen Phase identifiziert, die in Hirnkapillarendothelzellen mindestens zweimal stärker exprimiert werden als in Aortaendothelzellen.

Proteine des Cytoskelettes: Die meisten der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Proteine bilden Bestandteile des Cytoskeletts. Es wurden mehrere Isoformen von Aktin, Myosin, Tubulin und Vimentin identifiziert, die sowohl in Hirnkapillarendothelzellen als auch in Aortaendothelzellen in gleichem Maße exprimiert werden. Daneben wurden in Hirnkapillarendothelzellen eine Tropomyosin-Isoform und 2 Aktin-Isoformen identifiziert, die nicht in Aortaendothelzellen exprimiert werden.

Aktin, das häufigste Protein in eukaryotischen Zellen, ist der Proteinbaustein der Mikrofilamente (Aktinfilamente). Tropomyosin ist an der Stabilisierung der Aktinfilamente beteiligt. Da beide Proteine in allen eukaryotischen Zellen vorkommen, handelt es sich hier vermutlich um unterschiedlich, posttranslational modifizierte Isoformen. Das Cytoskelett stellt das mechanische Gerüst der Zelle dar, das ihr die typischen Eigenschaften verleiht und Membranen und Organellen miteinander verbindet. Es hat dynamische Eigenschaften und unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau, um sich an die Anforderungen der Zelle anzupassen. Die differentielle Expression bestimmter Isoformen der Cytoskelettbestandteile läßt sich daher durch die unterschiedliche Morphologie der beiden Zelltypen begründen.

Während die Aortaendothelzellen adhären auf einer Kunststoffoberfläche gewachsen sind und dabei eine spindelförmige Gestalt angenommen haben, wurden die Hirnkapillarendothelzellen direkt aus ihrer extrazellulären Matrix herausgelöst und sind noch kugelförmig.

Stomatin like 2: Die physiologische Funktion des Stomatin like 2 Proteins ist noch unklar. Über eine Rolle bei der Regulation von Ionenkanälen oder der Organisation der sogenannten *lipid rafts* wird spekuliert (Wang und Morrow, 2000).

Lipid rafts bilden eine separierte Phase innerhalb der Plasmamembran eukaryotischer Zellen, die reich an Sphingolipiden und Cholesterol ist. In diesen relativ detergentresistenten Mikrodomänen sind häufig Proteine über Glycosyl-Phosphatidylinositol-Reste mit der Lipiddoppelschicht verankert. Diese sogenannten GPI-verankerten Proteine haben unter anderem eine Funktion bei der Signalübertragung in die Zelle, so dass den *lipid rafts* die Rolle einer „Signaltransduktions-Plattform“ zugeschrieben werden kann. Aber auch viele Enzyme wie beispielsweise Alkalische-Phosphatase sind über GPI-Anker mit der Lipiddoppelschicht verbunden. Eine verstärkte Expression von Stomatin like 2 in Hirnkapillarendothelzellen könnte darauf hindeuten, dass es hier zu einer vermehrten Bildung der *lipid rafts* kommt. Die Isolierung von *lipid rafts* aus Hirnkapillaren und die Analyse der damit assoziierten Proteine, könnte daher eine erfolgversprechende Strategie für die Identifizierung Blut-Hirn-Schranke-spezifischer Proteine darstellen.

Rbm3: Zur Familie der glycinreichen RNA-bindenden Proteine (GRP-Familie) gehört das in den meisten humanen Zelllinien konstitutiv exprimierte Rbm3. Unter milden hypothermischen Bedingungen kommt es zu einer verstärkten Expression dieses sogenannten *coldshock* Proteins (Danno et al, 1997). Die Expression von Rbm3 in Hirnkapillaren kann daher durch die Bedingungen während der Präparation induziert worden sein. Eine genaue Funktion von Rbm3 ist jedoch noch nicht bekannt.

α -KAP₂: Hierbei handelt es sich um eine bisher nicht beschriebene, gehirnspezifische Isoform der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Kinase II α (α CaMKII). Die Diskussion hierzu erfolgt in Abschnitt 6.4.

Die übrigen Proteine, die in Hirnkapillarendothellen identifiziert wurden, werden in der Literatur als ubiquitär in eukaryotischen Zellen beschrieben. Die Möglichkeit besteht allerdings, dass diese Proteine in Aortaendothelzellen und in Hirnkapillarendothelzellen unterschiedlich posttranslational modifiziert werden und sich die Proteinspots daher auf den 2-D Gelen nicht zur Deckung bringen lassen. Die nicht lysosomale Thiolprotease Calpain

wird beispielsweise in verschiedenen gewebespezifischen Isoformen exprimiert (Perrin und Huttenlocher, 2002). Calpain ist für die limitierte Proteolyse von Substraten verantwortlich, die an der Signaltransduktion und der Remodelierung des Cytoskeletts beteiligt sind. Daher wäre möglich, dass es sich in diesem Fall um eine BMEC-spezifische Isoform von Calpain handelt.

Die meisten der Proteine (HMG-1, BTF3, hnRNP 2H9B, ERH, Serin-Threonin-Phosphatase) sind im Zellkern lokalisiert. Es kann daher auch darüber spekuliert werden, ob die Solubilisierung von Proteinen aus dem Zellkern nicht streng reproduzierbar durchgeführt werden kann und es daher zu Ungleichmäßigkeiten in der zweidimensionalen Darstellung gekommen ist. Denkbar ist beispielsweise, dass mit der Chromatinstruktur assoziierte Proteine nicht gelöst wurden.

6.4 Identifizierung von α -KAP₂

Das Protein α -KAP, eine Isoform der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase II α (α CaMKII), wurde erstmals von Bayer et al. (1996) identifiziert und als spezifisch für die Skelettmuskulatur der Maus beschrieben. Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinasen stellen eine Familie von multifunktionellen Proteinkinasen dar, die durch Ca^{2+} aktiviert werden und den Effekt zahlreicher extrazellulärer Signale in der Zelle weiterleiten. Sie verändern die Funktion von Schlüsselproteinen durch spezifische und reversible Phosphorylierung. CamKII wird aus 4 ähnlichen, sehr konservierten Genen (α , β , γ , δ) gebildet, durch alternatives Spleißen entstehen zahlreiche weitere Isoformen aus jedem Gen (Abbildung 6.2)

Im Gegensatz zu α CaMKII besitzt α -KAP (α CaMKII-Assoziationsprotein) keine Kinaseaktivität. Seine C-terminale Domäne ist bis auf eine 11 AS lange Insertion identisch mit der Assoziationsdomäne von α CaMKII während die N-terminale Domäne spezifisch ist für α -KAP (Abbildung 5.14)

Es konnte gezeigt werden, dass α -KAP die Funktion eines Ankerproteins für CamKII hat, indem es dieses über seine hydrophobe, N-terminale Domäne mit der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums verbindet (Bayer et al., 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden anhand von Massenfingerprints zwei Proteine im SDS-Lysat des fraktionierenden Aufschlusses von Hirnkapillarendothelzellen als α -KAP identifiziert. Da α -KAP im Gehirn bisher nicht beschrieben wurde, ist unter Verwendung von α -KAP-spezifischen Primern, ein 220 bp langer Abschnitt von cDNA aus

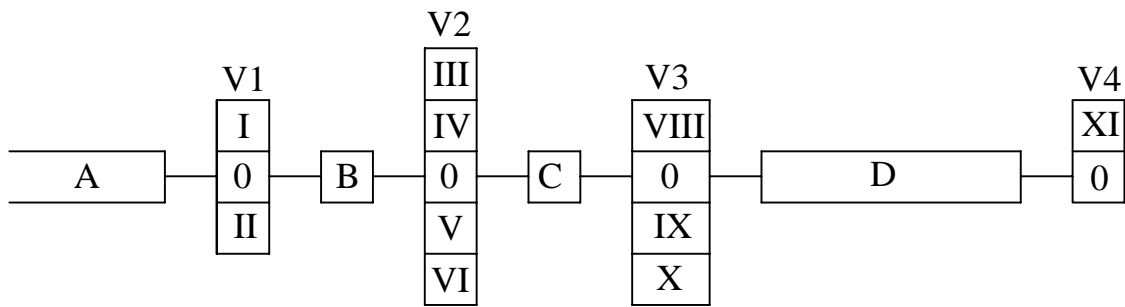
Hirnkapillarendothelzellen amplifiziert und sequenziert worden. Die Sequenzanalyse ergab eine 95 %ige Übereinstimmung mit der murinen Form. Eine 33 bp lange Sequenz durch die sich die C-terminale α -KAP-Domäne von α CaMKII unterscheidet, fehlt jedoch in der porcinen Form. Demnach wurde in Hirnkapillarendothelzellen eine neue Isoform von α -KAP identifiziert, deren C-terminale Domäne identisch ist mit der Assoziationsdomäne von α CaMKII und die im folgenden als α -KAP₂ bezeichnet wird.

Für die Bestimmung der Gewebespezifität von α -KAP₂ wurde eine Northern-Blot-Analyse mit Gesamt-RNA aus BMEC, PAEC, Gesamthirn, Colon, Herz, Milz, Leber, Lunge, Plexus, Milz und Testis angefertigt. Mit der verwendeten Sonde war sowohl die Detektion von α CaMKII-Transkripten als auch von α -KAP- bzw. α -KAP₂-Transkripten möglich. Die Unterscheidung konnte anhand der Transkriptlänge erfolgen. Durch den Vergleich mit Literaturwerten (Bayer et al., 1996) konnten Transkripte von α -KAP bzw. α -KAP₂ in Herz und Gehirn nachgewiesen werden. Eine Differenzierung zwischen α -KAP und α -KAP₂ konnte aufgrund des geringen Größenunterschiedes nicht erfolgen. Weder in BMEC noch in anderen Geweben konnten mit der Northern-Blot-Analyse Transkripte nachgewiesen werden.

Die übrigen Signale geringerer Größe, die mit RNA aus Gesamthirn erhalten wurden, könnten durch die Initiation der Transkription an unterschiedlichen Promotoren und/oder Polyadenylierung an unterschiedlichen Stellen erklärt werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Tobimatsu und Fujisawa (1989) bei der Analyse der gewebespezifischen Expression von CamKII der Ratte erhalten.

Mithilfe einer RT-PCR konnte ebenfalls die Expression von α -KAP₂ in Gesamthirn nachgewiesen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Produktgrößen war hier eine Unterscheidung von α -KAP möglich. Mit geringerer Signalintensität war α -KAP₂ auch in BMEC, Colon und Milz und mit sehr geringer Intensität in Niere und Testis. Kein Nachweis erfolgte in Aortaendothelzellen, Plexus, Leber und Lunge. α -KAP wurde dagegen in Hirnkapillarendothelzellen nachgewiesen, jedoch nicht in Gesamthirn. Außerdem wurden ein Nachweis für die Expression in Herz, Colon, Milz und Testis erhalten.

Aufgrund der Sequenzierung von cDNA aus Hirnkapillarendothelzellen und der MALDI-Analyse der Proteinspots, kann mit Sicherheit gesagt werden, dass im Gehirn die Expression von α -KAP₂ erfolgt. Dieses Ergebnis wird durch die Northern-Analyse bestätigt. Die Expression in Hirnkapillarendothelzellen konnte hier allerdings nicht gezeigt werden, woraus sich schließen läßt, daß möglicherweise Kontaminationen aus andern Hirngeweben in der für die RT-PCR verwendeten cDNA-Probe vorhanden waren.



$\alpha =$	A-B-C-D	$\delta_A =$	A-B-IV-V-VI-C-D-XI	(δ_1)
$\alpha_B =$	A-B-III-C-D	$\delta_B =$	A-B-III-C-D-XI	(δ_2)
$\alpha\text{-KAP} =$	I-B-III-C-D	$\delta_C =$	A-B-C-D-XI	(δ_3)
$\alpha\text{-KAP}_2$	I-B-C-D	$\delta_D =$	A-B-IV-V-C-D-XI	(δ_4)
		$\delta_E =$	A-B-IV-V-VI-C-D	(δ_5)
$\beta =$	A-II-B-IV-V-VI-C-D	$\delta_F =$	A-B-III-C-D	(δ_6)
$\beta' =$	A-II-B-IV-V-C-D	$\delta_G =$	A-B-C-D	(δ_7)
β_e	A-B-IV-V-VI-C-D	$\delta_H =$	A-B-IV-V-C-D	(δ_8)
$\beta_{e'}$	A-B-IV-V-C-D	$\delta_I =$	A-B-VI-C-D-XI	(δ_9)
β_3	A-B-IV-V-C-2X-D	$\delta_J =$	A-B-VI-C-D	(δ_{10})
β_M	A-II-B-IV-V-VI-C-3X-D	$\delta_K =$	A-B*-C-D-XI	(δ_{11})
		$\delta_L =$	A-B*-C-D	(δ_{12})
		$\delta_M =$	A-B-III-VI-C-D-XI	(δ_{11a})
$\gamma_A =$	A-B-III-VI-C-D			
$\gamma_B =$	A-B-IV-V-VI-C-D			
$\gamma_C =$	A-B-VI-C-D			
$\gamma_D =$	A-B-IV-VI-C-VIII-IX-D			
$\gamma_E =$	A-B-IV-V-VI-C-VIII-IX-D			
$\gamma_F =$	A-B-VI-C-VIII-IX-D			
$\gamma_G =$	A-B-IV-VI-C-IX-D			
$\gamma_H =$	A-B-IV-VI-C-D			

Abbildung 6.2: Diversität von CaMKII Isoformen (nach Hudmon und Schulman, 2002, $\alpha\text{-KAP}_2$ wurde hinzugefügt).

Solche Verunreinigungen könnten auch zum Nachweis auf Proteinebene in BMEC geführt haben. Da die CaMKII 1 % der Proteine im Vorderhirn bzw. 2 % im Hippocampus ausmacht (Hudmon und Schulman, 2002), könnte α -KAP₂ ebenfalls in einer so großen Menge vorkommen, dass eine Kontamination erklärbar wäre.

Mit der RT-PCR wurde α -KAP und α -KAP₂ in BMEC nachgewiesen, was einen Widerspruch zu den Ergebnissen der Northern-Blot-Analyse darstellt, der allerdings durch die höhere Sensitivität der PCR-Reaktion erklärt werden kann. Bei längerer Expositionsdauer des Röntgenfilms wären möglicherweise auch bei der Northern-Blot-Analyse Transkripte in BMEC oder anderen Geweben nachgewiesen worden. Bei der von Bayer et al. (1996) beschriebenen Identifizierung von α -KAP im Skelettmuskel der Maus wurden durch eine längere Expositionszeit geringe Mengen α -KAP-RNA im Gehirn, Herz und Uterus nachgewiesen.

Die Expression geringer Mengen α -KAP bzw. α -KAP₂, wie sie durch die RT-PCR nachgewiesen wurde, könnte dadurch begründet werden, dass ihre Promotoren nicht gewebespezifisch sind und es daher beim Öffnen der Chromatinstruktur zu einer geringfügigen Transkription kommt, für die keine weiteren, gewebespezifischen Faktoren notwendig sind. Daher wären keine Rückschlüsse aus dem Verhältnis der Produktintensitäten bei der RT-PCR auf die Quantität von α -KAP und α -KAP₂ möglich.

Wie durch die Northern-Analyse gezeigt wurde, kommt es zu keiner spezifischen Expression in BMEC. In den übrigen untersuchten Geweben kommt es nur im Herz zu einem Nachweis. Da hier vermutlich das muskelspezifische α -KAP-Transkript detektiert wurde (Bayer et al., 1996), handelt es sich bei α -KAP₂ wahrscheinlich um eine gehirnspezifisch exprimierte Isoform von α -KAP.

Anstelle der katalytischen Domäne der CaMKII besitzt α -KAP eine N-terminale 24 AS lange, hydrophobe Domäne, an die sich die 11 AS lange α -KAP-spezifische Sequenz und die Assoziationsdomäne anschließt (Abbildung 5.14). In der 11 AS langen Sequenz, die α -KAP von α -KAP₂ unterscheidet, befindet sich die potentielle Kernlokalisationssequenz, KKRK (Bayer et al., 1996). Von dieser NLS-Sequenz (*nuclear localization signal*) ist beispielsweise die Lokalisierung von δ_B - und α_B -CamKII im Zellkern abhängig (Hudmon und Schulman, 2000). Von Bayer et al. (1998) wurde ein Modell vorgeschlagen, bei dem es über die Assoziationsdomänen von α CaMKII und α -KAP zur Bildung von Heteromultimeren kommt, die über die hydrophobe Domäne von α -KAP mit der Membran des sarkoplasmatischen

Retikulums verbunden sind. Die Funktion der NLS scheint in diesem Fall von der hydrophoben Domäne überlagert zu werden, jedoch ist die NLS möglicherweise für weitere Funktionen von α -KAP in der Muskelzelle notwendig. Im Gehirn könnte α -KAP₂ ebenfalls eine Funktion beim intrazellulären Targeting der CamKII haben.