

2 Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	3
2	Inhaltsverzeichnis	4
3	Abbildungsverzeichnis	6
4	Tabellenverzeichnis	7
5	Abkürzungsverzeichnis	8
6	Einleitung	12
6.1	tPA als Arzneimittel	13
6.2	tPA im Nervengewebe: Neurotrophische und Neurodegenerative Wirkung	15
6.3	Die biologische Rolle der Neurotrophine	20
6.4	Neurotrophinrezeptoren	21
6.5	Chromatin, Nukleosom und Histone: Kontrolle der Transkription <i>in vivo</i>	23
6.6	Die Kontrolle der Expression des tPA Gens	27
6.7	Aufgabenstellung der Arbeit	29
7	Material und Methoden	30
7.1	Materialien und Chemikalien	30
7.2	Zellbiologische Methoden	31
7.2.1	Kultivierung und Konservierung von Zellen	31
7.2.2	Medien und Lösungen	32
7.2.3	Darstellung der Proteinextrakte (Roh-, Membran- und zytosolische Fraktion)	32
7.2.4	SDS-PAGE und Western-Blot Analyse	33
7.3	Molekularbiologische Methoden	34
7.3.1	Standard-Puffer und Medien	34
7.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	35
7.3.3	Sequenzierung von DNA	35
7.3.4	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
7.3.5	Darstellung, Amplifizierung und Isolierung rekombinanter DNA	35
7.3.6	Verwendete Vektoren	36
7.3.7	PCR und verwendete Primer	37
7.3.8	Darstellung der NF- κ B Deletionsmutanten	37
7.3.9	Transiente Transfektion und Transaktivierungsassay	37
7.3.10	Klonierung der tPA/Luc-Reportergen Konstrukte	38
7.4	Ribonuklease Protektions Assay (RPA)	40
7.5	DNaseI Hypersensitivitätsassay	41
7.5.1	Prinzip der Methode	41
7.5.2	Durchführung	43
7.6	<i>In vivo</i> Footprinting	47
7.6.1	Prinzip der Methode	47
7.6.2	Durchführung	50
8	Ergebnisse	55
8.1	Neurotrophine als Mediatoren der tPA Genexpression	55
8.1.1	Nachweis der Membranrezeptoren für Neurotrophine	55
8.1.2	Die Wirkung von Neurotrophinen auf die Transkription von tPA	56

8.2	Analyse des <i>tPA</i> Gens auf genomischer Ebene	61
8.2.1	DNaseI Hypersensitivitäts-Assays auf der genomischen <i>tPA</i> Sequenz	62
8.2.2	Analyse der hypersensitiven Regionen mit Hilfe von <i>in vivo</i> Footprinting	69
8.3	Phorbolster induziert <i>tPA</i> über ein NF-κB responsives DNA-Element	83
9	<i>Diskussion</i>	88
9.1	Experimentelle Methodik	88
9.1.1	Der DNaseI Hypersensitivitätsassay	89
9.1.2	<i>In vivo</i> Footprinting	90
9.1.3	Der Transaktivierungsassay	92
9.2	Neurotrophine regulieren die <i>tPA</i> Transkription	93
9.3	Eine funktionelle NF-κB Erkennungssequenz reguliert die Transkription von <i>tPA</i>	98
9.4	Erkennungssequenzen multipler Transkriptionsfaktoren	101
10	<i>Zusammenfassung</i>	107
11	<i>Literaturverzeichnis</i>	108
12	<i>Danksagung</i>	119
13	<i>Lebenslauf</i>	120
14	<i>Veröffentlichungen und Vorträge</i>	121
15	<i>Anhang</i>	122