

6 Einleitung

Der Gewebe-typ Plasminogenaktivator (tissue type plasminogen activator, *tPA*) ist eine Serinprotease, die das in hoher Konzentration im Blut zirkulierende Proenzym Plasminogen (1,5 – 2 μM) in die trypsin-ähnliche Protease Plasmin (Collen et al. 1991, Bachmann 1987) überführt. Mit Hilfe dieses Mechanismus generiert der Körper lokale proteolytische Aktivität, die bei Gewebeumbauprozessen wie der Wundheilung und wie neuerdings bekannt ist auch bei der Regulierung der synaptischen Plastizität erforderlich ist.

Plasminogen wird in der Leber als einzelsträngiges Proenzym synthetisiert und in den Blutkreislauf sezerniert (Bohmalk und Fuller 1983). Es wird durch einen der beiden Plasminogenaktivatoren uPA und *tPA* durch proteolytische Spaltung der Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹ Peptidbindung in Plasmin überführt (Bachmann 1987). Plasmin ist ein Enzym mit Trypsin-ähnlicher Spezifität, das Fibrin (das unlösliche Gerüst der Blutgerinnsel) und intrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin oder Laminin proteolytisch abbaut (Collen 1980, Mignatti und Rifkin 1993).

Humanes *tPA* ist als „Single Copy Gene“ auf Chromosom 8 lokalisiert (Rajput et al. 1985) und wird als einzelsträngiges Vorläuferprotein synthetisiert. Das *tPA* Monomer hat eine Größe von 72 kDa, besteht aus 530 Aminosäuren (Pennica et al. 1983) und enthält Domänen, die homolog zu anderen Proteinen sind. So ist beispielsweise die Region von 1-43 AS homolog zu den Fingerdomänen von Fibronectin und die Region der AS 44-91 ist homolog zur epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) Domäne. Die AS 92-173 und 180-261 sind homolog zur sogenannten Kringle Domäne des Plasminogens (Pennica et al. 1983). Die zweite Kringle Domäne und die Fingerdomäne sind diejenigen Regionen, die dem *tPA* die hohe Bindungsaffinität zum Plasminogen verleihen (van Zonneveld et al. 1986, Verheijen et al. 1986). *tPA* wird anschließend durch Plasmin an Position Arg-278-Ile-279 proteolytisch gespalten (Rijken & Groeneweld 1986) und damit in seiner katalytischen Wirkung etwa 30fach verstärkt (Hoylaerts et al. 1982). Es ist im Gegensatz zum einzelsträngigen Plasminogen oder uPA auch in seiner ungespaltenen Form katalytisch aktiv ist (Tate et al. 1987). Die für die proteolytische Spaltung von Plasminogen sensitive Region befindet sich in der Domäne, die von den AS 276-527 geformt wird (Pennica 1983).

Ein mit dem *tPA* verwandtes Enzym ist der Urokinase-typ Plasminogenaktivator (uPA). Im Gegensatz zu *tPA* wird uPA als inaktives Proenzym synthetisiert, das durch Plasmin oder

Kallikrein proteolytisch aktiviert werden muss. Die Aktivität von *tPA* ist in Gegenwart von Fibrin 500fach erhöht. Fibrin bindet spezifisch Plasminogen und *tPA* und wirkt deshalb als Kofaktor der *tPA* vermittelten Plasminogenaktivierung (Collen & Lijnen 1995). Diese Eigenschaft von *tPA* wird auch als "Fibrinselektivität" bezeichnet. Im Gegensatz zu *tPA* bindet uPA nicht an Fibrin und die Aktivität von uPA wird auch nicht durch Fibrin stimuliert. Experimente mit Mäusen, in denen das uPA Gen und das *tPA* Gen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen ausgeschaltet wurde, zeigen, dass *tPA* in erster Linie für die Beseitigung intra- und extrazellulärer Fibrinablagerungen zuständig ist, wogegen uPA eine wichtige Rolle bei Gewebeumbauprozessen, z.B. der Wundheilung, spielt (Declerck et al. 1995).

Beide Plasminogenaktivatoren werden von einer ganzen Reihe von Zelltypen produziert, wobei *tPA* vor allem von den vaskulären Endothelzellen synthetisiert und sezerniert wird (Rabiner et al. 1969, Chidkey 1993). Die Expression unterliegt einer gewebespezifischen Kontrolle durch extrazelluläre Mediatoren (Medcalf 1990, 1992).

6.1 *tPA* als Arzneimittel

Aufgrund seiner "Fibrinselektivität" (Bachmann 1987) wird *tPA*, das kommerziell aus rekombinanten CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) gewonnen wird und als Arzneimittel (Alteplase®) zugelassen ist, zur Behandlung von akuten Gefäßverschlüssen, wie dem koronaren Herzinfarkt, dem thrombotischen Schlaganfall und der akuten Lungenembolie eingesetzt.

Die Fibrinbildung begleitet Prozesse der Wundheilung und Entzündung. Für die Erhaltung einer normalen vaskulären Durchgängigkeit ist es daher unerlässlich, dass die Produktion von Fibrin zeitlich begrenzt und genau gesteuert wird. Bei einer Überproduktion von Fibrin kommt es sonst zu Thrombosen und im Versorgungsbereich des Koronargewebes und der zerebralen Gefäße zu anoxischen Schädigungen des Gewebes. Andererseits kann eine gestörte Fibrinbildung zu schweren Blutungen führen, die ebenfalls lebensbedrohlich werden können (Lijnen & Collen 1989).

Während der Blutgerinnung bindet das im Blut zirkulierende Plasminogen an das entstehende Gerinnsel. Gleichzeitig verbindet sich der primäre Inhibitor des Plasminogens, das sogenannte α 2-Antiplasmin, mit der Fibrinmatrix (Lijnen & Collen 1982). Einzelsträngiges *tPA* mit seiner Affinität zu Fibrin (Wun & Capuano 1982) bindet ebenfalls an die Fibrinmatrix und beginnt Plasminogen in Plasmin zu spalten (Ranby et al., 1982, Hoylaerts et al., 1982), welches daraufhin seinerseits teilweise das vorhandene einzelsträngige *tPA* in seine aktivere zweisträngige Form überführt. Ist nun die Menge des gebundenen *tPA* gering, so wird der überwiegende Teil des gebildeten Plasmins sofort durch das vorhandene α 2-Antiplasmin neutralisiert. Um eine fibrinolytische Therapie erfolgreich einsetzen zu lassen, muss demnach die Bildungsrate des Plasmins einen bestimmten Schwellenwert übersteigen.

Die jeweilig vorliegende Zusammensetzung des Plasmas in räumlicher Nähe um den Thrombus und die aus der Koagulationskaskade resultierenden Stimuli steuern die Ausschüttung des einzelsträngigen *tPA* aus den Vesikeln des vaskulären Endothels (Kooistra et al. 1994). Einzelsträngiges *tPA* infiltriert den sich bildenden Blutpfropf und beginnt Plasminogen in Plasmin zu spalten (Suenson et al. 1984), welches wiederum das sehr viel aktivere zweisträngige *tPA* bildet, das seinerseits durch die Gegenwart des Fibrins um ca. 500fach aktiver noch mehr Plasminogen in Plasmin spaltet. Eine besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang den auf den Zelloberflächen gebundenen Enzymen Plasminogen, Plasmin und *tPA* zu, die dort zu einer stark gesteigerten Plasminogenaktivierung und damit zu einer verstärkten Plasminaktivität führen (Plow et al. 1995, Review). Diese gesteigerte, zellassoziierte proteolytische Aktivität ist daneben auch die Grundlage für den physiologischen Prozess der Zellmatrix-Degradierung, der beispielsweise bei der Zellmigration von Neuronen (Sumi 1992, Seeds 1990) von Bedeutung ist. Übersteigt nun die anfänglich gebildete Plasminmenge den oben erwähnten Schwellenwert, kommt eine sich selbst verstärkende Kaskade in Gang, die zur Auflösung des Thrombus führt. Dabei sinkt die Menge des vorhandenen Fibrins und *tPA* verliert seine erhöhte katalytische Aktivität wieder. Zudem wird *tPA* ständig durch die Leber aus dem Blutstrom eliminiert (Sprengers & Kluft 1987, Owensby et al 1989). Die angelaufene Fibrinolytische Kaskade wird auf diese Weise beendet.

Die physiologische Rolle von *tPA* ist auch mit Hilfe der gezielten Ausschaltung des Gens in transgenen Labormäusen (gene „knock out“) untersucht worden.

tPA^{-/-} Mutanten zeigen ein stark vermindertes thrombolytisches Potential, spontan auftretende Fibrinablagerungen, eine reduzierte Lebenserwartung und erhöhte Suszeptibilität für Endotoxin induzierte Thrombosen (Carmeliet et al. 1994). Klinische Studien beim Menschen haben gezeigt, dass ein reduziertes fibrinolytisches Potential mit dem Auftreten und der Entwicklung thrombolytischer Komplikationen einhergeht (Vermynen & Chamone 1979).

6.2 *tPA* im Nervengewebe: Neurotrophische und Neurodegenerative Wirkung

Relativ neue und überraschend sind die Ergebnisse der Untersuchungen über *tPA* im zentralen und peripheren Nervensystem.

TPA ist an kognitiven Prozessen wie beispielsweise der long-term potentiation (LTP) beteiligt (Qian et al. 1993, Zhuo et al. 2000), bei der exzitatorische Reize die Transkription des *tPA* Gens im Hippocampus (vor allem im *gyrus dentatus* und den CA-Feldern 1-3) stimulieren (Qian et al. 1993). Dort korreliert zudem die forskolin-induzierte *tPA* Ausschüttung mit der axonalen Verlängerung von Granulärzellen des *gyrus dentatus* (Baranes et al. 1998). Histologische Untersuchungen zeigen, dass *tPA* in Neuronen des Hippocampus und dort auch in Mikrogliazellen exprimiert wird (Tsirka et al. 1995) sowie das Wachsen der „mossy fibers“ nach „seizure“-Induktion (Krampfanfall) im Hippocampus reguliert (Wu et al. 2000). Man kann während der LTP, die als Model für die Erinnerungsbildung bzw. des Lernens betrachtet wird, hohe *tPA* Level im *zerebralen Kortex*, dem *Hippocampus* und dem *Cerebellum* beobachten. Die Langzeitgedächtnisbildung verläuft in zwei Phasen. Man unterscheidet eine transkriptionsunabhängige Frühphase (Alkon et al 1991) und eine Spätphase, in der Kaskaden von sogenannten „immediate early genes“ aktiviert werden (Goelet et al. 1986). Diese führen zu strukturellen Veränderungen und Modulierungen in der Stärke von Synaptischen Verbindungen, was als synaptische Plastizität bezeichnet wird (Malenka 1994, Calabresi et al. 2000). In einem dynamischen Prozess werden dabei aktive Nervenverbindungen gestärkt, neue Synapsen gebildet und wenig beanspruchte Nervenverbindungen geschwächt oder eliminiert (Shatz 1990). In den beschriebenen Gehirnarealen verhält sich *tPA* wie ein solches „immediate early gene“ (Quian et al. 1993, Seeds et al. 1995), das heißt es wird frühzeitig exprimiert und der Anstieg der *tPA* Biosynthese korreliert dabei mit Bereichen erhöhter synaptischer Plastizität. Interessanterweise lässt sich die LTP im Hippocampus der Ratte

durch *tPA* Inhibitoren selektiv blockieren und durch rekombinantes *tPA* induzieren (Huang et al. 1995).

Die durch *tPA* modulierte neurale Plastizität wird durch seine proteolytischen Eigenschaften vermittelt. So werden gleichzeitig mit der Sekretion von *tPA*-Zelloberflächenrezeptoren die Glykoproteine Laminin, Fibronectin und Thrombospondin in der extrazellulären Matrix proteolytisch gespalten (Salonen et al. 1985, Eberhard et al. 1999, Lawler 1981). Die Spaltung von Laminin führt seinerseits zu neuronalen Strukturveränderungen (Verrall & Seeds 1989, Seeds et al. 1995, Huang et al. 1996) und zu neuronaler Degeneration (Chen & Strickland 1997). Die Mechanismen, die zu einer Aktivierung der *tPA* Biosynthese im Gehirn führen, beginnen mit der Aktivierung von Zellrezeptoren wie z.B. dem N-methyl-D-aspartat (NMDA) Rezeptor (Inoue et al. 1994), der durch den Neurotransmitter Glutamat aktiviert wird (Meldrum & Garthwaite 1990). Glutamat ist ein wichtiger exzitatorischer Neurotransmitter, der im ZNS Calcium-Kanäle der Neuronen öffnet und zum Einströmen von Calciumionen führt (Bacsikai et al 1995), welches zu einer erhöhten Expression von *tPA* führt. Studien an Mäusen zeigten eine Schlüsselrolle von *tPA* im Gehirn. Setzt man Mäusen wiederholt elektrischen oder chemischen neuronalen Reizen aus, so resultiert das in einer verstärkten synaptischen Aktivität, dem sogenannten synaptischen Feuern („kindling“, Qian et al. 1993). Das „kindling“ ist ein pharmakologisches Modell für epileptische Anfälle. Dieses synaptische Feuern korreliert mit stark erhöhten Konzentrationen von *tPA* im gesamten *Hippocampus* und in Teilen des *Cerebellums* (Frey et al. 1996, Huang et al. 1996). Trainiert man Mäuse auf die Durchführung komplexer motorischer Abläufe, führt auch das zu einer Erhöhung der *tPA* Produktion im zerebralen Kortex und in der Folge zu erhöhter synaptischer Plastizität (Seeds et al 1995, Black et al. 1990). *TPA*-knock-out Mäuse hingegen haben zwar die Fähigkeit zur Entwicklung der transkriptionsunabhängigen Frühphase der LTP, sie sind aber nur rudimentär dazu fähig die transkriptionsabhängige Spätphase der LTP abzuschließen, welche die eigentliche Erinnerung generiert und speichert (Huang et al 1996). Weiterhin sind *tPA*^{-/-} Mutanten viel weniger empfänglich für metrazol-induzierte Krämpfe (Frey et al 1996) und die granulären Neuronen, die normalerweise *tPA* sezernieren, zeigen zudem ein auf die Hälfte reduziertes Migrationsverhalten (Seeds et al. 1999). Auf der Grundlage dieser Experimente kann als gesichert gelten, dass die Signaltransduktionswege, welche die L-LTP induzieren auch die Produktion von *tPA* stimulieren. *TPA* wiederum verursacht die Degradation von Zelloberflächenrezeptoren, Zelladhäsionsmolekülen und extrazellulären Matrixproteinen, was zu neuronalen Strukturveränderungen und synaptischer Remodellierung führt. Diese Befunde

werden erhärtet durch Experimente mit transgenen Mäusen, bei denen *tPA* unter der Kontrolle eines neuronal spezifischen Promotors überexprimiert wird (3-10fach über Wildtyp) und die daraufhin eine deutlich verlängerte LTP im *Hippocampus* und verbesserte Erinnerungsvermögen zeigen (Madani et al 1999) ohne dass dabei anderweitige pathologische Befunde beobachtet wurden.

tPA entfaltet aber andererseits auch toxische Wirkung im ZNS. So führt Glutamat zu einem Calcium-Einstrom und in der Folge zu erhöhter *tPA* Expression, welche wiederum zu einem Abbau von Laminin führt (Chen & Strickland 1997) und Apoptose und neuronalen Zelltod zur Folge hat (Murphy et al. 1991). *tPA* Knock-out Mäuse sind hingegen resistent gegen diese Art der neuronalen Schädigung (Tsirka et al. 1995). Ausgedehnte Areale neuronaler Degeneration bilden sich nach Unterbrechung der Blutversorgung (Wang et al. 1998), wenn *tPA* aus externen Quellen substituiert wird. Die alleinige Verabreichung von exzitatorischen Toxinen, wie Kainsäure, die an der Kainat-induzierten neuronalen Degeneration beteiligt ist (Tsirka et al. 1996), in *tPA* Knock-outs ohne *tPA* ist jedoch nicht ausreichend, um den Zelltod der Neuronen zu induzieren (Tsirka et al. 1995). Das bedeutet, dass *tPA* eng mit dem Prozess der Exitotoxin vermittelten Zellschädigung assoziiert sein muss. Auch beim Menschen steht die neuronale Degeneration nach Anoxie in Verbindung mit einer Freisetzung von Glutamat (Meldrum & Garthwaite 1990). Diese Daten zeigen, dass *tPA* eine Rolle für die Balance zwischen synaptischer Remodellierung und dem Zelltod im ZNS spielt. Ein neuronaler spezifischer Proteaseinhibitor (Neuroserpin) ist offenbar für die Balance zwischen Lernprozessen und dem neuronal-zellulären Überleben von Bedeutung (Hastings et al. 1997). Interessanterweise zeigen aber jüngste Experimente, dass *tPA* auch nicht-proteolytische neuroprotektive Eigenschaften bei der durch oxidativen Stress vermittelten Zinktoxizität in kortikalen Neuronen besitzt (Kim et al. 1999). Bei entzündungsbedingten neuronalen Schädigungsprozessen wie der Multiplen Sklerose hingegen scheint andererseits die proteolytische Aktivität des *tPA* via Plasminogenaktivierung protektiv auf die beschädigten Neuronen, wie Experimente an Knock-out Modellen zeigen (Akkassoglou et al. 2000).

Während der Embryogenese und der neonatalen Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems korreliert die Aktivität des *tPA* Gens in bestimmten Gehirnregionen mit den Zonen aktiver zellulärer Migration, Geweberemodellierung und axonalem Wachstum (Theuring et al. 1995, Seeds et al. 1995, Calabresi et al. 2000, Wu et al. 2000) Die zentrale Funktion von *tPA* während der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems

legen besonders die Experimente mit transgenen Mäusen und Ratten nahe, in deren Keimbahn ein Reporterogen (β -Galaktosidase) unter Kontrolle des *tPA*-Promotors eingeführt wurde. Der Promotor stimuliert daraufhin die Expression des Reportergens vor allem in Derivaten der Neuralleiste während der Migration, den Spinalganglien, den *rami communicantes*, den sympathischen und parasympathischen Grenzsträngen und den peripheren Nerven (Theuring et al. 1995). Im erwachsenen Gehirn ist der Grad der *tPA* Expression im Verhältnis zum sich entwickelnden Embryo reduziert und ist hauptsächlich auf die distalen Regionen der wachsenden Nervenzapfen beschränkt, denen es die Progression durch das Gewebenetzwerk ermöglicht (Seeds et al 1995) - wahrscheinlich indem es wie im nicht-neuronalen Gewebe den Abbau von Matrixproteinen betreibt, der mit synaptischem Wachstum einhergeht. Die spezifische Funktion von *tPA* während der Entwicklung des Nervensystems ist nicht bekannt, aber es ist intuitiv plausibel, dass es eine wichtige Rolle bei der Bildung und der Elimination von Synapsen spielt.

Auch bei zwei neurodegenerativen Erkrankungen, nämlich beim Morbus Alzheimer und der Multiple Sklerose (MS), spielt *tPA* offenbar eine wichtige Rolle. Experimente haben in jüngster Zeit beispielsweise gezeigt, dass die *tPA*-Expression (mRNA und Protein) in Nervenzellen von MS-Patienten stark erhöht ist (Akenami et al. 1999), während die seines Inhibitors PAI-1 hingegen gleich bleibt. Im gesunden Gehirn hingegen ist *tPA* nur in geringen Mengen in Neuronen nachweisbar und dafür stärker im Bereich des Blutgefäßepithels. Seine postulierte schädigende Wirkung auf das Myelin der Nervenzellen entfaltet *tPA* wahrscheinlich über die Aktivierung von Plasmin, das ein vielfältiges Wirkungsspektrum besitzt (Akenami et al. 1999). Darüber hinaus hat *tPA* auch einen zytokinähnlichen Effekt auf Mikrogliazellen, die sich wie Makrophagen verhalten können und sich als solche durch *tPA* aktivieren lassen und ebenfalls an der Demyelinierung der Axone mitwirken können (Rogove 1999).

Beim Morbus Alzheimer wirken die aggregierten Amyloid- β -Peptide ($A\beta$ -Peptide) neurotoxisch. Kürzlich konnte in diesem Zusammenhang Plasmin als erste physiologisch relevante Protease identifiziert werden, die aggregierte $A\beta$ -Peptide abbauen kann. Es zeigte sich *in vitro* und *in vivo*, dass nur aggregierte, nicht aber freie $A\beta$ -Peptide *tPA* und uPA induzieren und dass via Plasminogenaktivierung jene aggregierten $A\beta$ -Peptide abgebaut werden, d. h. durch *tPA* aktiviertes Plasmin offenbar eine neuroprotektive Wirkung besitzt (Tucker et al. 2000). Interessanterweise wurde schon vorher entdeckt, dass die Inhibitoren

von *tPA*, nämlich PAI-1 und PAI-2, im Gehirn von Alzheimer Patienten verstärkt exprimiert werden und so möglicherweise dem neuroprotektiven Effekt von Plasmin entgegenwirken (Akiyama et al. 1993, Sutton et al 1994).

All diese Daten unterstreichen die Bedeutung von *tPA* im ZNS und fordern ein tiefergehendes Verständnis seiner Expressionskontrolle als fundamentalen Bestandteil der Genexpressionsregulation im ZNS. Im Licht der erst kürzlich weitgehend abgeschlossenen Sequenzierung des menschlichen Genoms (*Nature* 15. Feb. 2001 und *Science* 16. Feb. 2001) und der unerwartet niedrigen Anzahl von entdeckten Genen kann angenommen werden, dass die in den Genen kodierten Proteine sehr wahrscheinlich in Abhängigkeit vom vorherrschenden Zellkontext und der physiologischen Situation unterschiedliche Funktionen besitzen. Der Phänotyp ist demnach eher Ausdruck der Regulation der Genexpression als von Variationen der Strukturgene. Die Vorstellung, dass ein Protein immer nur eine Funktion ausübt und durch wenige Mediatoren reguliert wird, muss jetzt neu überdacht werden. In diesem Kontext ist eine detaillierte Untersuchung der Genexpression von *tPA* im ZNS von hohem Erkenntniswert.

6.3 Die biologische Rolle der Neurotrophine

Die Untersuchung der Biosynthese von *tPA* im ZNS muss auch die Rolle der Neurotrophine miteinschließen, die als die wichtigsten Zytokine im ZNS gelten.

Die bekannten Vertreter der Neurotrophine sind der Nerve Growth Factor (NGF), der brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und die Neurotrophine 3, 4/5 und 6 (NT-3 und NT-4/5 sowie NT-6), wobei NGF, BDNF und NT-3 von drei unterschiedlichen Genen kodiert werden und bis heute in allen höheren Wirbeltieren nachgewiesen wurden, während das Vorkommen von NT-4/5 und NT-6 in den einzelnen Spezies bisher nur unvollkommen erforscht ist. Sequenzanalysen der AS-Ketten der Neurotrophine sowie die Berücksichtigung der Entwicklung des Peripheren Nervensystems haben zu dem Schluss geführt, dass BDNF und NT-3 phylogenetisch deutlich älter als NGF sein dürften (Barde 1994), wobei Experimente mit AS-Substitutionen an strategischen Positionen nahe liegen, dass NT-3 selbst womöglich der Vorläufer aller Neurotrophine ist (Urfer et al. 1994).

Alle Neurotrophine weisen ähnliche biochemische Eigenschaften auf. Sie sind sekretorische Proteine und werden als sogenannte Vorläuferproteine in einer Umgebung synthetisiert, die für die Bildung der Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 1-4, 2-5, 3-6 in den gereiften Proteinen NGF und BDNF notwendig ist, welche sich im übrigen in allen Neurotrophinen an identischer Position befinden (Acklin et al. 1993). Trotz signifikant divergierender Vorläufersequenzen zeigen die prozessierten Neurotrophine einen hohen Grad an Sequenzhomologie, wobei ca. 50 % der Aminosäuren allen sechs Neurotrophinen gemein sind. Die erste Kristallstruktur konnte von einem NGF (12,500 kDa/Monomer) Dimer mit einer Auflösung von 2,3 Å gelöst werden (McDonald et al. 1991) und zeigt, dass das NGF Monomer aus drei antiparallelen β -Strängen besteht, die eine große flache Oberfläche schaffen, die im Dimer durch die korrespondierende Fläche des anderen Monomers bedeckt ist. Die meisten konservierten hydrophoben AS in allen Neurotrophinen sind interessanterweise in Positionen dieser hydrophoben Oberfläche lokalisiert, was die Vermutung nahe liegt, dass alle Neurotrophine eine ähnliche dreidimensionale Struktur aufweisen. Neben den vorkommenden Homodimeren können Neurotrophine auch stabile Heterodimere bilden, wie sich anhand von Experimenten mit BDNF und NT-3 gezeigt hat (Radziejewski et al. 1993, Arakawa et al. 1994, Jungbluth et al. 1994, Heymach et al. 1995, Robinson et al. 1995), bei denen die Heterodimerbildung durch wiederholtes Denaturieren/Renaturieren von Homodimerlösungen oder Koexpression in einer Zelle erreicht

werden konnte. BDNF/NT-3 Heterodimere zeigen die vereinigten biologischen Eigenschaften ihrer einzelnen Homodimer-Komponenten, wenn auch mit verminderter Potenz und das interessanterweise auch in neuronalen Zellen, die konstitutiv BDNF und NT-3 exprimieren (Jungbluth et al. 1994) Ob solche Heterodimere eine biologische Relevanz besitzen ist jedoch bis jetzt nicht klar.

6.4 Neurotrophinrezeptoren

Ihre Wirkung vermitteln alle Neurotrophine über zwei verschiedene Arten von transmembranen Glykoproteinen, nämlich der Familie der Tyrosinkinase Rezeptoren (Trk), an welche die Neurotrophine spezifisch und hochaffin binden und den Rezeptor p75^{NTR}, an den alle Neurotrophine mit niedriger Affinität binden (**Abb. 1.1**, Kaplan & Miller 1997). Demgemäss unterscheiden sich auch die Expressionsmuster dieser Rezeptoren insoweit, als dass jeder der verschiedenen Trk-Rezeptoren meist nur in bestimmten neuronalen Zelltypen exprimiert wird, der p75^{NTR}-Rezeptor hingegen in vielen neuronalen Zellen normalerweise mit den Trk-Rezeptoren co-exprimiert wird und darüber hinaus noch von einer Reihe nicht-neuronaler Zellen exprimiert wird. Die Trk-Rezeptoren werden im Zuge der Signalübertragung zunächst transphosphoryliert, binden dann den Neurotrophin-Liganden und lösen damit eine Phosphorylierungskaskade an zellulären Proteinen aus. Expressionsstudien in diversen Zelllinien haben gezeigt, dass TrkA als Rezeptor für NGF dient, TrkB für BDNF oder NT-4 und TrkC der Rezeptor für NT-3 ist, wobei NT-3 aber auch an TrkA und TrkB binden und mit deutlich geringerer Potenz signalaktiv werden kann (Kaplan & Miller 1997). Diese Erkenntnisse wurden nicht zuletzt durch Experimente mit Nullmutanten in den TrkA, TrkB und TrkC Genen in Mäusen gewonnen, die denselben Phänotyp zeigten, welche Nullmutanten der NGF-, BDNF- und NT-3 Genen in Mäusen zeigten.

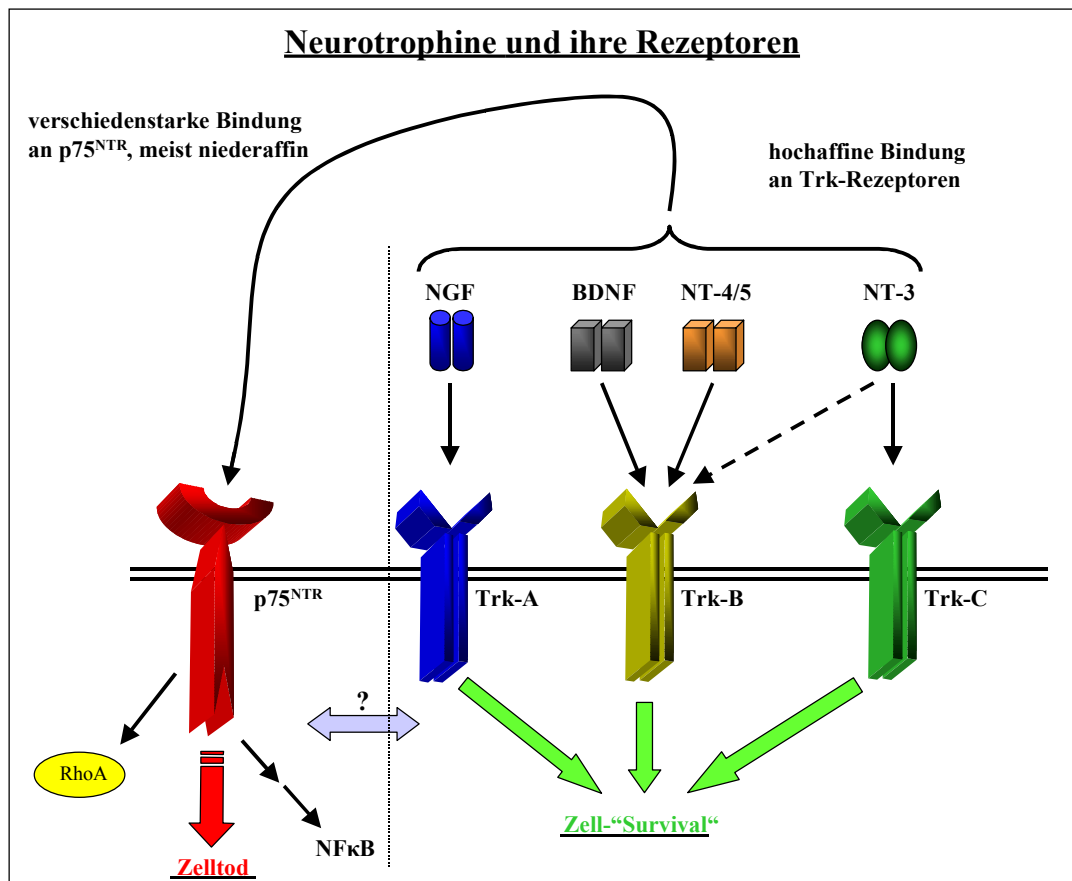


Abbildung 1.1: Neurotrophine und ihre Rezeptoren.

Die Funktionen des $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptors, an den alle Neurotrophine mit unterschiedlicher, wenn auch meist schwächerer, Affinität als an die Trk-Rezeptoren binden (Rodriguez-Tébar et al. 1990, Rodriguez-Tébar et al. 1992, Chao 1994, Dechant et al. 1997) und der ein Mitglied der TNF/Fas/CD40-Rezeptor Superfamilie ist (Itoh et al. 1991), sind hingegen diversifizierter und komplexer als die der Trk-Rezeptoren. *In vitro* Studien mit Neuronen von $p75^{\text{NTR}}$ -Nullmutanten und Studien mit Neurotrophinmutanten mit veränderter Bindungsaffinität zum $p75^{\text{NTR}}$ Rezeptor haben gezeigt, dass $p75^{\text{NTR}}$ die durch die Trk-Rezeptoren vermittelte, normale Zellantwort auf Neurotrophine selektiv verändert (Davies 1997). So führt $p75^{\text{NTR}}$ in TrkA exprimierenden Neuronen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber NGF während gleichzeitig deren Sensitivität gegenüber NT-3 herabgesetzt wird und spielt darüber hinaus eine Rolle in der Diskriminierung von Liganden beim TrkB-Rezeptor. Diese Effekte basieren zum Teil auf einer direkten Wechselwirkung der Rezeptoren miteinander (Kaplan & Miller 1997, Bibel et al. 1999) und es gibt Hinweise, dass der $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor den Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert und so für die verstärkte "Survival"-Antwort der Zelle auf NGF verantwortlich zeichnet (Hamanoue et al. 1999). Interessanter als die Verstärkung der trophischen Effekte von Neurotrophinen ist hingegen die Beobachtung, dass der $p75^{\text{NTR}}$ -

Rezeptor zur Apoptose von Neuronen und anderen Zelltypen führen kann (Itoh et al. 1991). Ligandenunabhängig ausgelöste Apoptose wurde in postnatalen Neuronen des dorsalen Ganglions und anderen Zelllinien *in vitro* beschrieben. Ferner wurde der Vorgang in propriozeptiven und sympathischen Neuronen, in Oligodendrozyten *in vitro* und in der sich entwickelnden Netzhaut und Rückenmark, den sympathischen Ganglienzellen und den cholinergischen basalen Vorderhirn-Nuklei *in vivo* beobachtet (Frade & Barde 1998 *Bioessays*, Rabizadeh et al. 1993, Bamji et al. 1998, Friedman & Grosman 1999, Frade & Barde 1998 *Neuron*, van der Zee et al. 1996). Neuere Untersuchungen in jüngster Zeit ergaben darüber hinaus aber auch erste Anzeichen dafür, dass p75^{NTR} bedeutend für die Steuerung des axonalen Wachstums ist und dass die molekulare Grundlage dafür höchstwahrscheinlich die direkte Interaktion der intrazellulären Domäne mit dem Protein RhoA ist (Yamashita et al. 1999). Als Mitglied der Ras-Superfamilie der GTP-bindenden Proteine ist RhoA schon in vergleichbarer Funktion in Fibroblasten bei der Bündelung von Actinfilamenten in Stressfasern sowie der Gruppierung von Integrinen und assoziierten Proteinen in fokalen Adhäsionskomplexen beschrieben (Mackay & Hall 1998).

6.5 Chromatin, Nukleosom und Histone: Kontrolle der Transkription *in vivo*

Aufgrund der Größe des menschlichen Genoms von ca. 3.5 Mrd. Basenpaaren und der sich daraus ergebenden linearen Länge, muss die DNA in den Zellkernen in hochorganisierte, dreidimensionale Form verpackt werden. Während der Metaphase der Mitose liegt sie daher in ihrer höchst kondensierten Form als Metaphasen-Chromosom und den größten Teil des restlichen Zellzyklus in Form der dichtgepackten, sogenannten 30 nm Chromatinfibrillen vor, die wiederum Schleifen entlang der Chromosomenhauptachse bilden (**Abb. 2.1**).

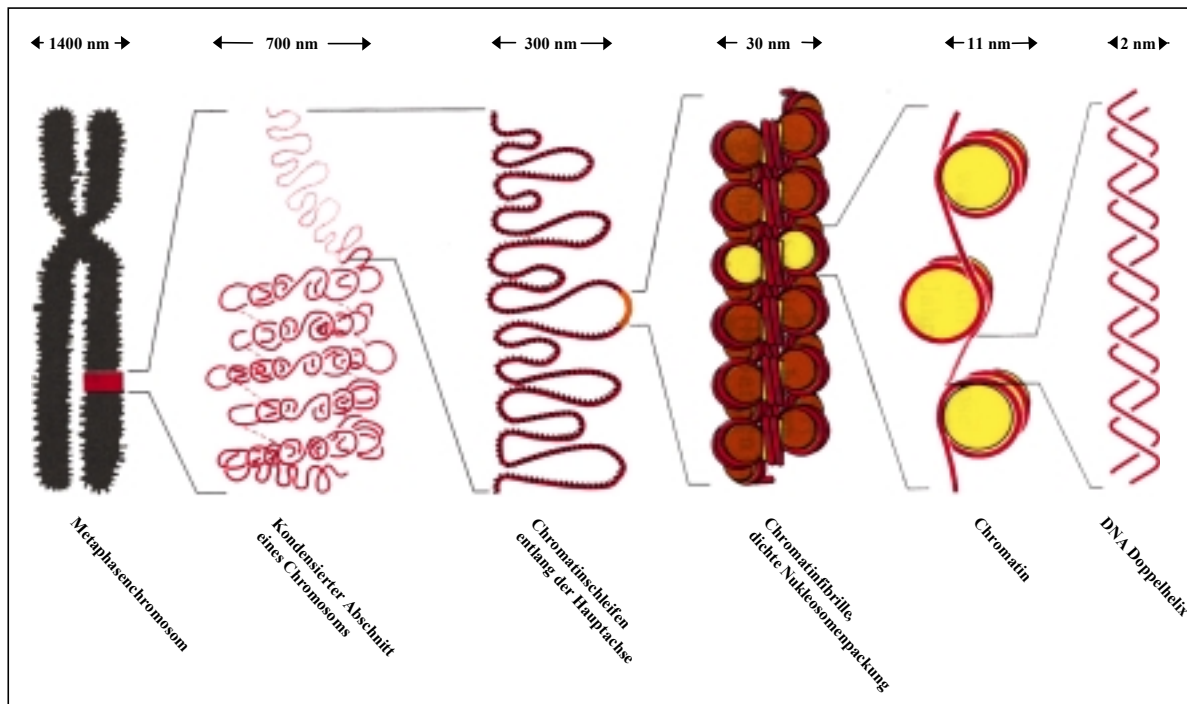


Abbildung 2.1: Packungszustände genomischer DNA.

Der Großteil des Chromatins in den Interphasenkernen liegt zu ca. 90 % als dichtgepacktes Euchromatin und zu 10 % als äußerst dicht gepacktes Heterochromatin vor und ist transkriptionell vollständig inaktiv. Nur etwa 10 % des Chromatins (genauer: 10 % des Euchromatins) verteilen sich auf transkriptionell aktive Bereiche, in denen die Chromatinstruktur aufgelockert ist und die 30nm Chromatinfibrillen sterisch relativ gut zugänglich für nicht chromosomale Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren sind. Die DNA ist im Chromatin in sogenannten Nukleosomen organisiert, in denen sie regelmäßig um die Histonkerne gewunden ist, wobei ca. 200 bp (146 bp davon bilden die Core-Region) etwa 1,8 Umdrehungen um einen Histonkern beschreiben, gefolgt von einer kurzen, etwa 30 bp langen Linker-Sequenz. Der Nukleosomenkern im Chromatin wird von einem Histonoktamer gebildet, das aus den Dimereinheiten $[H2A]_2$ und $[H2B]_2$ sowie dem $[H3H4]_2$ Tetramer besteht, welche dabei interessanterweise über die meisten eukariotischen Spezies hinweg hochkonserviert sind und damit einen deutlichen Hinweis auf ihre Bedeutung für die Zelle geben (Kornberg & Lorch 1999).

Aufgrund der dichten räumlichen Packung des Chromatins wird eine große Zahl von Protein-DNA Interaktionen verhindert. Als Resultat davon inhibiert die Chromatinstruktur zelluläre Prozesse, denen eine spezifische Protein-DNA Wechselwirkung zugrunde liegt, so z.B. der

Transkription von Genen. Das bedeutet, dass der Kontrolle der Chromatinstruktur hinsichtlich der Signaltransduktion zur Transkription von Genen sowohl in positiver als auch in negativen Sinn essentielle Bedeutung zukommt und aufgrund ihrer zeitlichen Präferenz im Transkriptionsprozess noch bedeutender ist als die Sequenzspezifität der Transkriptionsfaktoren. Zu Aktivierung der Transkription muss die Chromatinstruktur an den Promotoren der Gene und an beteiligten Regulatorsequenzen aktiv remoduliert werden, um die repressive Wirkung des normalen Chromatins zu überwinden. Auf der anderen Seite können aber auch repressive Chromatinstrukturen an regulatorischen Sequenzabschnitten etabliert werden, um eine sonst auftretende Transkription zu reprimieren (Review: Cheung , Allis & Sassone-Corsi 2000, **Abb. 2.2**).

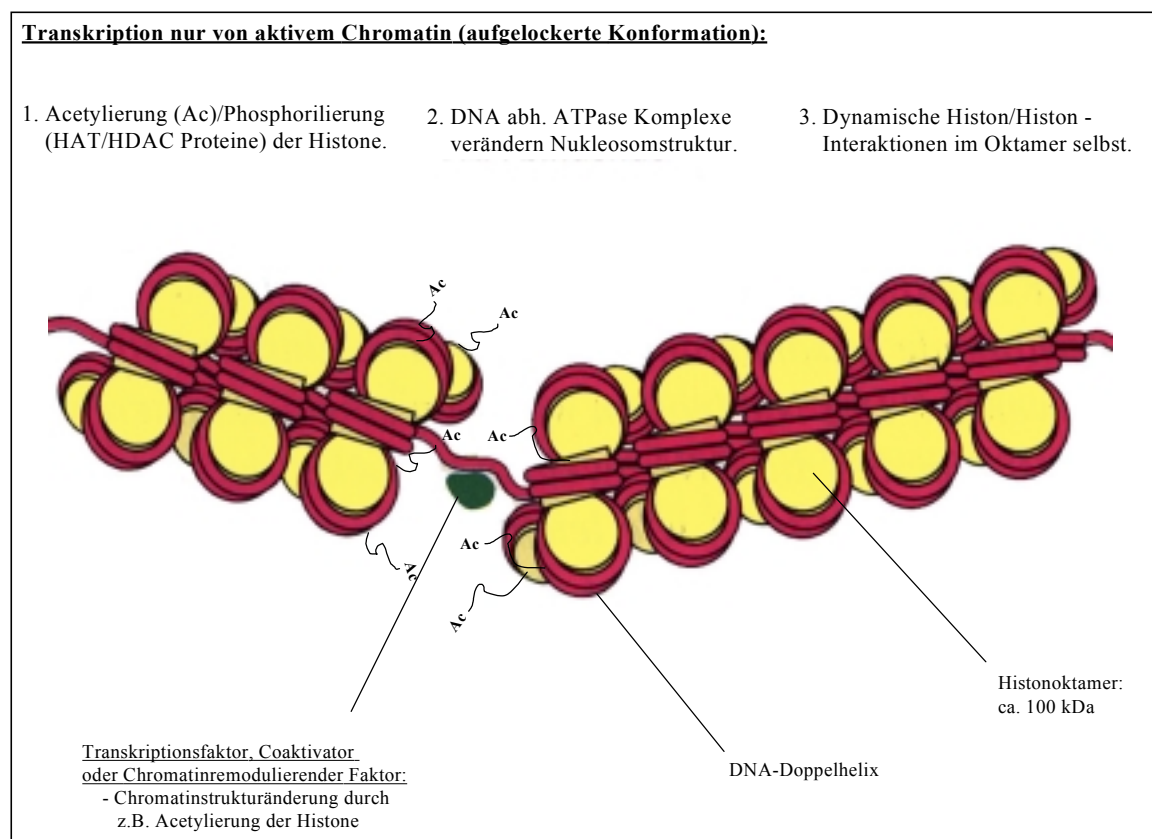


Abbildung 2.2: Transkriptionsfaktoren modifizieren die Chromatinstruktur und ermöglichen den Zugang zur DNA.

In den letzten beiden Jahren wurden zwei große Klassen von chromatinverändernden Faktoren identifiziert, nämlich die Histon-Modifizierenden-Enzyme und die ATP-abhängigen-Chromatinverändernden-Komplexe, die Schlüsselrollen bei der für die Transkription wichtigen Chromatinstrukturkontrolle spielen (Berlotserkovskaya & Berger 1999, Kingston et al. 1999, Kornberg et al. 1999, Maldonado et al. 1999, Strahl & Allis 2000,

Struhl 1999, Suka et al. 1998, Tsukiyama et al. 1997, Tyler et al. 1999, Wade & Wolffe 1999, Workman et al. 1998).

Unter den bis heute beschriebenen Histonmodifikationen wurde die Acetylierung der Arginin- und Lysinreste in den Histonproteinen am besten untersucht, weil sie eng mit aktiver Transkription korreliert. Die Acetylierung von Histonen wird nämlich generell in transkriptionell aktiven Regionen des Chromatins beobachtet und ihr Ausmaß wird durch die Histon-Acetyltransferaseaktivität (HAT) bzw. Histon-Deacetylaseaktivität (HDAC) verschiedener Proteine reguliert. Neben der Acetylierung wurde in jüngerer Zeit auch Phosphorylierung der Histone an verschiedenen Stellen beobachtet, die bis jetzt aber nur wenig untersucht wurde und in ihrer Bedeutung kaum verstanden ist (Mizzen et al. 1998, Struhl 1998, Grant & Berger 1999). Durch die Acetylierung verlieren die sonst positiv geladenen Lysin- und Argininreste ihre Ladung und die elektrostatischen Wechselwirkungen zur negativ geladenen DNA werden deutlich herabgesetzt, bei der Phosphorylierung werden sogar negativ geladene Gruppen eingeführt, was beides zu einer deutlichen Auflockerung der Chromatinstruktur führt und damit die räumliche Zugänglichkeit zur DNA stark erhöht. Ob darüber hinaus durch die Acetylierung gezielt weitere Proteine wie z. B. Co-Faktoren rekrutiert werden, ist zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Die Tatsache, dass viele der vorher beschriebenen Co-Aktivatoren und Co-Repressoren Acetyltransferase- oder Deacetylaseaktivität besitzen untermauert jedenfalls die Erkenntnis, dass die Regulierung der Chromatinstruktur essentiell wichtig für die Kontrolle der Transkription ist (Strahl & Allis 2000, Suka et al. 1998, Struhl 1998).

Zusätzlich zu den Histon-modifizierenden Enzymen haben biochemische und genetische Untersuchungen noch eine weitere Klasse von Proteinen identifiziert, die Einfluss auf die Chromatinstruktur nehmen. Es sind die ATP-abhängigen Chromatin-remodulierenden-Komplexe, die in einer großen Zahl von eukariotischen Organismen nachgewiesen wurden (Cairns 1998, Kadonaga 1998, Kingston & Narlika 1999, Peterson 1998). Sie werden gemäß der in ihnen gefundenen ATPase-Untereinheiten in drei Gruppe unterteilt: SWI/SNF, ISWI und CHD1. Sie alle besitzen eine ausgeprägte *in vitro* Aktivität und ihre genauen Funktionen *in vivo* werden zur Zeit intensiv erforscht. So scheinen beispielsweise die ISWI-Komplexe in *Drosophila* sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf die Transkription auszuüben und zudem essentiell wichtig für die Erhaltung der Integrität des männlichen X-Chromosoms zu sein (Deuring et al. 2000).

Ein ganz neuer, dritter Weg die Chromatinstruktur zu beeinflussen scheinen direkte Histon-Histon Wechselwirkungen im Histonoktamer selbst zu sein. So wurde bereits gezeigt, dass die Interaktionen der Histon-Dimer und –Tetramereinheiten untereinander kritisch für die Transkription sind und dass dem Tyrosinrest 98 im Histon H4 dabei eine Schlüsselfunktion zukommt. Eine Glyzinsubstitution (Y98G) zeigte nämlich einen letalen Phänotyp, während eine Histidinsubstitution an dieser Stelle (Y98H) noch schwach lebensfähig war (Santisteban et al. 1997). Bei all diesen Prozessen muss sich stets vor Augen gehalten werden, dass die Modifikationen an den Histonen und die damit verbundenen Veränderungen der Chromatinstruktur keinesfalls statische Vorgänge sind, sondern es sich um permanent ablaufende, dynamische Prozesse handelt, die ihre Wirkung im zellulären Kontext über einen zeitlichen Mittelwert entfalten. Es sind weniger „An/Aus“ Zustände, die betrachtet werden, sondern vielmehr „Mehr/Weniger“ Zustände, denn selbst bei Genen, die pro Zyklus nur wenige Male transkribiert werden, passiert dies in einer Zelle nicht auf einmal, sondern konstant auf niedrigem Niveau. Vor diesem Hintergrund ist es einleuchtend, dass jede Untersuchung zur Transkriptionskontrolle von Genen zwingend den *in vivo* vorhandenen Chromatinkontext berücksichtigen muss, um relevante Daten zu erhalten.

6.6 Die Kontrolle der Expression des *tPA* Gens

Humanes *tPA* gehört zu den Genen, die überwiegend (ca. 90 %) TATA-Box unabhängig transkribiert werden wobei das humane Gen im Gegensatz zur Maus und zur Ratte eine TATA-Box bei ca. –135 bp besitzt, von der jedoch nur ca. 10 % der mRNA transkribiert werden (Henderson & Sleight 1992, Smale et al. 1989, Carcamo et al. 1990, Beaupain et al. 1990, Killen et al. 1988). Bei allen Genen bildet eine hochkonservierte **DNA-Sequenz** den Transkriptionsstart (**A**):

Human <i>tPA</i>	:	G A G C T C A G A G C T G A G A T
Maus <i>tPA</i>	:	G g a g a C A G A G C T G c a g a
Ratte <i>tPA</i>	:	G g a g a C A G A G C T G c g g g
Ad IVa2	:	G t - C T C A G A G t g G t c c g
TdT	:	G c c C T C A t t c t g G A G A c
PBGD	:	G g G C T C A G t G t c c t G g T
COLLAGEN	:	G c G C T C A G g t C T c t G c g

Der Promotor des *tPA* Gens enthält oberhalb des Transkriptionsstarts eine Bindungsstelle für das „cyclic-AMP-responsive-element-binding-protein-1“ (CREB 1), welche bereits detailliert charakterisiert worden ist (Costa et al. 1996, Medcalf et al. 1990). *TPA* wurde als ein Ziel-Gen des Transkriptionsfaktors CREB 1 identifiziert (Huang et al. 1996, Qian et al. 1993), der auch für die mRNA und Proteinbiosynthese benötigende LTP notwendig (Qian et al. 1993) und am Auftreten von Suchtmittel-Entzugserscheinungen beteiligt ist (Maldonado et al. 1996). Dieser Zusammenhang ist von großer Bedeutung, weil CREB 1 für die Etablierung des Langzeitgedächtnisses verantwortlich ist und die beteiligte Signalkaskade in der Evolution sehr gut konserviert wurde (Frank et al. 1994). CREB 1 "knock-out" Mäuse zeigen selektive Beeinträchtigung der LTP (Bourtchuladze et al. 1994) und es ist wahrscheinlich, dass CREB 1 Gene steuert, die zur Gedächtnisbildung erforderlich sind.

Interessanterweise findet sich beim Menschen auf der CRE-ähnlichen Konsensussequenz von schwacher Bindungsaffinität zwischen -223 und -215 bp eine Punktmutation G→A in TGACGTCA, die für die deutlich verminderte Bindungsaffinität im Gegensatz zur perfekten Konsensussequenz der beiden Nagerspezies verantwortlich zeichnet (Holmberg et al. 1995). In unmittelbarer Nachbarschaft dazu liegt eine TAAT enthaltende Sequenz zwischen -210 und -199 bp, die für konstitutive und cAMP induzierte Transkription wichtig zu sein scheint und einen vermutlich neuartigen Faktor tPF-1 bindet (Leonardsson et al. 1997). Bis heute wurde der *tPA* Promotor bis zu -9.5 kb (stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt) untersucht. Dabei wurden die folgenden Bindungsstellen und transkriptionsrelevanten Erkenntnisse entdeckt und gewonnen (**Abb. 3.1**)

Es gibt zwei, für die basale Transkription essentielle, miteinander kooperierende DNA Elemente, namentlich eine CRE (cAMP responsive element)-ähnliche Konsensussequenz von schwacher Bindungsaffinität zwischen -223 und -215 bp und eine postulierte, der AP-2 (activation protein 2) Bindungsstelle homologe Sequenz zwischen -50 und -36 bp (Costa et al. 1996, Medcalf et al. 1990). Kurz oberhalb des Transkriptionsstarts finden sich zwei GC Boxen zwischen -86/-80 bp und -71/-39 bp, die jeweils eine SP-1 ähnliche Bindungsstelle enthalten. Ferner liegt ein NF-1 ähnliches Element zwischen -196 bp und -182 bp. Des Weiteren existiert ein sogenanntes RARE (retinoic acid response element) bei -7,3 kb (Bulens et al. 1995) und eine Enhancerregion zwischen -7,1 und -8,0 kb, die durch Steroidhormone wie Glucocorticoide, Progesteron, Androgene und Mineralcorticoide aktiviert wird (Bulens et al. 1997).

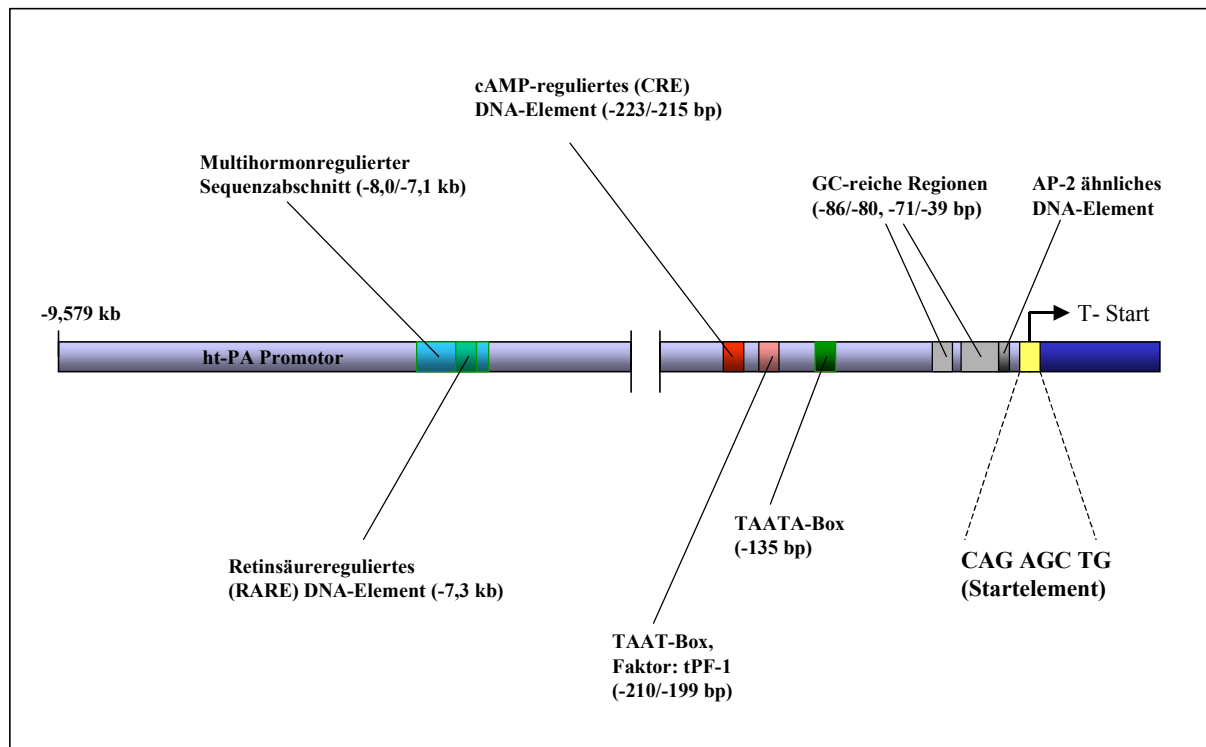


Abbildung 3.1: Postulierte regulatorische Elemente im *tPA*-Promotor.

Bis zum Beginn dieser Arbeit wurden noch keine Bindungsstellen, die für die konstitutive oder regulierte Expression von *tPA* im Nervensystem relevant ist gefunden. Wichtig zu erwähnen an dieser Stelle ist die Tatsache, dass alle bisher genannten regulatorischen, cis-ständigen DNA Elemente aufgrund von *in vitro* Experimenten gewonnen wurden, wobei die computergestützte Sequenzanalyse in Verbindung mit daraus konzipierten Reporterplasmiden in Transaktivierungsassays die Hauptquelle der Erkenntnisse bildeten. Kein einziges dieser Elemente konnte auf seine *in vivo* Funktionalität hin überprüft werden, was ihre Relevanz in letzter Konsequenz immer zweifelhaft erscheinen lässt.

6.7 Aufgabenstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es einerseits zu untersuchen, ob und wie die Neurotrophine als Mediatoren auf die Expressionskontrolle von *tPA* in neuronalen Zellen einwirken und zum anderen nach *in vivo* wirksamen, cis-regulatorischen DNA Elementen im *tPA*-Gen innerhalb von neuronalen Zellen zu suchen und diese zu charakterisieren.