

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mechanismen und (patho)physiologische Konsequenzen einer
sauerstoffabhängigen Regulation des TrkB-Neurotrophinrezeptorgens

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lina Sciesielski

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Holger Scholz
 2. Prof. Dr. med. Christof Dame
 3. Prof. Dr. med. Dörthe Katschinski

Datum der Promotion: 19.10.2009

Für meine Familie

Es gibt drei Wege, Wissen zu erwerben:
Erstens durch Nachdenken, das ist der edelste,
zweitens durch Nachahmen, das ist der leichteste,
und drittens durch Erfahrung, das ist der bitterste.

Konfuzius (551 - 478 v. Chr.)

Danksagung

Die Arbeiten zu dieser Dissertation sind im Labor von Prof. Dr. Holger Scholz in der Abteilung Zelluläre Entwicklungsphysiologie und Pathophysiologie am Institut für Vegetative Physiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin entstanden.

Bei Herrn Prof. Dr. Holger Scholz möchte ich mich neben dem interessanten Thema ganz herzlich dafür bedanken, dass er mich stets durch neue Herausforderungen gefordert und gefördert hat. Holger, du warst mir immer ein Vorbild für ordentliche wissenschaftliche Arbeit - eine Erfahrung, die ich in meiner Postdoktorandenzeit gerne weitergeben möchte!

Im Besonderen danke ich unseren beiden Postdoktorandinnen Dr. Karin Kirschner und Dr. Anja Bondke für die sehr gute Zusammenarbeit, für ihre Ausdauer bei der kritischen und konstruktiven Diskussion meiner Ideen und dafür, dass sie stets ihr Wissen und ihre Erfahrungen so bereitwillig mit mir geteilt haben. Es war eine wunderbare Erfahrung, mit euch zu arbeiten!

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, die mich durch ihre hilfreichen Taten und guten Ratschläge in meiner Arbeit unterstützt haben. Ein ganz großes Dankeschön gilt unseren beiden Labormitarbeiterinnen Angelika Richter und Inge Grätsch. Ihr habt dazu beigetragen, dass mir die Arbeit und das „Leben“ im Labor viel Freude bereitet haben – allen ein ganz herzliches Dankeschön!

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank auch meinem Mann und meiner Familie für ihr Vertrauen in mich, ihr Verständnis für meine ergebnisbedingten Launen und ihr ungebrochenes Interesse an dem, was ich tue. Ohne eure Unterstützung wäre ich nicht da, wo ich heute bin!

Zudem möchte ich mich bei meinen Kollegen Prof. Dr. Dörthe Katschinski und Prof. Dr. Roland Wenger bedanken, die mich durch stetes Nachfragen und Angebote ihrerseits immer wieder dazu ermuntert haben, mir Gedanken über meine Zukunft in der Wissenschaftswelt zu machen. Vielen Dank!

Ebenso danke ich Dr. Christina Warnecke, Dr. Alexander Paliege, Dr. Peter Martinka, Prof. Dr. Axel Fischer, Dr. Christina Nassenstein und PD Dr. Armin Braun für ihre Unterstützung bei technischen Problemen bzw. für die gute Zusammenarbeit im Rahmen von Kooperationen, auch wenn nicht alle Ergebnisse in die vorliegende Arbeit Eingang gefunden haben. Die vielen wertvollen Erfahrungen bleiben mir auf jeden Fall erhalten!

Prof. Dr. Roland Wenger und Dr. Alexander Schramm danke ich für die Zelllinien MEF $HIF-1\alpha^{+/+}$ bzw. $HIF-1\alpha^{-/-}$ und die SY5Y-hTrkB-FL, die mir in meiner praktischen Arbeit sehr geholfen haben. Vielen Dank!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Sauerstoffhomöostase und Hypoxie	8
1.1.1	Hypoxie-induzierbarer Faktor	8
1.1.2	Simulation hypoxischer Zustände	11
1.1.3	Hypoxie in Tumoren	12
1.1.4	Hypoxie und Entzündung	12
1.2	Neurotrophine und ihre Rezeptoren	13
1.3	Der TrkB-Rezeptor	14
1.3.1	Das <i>TrkB</i> -Gen	14
1.3.2	Die TrkB-Expression	16
1.3.3	TrkB und BDNF	16
2	Fragestellung	18
3	Material und Methoden	20
3.1	Zellkulturtechniken	20
3.1.1	Kultivierung und Konservierung der verwendeten Zelllinien	20
3.1.2	Zellkultur unter Hypoxie bzw. mit Hypoxiemimetika	21
3.1.3	Transiente Zelltransfektionen	21
3.1.4	Knockdown mittels RNA-Interferenz	22
3.1.5	Zellmigrationsassay	22
3.2	Molekularbiologische Methoden	23
3.2.1	RNA-Extraktion	23
3.2.2	Reverse Transkription	23
3.2.3	Konventionelle PCR und Oligonukleotidprimer	24
3.2.4	Real-time RT-PCR	26
3.2.5	Bestimmung der optischen Dichte: DNA, RNA und Proteine	27
3.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	27
3.2.7	<i>In situ</i> mRNA Hybridisierung	28
3.2.8	Klonierung der verwendeten Konstrukte	28
3.2.9	Plasmidpräparation und Kontrollverdau	30
3.2.10	Kontrolle der Plasmididentität, Glyzerinkulturen	31
3.2.11	Luziferase-Assay, β -Galaktosidase-Assay	31

3.2.12	Protein-Extraktion und -quantifizierung	32
3.2.13	SDS-PAGE, Westernblot und Antikörper.....	32
3.2.14	Immunzytochemie	34
3.2.15	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	34
3.2.16	Immunhistochemie	35
3.2.17	Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)	35
3.3	Tierexperimentelle Arbeiten	36
3.3.1	Systemische Hypoxie bei Ratten.....	36
3.3.2	Isometrische Kraftmessungen an isolierten Trachealsegmenten	37
3.4	Sequenzanalyse <i>in silico</i>	37
3.5	Statistik.....	38
3.6	Bezugsquellen	38
3.7	Puffer und Lösungen	39
4	Ergebnisse	42
4.1	Die TrkB-Expression unter Hypoxie <i>in vitro</i>	42
4.1.1	Sauerstoffabhängige Expression der Neurotrophinrezeptoren <i>in vitro</i>	42
4.1.2	Zellhintergrundeinfluss auf die sauerstoffabhängige Expression von <i>TrkB</i>	43
4.1.3	TrkB-Proteinexpression und -lokalisation unter Hypoxie	44
4.2	Regulationsmechanismus <i>in vitro</i>	45
4.2.1	Transfektionen mit <i>TrkB</i> -Promotorkonstrukten.....	45
4.2.2	HIF-1 α - und HIF-2 α -Knockdown mittels RNA-Interferenz.....	47
4.2.3	Regulation des <i>TrkB</i> -Promotors durch HIF-1 α	49
4.2.4	Lokalisation der HIF-Bindungsstellen im <i>TrkB</i> -Promotor.....	50
4.3	Auswirkungen der hypoxischen TrkB-Expression auf die Migration isolierter Neuroblastomzellen.....	52
4.4	Überprüfung der Relevanz der hypoxischen TrkB-Induktion <i>in vivo</i>	54
4.4.1	Expression der Neurotrophinrezeptoren unter Hypoxie <i>in vivo</i>	54
4.4.2	Gewebebeschränkung der Hypoxieeffekte <i>in vivo</i>	56
4.4.3	Regulation des Spleißvorgangs unter Hypoxie <i>in vivo</i>	56
4.4.4	Lokalisation der TrkB-Expression in der Rattenlunge.....	57
4.5	Auswirkungen der hypoxischen TrkB-Expression auf das kontraktile Verhalten isolierter Atemwegssegmente der Ratte.....	59
5	Diskussion	64
5.1	Hypoxische TrkB-Expression in Neuroblastomzellen <i>in vitro</i>	64

5.1.1	Expression der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren <i>in vitro</i>	64
5.1.2	Regulationsmechanismus	64
5.1.3	Auswirkungen der hypoxischen TrkB-Expression auf die Migration isolierter Neuroblastomzellen.....	65
5.2	Hypoxische TrkB-Expression in der Rattenlunge <i>in vivo</i>	68
5.2.1	Expression der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren <i>in vivo</i>	68
5.2.2	Auswirkungen der hypoxischen TrkB-Expression auf das kontraktile Verhalten isolierter Atemwegssegmente der Ratte.....	70
6	Zusammenfassung	73
7	Abkürzungsverzeichnis	75
8	Literaturverzeichnis.....	77
9	Lebenslauf und Publikationsliste	94
10	Erklärung.....	95

1 Einleitung

1.1 Sauerstoffhomöostase und Hypoxie

Molekularer Sauerstoff ist als Oxidans für die aerobe Energiegewinnung erforderlich und für die meisten vielzelligen Organismen lebensnotwendig. Wenn der Sauerstoffbedarf nicht durch ein adäquates Sauerstoffangebot gedeckt werden kann, droht eine Störung der mitochondrialen Atmungskette, in deren Folge sich eine lebensbedrohliche ATP-Depletion entwickeln kann. Bereits unter Normalsauerstoffbedingungen (Normoxie) herrscht in den verschiedenen Zellen und Geweben des Organismus ein unterschiedlicher Sauerstoffpartialdruck (pO_2), an den sich diese im Laufe der Evolution adaptiert haben. Bei variablen Umgebungsbedingungen, z.B. Höhengedächtnis, und einer sich stetig ändernden Gewebeoxygenierung, z.B. aufgrund regionaler Durchblutungsänderungen, stellt die Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase ein entscheidendes Lebenskriterium dar.

Daher wurden während der Evolution komplexe Systeme entwickelt, um eine bedarfsgerechte Aufnahme und Verteilung von Sauerstoff auch unter den Bedingungen eines reduzierten Sauerstoffangebotes (Hypoxie) sicher zu stellen. Im Rahmen dieser Hypoxieadaptation wird die anaerobe Energiegewinnung u.a. durch eine verbesserte Bereitstellung glykolytischer Substrate gesteigert und die Gewebeoxygenierung durch Vasodilatation, vermehrte Blutbildung (Hämatopoese), und Gefäßwachstum (Angiogenese) verbessert. Auch die Auswirkungen negativer Begleiteffekte der Hypoxie, wie z.B. die Azidose als Folge einer unter anaeroben Bedingungen vermehrten Laktatproduktion, werden durch Adaptationsmechanismen gemildert (1). Sofern diese Vorgänge eine Neusynthese von Proteinen erfordern, wird die damit verbundene Gentranskription häufig durch Sauerstoff selbst reguliert.

1.1.1 Hypoxie-induzierbarer Faktor

Der Hauptregulator dieser hypoxischen Genregulation ist der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF), der eine zentrale Rolle in (patho)physiologischen Reaktionen auf Hypoxie spielt (2). Er induziert die Transkription vieler Gene, die vor allem der Sauerstoffversorgung, dem Zellmetabolismus und dem Zellwachstum zugeordnet werden können

(Auswahl in Tab. 1.1). Zusätzlich ist HIF unabdingbar für die Embryonalentwicklung (3-5). Es wird angenommen, dass HIF mehr als zweihundert Gene transkriptionell kontrolliert, davon sind in Säugetieren bisher 70 bestätigt (1).

Tab. 1.1: Auswahl einiger durch HIF transkriptionell aktivierter Gene; verändert nach (6)

Sauerstoffversorgung	Zellmetabolismus
Ceruloplasmin (Eisen-Oxidase)	Aldolase A
Endothelin-1 (Gefäßdurchmesser)	Carboanhydrase IX (pH-Regulation)
Erythropoietin (Erythropoiese)	GAPDH
Globin-2 (Sauerstofftransport)	Glukosetransporter 1 und 3
Hämoxxygenase 1 (Gefäßdurchmesser, Angiogenese)	Hexokinase 1 und 2
Leptin (Metabolismus und Angiogenese)	Laktat-Dehydrogenase
Transferrin, Transferrin-Rezeptor (Eisen-Transport)	Phosphoglyzeratkinase
VEGF, VEGF-Rezeptoren 1/2 (Angiogenese)	Pyruvatkinase M
Zellwachstum	Andere
c-Met (Protoonkogen)	PHD2 und 3 (Sauerstoffmessung)
IGFBP-1 (Wachstumsfaktor-bindendes Protein)	MT1 (Matrixmetalloproteinase)

Der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor HIF ist ein $\alpha\beta$ -Heterodimer, das spezifisch mit der HIF-Bindungsstelle in *cis*-regulierten Hypoxie-responsiven Elementen (HREs) sauerstoffregulierter Gene interagiert. Es handelt sich dabei um einen basischen Helix-Loop-Helix(bHLH)/PER-ARNT-SIM(PAS)-Transkriptionsfaktor, dessen α -Untereinheit sauerstoffabhängig degradiert wird. Bisher sind drei HIF- α -Isoformen beschrieben: HIF-1 α , -2 α und -3 α . Unter Normoxie (21 % O₂) kommt es in der sauerstoffabhängigen Degradationsdomäne (ODD) des HIF-Proteins zur Hydroxylierung zweier Prolinreste durch sog. Prolyl-4-hydroxylasen (PHDs), woraufhin das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (pVHL) binden kann und die HIF- α -Untereinheit über Poly-Ubiquitylierung dem Abbau durch das Proteasom zuführt (Abb. 1.1). Die Halbwertszeit des zytoplasmatischen HIF α -Proteins beträgt bei Normoxie weniger als 5 Minuten. Für die Aktivität der PHDs sind die Substrate 2-Oxoglutarat und Sauerstoff sowie die Kofaktoren Eisen und Ascorbat notwendig. Unter Hypoxie ist unzureichend Sauerstoff für diese Hydroxylierungsreaktionen verfügbar, sodass HIF- α stabilisiert wird, in den Zellkern transloziert und dort mit der konstitutiv exprimierten HIF- β -Untereinheit über die Interaktion der HLH- und PAS-Domänen einen funktionellen DNA-Bindungskomplex bildet (Abb. 1.1). Dieser bindet dann spezifisch an die HIF-Erkennungssequenz 5'-RCGTG-3' und führt zur Transkription der entsprechenden Zielgene (1). Zusätzlich zum Abbau der α -Untereinheit kann die Transkriptionsaktivität von HIF durch Hydroxylierung eines

Asparaginrestes in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD-C) des HIF- α -Proteins blockiert werden, da dies die Rekrutierung der Transkriptionskofaktoren p300/CBP verhindert (Abb. 1.1). Diese Asparaginyhydroxylase wird als „Factor inhibiting HIF-1“ (FIH-1) bezeichnet und scheint die HIF-Aktivität vor allem bei starker Hypoxie zu regulieren (1).

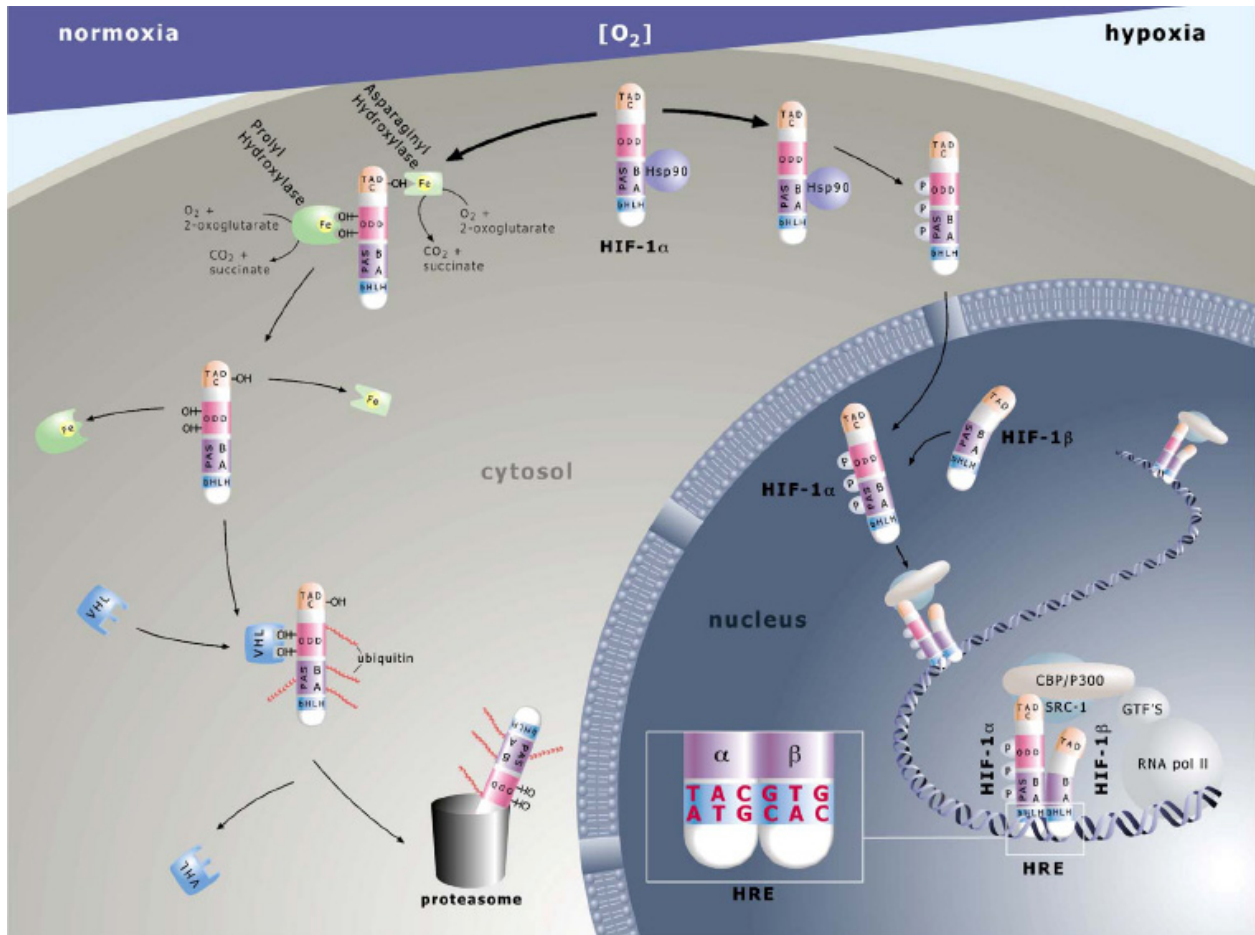


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Abbaus der HIF-1 α -Untereinheit unter Normoxie (links) bzw. ihrer Stabilisierung unter Hypoxie (rechts). Unter Normoxie wird HIF-1 α durch Prolylhydroxylasen hydroxyliert, durch den von Hippel-Lindau Faktor (VHL) markiert und nach Ubiquitinylierung durch das Proteasom abgebaut. Unter Hypoxie findet keine Hydroxylierung und damit kein Abbau statt und die stabilisierte HIF-1 α -Untereinheit kann im Zellkern mit der HIF- β -Untereinheit einen DNA-Bindungskomplex bilden und zur Transkription von Zielgenen führen; nach (1)

Bisher sind drei PHDs identifiziert worden: PHD1, PHD2 und PHD3. Da die von ihnen katalysierte Reaktion zur HIF-Abbaumarkierung sauerstoffabhängig ist, gelten sie als die eigentlichen Sauerstoffsensoren der Zelle. Dabei scheint PHD2 der Hauptregulator von HIF unter Normoxie zu sein, da der alleinige Knockdown von *PHD2* mittels RNA-Interferenz ausreichend ist, um HIF zu stabilisieren und HIF-Zielgene transkriptionell zu aktivieren. Dafür spricht auch, dass *PHD2*^(-/-)-Mäuse im Gegensatz zu *PHD1*^(-/-)- bzw. *PHD3*^(-/-)-Mäusen nicht lebensfähig sind. Die Expression von *PHD2* und *PHD3* wird unter Hypoxie durch HIF-1

transkriptionell aktiviert, wahrscheinlich, damit in Reoxygenierungsphasen das unter Hypoxie akkumulierte HIF-Protein schneller abgebaut werden kann (1).

Die verschiedenen HIF-Isoformen scheinen unterschiedliche Funktionen zu haben, da ihre Expressionsorte sich unterscheiden (7-9) und auch Knockouts von *HIF-1 α* bzw. *HIF-2 α* in der Maus keine überlappenden Phänotypen zeigen: Der Verlust von *HIF-1 α* resultiert im Entwicklungsstopp ab E8,5 und Tod der Embryos an E11. *HIF-1 α ^(-/-)*-Mäuse weisen Neuralrohrdefekte, kardiovaskuläre Fehlbildungen, eine reduzierte Anzahl von Ursegmenten, ein völliges Fehlen der Schädelvaskularisation mit ausgeprägtem Zelltod im Schädelmesenchym und eine deutliche Gewebhypoxie auf (3;4). Mäuse, denen *HIF-2 α* fehlt, sterben zwischen E9,5 und E13,5. Sie entwickeln durch Vaskulogenese normale Blutgefäße, bilden jedoch keinen funktionellen Blutkreislauf aus. Wahrscheinlich spielt *HIF-2 α* also beim Umbau des ersten vaskulären Netzwerks eine Rolle (5). Auch sind in *HIF-2 α ^(-/-)*-Mäusen die fötale Lungenreifung und postnatal die Surfactant-Produktion durch die Pneumozyten Typ II gestört, wahrscheinlich in Folge fehlender VEGF-Stimulation durch *HIF-2 α* . In einem konditionellen *HIF-2 α* -Knockout bei der Maus wurde auch gefunden, dass die Erythropoietin-Produktion *HIF-2 α* -abhängig reguliert ist (10). Diese Daten belegen die essentielle Rolle der HIF-Isoformen im Rahmen der embryonalen Entwicklung, in der Hypoxie als Stimulus eine entscheidende Rolle spielt.

1.1.2 Simulation hypoxischer Zustände

Es gibt mehrere Möglichkeiten, hypoxische Zustände im Experiment künstlich zu erzeugen. Zum einen kann der pO_2 in einem speziellen Hypoxieinkubator/-zelt gesenkt werden. Das funktioniert normobar durch ein Luftgemisch, in dem ein Teil des Sauerstoffs durch Stickstoff ersetzt wird, oder hypobar durch Erniedrigung des Luftdrucks wie es auch in großer Höhe geschieht. Im intakten Organismus ist es möglich, die Bindung von Sauerstoff an das Hämoglobinmolekül durch Kohlenstoffmonoxid zu blockieren, die Sauerstofftransportkapazität durch künstlich erzeugte Anämie zu verringern oder ein Gewebe unzureichend zu durchbluten, was eine ischämische Hypoxie hervorruft.

In Kenntnis der Regulation der HIF-Stabilisierung und -Transaktivierung (s. Abb. 1.1) können sog. Hypoxiemimetika dazu eingesetzt werden, auch unter Normoxie hypoxieartige Effekte auszulösen. So kann der Abbau von HIF u.a. durch PHD-Inhibitoren verhindert werden, zu denen die Eisenchelatoren 2,2'-Dipyridyl (DP) und Desferrioxamin gehören (1;11). Sie wirken, indem sie das Fe^{2+} aus dem aktiven Zentrum der Prolylhydroxylasen verdrängen. Auf demselben

Wege wirkt auch Co^{2+} hemmend auf die Prolylhydroxylaseaktivität. Das bekannteste Hypoxiemimetikum dieser Gruppe ist CoCl_2 (12;13). Die Transkription HIF-regulierter Gene unter Normoxie kann ebenso durch Inhibition der Asparaginyhydroxylase gefördert werden. Dimethyloxylglycin (DMOG) ist z.B. ein 2-Oxoglutarat-Analogon, das sowohl die Prolyl- als auch die Asparaginyhydroxylasen kompetitiv hemmt (14).

1.1.3 Hypoxie in Tumoren

In Tumoren kommt es oft zu lokaler Hypoxie, da bei unzureichender Tumolvaskularisierung der Sauerstoffbedarf das Sauerstoffangebot aufgrund der hohen Zellproliferation übersteigen kann. Hypoxie scheint dabei ein Marker für Tumoraggressivität zu sein, da die Wahrscheinlichkeit, dass stark hypoxische Tumore metastasieren und zum Tode führen, erhöht ist (15). Dies scheint vor allem durch HIF vermittelt zu sein, da der Verlust von *HIF-1 α* in embryonalen Stammzellen das Wachstum solider Tumore signifikant reduziert, wahrscheinlich, da weniger VEGF gebildet wird (4). Eine HIF- α -Stabilisierung, die für die Bildung des HIF-Heterodimers und damit die Transkription von Zielgenen notwendig ist, wird in ungefähr der Hälfte aller malignen, soliden Tumore beobachtet, meist in perinekrotischen Gebieten (16). Zusätzlich zum erhöhten Sauerstoffverbrauch durch schnell proliferierende Zellen, was in Tumorphoxie und HIF-Aktivierung resultiert, gibt es Hinweise auf direkte Zusammenhänge zwischen Proliferation und verstärkter HIF-Antwort. So wurde beschrieben, dass die Aktivierung von einigen Onkogenen, der Verlust von Tumorsuppressorfunktionen und die Exposition gegenüber verschiedenen Wachstumsfaktoren im Rahmen einer sonst erhaltenen hypoxischen Antwort die HIF-Aktivität unter Normoxie und Hypoxie erhöhen können (16). Auch eine Rolle hypoxieregulierter miRNAs in der Tumorentwicklung wird diskutiert (Übersicht in (17)). Zusätzlich zu eventuell auftretender HIF-Aktivierung sind ischämische Gebiete gegenüber üblichen Therapien geschützt, da sie eine geringere Dosis der systemisch verabreichten Chemotherapeutika erreicht und sie aufgrund verminderter Sauerstoffradikalproduktion strahlenresistenter sind (16).

1.1.4 Hypoxie und Entzündung

Hypoxie im Rahmen von Entzündungen hat zwei Hauptursachen: Zum einen hat ein entzündetes Gewebe durch die infiltrierenden Immunzellen sowie die entzündeten Gewebszellen vor Ort eine erhöhte metabolische Aktivität, was in erhöhtem Sauerstoffbedarf resultiert. Zum anderen kann eine starke Entzündung zu Stenosen und Mikrothromben der Blutgefäße führen, sodass die

entzündete Region weniger gut durchblutet und entsprechend schlechter mit Sauerstoff versorgt wird (18). Zudem gehen Entzündungen oft mit Ödem einher, das durch die Ansammlung von Wasser im Interstitium die Diffusionsstrecke zwischen den zu versorgenden Zellen und dem Blutgefäß erhöht und damit die Sauerstoffdiffusion verschlechtert. All diese Faktoren führen in der Mikroumgebung der entzündeten Gewebe zu niedrigen Sauerstoff- und Glukoseniveaus und hohen Niveaus an inflammatorischen Zytokinen, ROS, NO und Stickstoffmetaboliten (19).

In Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems wird HIF-1 sogar unter Normoxie induziert. Es wird angenommen, dass diese HIF-Induktion die Zellen darauf vorbereitet, in hypoxisches und entzündetes Gewebe zu migrieren und dort zu funktionieren. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 wird neben der posttranslationalen Abbaumarkierung durch PHDs unter Normoxie auch unter vielen inflammatorischen Bedingungen transkriptionell, translational und posttranslational reguliert: positiv u.a. durch bakterielle und virale Bestandteile, Mikrotubuli-Zerstörung, IL-1 β , TNF α , HGF, IL-18, ROS, NO, Wasserstoffperoxid (18;19) und negativ durch die miRNA 155 (20). Die Wechselwirkungen zwischen der hypoxischen HIF-1-Induktion und anderen durch Entzündung aktivierten Signalwegen (z.B. NF- κ B) gewährleisten eine Zelltyp-spezifische und Stimulus-adäquate Zellantwort (19).

1.2 Neurotrophine und ihre Rezeptoren

Neurotrophine sind Wirbeltier-spezifische Wachstumsfaktoren, die vor allem auf Nervenzellen wirken. Während der Entwicklung regulieren sie das Überleben und die Differenzierung von Neuronen und kontrollieren die chemotrophe Ausrichtung von Neuriten *in vivo* (21). Im reifen Nervensystem sind sie die Hauptkandidaten für die Regulation höherer Hirnfunktion, indem sie die neuronale Plastizität beeinflussen. Auf zellulärer Ebene sind die Wirkungen von Neurotrophinen sehr vielseitig, zelltypspezifisch und erscheinen nicht selten paradox: Neurotrophine können Zellen dazu veranlassen, zu proliferieren oder den Zellzyklus zu verlassen, zu wachsen oder zu schrumpfen, und sie können Zellen vor Apoptose schützen oder diese induzieren (21). Sie bilden eine Familie von zumeist basischen Polypeptiden mit ca. 13 kDa, die zur biologisch aktiven Form dimerisieren. Zu den Neurotrophinen zählen der Nerve Growth Factor (NGF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT3) und Neurotrophin-4/5 (NT4/5). Diese vermitteln ihre Wirkung durch Bindung zweier verschiedener Klassen von Zelloberflächenrezeptoren: Die zur Tropomyosin-verwandten Tyrosinkinase(Trk)-

Rezeptorklasse gehörenden Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC binden selektiv NGF, BDNF bzw. NT4/5 und NT3 (s. Abb. 1.2). Zusätzlich können alle Neurotrophine mit einem weniger affinen Neurotrophinrezeptor interagieren: $p75^{\text{NTR}}$, der zur Familie der TNF-Rezeptoren gehört (22). Die Rezeptoren besitzen eine intrazelluläre Tyrosinkinase, die durch Bindung von Neurotrophinen aktiviert wird und hoch konserviert ist. Die Rezeptoren unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer extrazellulären Domäne, die auch ihre Ligandenspezifität ausmacht (22).

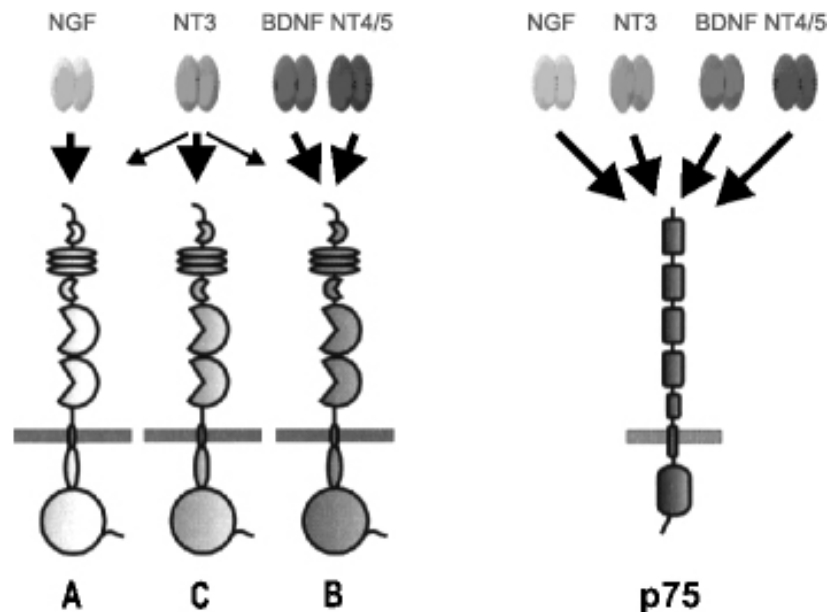


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der transmembranen Neurotrophinrezeptoren TrkA, B und C bzw. $p75^{\text{NTR}}$ mit den jeweils spezifisch bindenden Neurotrophinen NGF, NT3, BDNF und NT4/5. Die Proteinstruktur der Rezeptoren ist schematisch dargestellt. Bei den Trk-Rezeptoren rahmen extrazellulär zwei Cysteincluster (kleine Halbmonde) drei Leucin-reiche Tandemrepeats (Scheibchen) ein, an die sich zwei Ig-ähnliche Neurotrophin-Bindungsregionen (große Halbmonde) anschließen, intrazellulär wird das Neurotrophinsignal über eine Tyrosinasedomäne (Kugel) vermittelt. Der $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor besitzt vier extrazelluläre Cystein-reiche Domänen (Zylinder), an denen die Neurotrophininteraktion stattfindet und eine intrazelluläre Domäne (eckiges Oval), die der Todesdomäne von einigen Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Familie ähnelt; nach (22)

1.3 Der TrkB-Rezeptor

1.3.1 Das *TrkB*-Gen

Das humane *TrkB*-Gen auf Chromosom 9 überspannt 590 kbp, besitzt 24 Exons und kodiert für mehrere Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen (23). Zwei dieser Varianten

besitzen dieselbe extrazelluläre Domäne; die eine ist jedoch um die Tyrosinkinasedomäne verkürzt („trunkiert“) und nur 95 kDa statt 145 kDa groß (s. Abb. 1.3).

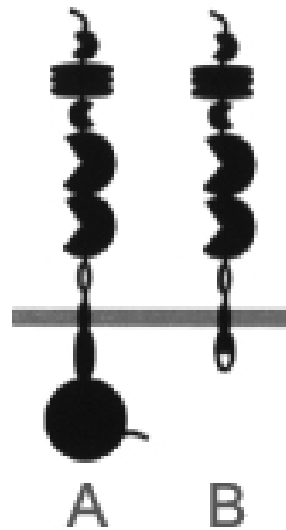


Abb. 1.3: Schema des katalytisch aktiven Tyrosinkinase-Rezeptors TrkB-FL (A) und der um die Tyrosinkinasedomäne verkürzten Rezeptorisoform TrkB-T1 (B), nach (22)

Die komplexen Wechselwirkungen der TrkB-FL(full length)- und der TrkB-T1(truncated)-Isoform sind noch nicht vollständig aufgeklärt, obwohl allgemein akzeptiert ist, dass TrkB-T1 als dominant negativer Inhibitor von TrkB-FL wirken kann (22). Ob die Inhibition der Neurotrophinsignalkaskade jedoch durch eine Bindung des Liganden durch den trunkierten Rezeptor oder durch eine Behinderung der Dimerisierung und Autophosphorylierung von TrkB-FL funktioniert, ist noch unklar (24). Allerdings wurde gezeigt, dass TrkB-T1 BDNF binden und durch Internalisierung aus dem Extrazellulärraum entfernen kann (25). Zudem vermindert eine Überexpression von TrkB-T1 *in vivo* die Signalweiterleitung nach BDNF-Stimulation (26). Kürzlich wurde beschrieben, dass die Kalziumfreisetzung in TrkB-FL-defizienten Gliazellen über TrkB-T1 reguliert wird. Die trunkierte Isoform kann also auch unabhängig von der Koexpression der TrkB-FL-Isoform eigenständige Wirkungen entfalten (27).

In der Maus sind zwei unterschiedliche Promotoren für das *TrkB*-Gen beschrieben, die 0,5 kbp bzw. 1,8 kbp aufwärts von der Translationsstartstelle liegen. Es besteht offenbar keine Präferenz für die Herstellung der TrkB-FL- bzw. TrkB-T1-Isoform durch einen der beiden Promotoren. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer 5'UTR, sodass sie die TrkB-Expression eventuell über die Translationseffizienz aufgrund unterschiedlicher Leadersequenzen beeinflussen (28).

1.3.2 Die TrkB-Expression

Der TrkB-Rezeptor wird im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert: in der Hirnrinde, im Hippocampus, im *Gyrus dentatus*, in Purkinje- und granulären Neuronen des Kleinhirns (29) sowie den Hinterwurzelganglien und dem Rückenmark (30). Der TrkB-Rezeptor wird auch in nicht-neuronalen Geweben exprimiert: im Herz und Gefäßsystem (31), der Lunge (32), den Nieren, der Bauchspeicheldrüse, dem Skelettmuskel (23) und den Eierstöcken (33). Dabei wird angenommen, dass die BDNF-Menge die TrkB-Expression reguliert, da geringere Dosen an BDNF diese erhöhen und höhere Dosen sie verringern (34).

1.3.3 TrkB und BDNF

Der biologische Effekt von BDNF wird über die Rezeptortyrosinkinase TrkB an der Zytoplasmamembran vermittelt. Die Bindung von BDNF führt zur Dimerisierung von TrkB-Proteinen und zur Autophosphorylierung mehrerer Tyrosinreste. Die Phosphotyrosinreste von TrkB rekrutieren Effektorproteine und wirken über Schlüsselsignalwege auf die Gentranskription. Dazu gehören die Signalwege PLC- γ 1/IP3/Ca²⁺ bzw. PLC- γ 1/DAG/PKC, Ras/MAPK und PI3K/Akt, die hauptsächlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie CREB und Elk-1 führen (35).

BDNF und der zugehörige Rezeptor TrkB spielen in vielfältigen biologischen Prozessen eine Rolle. So sind sie u.a. notwendig für Wachstum, Differenzierung, Adhäsion, Beweglichkeit, Tod bzw. Überleben und Plastizität zentraler und peripherer Neurone (36). Sie tragen zum Erwerb der Ovarialfunktion bei (33) und können Angiogenese vermitteln (37). Aus ihrem Einfluss auf die neuronale Plastizität ergibt sich auch eine Rolle in den damit verbundenen Erinnerungsprozessen (38), dem Altern und einigen neurologisch-psychiatrischen Erkrankungen wie Alzheimer (39) und Schizophrenie (40).

TrkB und BDNF sind außerdem essentiell für die embryonale und perinatale Entwicklung. So erscheinen *TrkB*^(-/-)-Knockout-Mäuse äußerlich normal, sterben aber kurz nach Geburt (<48 h), da sie aufgrund eines fehlenden Saugreflexes keine Nahrung aufnehmen können. Das liegt wahrscheinlich an der Reduktion der Neuronen im motorischen Fazialiskern (-60 %) und im Trigeminus-Ganglion, was die Mäuse berührungsunempfindlich macht. Dazu trägt wohl auch eine 30 %-ige Reduktion der Neuronen des Hinterwurzelganglions bei. *BDNF*^(-/-)-Knockout-Mäuse hingegen überleben meist ca. zwei Wochen, zeigen aber im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern ein verringertes Wachstum und anormales Verhalten („spinning“, „circling“). Ihnen fehlen ähnlich viele Hinterwurzelganglien wie den *TrkB*^(-/-)-Mäusen, was den Schluss

zulässt, dass es sich bei BDNF wahrscheinlich um den Hauptliganden für den TrkB-Rezeptor handelt. Schließlich sollte ein Doppelknockout von $BDNF^{(-/-)}$ und $NT4/5^{(-/-)}$ denselben Phänotyp zeigen wie $TrkB^{(-/-)}$. NT-4/5 spielt aber wahrscheinlich in der Entwicklung der Motoneuronen des Gesichts bzw. Rückenmarks eine Rolle, da diese in $BDNF^{(-/-)}$ im Gegensatz zu $TrkB^{(-/-)}$ normal entwickelt sind (41). Bei den $BDNF^{(-/-)}$ zeigt sich auch eine im Vergleich zum Wildtyp um ca. 25 % gesenkte Atemfrequenz (42), was durch das Fehlen von BDNF im Prä-Bötzinger-Komplex, dem Ort der zentralen Rhythmusgeneration der Atmung, zu erklären ist (43). Sowohl $BDNF$ als auch $TrkB$ werden im sich entwickelnden Herzen exprimiert (31;44;45) und scheinen dort für die korrekte Herzentwicklung essentiell zu sein, da $BDNF^{(-/-)}$ -Mäuse defekte Vorhofsepten und intramyokardiale Blutungen zeigen (44) und $TrkB^{(-/-)}$ -Mäuse eine geringere Gefäßdichte im Subepikardium und eine gestörte Vaskularisierung aufweisen (31).

2 Fragestellung

Der TrkB/BDNF-Signalweg ist nicht nur für die Entwicklung und Integrität des Nerven- (36) und Herzkreislaufsystems (31;44) wichtig, sondern spielt auch eine Rolle beim Wachstum bestimmter maligner Tumoren. Neuroblastome, die aus Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems hervorgehen, gehören zu den häufigsten pädiatrischen Tumoren (Übersicht in (46)). Interessanterweise werden TrkB und seine Liganden BDNF und NT-4/5 in aggressiven Neuroblastomen mit ungünstiger Prognose stark exprimiert (47;48). Entsprechend kann eine Aktivierung des TrkB/BDNF-Signalwegs die Invasivität von Tumorzellen verstärken (47;49) und diese vor Chemotherapie-induzierter Apoptose schützen (50-52). Da TrkB ein relevantes Ziel der Anti-Tumortherapie werden könnte (53), ist es wünschenswert, detailliertes Wissen über die Mechanismen zu erlangen, die die TrkB-Expression in Neuroblastomzellen kontrollieren.

Lokale Hypoxie durch ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffversorgung und -verbrauch von Tumorzellen ist eine häufige Situation in Neuroblastomen und anderen Malignomen (Übersicht in (54)). Neuere Untersuchungen dokumentieren, dass Tumorphypoxie nicht nur das Gefäßwachstum stimuliert, sondern auch die Genexpression von Neuroblastomzellen zu einem unreiferen und aggressiveren Phänotyp hin verändern kann (Übersicht in (55)). Die dieser hypoxieinduzierten Dedifferenzierung von Neuroblastomzellen zu Grunde liegenden, molekularen Mechanismen sind bisher kaum verstanden.

Zudem ist gezeigt worden, dass die Expression von TrkB nach ischämischer Hirnverletzung bei der Ratte ansteigt (56). Dieser und weitere Befunde (31) deuten darauf hin, dass Hypoxie möglicherweise die TrkB-Expression stimuliert. Die Sequenzanalyse ergab eine Häufung von zwölf putativen Bindungsstellen für HIF-Transkriptionsfaktoren im *TrkB*-Promotor.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb als übergeordnetes Ziel die Frage geklärt werden, ob das *TrkB*-Gen sauerstoffabhängig reguliert ist. Dazu wurden folgende Teilziele definiert:

Teilziel 1

Zunächst sollte in verschiedenen neuronalen und nicht-neuronalen Zelllinien untersucht werden, ob die TrkB-Expression sauerstoffabhängig reguliert ist. Dazu wurden TrkB-mRNA und -Protein nach Inkubation der Zellen bei 21 bzw. 1 % O₂ vergleichend quantifiziert.

Teilziel 2

Anschließend sollte der für die sauerstoffabhängige TrkB-Expression verantwortliche molekulare Mechanismus identifiziert werden. Dazu wurde der *TrkB*-Promotor in einen Luziferase-Expressionsvektor kloniert und transient in eine Zelllinie transfiziert, um eine hypoxieabhängige Stimulation des *TrkB*-Promotors nachzuweisen. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Rolle hypoxieabhängiger Transkriptionsfaktoren (HIFs) gelegt. Daher erfolgten ein siRNA-Knockdown der beiden HIF- α -Isoformen und anschließend die transiente Transfektion des *TrkB*-Promotorkonstrukts in eine HIF-1 α -defiziente Zelllinie.

Teilziel 3

Danach sollte die Bedeutung von sauerstoffabhängig exprimiertem TrkB für das Verhalten von Neuroblastomzellen untersucht werden. Dazu wurden u.a. Migrationsassays mit normoxisch bzw. hypoxisch präinkubierten Zellen durchgeführt.

Teilziel 4

Anschließend sollte eine eventuelle Relevanz der hypoxieinduzierten TrkB-Expression in verschiedenen Geweben *in vivo* untersucht werden, indem Ratten für 6 h bei 8 % O₂ inspiratorischer Sauerstoffkonzentration bzw. bei Raumluft (21 % O₂) exponiert wurden. In den verschiedenen Organen wurden TrkB-mRNA und -Protein nach systemischer Hypoxie quantifiziert und die Lokalisation der TrkB-Expression mittels *in situ* mRNA-Hybridisierung und Immunhistochemie identifiziert.

Teilziel 5

Abschließend sollte eine Charakterisierung der funktionellen Bedeutung einer hypoxievermittelten TrkB-Expression *in vivo* erfolgen. Dazu wurden myographische Untersuchungen der Acetylcholin-induzierten Kontraktion isolierter Atemwegssegmente der normoxischen bzw. hypoxischen Ratte durchgeführt.

3 Material und Methoden

Die folgenden Methoden wurden in einem molekularbiologischen Labor der Sicherheitsstufe S1 mit der dafür üblichen Ausstattung durchgeführt. Es wurden ausschließlich Chemikalien mit analytischem Reinheitsgrad bzw. für die Zellkultur geeignete Substanzen verwendet. Die Bezugsquellen der verwendeten Produkte sind in Kap. 3.6 und die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen in Kap. 3.7 zu finden.

3.1 Zellkulturtechniken

3.1.1 Kultivierung und Konservierung der verwendeten Zelllinien

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien (Tab. 3.1) stammten von der American Type Culture Collection, der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen oder wurden uns von Kollegen zur Verfügung gestellt. Die Abwesenheit von kontaminierenden Mykoplasmen wurde regelmäßig durch einen PCR-basierten Test (VenorGeM[®], Minerva Biolabs) kontrolliert.

Tab. 3.1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
HEK293	DSMZ
U2OS	ATCC
Kelly	DSMZ
SH-SY5Y	DSMZ
MEF <i>HIF-1α</i> ^(+/+) bzw. ^(-/-)	Prof. Roland Wenger, Institut für Physiologie, Universität Zürich, Schweiz
SY5Y-hTrkB-FL	Dr. Alexander Schramm, Universitätsklinik Essen

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ (Inkubator CB150, Binder) auf Kunststoffzellkulturschalen (TPP) kultiviert. Die humanen embryonalen Nierenzellen HEK293, die humanen Osteosarkomzellen U2OS und die embryonalen Maus-fibroblasten MEF wurden in DMEM („high glucose“, PAA Laboratories) mit 10 % FKS (Biochrom), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (PAA Laboratories) kultiviert. Die humanen Neuroblastomzellen Kelly, SH-SY5Y und die davon abgeleiteten SY5Y-hTrkB-FL

wurden in RPMI 1640 („high glucose“, PAA Laboratories) mit 10 % FKS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (PAA Laboratories) kultiviert. Monolayerkulturen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert, um eine Verminderung der Proliferationsrate durch Kontaktinhibition zu vermeiden. Nach mikroskopischer Begutachtung der Zellmorphologie (Axiovert 35, Zeiss) erfolgte die Passage der Zellen durch Trypsinierung (Reagenzien von PAA Laboratories) und anschließende Aussaat in der gewünschten Dichte in frischem Medium. Zellzahl- und Vitalitätsbestimmungen erfolgten nach Trypanblaufärbung mit einer verbesserten Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG).

Um immer wieder auf die Originalzelllinie zurückkommen zu können, wurden von allen gekauften Zelllinien nach initialer Expansion und negativem Mykoplasmentest Glyzerinkulturen einer niedrigen Passagenzahl (<5) angelegt und bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen von der Kulturplatte abgelöst, 5 min bei 135 g abzentrifugiert und in Gefriermedium resuspendiert. Pro Kryoröhrchen (Greiner Labortechnik) wurden Zellen für eine erneute Aussaat auf 75 cm² Kulturfläche abgefüllt. Das schonende Einfrieren erfolgte mit einer Abkühlrate von -1 °C/min in einer mit Isopropanol gefüllten Gefrierbox (Nalgene™ Cryo -1 °C Freezing Container, Nalgene) bei -80 °C.

3.1.2 Zellkultur unter Hypoxie bzw. mit Hypoxiemimetika

Für die Hypoxie wurden die ca. 40-50 % konfluenten Zellen 16 h bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und 1 % O₂ inkubiert (Inkubator CB150, Binder). Nach Einschalten des Hypoxieinkubators wurde der Sauerstoff innerhalb von 2 h bis auf den Sollwert von 1 % O₂ durch N₂ ersetzt, erst dann begann die Zählung der Inkubationszeit. Bei Behandlung mit dem Hypoxiemimetikum 2,2'-Dipyridyl (DP, Sigma, in EtOH) verblieben die Zellen unter Normoxie (21 % O₂), dem Medium wurde jedoch DP auf eine Endkonzentration von 100 µM zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 16 h. Lösungsmittelleffekte wurden im Rahmen der Optimierung jedes einzelnen Experiments durch Kontrollversuche mit dem Vehikel Ethanol (Roth) ausgeschlossen.

3.1.3 Transiente Zelltransfektionen

Die Kelly-Zellen wurden mit 10⁵ Zellen/cm² auf 6-Loch-Platten, die MEFs mit 80 % Konfluenz in 24-Loch-Platten ausgesät. Frühestens 16 h später wurde die Transfektion durchgeführt. Dazu wurde jeweils 1 µg der zu transfizierenden DNA (900 ng Reportergenkonstrukt + 100 ng

β -Galaktosidasekonstrukt) pro Ansatz mit 100 μ L Medium ohne Zusätze gemischt und mit 3 μ L Fugene-6 (Roche) 15 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde auf die Zellen gegeben und diese bei 21 % O₂ wie gewohnt im Inkubator kultiviert. Die Behandlung mit 1 % O₂ bzw. 100 μ M DP begann frühestens 8 h nach Transfektion (Details s. Kap. 3.1.2). Die verwendeten Plasmide und ihre Herstellung sind in Kap. 3.2.8 erläutert.

3.1.4 Knockdown mittels RNA-Interferenz

Kelly-Zellen wurden bei 40–50 % Konfluenz in 24-Loch-Platten mit dem *TrkB*-Promotor-Reporterkonstrukt *pGL3-TrkB-2107* (s. Kap. 3.2.8) und einem konstitutiv exprimierenden β -Galaktosidaseplasmid wie in Kap. 3.1.3 beschrieben kotransfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mittels Oligofectamine (Invitrogen) mit den siRNAs (s. Tab. 3.2, 200 nM Endkonzentration) nach Herstellerprotokoll transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der siRNA-Transfektion wurden die Zellen für 16 h mit dem Hypoxiemimetikum DP (100 μ M) stimuliert. Die Knockdowneffizienz wurde mittels Real-time RT-PCR (Tab. 3.3, Primer Nr. 21, 22) auf mRNA-Ebene bzw. mittels Westernblot (Tab. 3.5, Antikörper Nr. 2, 3) auf Proteinebene quantifiziert.

Tab. 3.2: In der vorliegenden Arbeit verwendete siRNAs von Xeragon (HIF siRNAs) bzw. Eurogentec (luc siRNA)

Bezeichnung der siRNA	NCBI-Nr.	Sequenz
luc siRNA (sense)	X65323.2	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT-3'
hHIF-1a siRNA (sense)	AF304431.1	5'-GCCACUUCGAAGUAGUGCudTdT-3'
hHIF-2a siRNA (sense)	NM_001430.1	5'-GCGACAGCUGGAGUAUGAAAdTdT-3'

3.1.5 Zellmigrationsassay

Die Migrationsassays wurden mit BioCoat™ Cell Culture Inserts (BD Biosciences, Heidelberg) in 24-Loch-Platten auf Polycarbonatfiltern mit 8 μ m Porengröße durchgeführt. Dazu wurden Kelly-Zellen, die zur Stimulation der TrkB-Expression für 24 h entweder bei 21 oder 1 % O₂ inkubiert worden waren, bzw. SH-SY5Y oder SY5Y-hTrkB-FL mit Accutase (PAA Laboratories) von der Kulturplatte gelöst. Die Zellen wurden in serumfreiem Kulturmedium mit $7,7 \cdot 10^4$ (Kelly) bzw. $3,75 \cdot 10^4$ Zellen/Loch (SH-SY5Y/SY5Y-hTrkB-FL) im oberen Transwell-kompartiment ausgesät. Serumfreies Zellkulturmedium mit oder ohne Zusatz von 50 ng/mL hBDNF (Kelly; Alomone Labs) bzw. 10 % FKS (SH-SY5Y/SY5Y-hTrkB-FL) wurde in die unteren Kompartimente zugegeben. In einigen Experimenten wurde der Tyrosinkinase-Inhibitor

K252a (Calbiochem, in DMSO) in einer Endkonzentration von 200 nM zu den Zellen gegeben. Die Zellmigration erfolgte bei 21 % O₂, 5 % CO₂ und 37 °C. Nach 27 (Kelly) bzw. 22 h (SH-SY5Y/SY5Y-hTrkB-FL) Inkubation wurden die nicht migrierten Zellen auf der Oberseite der Membran vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt, die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran für 2 min in Methanol fixiert und mit Toluidinblau-Lösung 10 min gefärbt. Die Zellen pro Membran wurden unter dem Mikroskop (Axiovert S100, Zeiss) in 100x Vergrößerung (Kelly) bzw. anhand von fünf repräsentativen Fotos pro Probe (SH-SY5Y/SY5Y-hTrkB-FL) ausgezählt. Die Migrationsassays wurden in Dreifachbestimmung und in mindestens drei unabhängigen Experimenten für jede Bedingung durchgeführt. Es wurde keine Veränderung der *TrkB*-Expression durch serumfreie Kulturbedingungen beobachtet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Extraktion

Zellen für RNA-Präparationsversuche wurden mit derselben Zelldichte wie für Transfektionsversuche (s. Kap. 3.1.3) auf 6 cm- (HEK293, MEF) bzw. 10 cm-Schalen (U2OS, Kelly) ausgesät. Nach mindestens 24 h bei 21 % O₂ wurden die Platten 16 h bei 1 % O₂, 21 % O₂ oder 21 % O₂ plus DP weiterkultiviert. Danach wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen mit je 1 mL TRIzol[®] LS Reagent (Invitrogen) pro Schale lysiert und die Total-RNA nach Herstellerangaben präpariert. Die Messung der Total-RNA-Konzentration erfolgte bei 260 nm in einer 1:100-Verdünnung in ultraPURE-Wasser (s. Kap. 3.2.5).

3.2.2 Reverse Transkription

Für die Erststrang-cDNA-Synthese wurden jeweils 2 µg Total-RNA im 20 µL-Ansatz eingesetzt. Die Reverse Transkription (RT) erfolgte nach Herstellerangaben mit Oligo(dT)₁₂₋₁₈ und Superscript II Reverse Transkriptase (alles Invitrogen). Eine DNaseI-Behandlung (Promega) der RNA erfolgte nur bei Proben, in denen die *BDNF*-mRNA quantifiziert werden sollte, da im Unterschied zu allen anderen Transkripten für diese mRNA keine Primerpaare verwendet werden konnten, deren Amplikons Exon-Intron-Grenzen überbrückten. Der DNaseI-Verdau erfolgte bei 37 °C für 30 min. Die erfolgreiche Umschreibung wurde in einer konventionellen

PCR-Reaktion mit einem Primerpaar für β -Aktin (s. Kap. 3.2.3, Primer 19, 20) überprüft. Als Kontrolle für den quantitativen DNaseI-Verdau wurde eine nicht umgeschriebene Probe (noRT) verwandt.

3.2.3 Konventionelle PCR und Oligonukleotidprimer

In einem 25 μ L-PCR-Ansatz wurden 1 μ L (c)DNA, 1/10 Vol 10x PCR-Puffer (Applied Biosystems), 1/50 Vol dNTPs, 1/100 Vol jeden Primers und 2,5 U AmpliTaq-Polymerase (Applied Biosystems) gemischt. Die PCR erfolgte in RNase- und DNase-freien 0,2 mL-Tubes (Thermo Fisher Scientific) im UNO-Thermoblock von Biometra. Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Tab. 3.3 dargestellt:

Tab. 3.3: In der vorliegenden Arbeit verwendete Oligonukleotidprimer von Biomers; die obere Sequenz gibt immer den Vorwärts- und die untere den Rückwärtsprimer an.

Laufende Nr. (Interne Nr.)	Zielgen bzw. -sequenz	Sequenz	NCBI-Nr. Produktgröße
1 (941/942)	hTrkA	5'-CAT TTC ACT CCT CGG CTC AGT C-3' 5'-CAG ATT TCA TCA CCG TGG CTG-3'	BC062580 391 bp
2 (1319/1306)	rTrkA	5'- TTT TCT GCA GTG CCA GGT GGA GGG G-3' 5'- GAT GCT GTT CCA CGG CTT TGC CCA-3'	NM_021589.1 260 bp
3 (1A/1B)	hTrkB	5'- CCT AAC CTC ACT GTG GAA -3' 5'- ATC TGC TTC CCA CTG TCA TCG -3'	NM_001018066 182 bp
4 (188/189)	rTrkB	5'- GTG GAG GAA GGG AAG TCT GTG -3' 5'- CAG TGG TGG TCT GAG GTT GGA -3'	M55293.1 281 bp
5 (645/646)	hTrkB-FL	5'-GTC GGT GGC CAC ACA ATG CT-3' 5'-CGG GGT CGC TGC AGG ACT C-3'	NM_006180 203 bp
6 (931/932)	hTrkB-T1	5'-ATT ATG GAA CTG CAG CGA ATG ACA TCG G-3' 5'-CCA CAG CCC CTT TCT CTG TCT TTT CCT TTA-3'	NM_001007097 275 bp
7 (1211/1212)	rTrkB-FL	5'-ATC ACC AAC AGC CAG CTC AAG C-3' 5'-CCT CCA CAC AGA CAC CGT AGA ACT TGA C-3'	NM_012731.1 274 bp
8 (1213/1214)	rTrkB-T1	5'-CTC CGT AAA GCA GGT TCA TC-3' 5'-TTC TGC TAT TAG CTG GCC TC-3'	AY265419.1 223 bp
9 (943/944)	hTrkC	5'-GCT CTA CAC CGG ACT TCA AAA GC-3' 5'-TGC AGT AGA GGT TCT GGC TGT TG-3'	BC013693 269 bp
10 (143/144)	rTrkC	5'-ACT GAG ATC AAT TGC CGG CG-3' 5'-GAT GGT CAG CTT CTG GAG TC-3'	NM_182809.2 210 bp
11 (945/946)	hp75 ^{NTR}	5'-TGG GCA GGA CCT CAG AGT CC-3' 5'-TTC CTC CCT CTG AGT CTC TG-3'	BC052977 283 bp

Laufende Nr. (Interne Nr.)	Zielgen bzw. -sequenz	Sequenz	NCBI-Nr. Produktgröße
12 (1307/1308)	rp75 ^{NTR}	5'-GCA GCA CCA TCG GTC TGC GGA-3' 5'-CGG AGC CAA CCA GAC CGT GTG TG-3'	NM_033217.3 313 bp
13 (1129/1130)	rBDNF	5'-GAG CGT GTG TGA CAG TAT TAG-3' 5'-GTA GTT CGG CAT TGC GAG TTC-3'	EF125690.1 219 bp
14 (1309/1310)	rGLUT-1	5'-GTC CTA TCT GAG TAT CGT GGC CAT C-3' 5'-AAG GTC CGG CCT TTG GTC TCA GGA A-3'	BC061873 288 bp
15 (613/614)	rVEGF	5'-GTA CCT CCA CCA TGC CAA GT-3' 5'-CTG CAT GGT GAT GTT GCT T-3'	NM_001110334 265 bp
16 (1612/1613)	rNOS1	5'-CAA GGC CCA CAT GGA CAG GC-3' 5'-GGT GGC ATA CTT GAC ATG GTT ACA-3'	NM_052799.1 229 bp
17 (1593/1594)	rNOS2	5'-ATG GCT TGC CCC TGG AAG T-3' 5'-TAT CCG AGG TGG CCT TGT GGT G-3'	AY211532.1 313 bp
18 (1595/1596)	rNOS3	5'-CAG TGA AGA TCT CTG CCT-3' 5'-GCC CGA CAT TTC CAT-3'	AJ011115.1 281 bp
19 (567/568)	hβ-Aktin	5'- AGA AAA TCT GCA CAC C -3' 5'- GCC ATC TCT TGA AGT C -3'	NM_001101 436 bp
20 (585/586)	rβ-Aktin	5'- ATG GTG GGT ATC AGA A -3' 5'- GGG GTG TTG ACT CAA A -3'	NM_031144 260 bp
21 (635/636)	hCarbo- anhydraseIX	5'- ACA CTG TGG AAG GCC ACC GTT TCC -3' 5'- GAC AGC AAC TGC TCA TAG GCA CTG -3'	NM_001216 166 bp
22 (639/640)	hErythropoietin	5'- AGG CCA AGG AGG CCG AGA ATA TCA -3' 5'- CAC GGC TGG GAA GAG TTG ACC AA -3'	BC143225 211 bp
23	rTrkB-FL (RNA-Sonde)	5'-ATA GGA TCC CAC GGA TGT TGC TGA CCA A-3' 5'-TGC AAG CTT GAC AGG GAT CTT GGT CAT C-3'	NM_012731.1
24	rTrkB-T1 (RNA-Sonde)	5'-ATA GGA TCC TGG AGG AAG GGA AGT CTG-3' 5'-TGC AAG CTT CAG TGG TGG TCT GAG GTT G-3'	AY265419.1
25 (894/899)	hTrkB-Prom (ChIP-Assay)	5'-CGC GAT TGT AGA AGA GAC TGT GGT-3' 5'-GAA GCA GAC AGC AGC AGC ATG TG-3'	AL390777 201 bp
26 (857/607)	hTrkB-878	5'-ATC GGT ACC TGT GAA CTC CCA CAT GCT GCT GCT G-3' 5'-GTT CCA TCT TCC AGC GGA TA- 3'	AL390777, Position 28861- 31861
27 (625/607)	hTrkB-969	5'-ATA GAG CTC AGG AGC TCG GCG AGG CCA GGA -3' 5'-GTT CCA TCT TCC AGC GGA TA-3'	AL390777
28 (697/698)	hTrkB-969 HRE2/3mut	5'-GAT GTG TGC TTA TGT GCG CGC TTA TGT GAA C-3' 5'-GTT CAC ATA AGC GCG CAC ATA AGC ACA CAT C-3'	AL390777
29 (629/607)	hTrkB-969	5'-TAT GAG CTC GGC GGT GAT CCT TGG TTA CCA-3' 5'-GTT CCA TCT TCC AGC GGA TA-3'	AL390777

Laufende Nr. (Interne Nr.)	Zielgen bzw. -sequenz	Sequenz	NCBI-Nr. Produktgröße
30 (858/859)	hTrkB-969 HRE1/2/3mut	5'-CGC ACG CGA TGT CAT GTC TAC-3' 5'-GTA GAC ATG ACA CGC GTG CG-3'	AL390777
31	pGL3 (Sequenzierung)	5'-CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC-3' 5'-CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC C-3'	AY487822

Folgende PCR-Programme wurden verwendet:

PCR- Programm- Nr.	Anwendung	Annealing-Temperatur; Zeit pro Zyklus	Extensions-Temperatur; Zeit pro Zyklus	Zyklenanzahl
1	Real-time RT-PCR	60 °C; 1 min		45
2	Kontrolle cDNA Mykoplasmentest	55 °C; 0,5 min	72 °C; 0,5 min	35
3	Klonierung	55 °C; 0,5 min	72 °C; bis zu 5 min	38
4	ChIP	58 °C; 0,5 min	72 °C; 0,5 min	32

3.2.4 Real-time RT-PCR

Pro 20 μ L-PCR-Ansatz wurden 2 μ L cDNA (1:10 verdünnt), 1/2 Vol 2x SYBR-Green-PCR-Mix (Applied Biosystems) und 1/100 Vol jeden Primers (Tab. 3.3) gemischt. Die PCR erfolgte in RNase- und DNase-freien 0,2 mL-Streifen (ABgene) mit Fluoreszenz-durchlässigen Deckeln im Real-time PCR-Messgerät Geneamp 5700 von Applied Biosystems. Es wurden mindestens Zweifachbestimmungen durchgeführt. Das verwendete PCR-Programm Nr. 1 ist in Kap. 3.2.3 dargestellt. Die Fluoreszenzintensität wurde nach jedem Zyklus bei 77 °C (30 s) gemessen, da hier eventuell auftretende Primerdimere vollständig denaturiert waren. Die Identität der PCR-Produkte wurde nach dem Lauf mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. 3.2.6) anhand der Produktgröße überprüft. Es wurde keine Veränderung der Menge an β -Aktin-mRNA durch Hypoxie beobachtet, sodass β -Aktin generell als Standardgen zur Normalisierung verwendet wurde.

Die C_t -Werte wurden jeweils in der Mitte der exponentiellen Phase ermittelt. Die Negativkontrolle musste einen C_t -Wert von 45 aufweisen, um eine Kontamination auszuschließen. Die Werte der Mehrfachbestimmung der Proben wurden gemittelt und durch Subtraktion des Mittelwerts des Standards derselben Probe normalisiert: ΔC_t . Zu vergleichende Normoxie-Hypoxie-Proben mit Differenzen des C_t -Werts des Standardgens >1 wurden nicht ausgewertet, da die Ausgangsmenge an cDNA offenbar zu unterschiedlich war, um dadurch auf einen Effekt in der Probe zu schließen. Die Effizienz der PCR-Reaktionen wurde für jedes

Primerpaar fünf Mal über eine cDNA-Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:5, 1:25) bestimmt und das mittlere Ergebnis von einer Verdopplung pro Zyklus für die Auswertung aller Ergebnisse herangezogen. Der Unterschied in der mRNA-Menge zwischen Normoxie und Hypoxie wurde durch den $\Delta\Delta C_t$ -Wert, $\Delta C_t \text{Normoxie} - \Delta C_t \text{Hypoxie}$, repräsentiert. Einen Verhältniswert der mRNA-Niveaus Normoxie vs. Hypoxie erhielt man durch Potenzieren des Faktors 2 (für die Verdopplung pro Zyklus) mit dem $\Delta\Delta C_t$.

3.2.5 Bestimmung der optischen Dichte: DNA, RNA und Proteine

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Nukleinsäuren wurde eine Messung der OD bei 260 nm in Quarzglasküvetten im Abgleich gegen das verwendete Lösungsmittel (Wasser bzw. Puffer) im UV/Vis-Spektralphotometer DU640 von Beckmann Instruments durchgeführt. Einer OD von 260 nm = 1 entsprachen 50 µg/mL dsDNA und 40 µg/mL RNA. Zur Bestimmung der Verunreinigung der Proben mit Proteinen wurde zusätzlich die OD bei 280 nm gemessen. Lag das Verhältnis 260/280 zwischen 1,6 und 1,8 (DNA) bzw. 1,8 und 2,0 (RNA), wurden die Nukleinsäuren ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Die β -Galaktosidase-Aktivität von Transfektionslysaten wurde über eine o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG)-gekoppelte Farbreaktion bestimmt, deren gelbes Produkt in Halbmikroküvetten bei 420 nm gemessen wurde (β -Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer, Promega).

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte je nach Probe auf einem von zwei Wegen, jeweils in Doppelbestimmung:

a) Bestimmung der $OD_{260 \text{ nm}}$ und $OD_{280 \text{ nm}}$ in 1:100 Verdünnung anhand folgender Formel:

$$\text{Proteinkonzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = 1,55 \cdot OD_{280 \text{ nm}} - 0,76 \cdot OD_{260 \text{ nm}}$$

b) Messung von je 5 µL des Lysats mittels BCA-Assay (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) mit einer BSA-Standardkurve und der Messung des farbigen Reaktionsprodukts in Halbmikroküvetten (Brand GmbH & Co.KG) bei 562 nm.

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse von DNA-Fragmenten wurden 0,8-1,5 %-ige Agarosegele (Universal Agarose, peQlab) in 0,5x TBE hergestellt und mit 1/10.000 SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) versetzt. Je nach dem Molekulargewichtsbereich, in dem die Fragmente effektiv aufgetrennt

werden sollten, wurden die Gelkonzentration und der Längenstandard ausgewählt. Die Proben wurden mit 1/4 Vol 5x DNA-Ladepuffer versetzt und parallel zu einem DNA-Längenstandard (1 kbp bzw. 100 bp DNA-Marker, Invitrogen) zur Größenbestimmung der Fragmente aufgetragen. An die Elektrophoresekammer (Mini-Sub Cell GT, BioRad) wurde eine konstante Spannung von 10-14 V/cm Gellaufstrecke angelegt. Waren die Fragmente ausreichend aufgetrennt, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel zur Dokumentation auf einen Transilluminator (White/UV Transilluminator, UVP) gelegt und fotografiert.

3.2.7 *In situ* mRNA Hybridisierung

Die *in vitro* Transkription der Antisense- und Sense-RNA-Sonden wurde mit dem RNA Labeling Kit (Roche) und 1 µg des linearisierten Plasmids (Herstellung s. Kap. 3.2.8) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Dabei ergab der Ansatz desselben Plasmids mit T7-RNA-Polymerase die Antisense- und der mit SP6-RNA-Polymerase die Sense-Sonde. Über markiertes UTP erfolgte dabei gleichzeitig die Markierung der Sonden mit Digoxigenin (DIG). Die *in situ* mRNA-Hybridisierung erfolgte auf 6 µm Kryoschnitten. Diese wurden für 10 min in 4 % PFA in PBS fixiert, dann mit jeweils 1 µg RNA-Sonde (Antisense bzw. Sense) in Hybridisierungspuffer für 16 h bei 68 °C in 4-Well-Schalen (Quadriperm, Greiner Labortechnik) hybridisiert. Nach vier Waschschritten (15 min/5xSSCT/RT, 2x15 min/2xSSC/37 °C, 10 min/Maleinsäurepuffer/RT) und Blockierung für 1 h bei RT mit 1 % Blocking Reagent (Roche) in Maleinsäurepuffer wurde DIG durch einen AP-konjugierten DIG-Antikörper (1:400 in 1 % Blocking Reagent) 1 h bei RT gebunden. Nach sechs weiteren Waschschritten bei RT (3x5 min/1xTBST, 2x5 min TBS, 10 min NTM-Puffer) erfolgte die Detektion der Hybridisierungssignale mit dem NBT/BCIP Reagenz (Roche) nach Herstellerangaben. Kryoschnitte vom Rattenhirn (*Gyrus dentatus*), in dem das charakteristische Expressionsmuster von *TrkB* beobachtet wurde (57), dienten als Positivkontrolle für die Sonden. Als Negativkontrolle im Versuch wurden Gewebeschnitte mit den korrespondierenden Sense-RNA-Sonden hybridisiert. Insgesamt wurden pro Bedingung sechs Schnitte untersucht.

3.2.8 Klonierung der verwendeten Konstrukte

Eine Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide gibt nachfolgende Tabelle:

Plasmidbezeichnung	Verwendung	Quelle
pSPT18	Leerer Klonierungsvektor	Roche, Mannheim
pSPT18-rTrkB-FL	ISH, Antisense- und Sense-Sonde	Eigene Arbeit
pSPT18-rTrkB-T1	ISH, Antisense- und Sense-Sonde	Eigene Arbeit
pCMV- β -Galaktosidase	Normalisierung, Bestimmung Transfektionseffizienz	Laborsammlung
pGL3-basic	Leerer Klonierungsvektor	Promega, Mannheim
pGL3-TrkB-2107	<i>TrkB</i> -Promotorkonstrukt, s. Abb. 4.6A	Eigene Arbeit
pGL3-TrkB-969	<i>TrkB</i> -Promotorkonstrukt, s. Abb. 4.6A	Eigene Arbeit
pGL3-TrkB-969 HRE1mut	<i>TrkB</i> -Promotorkonstrukt mit Mutation der HRE1, s. Abb. 4.10	Eigene Arbeit
pGL3-TrkB-969 HRE2/3mut	<i>TrkB</i> -Promotorkonstrukt mit Mutation der HRE2 und HRE3, s. Abb. 4.10	Eigene Arbeit
pGL3-TrkB-878	<i>TrkB</i> -Promotorkonstrukt, s. Abb. 4.6A	Eigene Arbeit
pGL2-EpoProm+Enhancer	Positivkontrolle für HIF-Induktion	Laborsammlung, (58)

Die Eckdaten zur Herstellung der Plasmide sind in Tab. 3.4 dargestellt. Hier sind jeweils der Vektor, die Nummern der mit Restriktionsenzym-Überhängen versehenen Primer für die Insert-PCR laut Tab. 3.3, die Template-DNA und die verwendeten Restriktionsenzyme dargestellt.

Tab. 3.4: Tabelle über die Klonierungsstrategien der oben aufgeführten, selbst hergestellten Plasmide anhand von Vektor, Primer-Nr. laut Tab. 3.3 für die Insert-PCR, Template-DNA und verwendeten Restriktionsenzymen

Plasmid	Vektor	Primer-Nr.	Template	Restriktionsenzyme
pSPT18-rTrkB-FL	pSPT18	23	Ratte, GehirncDNA	BamHI, HindIII
pSPT18-rTrkB-T1	pSPT18	24	Ratte, GehirncDNA	HindIII, XbaI
pGL3-TrkB-2107	pGL3-basic	-	pGL2-TrkB-2107	SacI
pGL3-TrkB-969	pGL3-basic	-	pGL3-TrkB-2107	KpnI, SacI
pGL3-TrkB-878	pGL3-basic	26	pGL3-TrkB-2107	KpnI, SacI
pGL3-TrkB-969 HRE2/3mut	pGL3-basic	27, 28	pGL3-TrkB-969	KpnI, SacI
pGL3-TrkB-969 HRE1/2/3mut	pGL3-basic	29, 30	pGL3-TrkB-969 HRE2/3mut	KpnI, SacI

10 μ g des jeweiligen Vektors wurden 2 h bei 37 °C mit 15 U der jeweiligen Restriktionsenzyme (Promega) im 30 μ L-Ansatz verdaut und anschließend mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen) geextrahiert. Die Dephosphorylierung erfolgte mit 3 U alkalischer Phosphatase (Roche) im 50 μ L-Ansatz innerhalb von 1 h bei 37 °C. Die Aufreinigung geschah mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen). Die Inserts wurden mittels PCR (Kap. 3.2.3, Programm 3) aus der angegebenen Template-DNA mit der Proofreading-DNA-Polymerase Pwo (peQlab) im 50 μ L-Ansatz hergestellt. Die Produkte wurden aus einem geeignet prozentigen Agarosegel extrahiert und mit dem MinElute Kit (Qiagen) aufgereinigt. Der anschließende Verdau erfolgte im 50 μ L-Ansatz mit 15 U der jeweiligen Restriktionsenzyme (Promega)

innerhalb von 2 h bei 37 °C. Nach nochmaliger Extraktion aus einem geeignet prozentigen Agarosegel wurden die Inserts mit dem MinElute Kit aufgereinigt und im Verhältnis 1:3 (v/v; Vektor zu Insert) in die Ligation eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit T4-DNA-Rapidligase (Roche) im 10 µL-Ansatz innerhalb von 5 min bei RT. Danach wurde die Hälfte des Ligationsansatzes mit 50 µL chemokompetenten *E. coli* DH5α (Invitrogen) vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 45 s bei 42 °C wurden 450 µL SOC-Medium (Invitrogen) dazugegeben und die *E. coli* 1 h bei 37 °C geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde zur Selektion positiver Klone auf Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Als Kontrolle diente die Religation des Vektors ohne Insert.

Die Klonierung der Upstream-Region des humanen Gens *NTRK2*, das für den Neurotrophinrezeptor TrkB kodiert, erfolgte von einem BAC (Klon RP11–301F14, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung) wie bereits beschrieben (31). Dieses Plasmid *pGL2-TrkB-2107* enthielt ein ca. 2,1 kbp langes SacI-Restriktionsfragment von -2107 bis +104 bp relativ zur Transkriptionsstartstelle von *NTRK2*, das in die SacI-Restriktionsschnittstelle des Reportervektors *pGL2-basic* kloniert war. Dieses Insert wurde über einen Restriktionsverdau mit SacI in den Reportervektor *pGL3-basic* überführt (Tab. 3.4). Zur gezielten Mutation der drei identifizierten HREs zwischen -923 bp und -879 bp des *TrkB*-Promotors wurden PCRs mit mutierten Oligonukleotidprimern (s. Tab. 3.4) durchgeführt. Nach Restriktionsverdau der mutierten Inserts erfolgte die Klonierung wie oben beschrieben.

3.2.9 Plasmidpräparation und Kontrollverdau

Auf Selektivmedium gewachsene Klone wurden mit Hilfe einer Impföse gepickt und in 3 mL Ampicillin-haltigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C angezchtet. Die Präparation der Plasmid-DNA aus 1 mL gesättigter Bakterienkultur erfolgte mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 40 µL ultraPURE-Wasser von der Säule eluiert. Zur Selektion der richtigen Klone erfolgte ein Kontrollverdau von einem Viertel der Plasmid-DNA im 20 µL-Ansatz mit 5 U geeigneter Restriktionsenzyme (Promega). Es wurde 1,5 h bei 37 °C verdaut und der gesamte Verdau auf ein 0,8 %-Agarosegel aufgetragen. Von den positiven Klonen wurden aus der Minikultur Maxikulturen angesetzt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Die Präparation der Plasmid-DNA aus 200 mL gesättigter Maxikultur erfolgte mit dem Plasmid Maxi Kit und 500er Säulen (Qiagen) nach Herstellerangaben. Je nach Größe des DNA-Pellets

wurde es in 300-400 μL Puffer EB aufgenommen und die DNA-Konzentration am Photometer bestimmt (s. Kap. 3.2.5).

3.2.10 Kontrolle der Plasmididentität, Glyzerinkulturen

Zur Überprüfung der amplifizierten Plasmide erfolgte ein 10 μL -Kontrollverdau von jeweils 2 μg Plasmid mit 5 U geeigneter Restriktionsenzyme (Promega). Es wurde 2 h bei 37 °C verdaut und der gesamte Verdau auf ein 0,8 %-Agarosegel aufgetragen. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der Inserts vom 5'- bzw. 3'-Ende her mit den Primern Nr. 31 (s. Tab. 3.3) mit fluoreszenzmarkierten (d)NTPs nach der Sanger-Methode bei der Firma Eurofins MWG GmbH. Bakterien mit korrekten Plasmiden wurden als Glyzerinkultur bei -80 °C gelagert. Dazu wurden 800 μL gesättigter Bakterienkultur aus der Maxikultur mit demselben Volumen an Gefriermedium versetzt, gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.2.11 Luziferase-Assay, β -Galaktosidase-Assay

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Reporter-Lysepuffer in einem Frier-Tau-Schritt lysiert (Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer, Promega). Nach dem Abzentrifugieren der Lysate bei 4 °C, 16.000 g, 10 min wurde die Luziferaseaktivität im Luminometer (Microlite TLX 1, Dynatech Laboratories) gemessen. Dazu wurden 20 μL Lysat mit 100 μL Luziferase-Reaktionslösung versetzt und sofort 10 x 2 s gemessen. Die Summe der Luziferasewerte wurde als Messwert betrachtet. Die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität der Lysate wurde mittels einer ONPG-gekoppelten Farbreaktion am Photometer bestimmt (s. Kap. 3.2.5). Dazu wurden 75 μL Lysat mit 75 μL 2x Assay Puffer auf Eis versetzt, die Proben gemischt und 1-15 min bei 37 °C inkubiert, bis die ersten Proben eine intensiv gelbe Färbung zeigten. Abgestoppt wurde mit 250 μL 1 M Na_2CO_3 .

Die Relativen Licht Einheiten (RLU) aus dem Luziferase-Assay wurden auf die β -Galaktosidase-Aktivitäten in mg/mL bezogen, um eine Verfälschung der Messwerte durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen zu vermeiden. Zur leichteren Vergleichbarkeit dieser Quotienten wurde der Messwert für Normoxie = 1 gesetzt und die Messwerte der behandelten Proben entsprechend umgerechnet.

3.2.12 Protein-Extraktion und -quantifizierung

Die fraktionierte Proteinpräparation erfolgte jeweils von subkonfluent bewachsenen 10 cm-Schalen. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in je 1 mL Puffer 1 abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde durch drei Frier-Tau-Zyklen in flüssigem Stickstoff lysiert. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 g, 4 °C, 2 min wurde der Überstand (Zytosolfraktion) abgenommen und das verbleibende Zellpellet in 30-50 µL Puffer 2 mit einem kleinen Minimagnetrührer im Eiswasserbad für 30 min gerührt. Nach Vortexen und einer weiteren Zentrifugation (s.o.) wurde der Überstand (Membranfraktion) abgenommen und die Kerne durch 5-minütiges Kochen in 100 µL SDS-Puffer nach Laemmli in Lösung gebracht. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (s.o.) wurde die Kernfraktion abgenommen. Die Proteinkonzentration der Zytosol- und Membranproteinfraktion wurde mittels BCA-Assay, die der Kernproteinfraktion photometrisch bestimmt (s. Kap. 3.2.5). Zur Lagerung bei -20 °C wurden die Proteinlösungen mit 1/2 Vol 3x Proteinprobenpuffer versetzt und 5 min gekocht.

Die Kernextraktpräparation erfolgte jeweils von subkonfluent bewachsenen 10 cm-Schalen im Kühlraum auf Eis. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, gut ausgeklopft, die Zellen in je 150 µL Puffer A abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach 20 min Inkubation auf Eis und einer Zentrifugation bei 7.500 g, 4 °C, 5 min wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Kernpellet in 50 µL Puffer B mit einem kleinen Minimagnetrührer im Eiswasserbad für 30 min gerührt. Nach einer Zentrifugation bei 16.100 g, 4 °C, 20 min wurde der Überstand (Kernextrakt) abgenommen und in 5 µL-Aliquots bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay (s. Kap. 3.2.5) bestimmt.

3.2.13 SDS-PAGE, Westernblot und Antikörper

Membranproteinfraktionen (TrkB) bzw. Kernextraktproteine (HIF-1) wurden mittels eines 7,5 %-igen Polyacrylamidgels mit 11,5-17 V/cm Gellaufstrecke in 1x SDS-Laufpuffer aufgetrennt (Mini Protean 2 Cell, BioRad). Die Proteine wurden auf Polyvinyliden-difluorid(PVDF)-Membranen (Immobilon P, Millipore, Schwalbach) mittels Semidry- (s. Abb. 4.3B) bzw. Tank- (Abb. 4.16A) Blotting-Technik (beide Systeme von BioRad) im entsprechenden 1x Blottingpuffer übertragen. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation der Membranen für 1 h bei RT in 5 % Magermilch (Roth) in TBS-Tween (TBST) erreicht. Die Inkubation mit Primäantikörper (s. Tab. 3.5, in 2,5 % Magermilch) erfolgte über

Nacht bei 4 °C in 2,5 % Milch in TBST. Danach wurden die Membranen drei Mal 15 min in TBST gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper (s. Tab. 3.5, in 2,5 % Magermilch) inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen (s.o.) in TBST erfolgte die Detektion der Produkte mittels Chemilumineszenzsystem (Western Lightning™ Plus-ECL Chemilumineszenz System, Amersham Biosciences) und Belichtung von Röntgenfilmen (Hyperfilm™ MP, Amersham Biosciences). Der Antikörper gegen β -Aktin (s. Tab. 3.5, in 2,5 % Magermilch) wurde nach dem Strippen der Membranen mit 0,2 M NaOH bei RT für 6 min, dreimaligem Waschen in TBST und erneutem Blockieren (s.o.) jeweils verwendet, um Unterschiede in der Proteinbeladung zu detektieren.

Tab. 3.5: In der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper mit Details zu Anwendung, Klonalität, Spezies, Spezifität, Konjugation, Verdünnung und Hersteller; MAK: monoklonaler Antikörper, PAK: polyklonaler Antikörper

Nr. Anwendung	Klonalität	Spezies	Spezifität	Konjugation	Verdünnung	Hersteller: Katalog- nummer
1 WB	MAK	Maus	hTrkB	-	1:500	Abnova Corporation, Taipei, Taiwan: H00004915-M01
2 WB, ChIP	PAK	Kaninchen	h/mHIF-1 α	-	1:1.000	Novus Biologicals, Littleton, USA: 100-449
3 WB	PAK	Kaninchen	h/m/rHIF-2 α	-	1:1.000	Novus Biologicals, Littleton, USA: 100-122
4 IZ	PAK	Ziege	h/m/rTrkB	-	1:75	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg: sc-20542
5 EMSA, ChIP	MAK	Maus	hHIF-1 α	-	-	BD Biosciences, Heidelberg: 610958
6 ChIP	PAK	Kaninchen	h/mAcetyl- Histon 3	-	-	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA: 06-599
7 WB	MAK	Maus	r/mTrkB	-	1:250	BD Biosciences, Heidelberg: 610101
8 IHC	PAK	Kaninchen	rTrkB	-	1:100	Abcam, Cambridge, Großbritannien: ab6180
9 WB	MAK	Maus	h/r/m β -Aktin	-	1:1.000	Chemicon, Hofheim: MAB1501
10 WB	PAK	Ziege	Maus-IgG	HRP	1:7.500	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg: sc-2031
11 WB	PAK	Esel	Kaninchen-IgG	HRP	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg: sc-2313
12 IZ	PAK	Esel	Ziege-IgG	Cy3	1:200	Jackson Immuno Research, Newmarket, Groß- britannien: 705166147

Nr. Anwendung	Klonalität	Spezies	Spezifität	Konjugation	Verdünnung	Hersteller: Katalog- nummer
13 WB	PAK	Esel	Maus-IgG	HRP	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg: sc-2306
14 IHC	PAK	Ziege	Kaninchen-IgG	AP	1:200	Sigma, Steinheim: A9919

3.2.14 Immunzytochemie

Das Wachstum der Zellen für die Immunfärbung erfolgte in gekammerten Objektträgern (Lab-Tek® Chamber Slide™, Nalge Nunc International). Die Immunfärbung von 3 min bei -20 °C mit Aceton-Methanol(3:2, v/v, Roth)-fixierten Kelly-Zellen erfolgte nach 5 min Blockierung mit Protein Block Serum-free (Dako) mittels der Antikörper Nr. 4 (TrkB, Tab. 3.5, 1 h bei RT) und Nr. 12 (Tab. 3.5, 30 min bei RT) in Antikörperdiluent (Zymed Laboratories). Zwischen dem Primär- und Sekundärantikörperschritt und nach letzterem wurde jeweils 3x3 min mit PBS bei RT gewaschen. Die Inkubation der Zellen mit Normalziegenserum (Jackson Immuno Research) diente als Negativkontrolle, das Eindeckeln mit DAPI-haltigem Eindeckelmedium (Vectashield® mit DAPI, Vector Laboratories) als Gegenfärbung der Zellkern-DNA. Die Objektträger wurden unter einem Lichtmikroskop (Axioplan S100, Zeiss) begutachtet, das mit einer Digitalkamera (Spot RT Slider, Diagnostic Instruments) verbunden war, und mittels Metamorph V4.1.2 Software (Visitron Systems) aufgenommen.

3.2.15 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Elektrophoretische Mobilitätsshift Assays wurden mit Kernextrakten von Kelly-Zellen durchgeführt, die auf 10 cm-Schalen für 5 h bei 1 bzw. 21 % O₂ inkubiert worden waren. Die Kernextraktpräparation erfolgte wie in Kap. 3.2.12 beschrieben. Die folgenden Oligonukleotide wurden mittels T4 Polynukleotidkinase innerhalb von 1 h bei 37 °C am 5'-Ende mit [³²P]-ATP (7.000 Ci/mmol, ICN Biochemicals) markiert und nach Aufreinigung mit ProbeQuant G50-Säulen (Amersham) 30 min bei RT mit jeweils 5 µg Kernextrakt in 1x Bindungspuffer versetzt:

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz
TrkB-HRE1	5'-GAC ACA CAC ACG CAC GCG CGT GCA TGT CTA-3'
TrkB-HRE1mut	5'-GAC ACA CAA AAA CAC GCG AAA ACA TGT CTA-3'
TrkB-HRE2/3	5'-GAT GTG TGC GTG TGT GCG CGC GTG TGT GAA-3'
TrkBHRE2/ 3mut	5'-GAT GTG TGA AAA TGT GCG CGA AAA TGT GAA-3'

Für die Supershift-Experimente wurde 1 µg des Antikörpers Nr. 5 (HIF-1α, Tab. 3.5) über Nacht bei 4 °C zur Bindungsreaktion gegeben. Die Proben wurden für 4 h in einem nicht-denaturierenden 4 % Polyacrylamidgel bei 4 °C aufgetrennt. Die getrockneten Gele (Geltrockner Modell 583, BioRad) wurden auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm™ MP, Amersham Biosciences) mit Verstärkerfolie für 2 h exponiert.

3.2.16 Immunhistochemie

Die Immunfärbung erfolgte auf 4 µm dicken Paraffinschnitten von 3 % PFA-fixiertem Lungengewebe. Die Lungenschnitte wurden entparaffiniert (3x10 min Xylol, 2x5 min 100 % EtOH, 2x5 min 95 % EtOH, 1x5 min 80 % EtOH, 1x5 min 70 % EtOH, 1x5 min PBS) und für 6 min in einem Dampfkochtopf demaskiert. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit 3 % Wasserstoffperoxid in Methanol (Merck, Roth) inaktiviert. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit 5 % Magermilch (Roth) in PBS für 30 min bei RT blockiert. Die Immunhistochemie wurde mit den folgenden Antikörpern in 5 % Magermilch in PBS durchgeführt: Primärantikörper Nr. 8 (TrkB, Tab. 3.5, 1 h bei RT) und Sekundärantikörper Nr. 14 (Tab. 3.5, 30 min bei RT). Die Inkubation mit Kaninchen-IgGs (Jackson Immuno Research) diente als Negativkontrolle. Die Reaktionen wurden mittels NBT/BCIP-Substrat (Roche) sichtbar gemacht und wie in Kap. 3.2.14 beschrieben fotografiert.

3.2.17 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Für den ChIP Assay wurden Kelly-Zellen für 5 h bei 1 bzw. 21 % O₂ inkubiert. Die Quervernetzung der DNA-gebundenen Proteine wurde durch Fixierung der Zellen im Medium mit 30 %-iger (w/v) PFA-Lösung in PBS mit einer Endkonzentration von 1 % PFA erreicht, 10 min bei 37 °C erreicht. Nach zweimaligem Waschen mit PBS+Complete™ (Roche) und 10 min in Lysepuffer auf Eis wurde die Zelllysat-DNA mittels Ultraschall zu Fragmenten von 200-600 bp zerkleinert. Nach einem Pre-clearing-Schritt mit DNA-blockierten Protein A/G-Agarosekügelchen (Upstate Biotechnology) in IP-Puffer für 1 h bei 4 °C erfolgte die Immunpräzipitation in IP-Puffer über Nacht bei 4 °C mit den folgenden Antikörpern (Tab. 3.5): Mix aus Nr. 2 und 5 (HIF-1α) bzw. Nr. 6 (Acetylhiston 3). Die Inkubation mit Maus-Kaninchen-IgG diente als Negativkontrolle. Die Antikörper-gebundenen Proteine wurden für 3 h bei 4 °C an Protein A/G-Agarosekügelchen präzipitiert. Nach vier Waschschritten, jeweils 5 min bei 4 °C (LS-, HS-, Lithium-, TE-Puffer), wurde die DNA von den Agarosekügelchen in frisch

hergestelltem Elutionspuffer eluiert, mittels Phenol-Chloroform (Invitrogen) nach Herstellerangaben extrahiert und mit 100 % EtOH präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde in 30 μ L TE-Puffer aufgenommen und 1/10 Vol für die PCR-Amplifikation des humanen *TrkB*-Promotors eingesetzt (Tab. 3.3, Primer Nr. 25). Die PCR erfolgte mit Programm-Nr. 4 (Kap. 3.2.3) und die Auftrennung und Darstellung der PCR-Produkte auf einem 1,2 %-igen Agarosegel wie in Kap. 3.2.6 beschrieben.

3.3 Tierexperimentelle Arbeiten

3.3.1 Systemische Hypoxie bei Ratten

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten (FEM Charité -Universitätsmedizin Berlin) mit 250-300 g Körpergewicht verwandt. Die Studien waren vom Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt (G 0189/07 vom 15.11.2007, Erweiterungsantrag vom 29.07.2008) und wurden entsprechend der „European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes“ (Europarat Nr. 123, Straßburg 1985) durchgeführt.

Die adulten Tiere wurden 6 h bei 8 % (v/v) inspiratorischer Sauerstoffkonzentration gehalten, während die Vergleichstiere (21 % O₂) normale Raumluft atmeten. Danach wurden die Tiere mittels Urethan-Injektion (1,2 g/kg Körpergewicht, i.p., Sigma) narkotisiert, durch Ausbluten getötet und ihre Organe (Trachea, Leber, Gehirn, Niere, Milz, Herz, Lunge) entnommen. Die Organe wurden direkt nach der Entnahme in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Methylbutan schockgefroren bzw. für funktionelle Analysen verwendet (Kap. 3.3.2). Die Lungen für Kryo- bzw. Paraffinschnitte wurden am toten Tier *in situ* mit 6-8 mL einer 1:1 (v/v) Mischung von Tissue Tek O.C.T Compound (Sakura Finetek) und PBS bzw. 3 % PFA-Lösung in PBS über eine in der Trachea befindliche Venenverweilkanüle (16G, Abbot) instilliert. Anschließend wurden die Organe für Kryoschnitte in 800 mosM Sukrose bzw. für Paraffinschnitte in 330 mosM Sukrose über Nacht bei 4 °C entwässert. Die Einbettung der Lungen für Paraffinschnitte erfolgte automatisch in einem Hypercenter XP von Shandon/Thermo Fisher Scientific.

3.3.2 Isometrische Kraftmessungen an isolierten Trachealsegmenten

Isolierte Rattentracheen wurden in jeweils zwei Knorpelringe breite Segmente geschnitten. Die Proben wurden zwischen zwei Edelstahlschlaufen in einer 5 mL-Organkammer mit eiskalter Präparationslösung eingespannt. Die Kontraktionsmessungen wurden in PSS Mulvany-Lösung bei pH 7,4 und 37 °C unter Begasung mit Carbogen (95 % O₂ / 5% CO₂) durchgeführt. Die isometrisch entwickelte Kontraktionskraft wurde mit einem mechano-elektrischen Umwandler (Danish Myo Technology) aufgenommen und mit der Software Chart5 und einem ADI Powerlab-Verstärker (beide ADInstruments) aufgezeichnet. Die Ruhekraft wurde während einer 20-minütigen Äquilibrationsphase auf 0,7 g eingestellt. Die Kontraktion der Präparate wurde durch ACh (Sigma) hervorgerufen, das dem Organbad mit steigenden Endkonzentrationen von 10⁻⁹-10⁻³ M zugefügt wurde. ACh wurde entweder alleine oder nach Präinkubation mit rekombinantem hBDNF (50 ng/mL, Alomone Labs) hinzugegeben. Der Tyrosinkinase-Inhibitor K252a (100 nM, Calbiochem, in DMSO) wurde 25 min vor Zugabe von BDNF bzw. ACh hinzugefügt. In Kontrollexperimenten führte 0.005 % DMSO alleine zu keiner Veränderung der Kontraktionsantwort. Der NO-Synthaseinhibitor L-Nitroargininmethylester (L-NAME, 0,1 mM, Sigma) wurde 15 min vor Zugabe von BDNF bzw. ACh angewandt. Die Spannung der Präparationen wurde als Verhältnis der aufgezeichneten Kraft zur geringsten Weite der Trachealsegmente berechnet. In einigen Experimenten wurde das Atemwegsepithel der Präparate mit einem Rattenschnurrhaar vorsichtig entfernt. Die vollständige Entfernung der Epithelschicht und die strukturelle Unversehrtheit der darunter liegenden glatten Muskelzellen wurden mittels lichtmikroskopischer Untersuchung von HE-gefärbten Gewebeschnitten (5 µm Kryoschnitte) kontrolliert.

3.4 Sequenzanalyse *in silico*

Die Analyse der *TrkB*-Promotorsequenz (NCBI-Nr. AL390777) auf potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen erfolgte mit dem Programm Transfac[®] Professional 6.1 (BIOBASE). Die ca. 2 kbp lange Sequenz wurde mittels MATCH[™] mit folgenden Parametern untersucht: Matrix „vertebrates“, Suchparameter „cut-off to minimize the sum of both error rates“.

3.5 Statistik

Wenn nicht anders angegeben, sind alle Werte als Durchschnittswert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Real-time RT-PCR-Daten wurden mit Students t-Test (gepaart für Versuche *in vitro*) statistisch ausgewertet (Sigma Plot 9.0, SYSTAT Data). Die im Rahmen der isometrischen Kraftmessungen erhobenen Werte wurden mittels zweiseitiger ANOVA mit Bonferroni-Test als post-hoc-Test (Graph Pad Statistic 4, Graph Pad Software) statistisch analysiert. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Das α -Level wurde auf $0,05$ festgelegt.

3.6 Bezugsquellen

Firma	Firmensitz	Land
Abbot	Mannheim	Deutschland
ABgene	Hamburg	Deutschland
ADInstruments	Sidney	Australien
Alomone Labs	Jerusalem	Israel
Amersham Biosciences	Freiburg	Deutschland
Applied Biosystems	Mannheim	Deutschland
Beckmann Instruments	München	Deutschland
Binder	Tuttlingen	Deutschland
BIOBASE	Braunschweig	Deutschland
Biochrom	Berlin	Deutschland
Biomers	Ulm	Deutschland
Biometra	Göttingen	Deutschland
BioRad	München	Deutschland
Brand GmbH & Co.KG	Wertheim	Deutschland
Calbiochem	Darmstadt	Deutschland
Dako	Glostrup	Dänemark
Danish Myo Technology	Aarhus	Dänemark
Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung	Berlin	Deutschland
Diagnostic Instruments	Sterling Heights	USA
Dynatech Laboratories	Chantilly	USA
Eurofins MWG GmbH	Ebersberg	Deutschland
Eurogentec	Brüssel	Belgien
FEM Charité -Universitätsmedizin Berlin	Berlin	Deutschland
Graph Pad Software	San Diego	USA
Greiner Labortechnik	Kremsmünster	Österreich

Firma	Firmensitz	Land
ICN Biochemicals	Eschwege	Deutschland
Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
J.T. Baker	Griesheim	Deutschland
Jackson Immuno Research	Newmarket	Großbritannien
Merck	Darmstadt	Deutschland
Minerva Biolabs	Berlin	Deutschland
Nalge Nunc International	Rochester	USA
Nalgene	Roskilde	Dänemark
PAA Laboratories	Cölbe	Deutschland
Paul Marienfeld GmbH & Co.KG	Lauda-Königshofen	Deutschland
peQlab	Erlangen	Deutschland
Promega	Mannheim	Deutschland
Qiagen	Hilden	Deutschland
Roche	Mannheim	Deutschland
Roth	Karlsruhe	Deutschland
Sakura Finetek	Heppenheim	Deutschland
Serva	Heidelberg	Deutschland
Sigma	Deisenhofen	Deutschland
SYSTAT Data	Chicago	USA
Thermo Fisher Scientific	Bonn	Deutschland
TPP	Trasadingen	Deutschland
Upstate Biotechnology	Hamburg	Deutschland
UVP	Henderson	USA
Vector Laboratories	Burlingame	USA
Visitron Systems	Puchheim	Deutschland
Xeragon	Köln	Deutschland
Zeiss	Jena	Deutschland
Zymed Laboratories	Berlin	Deutschland

3.7 Puffer und Lösungen

Es wurden (Bio)Chemikalien in Analysequalität folgender Firmen verwendet: Invitrogen, J.T. Baker, Merck, PAA Laboratories, Promega, Roth, Serva und Sigma. Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser (Millipore Qualität) angesetzt.

Name	Zusammensetzung
<i>Zellkultur</i>	
1x PBS, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	0,2 g/L KCl, 0,2 g/L KH ₂ PO ₄ , 8 g/L NaCl, 1,15 g/L Na ₂ HPO ₄ , steril
Trypanblau-Lösung	0,4 % Trypanblau (w/v) in PBS, steril
Gefriermedium Zellkultur	70 % (v/v) Kulturmedium, 20 % (v/v) FKS, 10 % (v/v) DMSO, steril
Toluidinblau-Lösung	1 % (w/v) Toluidinblau, 1 % (w/v) Natriumtetraborat
<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	
5x TBE	54 g/L Tris-HCl, 27,5 g/L Borsäure, 10 mM EDTA
5x DNA-Ladepuffer	42,5 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
<i>In situ Hybridisierung</i>	
4 % PFA-Lösung	4 % (w/v) PFA in PBS
20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Zitrat (pH 7,0)
5x SSCT	5x SSC, 0,05 % (v/v) Tween 20
Hybridisierungspuffer	50 % Formamid, 5x SSC, 5x Denhardts Lösung, 100 µg/mL Heringsperma-DNA, 200 µg/mL Hefe-tRNA
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl (pH 7,5)
1x TBS	20 mM Tris-Base, 137 mM NaCl (pH 7,6)
TBST	1x TBS, 0,05 % Tween 20
NTM	0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl ₂ (pH 9,5)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA (pH 8,0)
<i>Klonierung</i>	
LB-Medium (± Ampicillin)	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 0,1 % (v/v) 1 M NaOH (pH 7), steril (± 100 µg/mL Ampicillin)
Ampicillin-Agarplatten	LB-Medium, 15 g/L Agarose, 100 µg/mL Ampicillin
PEG-Lösung	13 % (w/v) PEG in 1,6 M NaCl
Gefriermedium Bakterien	65 % Glycerin (v/v), 0,1 M MgSO ₄ , 0,025 M Tris-HCl, (pH 8), steril
<i>Proteinextraktion</i>	
Puffer 1	137 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7,2), 2 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 1 mM PMSF
Puffer 2	20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 137 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 % (v/v) Triton-X-100, 0,5 mM DTT, 1 mM PMSF
<i>Proteinextraktion</i>	
3x Proteinprobenpuffer	30 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,0), 30 % (v/v) Glycerin, 7,5 % SDS, 0,5 mg/mL Bromphenolblau, 100 mM DTT
Puffer A	1 mM HEPES (pH 7,9), 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 0,4 % (v/v) Nonidet-P40, 1x Complete™
Puffer B	20 mM HEPES (pH 7,9), 1,5 mM MgCl ₂ , 420 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT, 1x Complete™
<i>Proteinextraktion</i>	
SDS-Puffer nach Laemmli	50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4 M Harnstoff, 1 % (w/v) SDS, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau, 7,5 mM DTT
<i>SDS-PAGE, Westernblot</i>	
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris-Base, 1,92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS (pH 8,3)
1x Blottingpuffer Semidry	10 mM 6-Aminohexansäure, 10 % (v/v) Methanol
1x Blottingpuffer Tank	3,815 g/L Tris, 18,125 g/L Glycin (pH 8,6), 0,05 % (w/v) SDS, 0,2 Vol Methanol

Name	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, 0,4 % (w/v) SDS (pH 8,8)
Sammelgelpuffer	1 M Tris-HCl, 0,8 % (w/v) SDS (pH 6,8)
Polyacrylamidsammelgel	0,11 Vol AA/BA (w/v, 30/0,8), 0,125 Vol Sammelgelpuffer, 1 µL/mL TEMED, 10 µL/mL APS
Polyacrylamidtrenngel	0,25 Vol AA/BA (w/v, 30/0,8), 0,25 Vol Trenngelpuffer, 1/40 Vol Glycerin, 0,5 µL/mL TEMED, 5 µL/mL APS
<i>EMSA</i>	
1x Bindungspuffer	12 mM HEPES (pH 7,9), 4 mM Tris-HCl (pH 7,9), 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg denaturierte Kalbsthymus-DNA
4 % Polyacrylamidgel	4 % (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid, 0,05 % (v/v) TEMED, 0,075 % (w/v) APS in 0,5x TBE
<i>Immunhistochemie</i>	
3 % PFA-Lösung	3 % (w/v) PFA in PBS
1x PBS	0,2 g/L KCl, 0,24 g/L KH ₂ PO ₄ , 8 g/L NaCl, 1,44 g/L Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4)
<i>ChIP</i>	
Lysepuffer	1 % (w/v) SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,1)
IP-Puffer	0,01 % (w/v) SDS, 1,1 (v/v) % Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl (pH 8,1)
LS-Puffer	0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,1), 150 mM NaCl
HS-Puffer	0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,1), 500 mM NaCl
Lithium-Puffer	0,25 M LiCl, 1 % (v/v) Nonidet-P40, 1 % (w/v) Na-Desoxycholat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,1)
Elutionspuffer	1 % (w/v) SDS, 0,1 M NaHCO ₃
<i>Myograph</i>	
Präparationslösung	DMEM/F-12 (1:1, v/v), pH 7,4
PSS Mulvany-Lösung	119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl ₂ , 1,17 mM MgSO ₄ , 25 mM NaHCO ₃ , 1,18 mM KH ₂ PO ₄ , 0,027 mM EDTA, 5,5 mM Glukose (pH 7,4)

4 Ergebnisse

4.1 Die TrkB-Expression unter Hypoxie *in vitro*

4.1.1 Sauerstoffabhängige Expression der Neurotrophinrezeptoren *in vitro*

Die Neuroblastom-Zelllinie Kelly wurde benutzt, um zu untersuchen, ob die Expression der unterschiedlichen Neurotrophinrezeptoren sauerstoffsensitiv ist. Kelly-Zellen wurden ausgewählt, weil sie schon zuvor zur Untersuchung molekularer Mechanismen sauerstoffabhängiger Genexpression verwendet worden sind (59). Zudem sind hohe Expressionsniveaus des Neurotrophinrezeptors TrkB und der zugehörigen Liganden, BDNF und NT-4/5, in Neuroblastomen mit aggressivem Tumorwachstum assoziiert (47;48).

Im Vergleich zur Normoxie (21 % O₂) waren die *TrkB*-Transkriptniveaus in Kelly-Zellen, die für 16 h bei 1 % O₂ inkubiert worden waren, ca. 28-fach erhöht (Abb. 4.1).

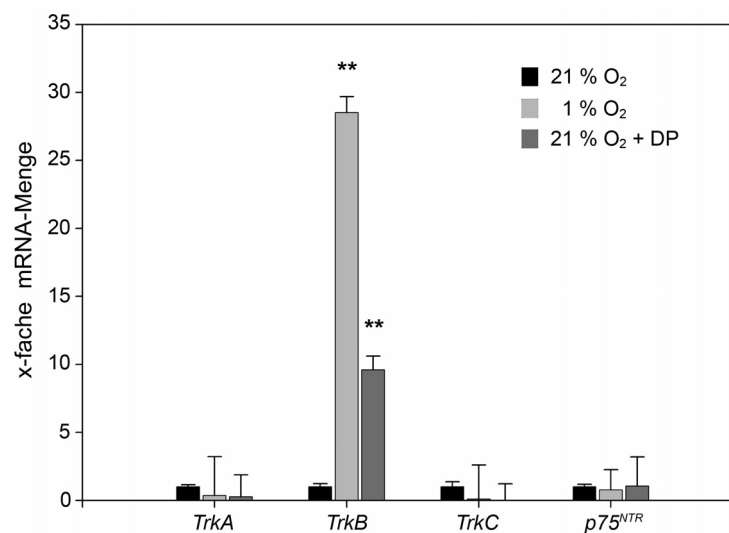


Abb. 4.1: Relative Transkriptniveaus der Rezeptortyrosinkinasen *TrkA*, *TrkB* und *TrkC* sowie des niedrigaffinen Neurotrophinrezeptors *p75^{NTR}* in der Neuroblastom-Zelllinie Kelly. Die Zellen wurden für 16 h entweder bei 1 oder 21 % O₂ inkubiert. Das Hypoxiemimetikum DP (100 µM) wurde den Kulturen bei 21 % O₂ für 16 h zugesetzt. Die mRNA-Niveaus wurden mittels quantitativer Real-time RT-PCR ermittelt und auf die β -Aktin-Transkripte normalisiert. Der zelluläre mRNA-Gehalt bei 21 % O₂ wurde auf 1 gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von n=4 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen (**P<0,01 gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂ in Abwesenheit von DP, Students gepaarter t-Test).

Entsprechend stimulierte auch die Behandlung mit dem Hypoxiemimetikum 2,2'-Dipyridyl (DP, 100 μ M) für 16 h bei 21 % O₂ die *TrkB*-Expression ca. 10-fach (Abb. 4.1). In Gegensatz dazu veränderte sich die Expression der Rezeptortyrosinkinasen *TrkA* und *TrkC* und des niedrigaffinen Neurotrophinrezeptors *p75^{NTR}* nicht signifikant (Abb. 4.1).

4.1.2 Zellhintergrundeinfluss auf die sauerstoffabhängige Expression von *TrkB*

Die Osteosarkom-Zelllinie U2OS und die embryonale Nieren-Zelllinie HEK293 wurden benutzt, um zu prüfen, ob die verstärkte *TrkB*-Expression unter Hypoxie auf neuronale Tumorzellen (Kelly) beschränkt ist oder einen Regulationsmechanismus darstellt, der in Zellen verschiedener Gewebeherkunft erhalten ist. Wie in Abb. 4.2 dargestellt waren die *TrkB*-Transkripte auch in U2OS- und HEK293-Zellen unter Hypoxie (1 % O₂, 16 h) signifikant erhöht. Entsprechend stimulierte die 16-stündige Behandlung mit DP die *TrkB*-Expression bei 21 % O₂ in allen drei Zelllinien (Abb. 4.2). Im Vergleich zu Kelly-Zellen war der Anstieg der *TrkB*-mRNA unter Hypoxie und DP in U2OS- und HEK293-Zellen jedoch schwächer (Abb. 4.2), sodass alle folgenden Experimente an der Neuroblastom-Zelllinie Kelly durchgeführt wurden.

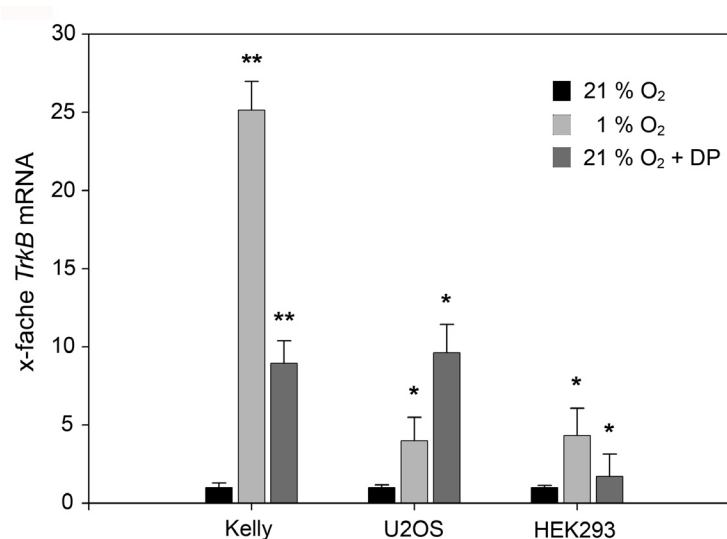


Abb. 4.2: Relativer *TrkB*-mRNA-Gehalt verschiedener Zelllinien, die 16 h entweder bei 21 % O₂ in An- und Abwesenheit von DP oder unter Hypoxie (1 % O₂) inkubiert wurden. Die mRNA-Niveaus wurden mittels quantitativer Real-time RT-PCR ermittelt und auf die β -Aktin-Transkripte normalisiert. Der zelluläre *TrkB*-mRNA-Gehalt bei 21 % O₂ wurde auf 1 gesetzt. Dabei zeigte sich, dass die *TrkB*-Expression unter Hypoxie und in Anwesenheit von DP (21 % O₂) in allen Zelllinien einschließlich der nicht-neuronalen HEK293- und U2OS-Zellen signifikant stimuliert wurde. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von n=5 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen (*P<0,05 und **P<0,01 gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂ in Abwesenheit von DP, Students gepaarter t-Test).

4.1.3 TrkB-Proteinexpression und -lokalisierung unter Hypoxie

Zur Analyse der Expressionskinetik von *TrkB* in Kelly-Zellen wurden nach 4, 8, 16, 24 und 32 h Inkubation bei 1 % O₂ Proben genommen. Die repräsentativen Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 4.3A dargestellt. Die *TrkB*-mRNA-Niveaus stiegen zwischen 4 und 24 h Exposition bei 1 % O₂ kontinuierlich an, bevor sie bei längerer Exposition (>30 h) ein Plateau erreichten. Um potentielle Nebeneffekte langwährender Hypoxie wie die Ansäuerung des Kulturmediums auszuschließen, wurden die Zellen in allen folgenden Experimenten für 16 h bei 1 % O₂ inkubiert.

Mittels Westernblot und einem monoklonalen TrkB-Antikörper, der beide Protein-Isoformen, die 145 kDa full-length (TrkB-FL) und die 95 kDa trunkierte (TrkB-T1), erkannte, konnte in Membranproteinpräparationen hypoxisch stimulierter Kelly-Zellen ebenfalls ein Anstieg des TrkB-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 4.3B). Die erfolgreiche hypoxische Stimulation der Zellen wurde durch ihre robuste Expression des Proteins HIF-1 α belegt, das in Kelly-Zellen bei 21 % O₂ nicht nachweisbar war (Abb. 4.3B). Bei der gewählten Belichtungszeit konnte kein TrkB-Protein in normoxischen (21 % O₂) Kelly-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.3B), obwohl beide Isoformen unter Normoxie auf mRNA-Ebene nachweisbar waren und in gleichem Maße durch Hypoxie induziert wurden (Daten nicht gezeigt). Die erneute Entwicklung der gestrippten Membran mit einem β -Aktin-Antikörper zeigte, dass gleiche Proteinmengen übertragen wurden (Abb. 4.3B).

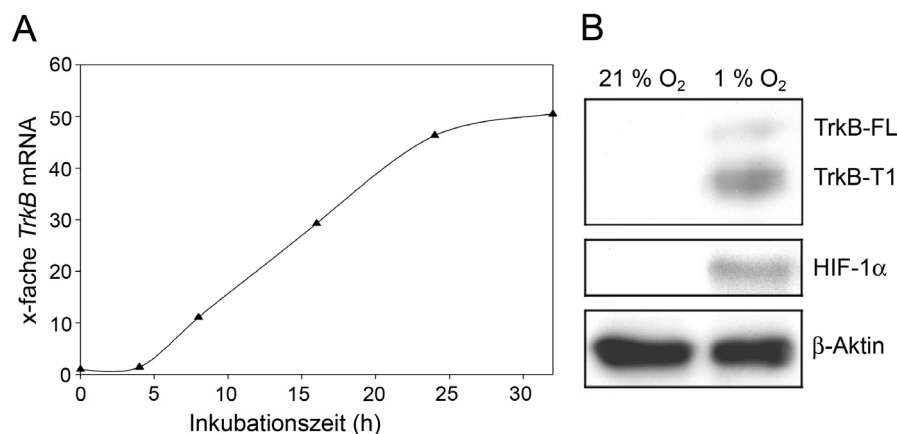


Abb. 4.3: **A**, Repräsentativer Graph, der die zeitabhängige Zunahme der *TrkB*-mRNA in Kelly-Zellen zeigt, die für verschiedene Zeitintervalle (4, 8, 16, 24 und 32 h) bei 1 % O₂ inkubiert worden waren. Der zelluläre *TrkB*-mRNA-Gehalt bei 21 % O₂ wurde auf 1 gesetzt. **B**, Westernblot, auf dem die 145- und 95-kDa großen TrkB-Proteine, TrkB-FL und TrkB-T1, in Membranpräparationen von hypoxisch behandelten (1 % O₂, 16 h) Kelly-Zellen zu sehen sind. Die hypoxische Stimulation der Neuroblastomzellen wird durch die Expression des HIF-1 α -Proteins belegt. Die beiden TrkB-Isoformen konnten in den Membranpräparationen von Kelly-Zellen bei Normoxie (21 % O₂) nicht nachgewiesen werden. Die Detektion von β -Aktin bestätigt die gleichmäßige Proteinbeladung.

Die Westernblot-Daten wurden durch eine immunzytologische Färbung von normoxischen und hypoxischen Kelly-Zellen bestätigt, die zeigt, dass die Stimulation der TrkB-Expression bei 1 % O₂ nicht auf eine ausgewählte Subpopulation von Kelly-Zellen beschränkt war (Abb. 4.4).

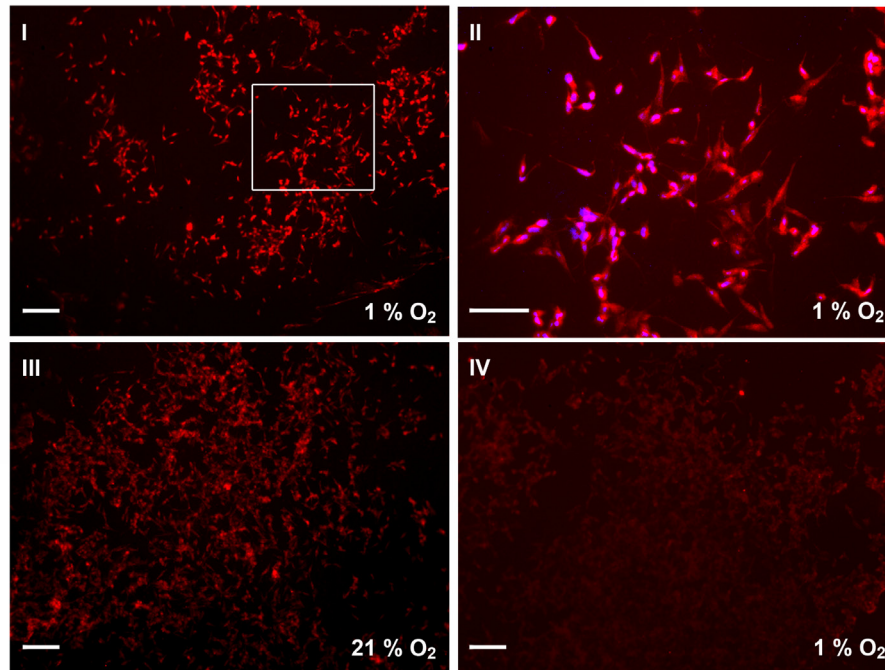


Abb. 4.4: Immunfärbung des TrkB-Proteins von Kelly-Zellen nach 16-stündiger Exposition bei 1 % O₂ (I, II) oder 21 % O₂ (III). Als Negativkontrolle diente die Inkubation der Zellen mit Normalziegenserum (IV). Dabei zeigte sich, dass die hypoxischen (I, II) im Vergleich zu normoxischen (III) Kelly-Zellen eine stärkere Färbung aufwiesen. Eine Gegenfärbung der Kerne mit DAPI (blau) ist in Feld II gezeigt, das eine Ausschnittvergrößerung des markierten Bereichs in Feld I darstellt. Die Markierung entspricht 200 µm.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Expression des membranständigen Neurotrophinrezeptors TrkB auf mRNA- und Proteinebene durch Inkubation unter Hypoxie (16 h, 1 % O₂) in verschiedenen neuronalen und nicht-neuronalen Zelllinien induzierbar ist.

4.2 Regulationsmechanismus *in vitro*

4.2.1 Transfektionen mit *TrkB*-Promotorkonstrukten

Zur Klärung des molekularen Mechanismus der verstärkten TrkB-Expression unter Hypoxie und Identifikation der beteiligten *cis*-Elemente im *TrkB*-Promotor, wurde die *TrkB*-Promotorsequenz

in silico analysiert. Die Analyse ergab 12 putative Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor HIF mit der Kernkonsensussequenz 5'-RCGTG-3', die zwischen -1967 und -35 bp upstream der Transkriptionsstartstelle des *TrkB*-Gens lagen (Abb. 4.5).

```

5' -GGCGAGGCCAGGAGAGCCGCGCACCCGGCCGGGCAGGGACGCGCAGGCGTCGGGCGCCGCTGGTTGCGCATCT
GGGCGCCAGAGCGCGCCCCAGCGCTGTGCCCGCCGCGACCCGGGCCATGGGCTGGTGTCTCCGGAGCGTGCCGGGC
GCTCTCTCCCGCGCGGGGGCACCCAGAGCCCTCGGAAGTGTCAAGCACTGCGGTGTATTTCCCGTTCTCTTTT
AAATGACTGCGGAAAAACAGATTCCGAGCCGCAAAAAGGGAAGACGGATTCTCAGACAAGGCTTGC AAAATGCCCGG
CAGCCATCATTTAACTGCACCCGAGAAATAGTTACGGTTTGTACCCGACCCTCCCGGATCGCCTAATTTGTGCC
TAGTGAGACCCCGAGGCTCTGCCCGCGCCTGGCTTCTTCGTAGCTGGATGCATATCGTGCTCCGGGCAGCGCGGG
CGCAGGGCACCGGTTCCGCGCACACCCCTAGCACACATGAACACGCGCAAGGTACGGCAGGGGAGCAAGGGCTTGGG
ATGCCCTACGTGGGGGTGGGCATCGCGGGGAGTGAATCCACGATCTGGGAATGGCTACATCCCGTCAGGTTAAAAG
GATGAGAGAAAAATGACGCGGCGCCACACATCGGACAGGCCAGGGTGGCCACCGAGCATTTAGAATACGCATCAGG
CGCGCTCCCTTCCCTCACATGTCTCTATTTCCCGGGCGTGTGATGGCAGAAAAACGGCAGGAAAAAGACCCACTT
AGAGAGCTAGAATTGTGTTGGAGACTCCCTTCCCTCTGCAAAAAGCACCAACAGGAAGCCCTCCAAAAACACCG
ATCCCCAAATAGGTGGCCCGGAATGGGGCGGTGATCCTTGGTTACCAATGCAGAACACGTTTTGGTGTTTACAA
CATTATTTATTTTATAGGATAGCTTGCCCTCCCTTTTAGGCAGGGTGGGAAAGGAGAACCGGGGAGGAGAAAGG
GAGGGAGGATTCCTATAATAAGAAATCAGCGCATTTTTCAGAGCTGAACCAAGCACGGTTTCCATTTCAAAAAGGG
AGACAGCCTCTACCGGATTGTAGAAGAGACTGTGGTGTGAATTAGGGACCGGAGGCGTGAACCGGAGGAACGG
TTCATCTTAGAGGTACCTGGATGTAATGCACACACACACAGACACACACGCGCGGCGTGCATGTCTACA
CGGCCAGGATGTGTGCGTGTGTGCGCGCGTGTGTGAATCCACATGCTGCTGCTGCTGCTTCTGGCCAGTGGC
ACCGATGCCTCCCTCCTCCCTGCTCGCCCCAGATTCCCTCCCTCCCTGGTGTCTTTGTCTGGAGGGTGTAT
GGGTTTGTGTGTATGAGCGTGTGTGTGTTTTGGATTTCAGACTAATTTTCTGGAGTTTCTGCCCTGCTCTG
CGTCAGCCCTCACGTCACCTTCGCCAGCAGTAGCAGAGGCGCGGGCGGCTCCCGGAATTGGGTTGGAGCAGGA
GCCTCGCTGGCTGCTTCGCTCGCGCTCTACGCGCTCAGTCCCGGGGAGCAGGAGCCTGGACCCAGGCGCCGC
CGCGGGGCGTGAGGCGCGGAGCCCGGGTGAAGCAGCGCAGATAGTCCCTCGGTCGCTCGGCCCTCACGTCTC
CCCTGGGGCGGCTCGGCTACTCCCAAGTGGGACGTGCCGCGCCACCTGCCCGCGCCACCGGCACCCAGCGGC
CGTGGCGGATTCTGCAGCATCATTCGGGGGCCCCGTCCGCGGAGCCAAAGCCGCGCGCAGTCTCCGCATTCCCTT
TAAAGGTCCTTCGCCCGCCTGTACCATGGAATCCTGTCTTGGGACCCCTTCCCTACCTCCCTCCCTTGGCC
TCAGGCTCGAAGAGAGAGTGGGCACACTGGTGGCTCCAGCGCGGTCAGTGCCATCGCGGGCAAGTTGATTCTGTG
GGCCGGAAGCTGGGCACTCATCCATCCACAGTCTCCGGGCTGGGGTGGGGTGGGATGACGCGAGCAGAGAGGGA
GAGTGCCCCAATTAGTGGTGTGGGGTCCTAGCTCAGTCTTACGCGTGTCTGTTTGTCTCAGCTCGAGGTG
CATACCGGACCCCAATTCGCATCTAACAAAGGAATCTCGCCCCAGAGAGTCCCGGGAGCGCCCGCGGTGGTGGC
CGGCGCGCGGGCCATGCAGCGACGGCCGCGCG-3'

```

Abb. 4.5: Dargestellt ist die Vorwärtsstrangsequenz des humanen *TrkB*-Promotorkonstrukts *pGL3-TrkB-2107* von -2107 bp bis +104 bp bzgl. des Transkriptionsstartpunktes. Die zwölf putativen HIF-Bindungsstellen sind durch Fettdruck und Unterstreichung hervorgehoben.

Um die funktionellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen zu lokalisieren, wurde ein ca. 2,1 kbp langes, humanes *TrkB*-Promotor-Reporterkonstrukt als Template für mehrere vom 5'-Ende her trunke Plasmide benutzt. Diese Konstrukte wurden transient in Kelly-Zellen transfiziert, die dann entweder bei 1 oder 21 % O₂ inkubiert wurden. Exposition bei 1 % O₂ aktivierte das Reporterkonstrukt *pGL3-TrkB-969* fast 5-fach, während *pGL3b-TrkB-878* durch Hypoxie nicht signifikant stimuliert wurde (Abb. 4.6A). Die Aktivität des leeren *pGL3basic*, der als Negativkontrolle diente, wurde durch Inkubation bei 1 % O₂ nicht verstärkt (Abb. 4.6A).

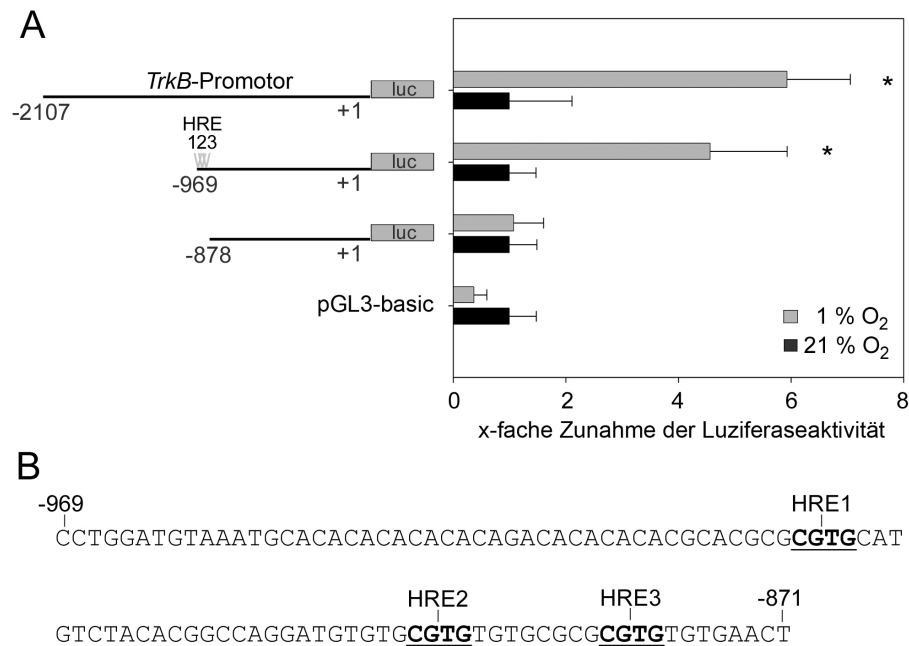


Abb. 4.6: **A**, Dargestellt sind die Luciferaseaktivitäten verschieden langer *TrkB*-Promotor-Reporterkonstrukte in transient transfizierten Kelly-Zellen. Die Längen der Reporterkonstrukte relativ zur Transkriptionsstartstelle sind in der Schemazeichnung ausgewiesen. Die transfizierten Zellen wurden für 16 h bei 1 bzw. 21 % O₂ inkubiert. Die hypoxiesensitive Region im *TrkB*-Promotor konnte auf eine 91-bp lange Region zwischen -969 und -878 bp upstream der Transkriptionsstartstelle eingegrenzt werden. Die Luciferaseaktivitäten wurden auf die Aktivität der β -Galaktosidase normalisiert, die als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz kotransfiziert worden war. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von n=3 Experimenten, jedes in Zweifachbestimmung gemessen (*P<0,05 gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂, Students gepaarter t-Test). **B**, Sequenz der hypoxieinduzierbaren Region im humanen *TrkB*-Promotor. Die drei vorhergesagten HREs sind gekennzeichnet.

Die hypoxiesensitive Region im *TrkB*-Promotor konnte mittels dieser Transfektionsexperimente einer 91 Nukleotide überspannenden Sequenz zwischen -969 und -878 bp relativ zur Transkriptionsstartstelle zugeordnet werden. Diese Sequenz enthielt drei putative HIF-Bindungselemente, die im Folgenden als Hypoxie-responsive Elemente (HRE)1 bis HRE3 bezeichnet wurden (Abb. 4.6B).

4.2.2 HIF-1 α - und HIF-2 α -Knockdown mittels RNA-Interferenz

Anschließend wurden die möglichen Rollen von HIF-1 und HIF-2 in der hypoxischen *TrkB*-Expression untersucht. Die HIFs umfassen eine Familie basischer Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren, die als Hauptregulatoren der Genexpression unter Sauerstoffmangel fungieren. Die meisten HIF-Zielgene werden von HIF-1 α induziert, während die Funktion von HIF-2 α nicht klar umrissen ist (für Details s. Kap.1.1.1).

Zur Analyse der individuellen Rollen der HIF- α -Isoformen in der Regulation von *TrkB* wurden Kelly-Zellen transient mit einem Luciferase-Reporterkonstrukt transfiziert, das ca. 2,1 kbp des

humanen *TrkB*-Promotors enthielt. Gleichzeitig wurde die Expression der HIF-Isoformen durch Kotransfektion spezifischer HIF-1 α bzw. HIF-2 α siRNAs gehemmt. Die transfizierten Zellen wurden bei 21 % O₂ mit dem Hypoxiemimetikum DP (100 μ M) für 16 h stimuliert. Die durch den *TrkB*-Promotor verursachte Luziferaseaktivität war in DP-behandelten vs. unbehandelten Kelly-Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, mehr als 6-fach erhöht (Abb. 4.7A). Die *TrkB*-Promotoraktivierung in der Anwesenheit von DP wurde durch Kotransfektion der siRNA gegen HIF-1 α signifikant reduziert, während der Knockdown von HIF-2 α keinen signifikanten Effekt auf die *TrkB*-Promotoraktivität hatte (Abb. 4.7A). Die Effizienz des siRNA-Knockdowns wurde mittels Westernblot-Detektion des Proteinsignals für HIF-1 α bzw. HIF-2 α in Kernextraktprotein von Kelly-Zellen überprüft. Wie erwartet waren HIF-1 α bzw. HIF-2 α in den entsprechend transfizierten Zellen deutlich reduziert, aber nicht komplett unterdrückt (Abb. 4.7B). Zusammen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die *TrkB*-Expression in hypoxischen Kelly-Zellen eher durch HIF-1 als durch HIF-2 stimuliert wird.

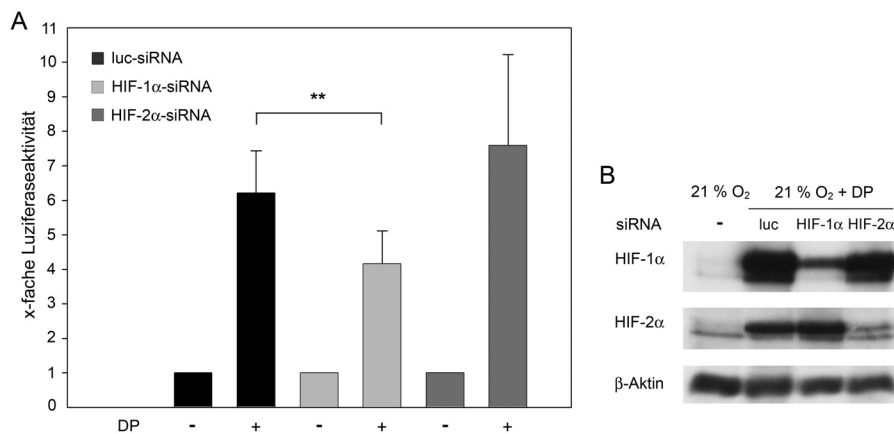


Abb. 4.7: **A**, Dargestellt ist die Aktivität eines Luziferase-Reporterkonstrukts, das ca. 2,1 kbp des humanen *TrkB*-Promotors enthält: *pGL3-TrkB-2107*. Vierundzwanzig Stunden nach transienter Transfektion mit dem Promotorkonstrukt wurden Kelly-Zellen mit spezifischen siRNAs gegen HIF-1 α bzw. HIF-2 α transfiziert. Eine siRNA gegen einen Teil der kodierenden Sequenz der Firefly-Luziferase des *pGL2basic*-Vektors (luc-siRNA) diente als Negativkontrolle. Die doppelt transfizierten Zellen wurden dann für 16 h bei 21 % O₂ mit oder ohne Zugabe von DP kultiviert. Der Graph zeigt die x-fache Zunahme der normalisierten Luziferaseaktivität in DP-behandelten vs. unbehandelten Zellen (Luziferaseaktivität in unbehandelten Zellen=1). Ungefähr 6-fach höhere Promotoraktivitäten wurden in DP-behandelten im Vergleich zu unbehandelten Kelly-Zellen gemessen, die mit der luc-siRNA transfiziert worden waren. Diese *TrkB*-Promotorstimulation durch DP wurde signifikant reduziert durch Transfektion der HIF-1 α , nicht aber der HIF-2 α siRNA. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von n=6 Experimenten, jedes in Zweifachbestimmung gemessen (**P<0,01 gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂, Students gepaarter t-Test). **B**, Repräsentativer Westernblot, der die reduzierte Proteinexpression von HIF-1 α und HIF-2 α in DP-behandelten Kelly-Zellen zeigt, die mit den entsprechenden siRNAs transfiziert worden waren. Dabei zeigte sich, dass die Inkubation mit den spezifischen siRNAs die HIF-Akkumulation in der Anwesenheit von DP nicht komplett unterdrückte. Die Detektion von β -Aktin bestätigte die gleichmäßige Proteinbeladung.

4.2.3 Regulation des *TrkB*-Promotors durch HIF-1 α

Um die Rolle von HIF-1 in der *TrkB*-Expression bei Sauerstoffmangel weitergehend zu untersuchen, wurde die HIF-1 α -defiziente embryonale Mausfibroblasten-Zelllinie MEF (60) benutzt. Diese und die korrespondierende Wildtyp-Zelllinie, die beide Allele für HIF-1 α besitzt, wurden transient mit dem ca. 2,1-kbp langen *TrkB*-Promotor-Reporterkonstrukt *pGL3-TrkB-2107* transfiziert und anschließend für 16 h entweder bei 1 oder 21 % O₂ inkubiert. Die *TrkB*-Promotoraktivität der transfizierten Wildtypzellen (MEF HIF-1 α ^{+/+}) war nach Hypoxieexposition mehr als 3-fach verstärkt (Abb. 4.8). Im Gegensatz dazu veränderte die Inkubation von HIF-1 α -defizienten MEF-Zellen (MEF HIF-1 α ^{-/-}) bei 1 % O₂ die *TrkB*-Promotoraktivität nicht signifikant (Abb. 4.8). In mit dem Leervektor *pGL3basic* transfizierten Zellen zeigte sich wie erwartet keine Zunahme der Luziferaseaktivität durch Hypoxieexposition (Abb. 4.8). Diese Ergebnisse zeigen, dass HIF-1 α für die Stimulation des *TrkB*-Promotors unter Sauerstoffmangel notwendig ist. Es ist erwähnenswert, dass die beiden MEF-Zelllinien sehr geringe Niveaus endogener *TrkB*-mRNA besitzen, die bei hypoxischer Inkubation unverändert bleiben (Daten nicht gezeigt).

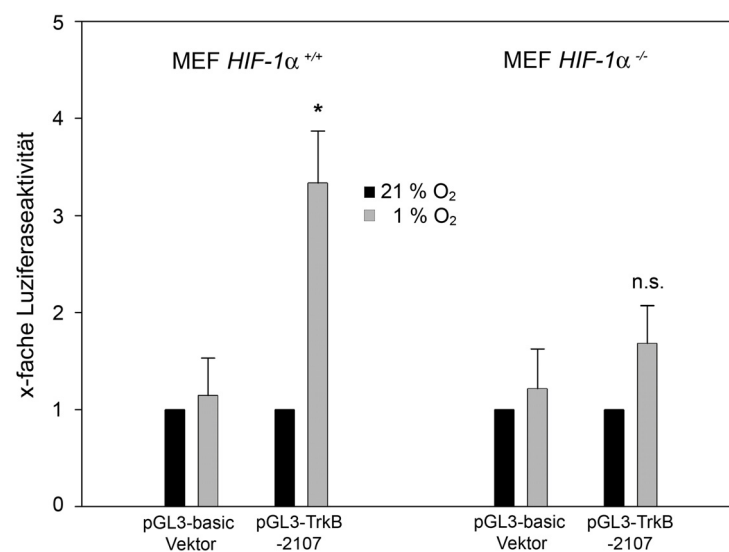


Abb. 4.8: Dargestellt ist die Aktivität eines Luziferase-Reporterkonstrukts, das ca. 2,1 kbp des humanen *TrkB*-Promotors enthält (*pGL3-TrkB-2107*), in Wildtyp- (MEF HIF-1 α ^{+/+}) und HIF-1 α -defizienten (MEF HIF-1 α ^{-/-}) murinen, embryonalen Fibroblasten. Die transient transfizierten Zellen wurden für 16 h entweder bei 1 oder 21 % O₂ inkubiert. Der Graph zeigt die x-fache Zunahme der normalisierten Luziferaseaktivität in hypoxischen vs. normoxischen Zellen (Luziferaseaktivität bei 21 % O₂=1). Die Luziferaseaktivität des Konstrukts *pGL3-TrkB-2107* wurde in Wildtyp-MEF-Zellen bei 1 % O₂ signifikant stimuliert, nicht aber in den HIF-1 α -defizienten MEF-Zellen. Das leere Plasmid *pGL3-basic* wurde als Negativkontrolle transfiziert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von n=5 Experimenten, jedes in Zweifachbestimmung gemessen (*P<0,05 gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂, Students gepaarter t-Test).

4.2.4 Lokalisation der HIF-Bindungsstellen im *TrkB*-Promotor

Elektrophoretische Mobilitätsshift Assays (EMSA) wurden mit Kernextrakten von normoxischen (21 % O₂) bzw. hypoxischen (1 % O₂, 5 h) Kelly-Zellen durchgeführt, um zu testen, ob HIF-1 an die identifizierten HREs im *TrkB*-Promotor bindet. Dazu wurden zwei verschiedene Oligonukleotide benutzt: Oligonukleotid *TrkB-HRE1* enthielt die vorhergesagte HRE1 und das Oligonukleotid *TrkB-HRE2/3* die HRE2 und HRE3 (Abb. 4.9B).

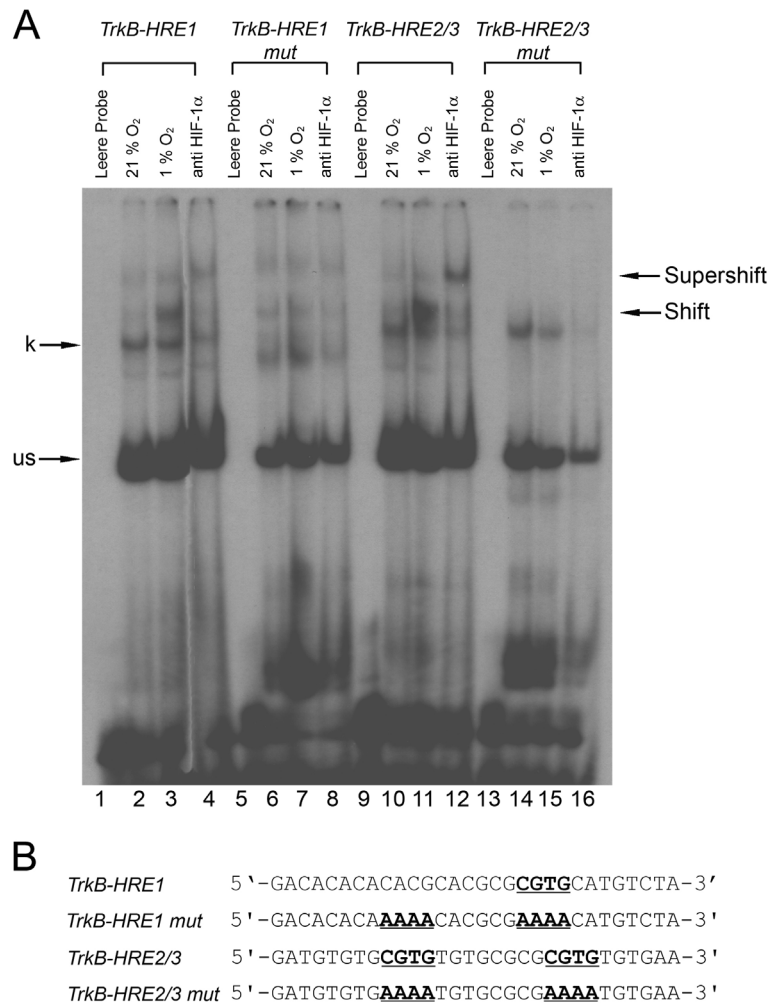


Abb. 4.9: **A**, Dargestellt ist ein EMSA, der die Bindung von Kernextraktprotein hypoxischer (1 % O₂, 5 h) Kelly-Zellen an die vorhergesagten HREs im humanen *TrkB*-Promotor zeigt. Die Bindungsreaktionen wurden mit 5'-terminal markierten Oligonukleotiden und 5 μ g Kernextrakt durchgeführt. Die Proben wurden auf ein nicht-denaturierendes 4 % Polyacrylamidgel geladen und 4 h bei 4 °C aufgetrennt. Die Komplexbildung wurde durch Autoradiographie der getrockneten Gele sichtbar gemacht. Zusätzlich zum Auftreten von unspezifischen (us) und konstitutiven Signalen (k) bekam man eine Retardierungsbande („Shift“) mit Kernextrakten von hypoxischen Kelly-Zellen (Spuren 3 und 11). Diese Retardierungsbande wurde in normoxischen (21 % O₂) Kernextrakten nicht detektiert (Spuren 2 und 10). Die Komplexe konnten supergeschiftet werden durch Inkubation mit einem spezifischen HIF-1 α -Antikörper („Supershift“, Spuren 4 und 12). Die Mutation der HIF-Erkennungssequenz in zwei Oligonukleotiden (*TrkB-HRE1mut* und *TrkB-HRE2/3mut*) resultierte im Verlust der spezifischen Bindung von hypoxischem Kelly-Zellkernextrakt (Spuren 7 und 15). **B**, Sequenz der Oligonukleotide, die für die EMSA-Experimente verwendet wurden. Die HRE-Kernsequenzen und die korrespondierenden Mutationen sind unterstrichen und fett dargestellt.

Neben der bereits beschriebenen, konstitutiven Bindung an die HIF-1 Erkennungssequenz ((61), Abb. 4.9A, „k“) wurde eine zusätzliche Retardierungsbande mit den Kernextrakten von hypoxischen (1 % O₂), nicht aber von normoxischen (21 % O₂) Kelly-Zellen erhalten (Abb. 4.9A, „Shift“). Diese Komplexe konnten durch Inkubation mit einem monoklonalen HIF-1 α -Antikörper weiter retardiert werden (Abb. 4.9A, „Supershift“), was beweist, dass die Bindungsaktivität in dem hypoxischen Kernextrakt tatsächlich HIF-1-Protein war. Entsprechend resultierte eine Mutation der HIF-1-Erkennungssequenz in zwei Oligonukleotiden, *TrkB-HRE1mut* und *TrkB-HRE2/3mut* (Abb. 4.9B), in einem Verlust der Bindung von Kernextrakten aus hypoxischen Kelly-Zellen (Abb. 4.9A).

Es wurde zusätzlich untersucht, ob Inaktivierung der identifizierten HIF-1-Bindungs-elemente die Transkriptionsantwort des Plasmids *pGL3-TrkB-969* unter Hypoxie beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden in diesem *TrkB*-Promotor-Reporterkonstrukt dieselben Basenpaare mutiert wie in den EMSA-Nukleotiden. Verglichen mit dem Wildtypkonstrukt, *pGL3-TrkB-969*, führte die kombinierte Mutation von HRE2 und HRE3 zu einer ca. 50 %-igen Reduktion der Reporteraktivität unter Hypoxie (1 % O₂). Durch zusätzliche Mutation der HRE1 im *pGL3-TrkB-969* wurde die Abnahme statistisch signifikant (Abb. 4.10). Das Mutationskonstrukt, dem die HRE1 bis HRE3 fehlten, konnte auch nicht durch Behandlung der transfizierten Kelly-Zellen mit DP aktiviert werden (Daten nicht gezeigt).

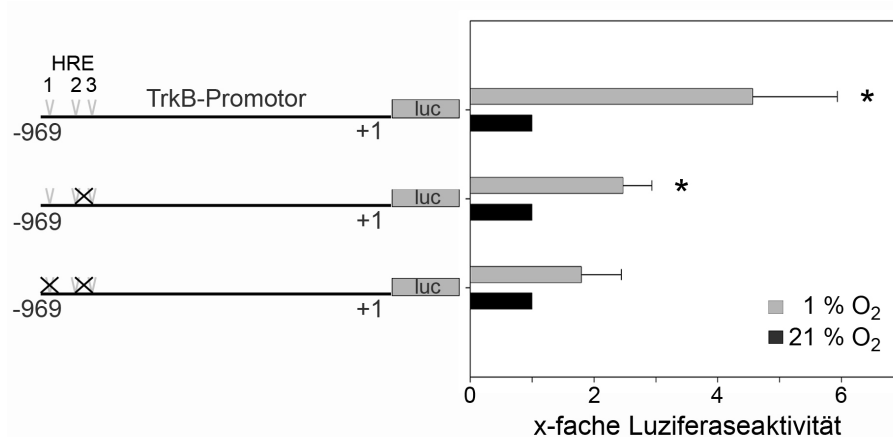


Abb. 4.10: Dargestellt ist die transkriptionelle Aktivität eines 969 bp langen Wildtyp-*TrkB*-Promotorkonstrukts (oberstes) und zweier Plasmide, die in den identifizierten HREs Mutationen tragen. Kelly-Zellen wurden mit den angegebenen Promotorkonstrukten und dem β -Galaktosidase-Plasmid zur Normalisierung auf die Transfektionseffizienz transient kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 16 h bei 1 bzw. 21 % O₂ inkubiert. Die kombinierte Mutation der HRE2 und HRE3 resultierte in einer nicht signifikanten Reduktion der Promotoraktivität bei 1 % O₂. Die Einführung von Mutationen in allen drei HREs (HRE1-HRE3, Sequenz s. Abb. 4.9B) unterband die *TrkB*-Promotorstimulation unter Hypoxie. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von n=3 Experimenten, jedes in Zweifachbestimmung gemessen (*P<0,05 gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂, Students gepaarter t-Test).

Eine ChIP-Analyse wurde durchgeführt, um zu testen, ob HIF-1 mit dem *TrkB*-Promotor auch in der natürlichen chromosomalen Konfiguration *in vivo* interagiert. Dabei ergab sich bei gleicher Menge an Input-DNA eine verstärkte Bindung von HIF-1 an den *TrkB*-Promotor in hypoxischen (1 % O₂, 5 h) im Vergleich zu normoxischen (21 % O₂) Kelly-Zellen (Abb. 4.11). Die Immunpräzipitation mit Maus-IgG diente als Negativ- und die mit einem Antikörper gegen Acetylhiston 3 als Positivkontrolle (Abb. 4.11).

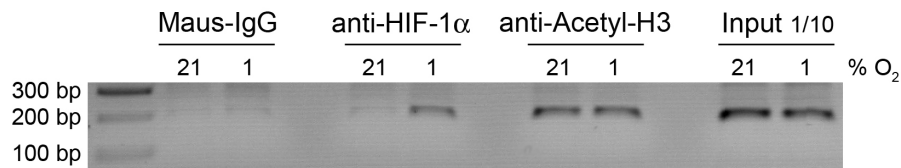


Abb. 4.11: Dargestellt ist ein repräsentativer ChIP-Assay, der die Interaktion von HIF-1 mit dem *TrkB*-Promotor in hypoxischen Kelly-Zellen zeigt. Aufgrund der besseren Sichtbarkeit der DNA-Banden ist das Originalagarosegel invers dargestellt. Es zeigte sich, dass die Bindung von HIF-1 an die den *TrkB*-Promotor repräsentierenden PCR-Produkte nur mit Kelly-Zellen erhalten wurde, die bei 1 % O₂, nicht aber bei 21 % O₂ inkubiert worden waren. Die Bindung von Acetylhiston 3 an den *TrkB*-Promotor diente als Positiv-, die Inkubation der Zellen mit Maus-IgG als Negativkontrolle. Die Inputkontrolle (1/10 Volumen) bestätigt, dass für normoxische und hypoxische Proben gleich viel DNA als PCR-Template eingesetzt worden war.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die unter Hypoxie verstärkte *TrkB*-Expression durch die Interaktion des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF)-1 mit drei Bindungsstellen im *TrkB*-Promotor vermittelt wird.

4.3 Auswirkungen der hypoxischen *TrkB*-Expression auf die Migration isolierter Neuroblastomzellen

Zuletzt wurden die funktionellen Konsequenzen der *TrkB*-Expression in der Neuroblastomzelllinie Kelly unter Hypoxie analysiert. Vorangegangene Studien hatten bereits gezeigt, dass der *TrkB*/BDNF-Signalweg die Zellmigration im Nervensystem und in nicht-neuronalen Geweben reguliert (62-64).

Daher wurde untersucht, ob das Migrationspotenzial der Neuroblastomzellen SY5Y-h*TrkB*-FL, die stabil mit einem h*TrkB*-FL-Expressionsplasmid transfiziert waren, im Vergleich zu den Wildtypzellen SH-SY5Y verändert war. Dazu wurden Migrationsassays durchgeführt, in denen 10 % FKS als Chemoattraktant diente. Wie aus Abb. 4.12 zu entnehmen, war das

Migrationspotenzial der hTrkB-FL-überexprimierenden SH-SY5Y mit knapp 6-fach im Vergleich zu den Wildtypzellen SH-SY5Y signifikant erhöht. Die Expression des TrkB-Rezeptors scheint bei der Zellmigration also eine Rolle zu spielen.

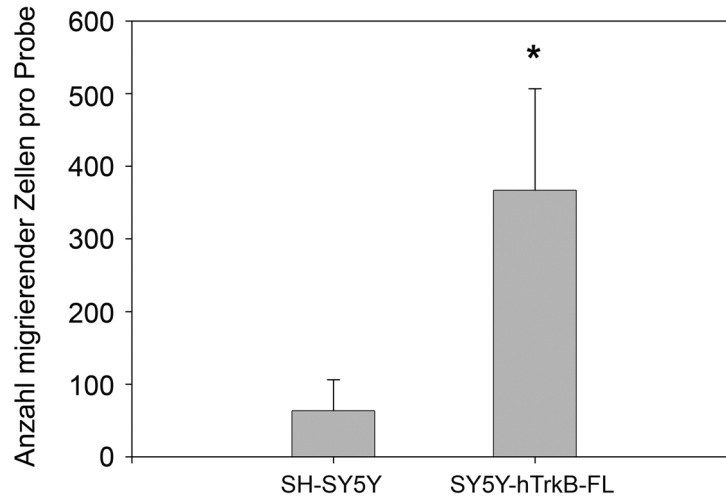


Abb. 4.12: Dargestellt sind Ergebnisse von Migrationsassays bei 21 % O₂ von SH-SY5Y Wildtypzellen im Vergleich zu SH-SY5Y, die stabil mit einem hTrkB-FL-Überexpressionskonstrukt transfiziert waren: SY5Y-hTrkB-FL. Die Zellen (37.500 Zellen pro Insert) wurden in serumfreies Kulturmedium in das obere Transwell-kompartiment ausgesät und für 22 h bei 21 % O₂, 5 % CO₂ inkubiert. Als Chemoattraktant diente 10 % fötales Kälberserum im unteren Kompartiment. Danach wurden die Membranen (8 µm Porendurchmesser) mit Toluidinblau gefärbt und die migrierten Zellen auf der Unterseite gezählt. Die Zellmigration war knapp 6-fach erhöht in TrkB-FL-überexprimierenden vs. Wildtyp-SH-SY5Y-Zellen. Die Werte sind Mittelwerte ± SD von n=3 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen (*P<0,05 gegen die Wildtyp-SH-SY5Y, Students t-Test).

Daher wurde nun untersucht, ob Exposition unter Hypoxie das Migrationspotenzial der Kelly-Zellen beeinflusst. Dazu wurden Migrationsassays mit Zellen durchgeführt, die zuvor 24 h entweder bei 1 oder 21 % O₂ inkubiert worden waren, um die TrkB-Expression zu stimulieren. Wie in Abb. 4.13 dargestellt verdoppelte sich in Kelly-Zellen, die bei 1 % O₂ präexponiert worden waren, bei Verwendung des TrkB-Liganden BDNF als Chemoattraktant die Anzahl migrierender Zellen im Vergleich zu solchen mit normoxischer Präinkubation. Die Zellmigration unter Hypoxie und bei 21 % O₂ war in Abwesenheit des TrkB-Liganden BDNF signifikant reduziert (Abb. 4.13). Die Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor K252a reduzierte die Anzahl migrierender Zellen unter Normoxie und Hypoxie ebenfalls signifikant (Abb. 4.13). Das TrkB/BDNF-System ist also für die Migration der Kelly-Zellen unter Normoxie und Hypoxie notwendig. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verstärkte TrkB-Expression unter Hypoxie für das verstärkte Migrationspotenzial der Neuroblastomzellen unter Hypoxie verantwortlich ist.

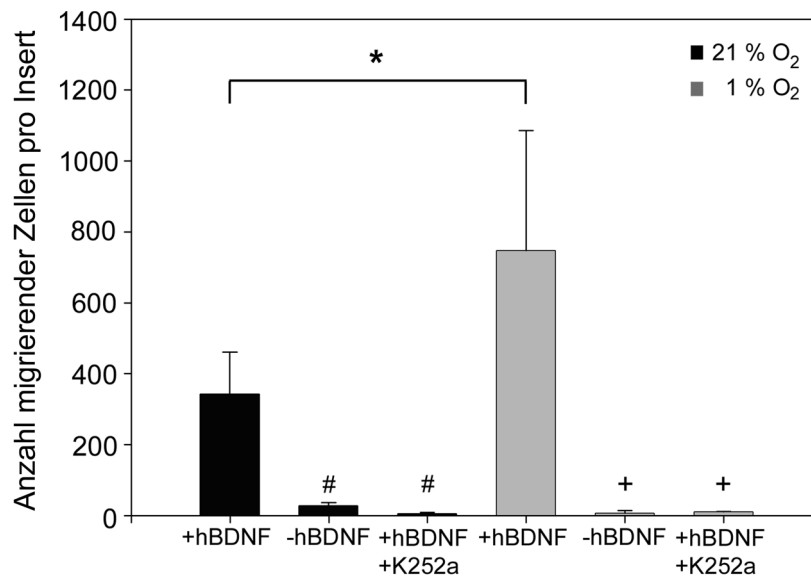


Abb. 4.13: Dargestellt sind die Resultate von Migrationsassays von Kelly-Zellen, die für 24 h entweder bei 1 oder 21 % O₂ präinkubiert worden waren, um die TrkB-Expression zu stimulieren. Die Zellen (77.000 Zellen pro Insert) wurden in serumfreies Kulturmedium in das obere Transwellkompartiment ausgesät und für 27 h bei 21 % O₂, 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Membranen (8 µm Porendurchmesser) mit Toluidinblau gefärbt und die migrierten Zellen auf der Unterseite gezählt. Die Zellmigration war ca. 2-fach erhöht in ex-hypoxischen vs. normoxischen Kelly-Zellen. Die Anzahl migrierender Zellen war durch Weglassen des TrkB-Liganden BDNF als Chemoattraktant im unteren Kompartiment signifikant reduziert. Ebenso unterdrückte die Inkubation mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor K252a die Migration der normoxischen (21 % O₂) und ex-hypoxischen (1 % O₂) Kelly-Zellen fast vollständig. Die Werte sind Mittelwerte ± SD von n=5 Experimenten, jedes in Dreifachbestimmung gemessen (*P<0,05 gegen die entsprechende Kontrolle bei 21 % O₂, Students t-Test). Die Symbole (#, +) zeigen die statistische Signifikanz (P<0,05, Students t-Test) gegenüber den entsprechenden Kontrollen bei 21 (#) und 1 % O₂ (+).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die durch Hypoxie verstärkte TrkB-Expression in der Neuroblastom-Zelllinie Kelly zu einer Steigerung des Migrationspotenzials führte, was durch Weglassen des Liganden BDNF bzw. den Tyrosinkinase-Inhibitor K252a verhindert werden konnte.

4.4 Überprüfung der Relevanz der hypoxischen TrkB-Induktion *in vivo*

4.4.1 Expression der Neurotrophinrezeptoren unter Hypoxie *in vivo*

Um festzustellen, ob die Expression der unterschiedlichen Neurotrophinrezeptoren, besonders von TrkB, *in vivo* sauerstoffabhängig reguliert ist, wurden Ratten für 6 h entweder bei Raumluft (21 % O₂) oder normobarer, systemischer Hypoxie (8 % O₂) exponiert. Dieses Protokoll wurde

gewählt, weil bereits gezeigt worden war, dass es sauerstoffregulierte Gene in verschiedenen Geweben *in vivo* zuverlässig induziert (65;66). Die mRNA-Niveaus der Neurotrophinrezeptoren wurden mittels quantitativer Real-time RT-PCR auf der Basis von $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werten festgestellt. Der markanteste Befund war eine fast 15-fache Zunahme der *TrkB*-mRNA-Menge in den Lungen hypoxischer vs. normoxischer Ratten (Abb. 4.14A). Die *TrkB*-Expression wurde in keinem anderen untersuchten Organ (Niere, Herz, Gehirn, Leber, Milz) durch Hypoxie signifikant stimuliert (Abb. 4.14B-F). Der *TrkB*-Ligand BDNF wurde ebenfalls im Lungengewebe exprimiert und zeigte eine signifikante, ca. 2,5-fache Zunahme der Transkripte in Lungen hypoxischer vs. normoxischer Ratten (Abb. 4.14A). Zum Vergleich wurde auch der mRNA-Gehalt der anderen Neurotrophinrezeptoren in normoxischen und hypoxischen Geweben bestimmt. Dabei reduzierte die Exposition von Ratten bei 8 % O₂ die Transkripte des niedrig affinen Neurotrophinrezeptors *p75^{NTR}* in den Lungen hypoxischer Ratten signifikant (Abb. 4.14A).

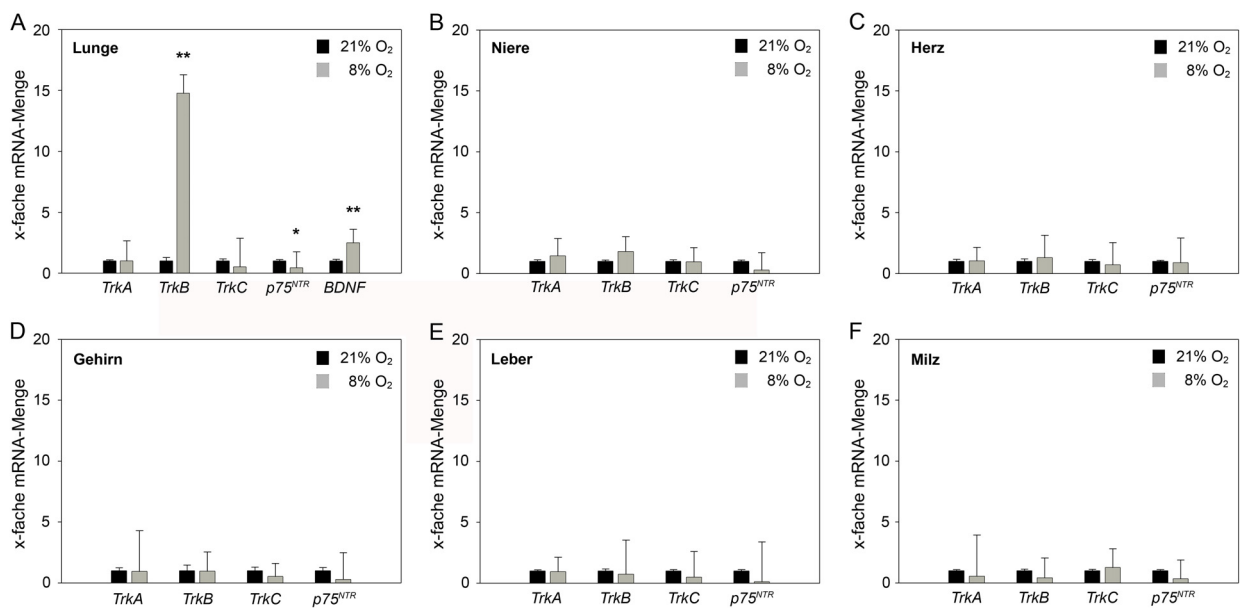


Abb. 4.14: Dargestellt ist die Expression der Neurotrophinrezeptoren in verschiedenen Rattenorganen. Die Tiere wurden für 6 h entweder bei 21 % oder 8 % O₂ exponiert und anschließend die mRNA-Niveaus mittels Real-time RT-PCR gemessen. Die relativen Genexpressionsniveaus in normoxischen und hypoxischen Organen wurden auf der Grundlage von Differenzen der Ct-Werte bestimmt. Von den Ct-Werten der interessierenden Gene wurden die Ct-Werte von β -Aktin abgezogen, um ΔCt -Werte zu erhalten. Die Differenzen der mRNA-Niveaus zwischen normoxischen und hypoxischen Ratten wurden als $\Delta\text{Ct}(\text{Normoxie}) - \Delta\text{Ct}(\text{Hypoxie})$ berechnet. Die x-fache Zunahme der mRNA wurden über die Gleichung $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ erhalten. Die für die PCR verwendeten Primer waren nicht selektiv für die alternativ gespleißten *TrkB*-mRNAs. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von jeweils n=5 normoxischen bzw. hypoxischen Tieren, jedes in Zweifachbestimmung gemessen (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂, Student's t-Test).

4.4.2 Gewebebeschränkung der Hypoxieeffekte *in vivo*

Als nächstes wurde untersucht, ob die Unfähigkeit der meisten Organe, mit einer Änderung der *TrkB*-mRNA auf Sauerstoffmangel zu reagieren, auf einen gewebespezifischen Genregulationsmechanismus hinweist oder ob diese durch eine lokale Beschränkung der Hypoxie auf die Lungen begründet war. Zu diesem Zweck wurden die mRNA-Niveaus von *Vaskulärem Endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF)* und *Glukosetransporter-1 (GLUT-1)* als Marker für Hypoxie gemessen, da beide Gene in vielen Geweben unter Sauerstoffmangel exprimiert werden. So wurden auch unter systemischer Hypoxie eventuell auftretende systemisch-kompensatorische Effekte ausgeschlossen. Dabei zeigte sich, dass die Expression von jeweils mindestens einem der für *VEGF* oder *GLUT-1* kodierenden Gene durch Hypoxie in allen untersuchten Organen signifikant stimuliert worden war (Abb. 4.15), was darauf hindeutet, dass eine hypoxieinduzierte Genexpression in allen untersuchten Geweben auftrat.

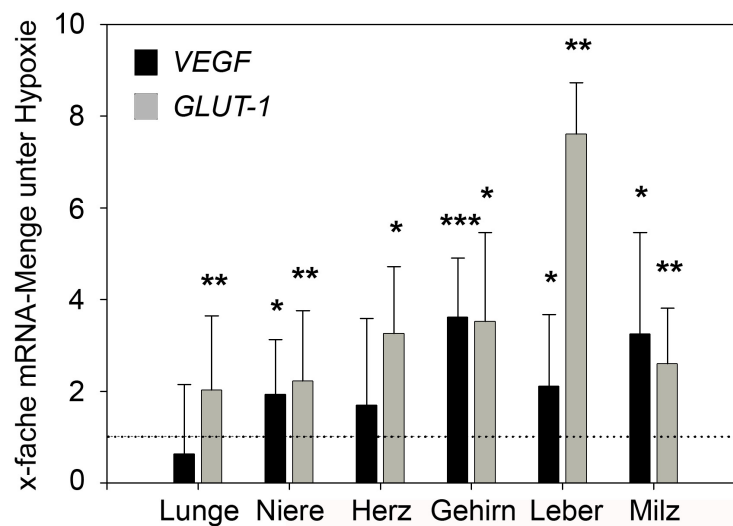


Abb. 4.15: Relativer mRNA-Gehalt von *Vaskulärem Endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF)* und *Glukosetransporter-1 (GLUT-1)* in verschiedenen Organen von hypoxischen (6 h, 8 % O₂) im Vergleich zu normoxischen (21 % O₂) Ratten. Die Berechnung der relativen mRNA-Menge erfolgte wie in Abb. 4.14 beschrieben. Die gepunktete Linie zeigt das Genexpressionsniveau bei 21 % O₂ (=1) an. Dabei zeigte sich, dass die Expression von jeweils mindestens einem der für *VEGF* oder *GLUT-1* kodierenden Gene durch Hypoxie in allen untersuchten Organen signifikant stimuliert worden war. Die Werte sind Mittelwerte ± SD von jeweils n=5 normoxischen bzw. hypoxischen Tieren, jedes in Zweifachbestimmung gemessen (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂, Students t-Test).

4.4.3 Regulation des Spleißvorgangs unter Hypoxie *in vivo*

Es existieren mehrere *TrkB*-Isoformen mit unterschiedlichen physiologischen Funktionen, die durch alternatives Spleißen der prä-mRNA entstehen. Es wurde ein monoklonaler Antikörper

benutzt, der beide Protein-Isoformen, die 145 kDa full-length (TrkB-FL) und die 95 kDa trunkierte (TrkB-T1), erkannte, um die TrkB-Expression mittels Westernblot zu beurteilen. Die Expression der beiden TrkB-Isoformen war in hypoxischen vs. normoxischen Rattenlungen deutlich induziert (Abb. 4.16A). Besonders das TrkB-T1-Protein, das als dominant-negativer Inhibitor von TrkB-FL betrachtet wird (22), aber auch unabhängig von TrkB-FL in der Kalzium-abhängigen Signaltransduktion wirken kann (27), schien durch Hypoxie stärker exprimiert als die TrkB-FL-Isoform (Abb. 4.16A). Eine Real-time RT-PCR wurde durchgeführt, um die verschiedenen *TrkB*-mRNA-Spleißvarianten in Lungengewebe von normoxischen und hypoxischen Tieren zu messen. Die Exposition von Ratten bei 8 % O₂ verstärkte beide *TrkB*-Transkripte ca. 14-fach, demnach blieb ihr Expressionsverhältnis (Normoxie vs. Hypoxie) unverändert (Abb. 4.16B). Das Spleißen der *TrkB*-prä-mRNA ist folglich nicht sauerstoffabhängig reguliert.

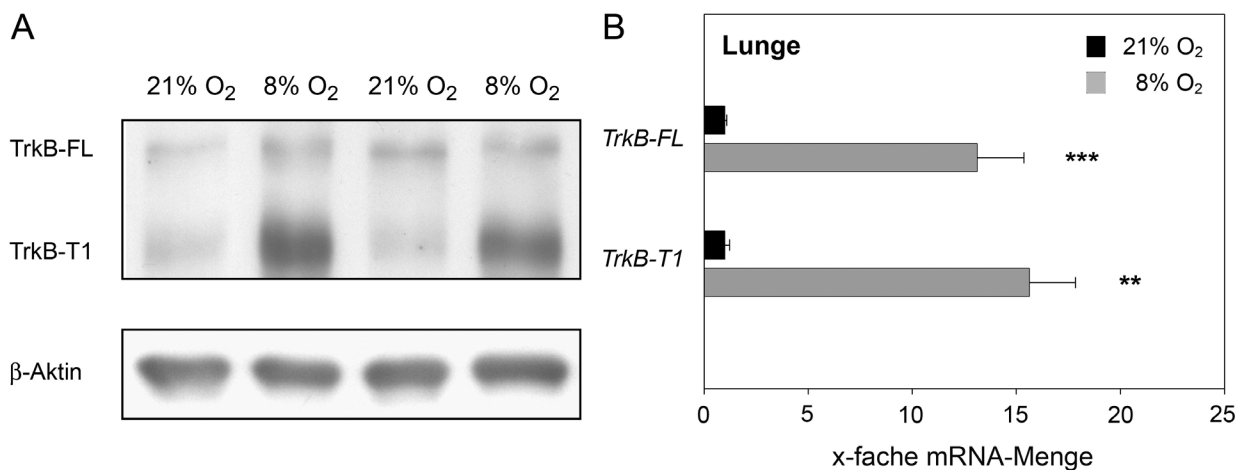


Abb. 4.16: **A**, Repräsentativer Westernblot, auf dem die 145- und 95-kDa großen TrkB-Proteine, TrkB-FL und TrkB-T1, in Lungen-Membranpräparationen von hypoxischen (6 h, 8 % O₂) im Vergleich zu normoxischen (21 % O₂) Ratten zu sehen sind. Der Westernblot gegen β -Aktin bestätigt die gleichmäßige Proteinbeladung. **B**, Dargestellt ist die mRNA-Expression des *full-length* *TrkB*-Neurotrophinrezeptors (*TrkB-FL*) und einer trunkierten Spleißvariante (*TrkB-T1*), der die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne fehlt, in Lungengewebe von normoxischen und hypoxischen Ratten. Die Berechnung der relativen mRNA-Menge erfolgte wie in Abb. 4.14 beschrieben. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von jeweils n=5 normoxischen bzw. hypoxischen Tieren, jedes in Zweifachbestimmung gemessen (**P<0,01, ***P<0,001 gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂, Students t-Test).

4.4.4 Lokalisation der TrkB-Expression in der Rattenlunge

Mittels *in situ* mRNA-Hybridisierung wurden die Orte der *TrkB*-Expression in Lungengewebe unter Normoxie und Hypoxie identifiziert. Mit spezifischen RNA-Sonden für *TrkB-FL* und *TrkB-T1* ließen sich die Basalzellen des Bronchialepithels normoxischer Ratten anfärben (Abb. 4.17A/B). Die Zilien blieben ungefärbt, waren aber durch die Instillation zum großen Teil

abgeschilfert. Durch die Exposition der Ratten bei 8 % O₂ wurde die Signalintensität der *TrkB*-mRNA-Detektion im Bronchialepithel verstärkt und zusätzlich war eine Expression in den alveolären Epithelzellen festzustellen (Abb. 4.17A/B). Die immunhistochemische Färbung mit einem polyklonalen Antikörper gegen beide Protein-Isoformen, TrkB-FL und TrkB-T1, bestätigte die mittels *in situ* mRNA-Hybridisierung identifizierten Orte der TrkB-Expression in der Rattenlung (Abb. 4.17C).

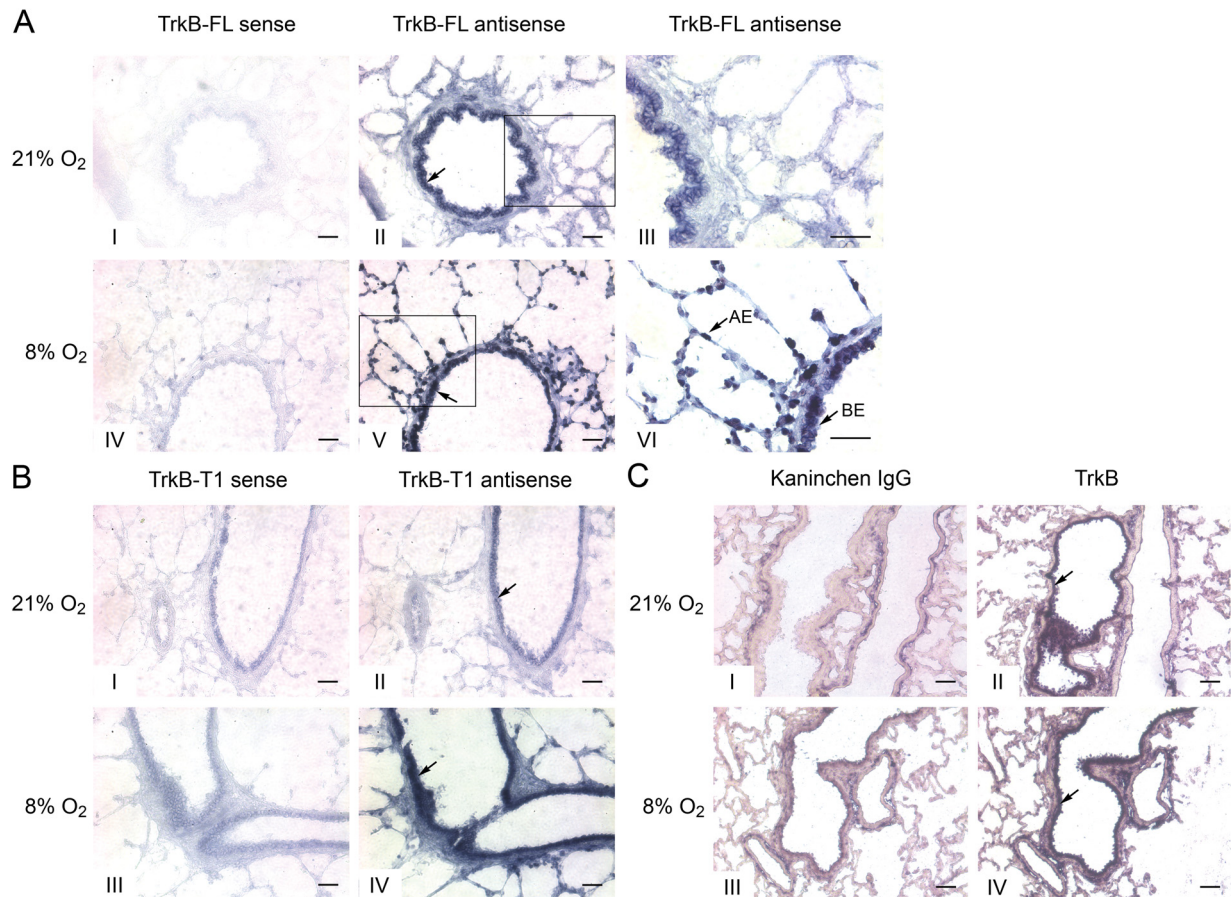


Abb. 4.17: Dargestellt ist eine *in situ* mRNA-Hybridisierung des *full-length* *TrkB*-Neurotrophinrezeptors (*TrkB-FL*, Feld **A**) und einer Spleißvariante, der die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne fehlt (*TrkB-T1*, Feld **B**) auf Lungengewebschnitten von normoxischen (21 % O₂) und hypoxischen (6 h, 8 % O₂) Ratten. Die Detektion der RNA-Sonden wurde mit einem AP-gekoppelten Digoxigenin-Antikörper erreicht. Die Hybridisierung mit den korrespondierenden Sense-RNA-Sonden diente als Negativkontrolle. Pfeile kennzeichnen die spezifischen Hybridisierungssignale in alveolären Epithelzellen (AE) und den Basalzellen des Bronchialepithels (BE). Die mikroskopischen Abbildungen sind repräsentativ für 18 Gewebeschnitte von je 3 normoxischen und hypoxischen Tieren. Die Markierung entspricht 100 μ m. **C**, Immunfärbung von TrkB auf Lungenschnitten von normoxischen und hypoxischen Ratten. Die Experimente wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen beide TrkB-Proteine, TrkB-FL und TrkB-T1, ausgeführt. Die Inkubation der Gewebeschnitte mit Normalkaninchen-IgG diente als Negativkontrolle. Der Primärantikörper wurde mit Peroxidase-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG detektiert. Pfeile kennzeichnen die TrkB-Immunreaktivität in denselben Zellen wie in der *in situ* mRNA-Hybridisierung. Die mikroskopischen Abbildungen sind repräsentativ für 18 Gewebeschnitte von je 3 normoxischen und hypoxischen Tieren. Die Markierung entspricht 100 μ m.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die TrkB-Expression auf mRNA- und Proteinebene durch die Exposition von Ratten bei systemischer Hypoxie (6 h, 8 % O₂) in den Basalzellen des Bronchialepithels und den alveolären Epithelzellen induziert wurde.

4.5 Auswirkungen der hypoxischen TrkB-Expression auf das kontraktile Verhalten isolierter Atemwegssegmente der Ratte

Neurotrophine und ihre Rezeptoren modulieren die Spannung der glatten Atemwegsmuskulatur und tragen eventuell zur Atemwegshyperreaktivität im Asthma bronchiale bei (67-70). Daher wurde untersucht, ob die Aktivierung des TrkB/BDNF-Signalwegs als Antwort auf Hypoxie die mechanische Atemwegsfunktion beeinträchtigt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Kraftmessungen an isometrisch kontrahierenden Trachealsegmenten von Ratten durchgeführt, die es erlaubten, die TrkB-Rezeptoraktivität pharmakologisch zu manipulieren. Die Gewebeproben wurden frisch aus Tracheen von Ratten präpariert, die für 6 h entweder bei 21 % oder 8 % O₂ gehalten worden waren, um die TrkB-Expression zu stimulieren. Diese blieb über die Präparations- und Experimentierzeit hinweg erhalten (Daten nicht gezeigt). Es wurden charakteristische, sigmoide Dosis-Wirkungskurven der Atemwegsspannung erhalten, indem die Endkonzentration von Acetylcholin (ACh) stufenweise von 10⁻⁹ auf 10⁻³ M gesteigert wurde (Abb. 4.18A). Die Maximalspannung der isolierten Trachealsegmente betrug 8,1 ± 0,5 mN/mm bei normoxischen bzw. 6,6 ± 0,6 mN/mm bei hypoxischen Ratten (Abb. 4.18A). Die Zugabe des TrkB-Liganden hBDNF (50 ng/mL Endkonzentration) zur Badlösung hatte keinen Effekt auf die Spannungsentwicklung der Trachealsegmente der Ratten bei 21 % O₂ (Abb. 4.18B), erhöhte aber die Maximalspannung der Trachealsegmente hypoxischer Ratten signifikant (Abb. 4.18C). Die Zugabe des Tyrosinkinase-Inhibitors K252a (100 nM) verhinderte diesen BDNF-Effekt (Abb. 4.18D).

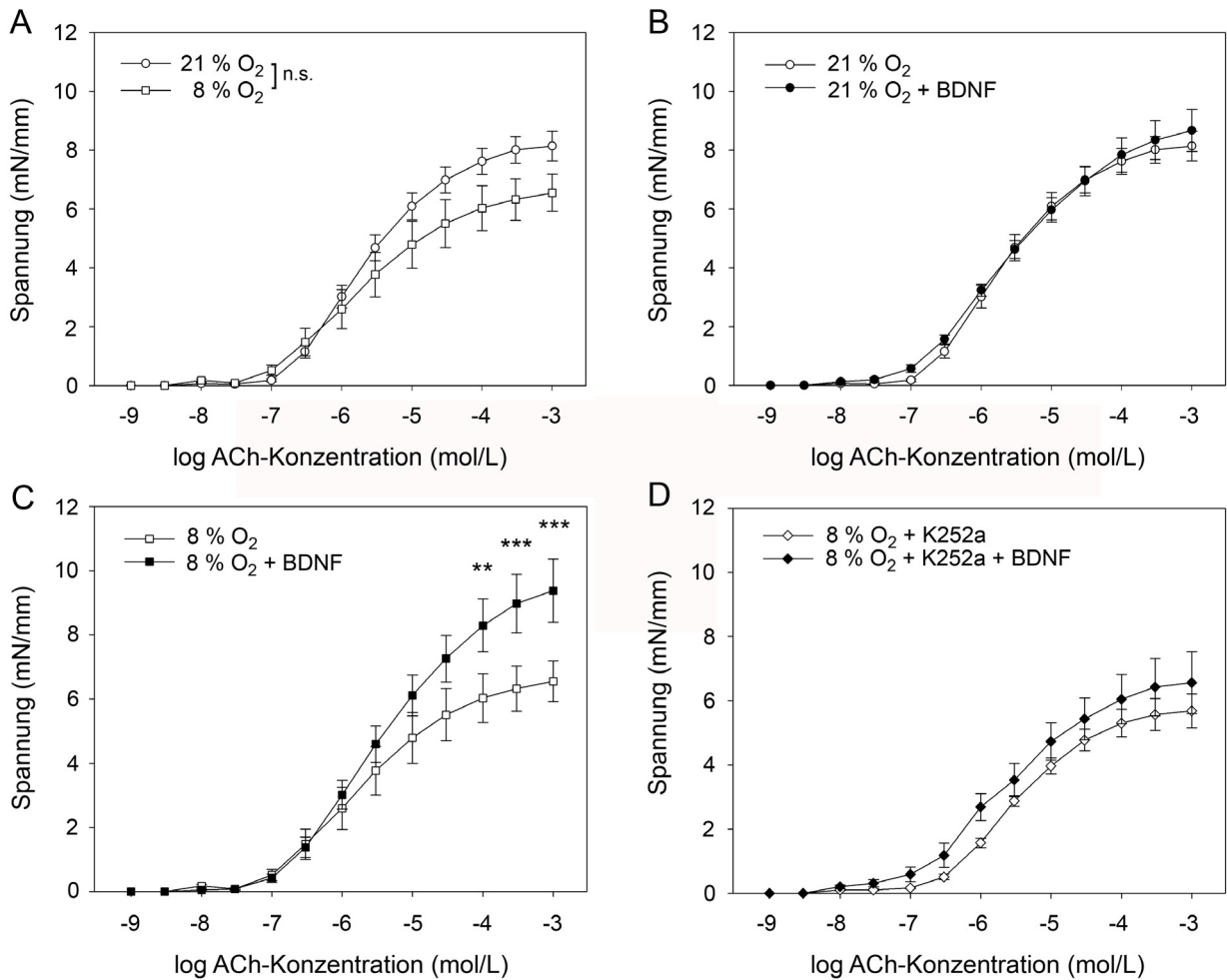


Abb. 4.18: Dargestellt ist die Spannung von isometrisch kontrahierenden Trachealsegmenten in Gegenwart von Acetylcholin (ACh). Die Gewebeprobe wurde sofort nach Exposition der Ratten bei 21 % O₂ oder 8 % O₂ zur Stimulation der TrkB-Expression frisch präpariert. Die Atemwegsspannung wurde als Verhältnis der entwickelten Kraft zur geringsten Weite der Trachealsegmente berechnet. Steigende ACh-Konzentrationen (10⁻⁹ bis 10⁻³ M) führten zu sigmoiden Dosis-Wirkungskurven in Präparationen von normoxischen und hypoxischen Ratten (Feld **A**). Präinkubation mit dem TrkB-Liganden BDNF verstärkte die Kontraktionsantwort auf höhere ACh-Konzentrationen in hypoxischen Präparationen signifikant (Feld **C**), nicht aber in normoxischen (Feld **B**). Dieser BDNF-Effekt wurde durch Vorbehandlung der Trachealsegmente mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor K252a verhindert (Feld **D**). Die Werte sind Mittelwerte ± SEM von jeweils n=5 normoxischen bzw. hypoxischen Tieren, jedes in Zweifachbestimmung gemessen (**P<0,01, ***P<0,001 gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂, zweiseitige ANOVA).

Da der Neurotrophinrezeptor TrkB vor allem in Bronchialepithelzellen exprimiert wird (Abb. 4.17), sollte die Entfernung des Epithels von hypoxischen Trachealsegmenten im Unvermögen von BDNF resultieren, die Maximalspannung in Anwesenheit von ACh zu verstärken. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das Epithel der Trachealsegmente vorsichtig abgeschabt, ohne die darunter liegende Schicht glatter Muskelzellen zu beschädigen (Abb. 4.19C). Die ACh-Kontraktionsantwort der Trachealsegmente ohne Epithel blieb im Prinzip unverändert, was auf einen funktionellen Erhalt der Präparate hinweist (Abb. 4.19A), allerdings scheiterte BDNF, die ACh-induzierte Kontraktion in deepithelialisierten Präparationen zu verstärken (Abb. 4.19B).

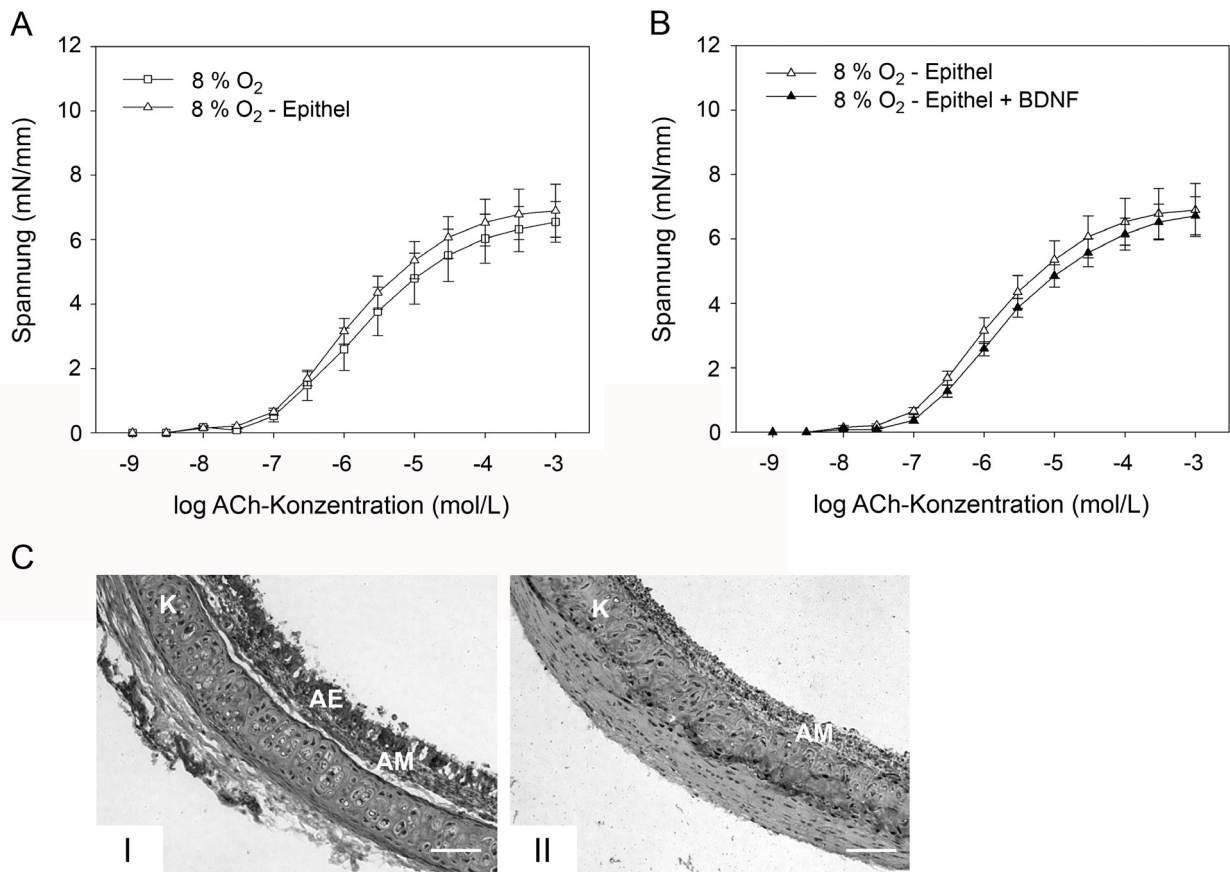


Abb. 4.19: **A**, Dargestellt ist die ACh-induzierte Spannungsentwicklung isolierter hypoxischer (6 h, 8 % O₂) Trachealsegmente mit intaktem Epithel und nach Deepithelialisierung. **B**, Zu sehen ist das Scheitern des TrkB-Liganden BDNF, die ACh-induzierten isometrischen Kontraktionen von hypoxischen Trachealsegmenten nach mechanischer Entfernung des Epithels zu erhöhen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils n=5 normoxischen bzw. hypoxischen Tieren, jedes in Zweifachbestimmung gemessen (**P<0,01, ***P<0,001 gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂, zweiseitige ANOVA). **C**, Repräsentative Histomorphologie (HE-Färbung) von isolierten Rattentrachealsegmenten mit intaktem Epithel (I) und nach mechanischer Deepithelialisierung (II). Die Markierung entspricht 200 μ m. AE, Atemwegsepithel; AM, Atemwegsmuskulatur; K, Knorpel.

Durch die Ausschüttung von Stickoxid (NO) und anderen Faktoren spielt das Bronchialepithel eine wichtige Rolle in der Regulation der Atemwegskontraktilität (Übersicht in (71)). Um die Bedeutung des lokalen NO-Systems in normoxischen und hypoxischen Rattenlungen einschätzen zu können, wurde die Expression der drei NO-Synthase(NOS)-Isoformen quantifiziert. Erwartungsgemäß waren die mRNA-Niveaus der HIF-Zielgene *Induzierbare NOS2* und *Endotheliale NOS3* (6) nach Exposition der Ratten bei 8 % O₂ ca. 27-fach (*NOS2*) bzw. ca. 2-fach verstärkt (*NOS3*, Abb. 4.20A). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die mRNA-Niveaus der *Neuronalen NOS1* nicht signifikant zwischen Normoxie und Hypoxie (Abb. 4.20A). In Anbetracht der starken Induktion der pulmonalen *NOS2*-Expression unter Hypoxie wurde untersucht, ob die NOS-Aktivität einen Einfluss auf den Effekt von BDNF auf die ACh-induzierte Atemwegskontraktion hat. Dazu wurden isolierte Trachealsegmente von Ratten, die

für 6 h bei 8 % O₂ zur Stimulation der TrkB-Expression exponiert worden waren, mit dem NOS-Inhibitor L-Nitroargininmethylester (L-NAME; 0,1 mM) vor BDNF- und/oder ACh-Zugabe behandelt. Während L-NAME die ACh-induzierten Kontraktionen in Abwesenheit von BDNF nicht signifikant veränderte, verhinderte es die Zunahme der Maximalspannung durch BDNF (Abb. 4.20B).

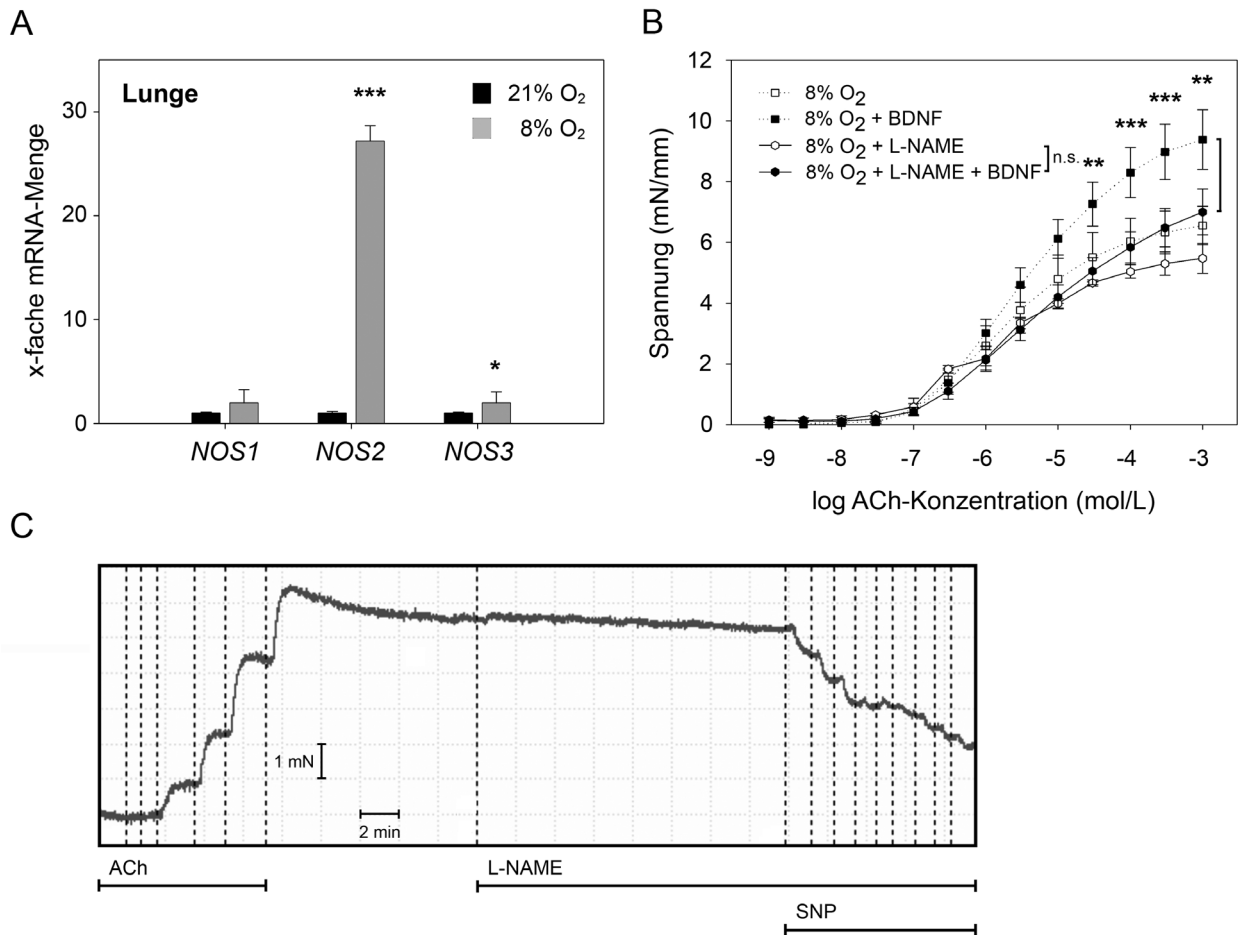


Abb. 4.20: *A*, Dargestellt ist die mRNA-Expression der NO-Synthase-Isoformen, *NOS1*, *NOS2* und *NOS3*, in der Lunge von Ratten, die für 6 h entweder bei 21 % oder 8 % O₂ exponiert worden waren. Anschließend wurden die mRNA-Niveaus mittels Real-time RT-PCR gemessen wie in Abb. 4.14 beschrieben. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD von jeweils $n=5$ normoxischen bzw. hypoxischen Tieren, jedes in Zweifachbestimmung gemessen (* $P<0,05$; *** $P<0,001$ gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂, Students t-Test). *B*, Dargestellt ist die ACh-induzierte Spannungsentwicklung isolierter hypoxischer Trachealsegmente, die mit dem NOS-Inhibitor L-NAME (0,1 mM) vorbehandelt worden waren. Die in der Abwesenheit von L-NAME erhaltenen Kontraktionskurven sind zum Vergleich gepunktet dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die L-NAME-Behandlung keinen Effekt auf die ACh-induzierte Spannungsentwicklung an sich hat (n.s.) und L-NAME den BDNF-Effekt auf ACh-induzierte Atemwegskontraktionen nicht simulieren kann ($P<0,05$). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils $n=5$ normoxischen bzw. hypoxischen Tieren, jedes in Zweifachbestimmung gemessen (** $P<0,01$, *** $P<0,001$ gegen die entsprechenden Kontrollen bei 21 % O₂, zweiseitige ANOVA). *C*, Abgebildet ist eine repräsentative Kontraktionsantwort auf ACh (10^{-8} bis $3 \cdot 10^{-6}$ M) von isolierten hypoxischen Trachealsegmenten, die Äquilibrationsphase nach Erreichen der Maximalspannung, die unveränderte Spannung während der Behandlung mit L-NAME (0,1 mM) und die konzentrationsabhängige Dilatation der Trachealsegmente durch den NO-Donor SNP (10^{-7} bis 10^{-3} M).

Zum Test, ob die dilatierende Funktion des NO-Systems in den verwendeten Präparationen erhalten war, wurde der NO-Donor Natriumnitroprussid (SNP) mit Endkonzentrationen zwischen 10^{-7} und 10^{-3} M appliziert. Wie in Abb. 4.20C dargestellt reduzierte diese Behandlung unter Inhibition der NO-Bildung durch L-NAME die Kraftentwicklung signifikant. Das NO-System in den Präparationen war also intakt und konnte nicht der Grund für das Ausbleiben der durch BDNF verstärkten ACh-induzierten Kontraktion in den hypoxischen Präparationen nach NOS-Inhibition durch L-NAME sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verstärkte TrkB-Expression im Bronchialepithel und den alveolären Epithelzellen der Lunge hypoxischer Ratten mit einer verstärkten Kontraktionsantwort von Trachealsegmenten auf hohe Dosen von Acetylcholin korrelierte. Diese Antwort ließ sich durch Weglassen des Liganden BDNF, den Tyrosinkinase-Inhibitor K252a bzw. die mechanische Entfernung des TrkB-exprimierenden Atemwegsepithels verhindern. Der beobachtete BDNF-Effekt war NO-abhängig, da er nach Inhibition der NO-Synthasen nicht reproduziert werden konnte.

5 Diskussion

5.1 Hypoxische TrkB-Expression in Neuroblastomzellen *in vitro*

5.1.1 Expression der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren *in vitro*

Die Bedeutung der hypoxieabhängigen *TrkB*-Expression lässt sich anhand ihrer Konservierung in verschiedenen neuronalen und nicht-neuronalen Zelltypen ablesen (Abb. 4.2). Sie scheint auch spezifisch für diesen einen Trk-Rezeptor zu sein, da sich in der genauer untersuchten Neuroblastom-Zelllinie Kelly keine sauerstoffabhängige Regulation der anderen Neurotrophinrezeptoren *TrkA*, *TrkC* bzw. *p75^{NTR}* feststellen ließ (Abb. 4.1). In Neuroblastomen wurde kürzlich eine unter Hypoxie alternativ gespleißte *TrkA*-Variante (*TrkAIII*) entdeckt, der die Exons 6, 7 und 9 fehlen und die in Neuroblastomen eventuell eine Rolle in der Tumorphysion spielt (72). Diese Isoform wurde durch die verwendeten Oligonukleotidprimer nicht erfasst, sodass über den *TrkAIII*-Status der verwendeten Kelly-Zellen keine Aussage gemacht werden kann.

5.1.2 Regulationsmechanismus

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Transkription des *TrkB*-Gens unter Sauerstoffmangel durch einen HIF-involvierenden Mechanismus aktiviert wird. HIFs wurden als eine Familie von Transkriptionsfaktoren erkannt, die als Hauptregulatoren der hypoxischen Genexpression fungieren. Mittels RNA-Interferenz sollte die Frage geklärt werden, ob die Transkription des Gens *NTRK2* vorzugsweise durch HIF-1 oder HIF-2 stimuliert wird. Diese Unterscheidung ist relevant, da sich HIF-1 und HIF-2 in ihrer zellulären Gewebeverteilung und den Zielgenpräferenzen unterscheiden, was für spezifische Rollen beider Proteine in der Zellantwort auf Hypoxie spricht (10). Obwohl ein vollständiger Knockdown der beiden Moleküle nicht erreicht werden konnte (Abb. 4.7), sprechen die Ergebnisse stark dafür, dass die Transkription des *TrkB*-Gens als Antwort auf Hypoxie eher durch HIF-1 als durch HIF-2 vermittelt wird. Diese Schlussfolgerung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die

Aktivierung des *TrkB*-Promotors unter Hypoxie in embryonalen Mausfibroblasten die Anwesenheit von HIF-1 α erforderte (Abb. 4.8).

HIFs interagieren mit HREs der Kernkonsensussequenz 5'-RCGTG-3'. Allerdings ist ein einzelnes HRE häufig nicht ausreichend, um die Hypoxiesensitivität auf einen Promotor zu übertragen, es sei denn, benachbarte Transkriptionsfaktorbindungsstellen sind vorhanden (6). Die verwendete, ca. 2,1 kbp lange Upstream-Region des *NTRK2*-Gens enthält zwölf putative HREs, manche davon in regulatorisch aktiven Domänen gehäuft (Abb. 4.5). So stellten sich auch in transienten Transfektionsexperimenten mit vom 5'-Ende verkürzten *TrkB*-Promotorkonstrukten (Abb. 4.6, Abb. 4.10) und im EMSA-Bindungsassay (Abb. 4.9) drei gehäuft vorkommende HREs als relevant für die sauerstoffabhängige Regulation der *TrkB*-Transkription in Kelly-Zellen heraus.

Es wurde vor kurzem gezeigt, dass das Wilmstumorprotein Wt1 die Transkription des *TrkB*-Promotors durch Bindung an ein GC-reiches Konsensusmotiv stimuliert, das in der Nähe der hier identifizierten HREs lokalisiert ist (31). Daher war es vorstellbar, dass HIF-1 und Wt1 synergistisch an der Regulation der *TrkB*-Expression beteiligt sind. Da Wt1 zudem selbst ein HIF-Zielgen ist (73), hätte es auch indirekt auf die *TrkB*-Expression wirken können, sodass eine eventuelle Rolle von Wt1 in der Regulation der hypoxischen *TrkB*-Expression in den Versuchen zum Regulationsmechanismus berücksichtigt wurde. In den verwendeten Kelly-Zellen zeigte sich zwar eine Induktion der *Wt1*-mRNA durch Hypoxieexposition, die Mutation der beschriebenen Wt1-Bindungsstelle im *TrkB*-Promotor hatte jedoch keinen Effekt auf die Promotoraktivität unter Hypoxie und auch im ChIP-Assay ergab sich keine verstärkte Bindung von *TrkB*-Promotor-DNA an Wt1-Protein (Daten nicht gezeigt).

5.1.3 Auswirkungen der hypoxischen *TrkB*-Expression auf die Migration isolierter Neuroblastomzellen

Neuroblastome, die aus Vorläuferzellen des sympathischen Nervensystems hervorgehen, gehören zu den häufigsten pädiatrischen Tumoren (Übersicht in (46)) und zeigen ein heterogenes klinisches Verhalten. In günstigen Fällen können sie zu benignen Ganglioneuroblastomen differenzieren oder sich spontan zurückbilden. Die Expression der Trk-Rezeptoren wurde bei Neuroblastomen als prognostischer Faktor für dieses heterogene Verhalten beschrieben. Demnach werden *TrkB* und sein Hauptligand BDNF in erster Linie in MYCN-amplifizierten, aggressiven Neuroblastomen exprimiert, während *TrkA* vor allem in solchen mit günstigerer

Prognose vorkommt (47;74). Obwohl die Funktion der verschiedenen TrkB-Isoformen kaum verstanden ist, scheint TrkB-T1 bevorzugt in stärker differenzierten Tumoren mit günstiger Prognose exprimiert zu werden (25), während in TrkB-FL-exprimierenden Neuroblastomzellen durch Aktivierung des TrkB/BDNF-Signalwegs Zellüberleben und -invasion verstärkt sind (47;49).

Auf der Suche nach Markergenen, die in Neuroblastom-Patientenmaterial mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind, führten Wei et al. einen Microarray-Screen durch und entwickelten mittels künstlicher neuronaler Netzwerke ein Vorhersagemodell anhand des jeweiligen Expressionsmusters. Auf diesem Wege identifizierten sie auch 19 Gene mit prädiktivem Charakter, TrkB befand sich jedoch nicht darunter. Über TrkA wurde keine Aussage getroffen, da es auf dem verwendeten cDNA-Chip nicht vorkam (75).

Neuere Untersuchungen zeigen zudem, dass Neuroblastomzellen auf Umgebungshypoxie mit der Ausbildung eines unreiferen und aggressiveren Phänotyps reagieren (Übersicht in (55)). Die eigenen Ergebnisse dokumentieren, dass die TrkB-Induktion unter Hypoxie das Migrationspotenzial von Neuroblastomzellen verstärkt (Abb. 4.13). Entsprechend war die Zellmigration während der Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor K252a und nach Weglassen des TrkB-Liganden BDNF als Chemoattraktant praktisch nicht nachweisbar (Abb. 4.13). Die Zellmigration ist während der normalen Gewebeentwicklung ein kritischer Schritt und eine Vorbedingung für Tumordinvasion. Daher ist es vorstellbar, dass die TrkB-Expression in Neuroblastomen einen unreifen Zustand reflektiert, der es den Tumorzellen ermöglicht, einen migrierenden und später invasiven Phänotyp zu entwickeln. Es können einige Mechanismen ins Auge gefasst werden, durch die der Neurotrophinrezeptor TrkB das maligne Verhalten von Neuroblastomen verstärken kann: So wurde beschrieben, dass die TrkB-Signaltransduktion das Tumorzellüberleben fördert und Neuroblastomzellen vor Chemotherapie-induzierter Apoptose durch Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs schützt (Übersicht in (76)).

Anoikis ist eine Form der Apoptose, die initiiert wird, wenn Zellen von ihrer extrazellulären Matrix gelöst werden. Als solche kann Anoikis als physiologische Hürde fungieren, um die Metastasierung von Tumorzellen zu verhindern. In einem unverzerrten, genomweiten Screening zur Identifikation Metastasierungs-assoziiierter Gene stellte sich heraus, dass TrkB in nicht-malignen Rattenepithelzellen über den PI3K/Akt-Signalweg als Suppressor der Caspase-abhängigen Anoikis wirkt (77). Es könnte also sein, dass die Aktivierung von spezifischen Pro-Überlebensmechanismen zum hohen metastatischen Potenzial der TrkB-exprimierenden Neuroblastome beiträgt. In eigenen Experimenten zeigten die Kelly-Zellen jedoch schon bei

21 % O₂ eine Anoikisresistenz (Daten nicht gezeigt), sodass keine Aussage über den Einfluss der hypoxieinduzierten TrkB-Expression auf die Anoikisresistenz gemacht werden kann.

Die Angiogenese ist ein weiteres wichtiges Ereignis in der Tumorprogression. Die Vaskularisierung von Neuroblastomen und ihr Gehalt an pro-angiogenen Molekülen, z.B. VEGF, korreliert mit einem ungünstigen klinischen Verlauf (78;79). Vor einiger Zeit wurde zudem beschrieben, dass TrkB für die Blutgefäßentwicklung in embryonalen Mausherzen nötig ist (31). Außerdem kann der TrkB/BDNF-Signalweg in Neuroblastomzellen über eine HIF-1 α -Induktion die VEGF-Expression stimulieren (80). Die Kombination dieser Daten deutet darauf hin, dass Hypoxie über die HIF-1-abhängige Induktion von TrkB zu einem pro-angiogenen Phänotyp der Neuroblastome beitragen könnte.

Die hier präsentierten Befunde könnten auch für andere Malignome relevant sein, da sich die hypoxische TrkB-Induktion nicht nur auf die Neuroblastom-Zelllinie Kelly beschränkte, sondern ebenfalls in einer Osteosarkom-Zelllinie gezeigt werden konnte (Abb. 4.2). Die Überexpression von TrkB ist häufig mit Tumorigenese, Angiogenese und Chemotherapie-Resistenz von Malignomen korreliert und trägt zu Metastasierung und einem aggressiven Phänotyp dieser Tumore mit ungünstiger Prognose bei. So wurde die TrkB-Expression neben Neuroblastomen u.a. in Zusammenhang gebracht mit: Retinoblastomen, Wilmstumoren, Leukämie, Hodgkin-Lymphomen, Pankreas-, Leberzell-, Magen- und Ovarialkarzinomen (81-85). Eventuell hat der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Mechanismus der hypoxisch induzierten TrkB-Expression auch in diesen Malignomen einen Anteil an der Tumorprogression und der Korrelation mit einer ungünstigen Prognose.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier präsentierten Ergebnisse neue Einblicke in die transkriptionelle Regulation des für TrkB kodierenden Gens *NTRK2* ermöglichen. Mit der Identifikation der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen HREs wurde zusätzlich zu den bereits identifizierten Transkriptionsregulatoren (86) ein neuer regulativer Schalter der TrkB-Expression entdeckt, der für die Tumorprogression bedeutend sein könnte.

5.2 Hypoxische TrkB-Expression in der Rattenlunge *in vivo*

5.2.1 Expression der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren *in vivo*

Bei der Analyse der Neurotrophinrezeptorexpression in den verschiedenen Rattenorganen waren nur die Niveaus von TrkB-mRNA und -Protein in den Lungen hypoxischer vs. normoxischer Ratten erhöht. Eine Stimulation der *TrkB*-Expression durch Hypoxie wurde in keinem anderen der untersuchten Organe festgestellt (Abb. 4.14). Allerdings stimulierte die Exposition von Ratten bei normobarer Hypoxie die Expression von mindestens einem der HIF-Zielgene *GLUT-1* oder *VEGF*, was darauf hindeutet, dass die sauerstoffabhängige Genregulation in allen untersuchten Geweben erhalten war (Abb. 4.15). Im Gegensatz zu den hier präsentierten Ergebnissen wurde beschrieben, dass die TrkB-Expression im zerebralen Rattenkortex durch eine Kombination aus Sauerstoffmangel und Verschluss der linken Halsschlagader aktiviert worden war (56). Diese unterschiedlichen Resultate legen nahe, dass die Sauerstoffempfindlichkeit der die TrkB-Expression kontrollierenden Mechanismen zwischen den Geweben variiert und/oder dass andere Faktoren wie z.B. reduzierte Nährstoffversorgung der Zellen zusätzlich zum Sauerstoffmangel zur TrkB-Induktion im ischämischen Rattenhirn beitragen.

Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Neurotrophine und ihre Rezeptoren auch außerhalb des Nervensystems wichtige Funktionen erfüllen. Beim Menschen exprimieren Atemwegs- und Lungengewebe, pulmonale Drüsenzellen, Lymphozyten und Makrophagen sowohl Neurotrophine als auch ihre hochaffinen Rezeptoren (32). Dabei werden die Neurotrophine von Entzündungszellen, Epithelzellen und glatten Muskelzellen der Atemwege produziert, während ihre (Trk-)Rezeptoren bislang in Neuronen, glatten Muskelzellen und immunkompetenten Zellen der Atemwege nachgewiesen wurden (Übersicht in (87)). In der vorliegenden Arbeit wurden alternativ gespleißte TrkB-mRNAs und -Proteine in Bronchial- und Alveolärepithelzellen normaler, adulter Ratten nachgewiesen und die TrkB-Expression dieser Zellen war nach akuter hypoxischer Exposition merklich verstärkt (Abb. 4.16, Abb. 4.17). Die mRNA-Expression des TrkB-Liganden *BDNF* in der Rattenlunge bei 8 % O₂ nahm ebenfalls signifikant zu (Abb. 4.14A). Dabei ist die TrkB-Expression in Bronchialepithelzellen, die auch BDNF produzieren (87), bisher nur von einer Gruppe übereinstimmend mit den hier beobachteten Befunden gezeigt worden (88), während andere das Bronchialepithel als TrkB-negativ beschrieben hatten (87;89). Das ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Reaktivität der verwendeten Antikörper zurück zu führen, da auch in den Optimierungsversuchen der hier gezeigten immunhistochemischen

Detektion von TrkB einige Antikörper die glatten Muskelzellen der Atemwege anfärbten. Daher wurde zur Verifizierung der Antikörperspezifität in dieser Arbeit zusätzlich eine *in situ* mRNA-Hybridisierung durchgeführt (Abb. 4.17A/B), die die TrkB-Expression im Bronchialepithel bestätigte.

Die mRNA-Niveaus des TrkB-FL und der trunkierten Spleißvariante TrkB-T1, der die katalytische Tyrosinkinasedomäne fehlt, nahmen durch Hypoxieexposition in gleichem Ausmaß zu, sodass das Verhältnis beider Transkripte in hypoxischem vs. normoxischem Lungengewebe gleich blieb (Abb. 4.16). Das war zu erwarten, da beide mRNAs vom gleichen Promotor transkribiert werden (28). Das Spleißen der nativen *TrkB*-mRNA blieb offensichtlich durch Hypoxie unbeeinflusst, allerdings erhöhte Sauerstoffmangel das trunkierte Protein TrkB-T1 scheinbar stärker als TrkB-FL (Abb. 4.16). Das wirft die Möglichkeit auf, dass ein bisher unbekannter posttranskriptioneller Mechanismus zur Akkumulation von TrkB-T1 im hypoxischen Lungengewebe beiträgt.

Die für die besondere Sauerstoffsensitivität der TrkB-Expression im Respirationstrakt verantwortlichen Signalwege sind unklar. Diesbezüglich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass HIF-1 die Transkription des *TrkB*-Gens in einer Neuroblastom-Zelllinie aktiviert, indem er mit drei von zahlreichen Bindungsmotiven im *TrkB*-Promotor interagiert (Kap. 4.2). Da das HIF-1-Protein unter Hypoxie in zahlreichen Geweben akkumuliert und auch zur Induktion von Zielgenen führt (Abb. 4.15), kann die Stimulation des *TrkB*-Promotors durch HIF-1 alleine die einzigartige Sauerstoffempfindlichkeit der TrkB-exprimierenden Zellen in der Lunge nicht erklären. Stattdessen würde man eher annehmen, dass noch zusätzliche, gewebespezifische Kofaktoren existieren, die synergistisch mit HIF-1 die TrkB-Expression kontrollieren. Ein Kandidat könnte dabei der bereits oben erwähnte Wilmstumortranskriptionsfaktor Wt1 sein, der den *TrkB*-Promotor *in vitro* und *in vivo* stimuliert (31) und z.B. auch in A549-Bronchialepithelzellen exprimiert wird (90). Aufgrund der Pneumozyten Typ II-spezifischen Expression von HIF-2 α (10) würde aber auch eine Transaktivierung von *TrkB* in der hypoxischen Rattenlunge durch HIF-2 statt HIF-1 in Frage kommen. Schließlich besitzen beide HIF-Isoformen dieselbe Erkennungssequenz (1) und können je nach Zellhintergrund selektiv dieselben Gene transaktivieren (10). Betrachtet man die Sequenz 2 kbp upstream des *TrkB*-Gens der Ratte, besitzt diese ebenso wie die für die Transfektionsversuche *in vitro* verwendete humane Sequenz gehäuft zahlreiche putative HIF-Bindungsstellen, in z.T. über die verschiedenen Spezies hochkonservierten Bereichen.

5.2.2 Auswirkungen der hypoxischen TrkB-Expression auf das kontraktile Verhalten isolierter Atemwegssegmente der Ratte

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass die Aktivierung des TrkB/BDNF-Signalwegs durch akute systemisch-hypoxische Behandlung die isolierten Trachealsegmente von Ratten für die Wirkungen von ACh sensitivierte. So verstärkte der TrkB-Ligand BDNF die maximale Kraftentwicklung bei cholinergem Stimulation von Trachealsegmenten hypoxischer Ratten signifikant (Abb. 4.18C). Dieser BDNF-Effekt, der in Präparationen von normoxischen Ratten nicht auftrat, konnte durch den Tyrosinkinase-Inhibitor K252a verhindert werden (Abb. 4.18D). Tatsächlich wurde eine verstärkte Atemwegskontraktilität unter akuter sowie chronischer Hypoxie (91;92) und im Asthma bronchiale (93) beschrieben. Es kam jedoch zu kontroversen Ergebnisse bezüglich der Effekte von cholinergen Agonisten (91;94;95). Die Gründe für diese Diskrepanzen sind bisher unklar, mögen aber mit den komplexen Effekten chronischer Hypoxie auf die elektromechanische Kopplung in Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur zu tun haben (95).

Neurotrophine können die Atemwegsantwort auf allergische Stimuli modulieren, indem sie einerseits die Aktivierung lokaler Entzündungszellen fördern (96), und andererseits die Synthese pro-inflammatorischer Peptide in sensorischen Nervenzellen der Atemwege unterstützen (97). Im Zusammenhang von TrkB und Entzündung ist beschrieben, dass die regionale Applikation von Entzündungsinduktoren zu einer signifikanten Zunahme der neuronalen TrkB-Expression im Tiermodell einer Kolitis führt (98). Weiterhin wurden auf eosinophilen Granulozyten TrkB-Rezeptoren nachgewiesen (70). Auch in der ventromedialen *Medulla oblongata* von Ratten wurde bei anhaltendem Entzündungsschmerz eine vermehrte TrkB-Expression festgestellt (99). Experimentelle Befunde und klinische Beobachtungen deuten darauf hin, dass BDNF durch seine lokale Wirkung am TrkB-Rezeptor die Symptomatik des allergischen Asthma bronchiale verstärken kann (100-102).

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 und sein Zielmolekül VEGF wurden in bronchoskopisch entnommenem Biopsiematerial von Asthmapatienten detektiert (103), was nahe legt, dass neben der entzündlichen Komponente möglicherweise auch die sauerstoffabhängige Transkriptionsregulation durch lokalen Sauerstoffmangel für die Pathophysiologie dieser Erkrankung von Bedeutung ist. HIF kann dort jedoch auch durch die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β (104) und NF- κ B induziert werden (105). Die Stimulation von HIF-1 α verstärkt die ACh-induzierte Kontraktionsantwort von kultivierten Muskelstreifen der

Kaninchentrachea, was nahe legt, dass HIF-1-nachgeordnete Signalwege mit Atemwegshyperreaktivität assoziiert sind (106). HIF-1 nimmt auch indirekt auf die Atemwegsclearance Einfluss, da es die Expression des wichtigsten der sezernierten, schleimbildenden Mucine, *MUC5AC*, induziert, welches bei Asthma bronchiale durch überschießende Schleimproduktion zur Atemwegsobstruktion beiträgt (107).

Passend zur Stimulation der TrkB-Expression in Bronchialepithelzellen durch Hypoxie (Abb. 4.17) verhinderte die Entfernung des Atemwegsepithels in den *in vitro*-Präparationen die verstärkte ACh-induzierte Kontraktion durch BDNF (Abb. 4.19B). Ein spannungssteigernder Effekt von BDNF war bisher nur für die glatte Muskulatur der Atemwege beschrieben worden (108). Zu den lokalen Mediatoren, die von Bronchialepithelzellen freigesetzt werden und auf die Spannung der glatten Atemwegsmuskulatur wirken, gehören Stickoxid (NO, Übersicht in (71)), Leukotriene und Prostaglandine (Übersicht in (109)). Die Exposition von Ratten bei 8 % O₂ verstärkte die pulmonale *NOS2*-Expression signifikant (Abb. 4.20A). Zudem verhinderte der NOS-Inhibitor L-NAME die Verstärkung der ACh-induzierten Atemwegskontraktionen durch den TrkB-Liganden BDNF (Abb. 4.20B). Demzufolge erfordert die Fähigkeit von BDNF, die mechanische Atemwegskontraktilität zu modulieren, die Aktivität der NO-Synthasen. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass BDNF *in vivo* Histamin-induzierte Atemwegskontraktionen erhöhte und die NO-Niveaus in der Ausatemluft von Meerschweinchen reduzierte (110). Dieser Effekt von BDNF auf die Histamin-induzierte Atemwegskontraktion war jedoch ebenso wie der hier beschriebene (Abb. 4.18C) zu schnell (< 30 min), um durch einen direkten Effekt von BDNF auf die NO-Synthasen ausgelöst worden zu sein. Bennedich-Kahn et al. vermuten einen nicht näher beschriebenen Effekt von BDNF auf L-Arginin, das Substrat der NO-Synthese (111). Zusätzlich kann BDNF die Kontraktilität der Muskelzellen in Lungenparenchymschnitten durch einen NO-cGMP-abhängigen Mechanismus fördern. Allerdings verstärkte BDNF die Kontraktilität in diesen Studien als eine Folge von Hyperoxie statt Sauerstoffmangel, wie es in den hier vorgestellten Experimenten beobachtet wurde (112). Derzeit ist unklar, warum der TrkB/BDNF-Signalweg die Atemwegskontraktilität in ähnlicher Weise unter zwei scheinbar gegensätzlichen Bedingungen (Hyperoxie vs. Hypoxie) modulieren kann. Im Gegensatz zu Sopi et al., der Gewebeproben von neugeborenen Tieren untersuchte (112), wurden die hier vorgestellten Experimente mit adulten Ratten durchgeführt. Daher kann spekuliert werden, dass die Empfindlichkeit des TrkB/BDNF-Systems gegenüber Sauerstoff mit dem Alter variiert. So fanden Cai et al. bei einem Phagen-Display auf der Suche nach altersabhängig variierenden Interaktionspartnern von BDNF in alten Mäuseherzen eine höhere

Dichte des trunkierten TrkB-T1-Rezeptors (113). Auf jeden Fall legen die kombinierten Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit und vorangegangener Studien nahe, dass eine verminderte Fähigkeit zur NO-Freisetzung ein Mechanismus ist, der bei erhöhten BDNF-Niveaus zur gesteigerten Atemwegskontraktilität beiträgt.

Diese Ergebnisse qualifizieren den TrkB/BDNF-Signalweg als potentielle Zielmoleküle für Medikamente unter Bedingungen, die mit Atemwegshyperreaktivität einhergehen. Eine Patientenstudie zeigte bei Asthmatikern im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte BDNF-Konzentration im Serum, in Thrombozyten und im Plasma. Des Weiteren bestand bei vorher unbehandelten Patienten ein Zusammenhang zwischen der BDNF-Konzentration in Thrombozyten und Atemwegsobstruktion. Beim Test verschiedener Kortikosteroide konnte Fluticason die BDNF-Sekretion von Immunzellen nach TNF α -Stimulation effektiv verringern (101). Dieser positive Effekt der Kortikosteroide wurde in einer größeren Untersuchung von Noga et al. bestätigt (102).

Zusammenfassend legen die Ergebnisse nahe, dass die hypoxische TrkB-Induktion *in vivo* zu einer verstärkten Atemwegskontraktilität *ex vivo* beiträgt. Während die hier vorgestellten Daten eine enge Beziehung zwischen BDNF und NO in der Regulation der Atemwegskontraktilität zeigen, erfordern die wahrscheinlich zusätzlich existierenden Wirkmechanismen von BDNF weitergehende Untersuchungen.

6 Zusammenfassung

Die hypoxische TrkB-Expression *in vitro*

Neurotrophine und ihre Rezeptoren spielen eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Funktion des Nervensystems. Hohe Expressionsniveaus des Neurotrophinrezeptors TrkB und seiner Liganden sind in Neuroblastomen mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. In der vorliegenden Arbeit wird dargestellt, dass das für die Rezeptortyrosinkinase TrkB kodierende Gen *NTRK2* in verschiedenen Zelllinien sauerstoffabhängig reguliert ist und durch den Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 (HIF-1) stimuliert wird. Die mRNA und -Proteinniveaus von TrkB waren in der Neuroblastom-Zelllinie Kelly unter Hypoxie (1 % O₂) vs. Normoxie (21 % O₂) ca. 28-fach erhöht. Ein Luziferase-Reporterkonstrukt, das ca. 2,1 kbp des humanen *TrkB*-Promotors enthielt, wurde unter Hypoxie und nach Stimulation mit dem Hypoxiemimetikum 2,2'-Dipyridyl (DP, 100 µM) bei 21 % O₂ ca. 6-fach stärker abgelesen. Die Luziferaseaktivität in der Anwesenheit von DP war durch RNA-Knockdown mit siRNAs gegen HIF-1α, nicht aber gegen HIF-2α, signifikant reduziert. Entsprechend konnte Hypoxie den *TrkB*-Promotor in embryonalen Mausfibroblasten, denen HIF-1α fehlte, nicht stimulieren. Die hypoxieresponsive *TrkB*-Promotorregion konnte auf drei Bindungsstellen für HIF-1 eingegrenzt werden, die sich im Bereich zwischen -923 und -879 bp relativ zur Transkriptionsstartstelle befanden. Die Migration von kultivierten Neuroblastomzellen war durch Inkubation bei 1 vs. 21 % O₂ ungefähr verdoppelt. Dieser Hypoxieeffekt wurde durch Weglassen des TrkB-Liganden Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) und den Tyrosinkinase-Inhibitor K252a verhindert. Zusammenfassend könnte die durch Hypoxie verstärkte TrkB-Expression einen kritischen Schalter für die bereits beschriebene Dedifferenzierung von Neuroblastomzellen unter hypoxischen Bedingungen darstellen und Teil der genetischen Adaptation im Rahmen der Tumorprogression sein.

Die hypoxische TrkB-Expression *in vivo*

Angeregt durch die oben beschriebene Stimulation der TrkB-Transkription unter Hypoxie in verschiedenen Zelllinien durch den Transkriptionsfaktor HIF-1, wurde weitergehend untersucht, ob die Expression von TrkB oder anderer Neurotrophinrezeptoren auch *in vivo* sauerstoffsensitiv ist. Wenn ja, sollten die funktionellen Konsequenzen dieser sauerstoffabhängigen Regulation untersucht werden. Dazu wurden Ratten für 6 h entweder bei Normoxie (21 % O₂) oder normobarer Hypoxie (8 % O₂) exponiert und die Genexpressionsniveaus bestimmt. Das markanteste Ergebnis war eine fast 15-fache Steigerung der *TrkB*-mRNA in den Lungen

hypoxischer Ratten, aber in keinem anderen der untersuchten Organe. Mittels *in situ* mRNA-Hybridisierung und Immunhistochemie wurden die Basalzellen des Bronchialepithels und die alveolären Epithelzellen als Ort der verstärkten TrkB-Expression unter Hypoxie identifiziert. Der TrkB-Ligand BDNF erhöhte die Acetylcholin(ACh)-induzierte Kontraktionsantwort isolierter Trachealsegmente von hypoxischen, nicht aber von normoxischen Ratten signifikant. Dieser BDNF-Effekt wurde durch Präinkubation der Gewebeproben mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor K252a und durch mechanische Entfernung des TrkB-exprimierenden Atemwegsepithels aufgehoben, während der Stickoxidsynthase(NOS)-Inhibitor L-Nitroargininmethylester (L-NAME, 0,1 mM) den Einfluss von BDNF auf die ACh-induzierte Kontraktion hypoxischer Trachealsegmente verhinderte. Diese Ergebnisse zeigen, dass systemische Hypoxie die Expression des Neurotrophinrezeptors TrkB im Atemwegsepithel stimuliert. Zusätzlich verstärkt die Aktivierung der TrkB-Signalwege durch BDNF unter Hypoxie die ACh-induzierte Atemwegskontraktilität durch einen Mechanismus, der NO erfordert, da er unter Inhibition der NO-Synthasen mit L-NAME nicht reproduziert werden konnte.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	“Bacterial Artificial Chromosome”
BCA	Bicinchoninsäure
BDNF	„Brain Derived Neurotrophic Factor“
BSA	Rinderserumalbumin
CA9	CarboanhydraseIX
CREB	„Ca ²⁺ /cAMP response element binding protein“
CBP	„CREB binding protein“
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
C _t	„Threshold cycle“
DP	2,2'-Dipyridyl (auch 2,2'-Bipyridin)
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol
DIG	Digoxigenin
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E	Entwicklungstag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Elk-1	„Ets domain protein-1“
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitätsshift Assay
Epo	Erythropoietin
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GLUT-1	Glukosetransporter-1
h	human
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRE	Hypoxie-responsives Element
HRP	“horseradish peroxidase”
Ig	Immunglobulin

Abkürzung	Bedeutung
IGFBP-1	Insulin-artiger Wachstumsfaktor Bindungsprotein 1
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IZ	Immunzytologie
L-NAME	L-Nitroargininmethylester
LPS	Lipopolysaccharid
m	Maus
MAPK	“Ras-mitogen-activated protein kinase”
min	Minute(n)
NGF	„Neurotrophin Growth Factor“
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid
PAS	Akronym für <i>PER</i> , <i>ARNT</i> , <i>SIM</i> , bei denen diese Domäne entdeckt wurde
PBS	“Phosphate-buffered Saline”
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PHD	Prolyhydrolyase(domäne)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVDF	Polyvinylidendifluorid
r	Ratte
RLU	Relative Licht Einheiten
ROS	„reactive oxygen species“
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
TBS	“Tris-buffered saline”
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Trk	Tropomyosinkinase-abgeleitet
TrkB-FL	„TrkB-Rezeptor full length“
TrkB-T1	„TrkB-Rezeptor truncated“
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“
Vol	Volumen
WB	Westernblot

8 Literaturverzeichnis

1. Fandrey J, Gorr TA, Gassmann M. Regulating cellular oxygen sensing by hydroxylation. *Cardiovasc Res* 2006;71:642-51.
2. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA et al. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001;107:43-54.
3. Iyer NV, Kotch LE, Agani F et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 1998;12:149-62.
4. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998;17:3005-15.
5. Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2alpha plays an important role in vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8386-91.
6. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005;2005:re12.
7. Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003;17:271-3.

8. Rosenberger C, Mandriota S, Jurgensen JS et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1721-32.
9. Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I et al. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J* 2001;15:2445-53.
10. Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. *Cell Death Differ* 2008;15:628-34.
11. Demougeot C, Van HM, Bertrand N et al. Cytoprotective efficacy and mechanisms of the liposoluble iron chelator 2,2'-dipyridyl in the rat photothrombotic ischemic stroke model. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:1080-7.
12. Nytko KJ, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH, Stiehl DP. Regulated function of the prolyl-4-hydroxylase domain (PHD) oxygen sensor proteins. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:1329-38.
13. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann N Y Acad Sci* 2002;973:443-7.
14. Asikainen TM, Ahmad A, Schneider BK et al. Stimulation of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and VEGF by prolyl 4-hydroxylase inhibition in human lung endothelial and epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2005;38:1002-13.

15. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol* 2009;19:12-6.
16. Pugh CW, Gleadle J, Maxwell PH. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia signalling pathways. *Breast Cancer Res* 2001;3:313-7.
17. Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA, Ivan M. A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ* 2008;15:667-71.
18. Taylor CT. Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *J Physiol* 2008;586:4055-9.
19. Frede S, Berchner-Pfannschmidt U, Fandrey J. Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation. *Methods Enzymol* 2007;435:405-19.
20. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* 2008;205:585-94.
21. Skaper SD. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008;7:46-62.
22. Dechant G. Molecular interactions between neurotrophin receptors. *Cell Tissue Res* 2001;305:229-38.

23. Stoilov P, Castren E, Stamm S. Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:1054-65.
24. Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N et al. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol* 2001;19:689-96.
25. Schramm A, Schulte JH, Astrahantseff K et al. Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2005;228:143-53.
26. Saarelainen T, Lukkarinen JA, Koponen S et al. Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons show increased susceptibility to cortical injury after focal cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci* 2000;16:87-96.
27. Rose CR, Blum R, Pichler B, Lepier A, Kafitz KW, Konnerth A. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 2003;426:74-8.
28. Baretino D, Pombo PM, Espliguero G, Rodriguez-Pena A. The mouse neurotrophin receptor trkB gene is transcribed from two different promoters. *Biochim Biophys Acta* 1999;1446:24-34.
29. Klintsova AY, Dickson E, Yoshida R, Greenough WT. Altered expression of BDNF and its high-affinity receptor TrkB in response to complex motor learning and moderate exercise. *Brain Res* 2004;1028:92-104.

30. Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K, Terao S, Mitsuma T. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res* 1996;21:929-38.
31. Wagner N, Wagner KD, Theres H, Englert C, Schedl A, Scholz H. Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev* 2005;19:2631-42.
32. Ricci A, Felici L, Mariotta S et al. Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:12-9.
33. Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Ojeda SR. Role of neurotrophic factors in early ovarian development. *Semin Reprod Med* 2009;27:24-31.
34. Ferrer I, Krupinski J, Goutan E, Marti E, Ambrosio S, Arenas E. Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001;101:229-38.
35. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:1545-64.
36. Golder FJ. Receptor tyrosine kinases and respiratory motor plasticity. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;164:242-51.

37. Kermani P, Hempstead B. Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:140-3.
38. Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem* 2008;89:312-23.
39. Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev* 2008;59:201-20.
40. Lu B, Martinowich K. Cell biology of BDNF and its relevance to schizophrenia. *Novartis Found Symp* 2008;289:119-29.
41. Klein R. Role of neurotrophins in mouse neuronal development. *FASEB J* 1994;8:738-44.
42. Erickson JT, Conover JC, Borday V et al. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J Neurosci* 1996;16:5361-71.
43. Bouvier J, Autran S, Dehorter N et al. Brain-derived neurotrophic factor enhances fetal respiratory rhythm frequency in the mouse preBotzinger complex in vitro. *Eur J Neurosci* 2008;28:510-20.
44. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 2000;127:4531-40.

45. Hiltunen JO, Arumae U, Moshnyakov M, Saarma M. Expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors in developing rat heart. *Circ Res* 1996;79:930-9.
46. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:203-16.
47. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 1994;14:759-67.
48. Aoyama M, Asai K, Shishikura T et al. Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett* 2001;164:51-60.
49. Matsumoto K, Wada RK, Yamashiro JM, Kaplan DR, Thiele CJ. Expression of brain-derived neurotrophic factor and p145TrkB affects survival, differentiation, and invasiveness of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1995;55:1798-806.
50. Ho R, Eggert A, Hishiki T et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res* 2002;62:6462-6.
51. Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res* 2002;62:6756-63.

52. Li Z, Jaboin J, Dennis PA, Thiele CJ. Genetic and pharmacologic identification of Akt as a mediator of brain-derived neurotrophic factor/TrkB rescue of neuroblastoma cells from chemotherapy-induced cell death. *Cancer Res* 2005;65:2070-5.
53. Desmet CJ, Peeper DS. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci* 2006;63:755-9.
54. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 2004;9 Suppl 5:4-9.
55. Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, Pahlman S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells - A mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:554-63.
56. Narumiya S, Ohno M, Tanaka N, Yamano T, Shimada M. Enhanced expression of full-length TrkB receptors in young rat brain with hypoxic/ischemic injury. *Brain Res* 1998;797:278-86.
57. Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie. Whole-mount in situ hybridizations of different genes on mouse tissue, gene: NTRK2, Set ID HB307. <http://www.genepaint.org> . 13-6-2007.
Ref Type: Internet Communication
58. Blanchard KL, Acquaviva AM, Galson DL, Bunn HF. Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol Cell Biol* 1992;12:5373-85.

59. Stolze I, Berchner-Pfannschmidt U, Freitag P et al. Hypoxia-inducible erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells. *Blood* 2002;100:2623-8.
60. Ryan HE, Poloni M, McNulty W et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000;60:4010-5.
61. Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M. The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4542-50.
62. Behar TN, Dugich-Djordjevic MM, Li YX et al. Neurotrophins stimulate chemotaxis of embryonic cortical neurons. *Eur J Neurosci* 1997;9:2561-70.
63. Polleux F, Whitford KL, Dijkhuizen PA, Vitalis T, Ghosh A. Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 2002;129:3147-60.
64. Kermani P, Rafii D, Jin DK et al. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest* 2005;115:653-63.
65. Weidemann A, Klanke B, Wagner M et al. Hypoxia, via stabilization of the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha, is a direct and sufficient stimulus for brain-type natriuretic peptide induction. *Biochem J* 2008;409:233-42.

66. Willam C, Maxwell PH, Nichols L et al. HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:68-77.
67. Braun A, Appel E, Baruch R et al. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol* 1998;28:3240-51.
68. Fox AJ, Patel HJ, Barnes PJ, Belvisi MG. Release of nerve growth factor by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 2001;424:159-62.
69. Nassenstein C, Dawbarn D, Pollock K et al. Pulmonary distribution, regulation, and functional role of Trk receptors in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:597-605.
70. Noga O, Englmann C, Hanf G, Grutzkau A, Guhl S, Kunkel G. Activation of the specific neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC influences the function of eosinophils. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1348-54.
71. Bove PF, van der Vliet, A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. *Free Radic Biol Med* 2006;41:515-27.
72. Tacconelli A, Farina AR, Cappabianca L, Gulino A, Mackay AR. TrkAIII. A novel hypoxia-regulated alternative TrkA splice variant of potential physiological and pathological importance. *Cell Cycle* 2005;4:8-9.

73. Wagner KD, Wagner N, Wellmann S et al. Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *FASEB J* 2003;17:1364-6.
74. Kogner P, Barbany G, Dominici C, Castello MA, Raschella G, Persson H. Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res* 1993;53:2044-50.
75. Wei JS, Greer BT, Westermann F et al. Prediction of clinical outcome using gene expression profiling and artificial neural networks for patients with neuroblastoma. *Cancer Res* 2004;64:6883-91.
76. Li Z, Thiele CJ. Targeting Akt to increase the sensitivity of neuroblastoma to chemotherapy: lessons learned from the brain-derived neurotrophic factor/TrkB signal transduction pathway. *Expert Opin Ther Targets* 2007;11:1611-21.
77. Douma S, Van LT, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van GE, Peeper DS. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 2004;430:1034-9.
78. Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW, Cohn SL. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1996;14:405-14.

79. Eggert A, Ikegaki N, Kwiatkowski J, Zhao H, Brodeur GM, Himelstein BP. High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:1900-8.
80. Nakamura K, Martin KC, Jackson JK, Beppu K, Woo CW, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 2006;66:4249-55.
81. Han L, Zhang Z, Qin W, Sun W. Neurotrophic receptor TrkB: Is it a predictor of poor prognosis for carcinoma patients? *Med Hypotheses* 2007;68:407-9.
82. Tanaka K, Mohri Y, Nishioka J et al. Neurotrophic receptor, tropomyosin-related kinase B as an independent prognostic marker in gastric cancer patients. *J Surg Oncol* 2009;99:307-10.
83. Li Z, Beutel G, Rhein M et al. High-affinity neurotrophin receptors and ligands promote leukemogenesis. *Blood* 2009;113:2028-37.
84. Stephan H, Zakrzewski JL, Boloni R, Grasemann C, Lohmann DR, Eggert A. Neurotrophin receptor expression in human primary retinoblastomas and retinoblastoma cell lines. *Pediatr Blood Cancer* 2008;50:218-22.
85. Yu X, Liu L, Cai B, He Y, Wan X. Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TrkB in human ovarian cancer. *Cancer Sci* 2008;99:543-52.

86. Lei L, Parada LF. Transcriptional regulation of Trk family neurotrophin receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:522-32.
87. Nockher WA, Renz H. Neurotrophins in inflammatory lung diseases: modulators of cell differentiation and neuroimmune interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:559-78.
88. Yao Q, Haxhiu MA, Zaidi SI, Liu S, Jafri A, Martin RJ. Hyperoxia enhances brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor expression in peribronchial smooth muscle of neonatal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L307-L314.
89. Nassenstein C, Kerzel S, Braun A. Neurotrophins and neurotrophin receptors in allergic asthma. *Prog Brain Res* 2004;146:347-67.
90. Marcet-Palacios M, Ulanova M, Duta F et al. The transcription factor Wilms tumor 1 regulates matrix metalloproteinase-9 through a nitric oxide-mediated pathway. *J Immunol* 2007;179:256-65.
91. Belouchi NE, Roux E, Savineau JP, Marthan R. Effect of chronic hypoxia on calcium signalling in airway smooth muscle cells. *Eur Respir J* 1999;14:74-9.
92. Ahmed T, Marchette B. Hypoxia enhances nonspecific bronchial reactivity. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:839-44.

93. Fayon M, Rebola M, Berger P et al. Increased secretion of leukemia inhibitory factor by immature airway smooth muscle cells enhances intracellular signaling and airway contractility. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L244-L251.
94. Clayton RA, Nally JE, MacLean MR, Thomson NC, McGrath JC. Chronic exposure to hypoxia attenuates contractile responses in rat airways in vitro: a possible role for nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1999;385:29-37.
95. Roux E, Duvert M, Marthan R. Combined effect of chronic hypoxia and in vitro exposure to gas pollutants on airway reactivity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L628-L635.
96. Hahn C, Islamian AP, Renz H, Nockher WA. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:787-94.
97. Goedert M, Stoeckel K, Otten U. Biological importance of the retrograde axonal transport of nerve growth factor in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:5895-8.
98. Qiao LY, Grider JR. Up-regulation of calcitonin gene-related peptide and receptor tyrosine kinase TrkB in rat bladder afferent neurons following TNBS colitis. *Exp Neurol* 2007;204:667-79.

99. Renn CL, Lin L, Thomas S, Dorsey SG. Full-length tropomyosin-related kinase B expression in the brainstem in response to persistent inflammatory pain. *Neuroreport* 2006;17:1175-9.
100. Braun A, Lommatzsch M, Neuhaus-Steinmetz U et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to neuronal dysfunction in a model of allergic airway inflammation. *Br J Pharmacol* 2004;141:431-40.
101. Lommatzsch M, Schloetcke K, Klotz J et al. Brain-derived neurotrophic factor in platelets and airflow limitation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:115-20.
102. Noga O, Hanf G, Schaper C, O'Connor A, Kunkel G. The influence of inhalative corticosteroids on circulating Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 in allergic asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1906-12.
103. Lee SY, Kwon S, Kim KH et al. Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97:794-9.
104. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999;94:1561-7.
105. Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J* 2006;396:517-27.

106. Chachami G, Hatziefthimiou AA, Liakos P et al. Exposure of differentiated Airway Smooth Muscle cells to serum stimulates both induction of Hypoxia Inducible Factor-1 {alpha} and airway responsiveness to ACh. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007.
107. Evans CM, Kim K, Tuvim MJ, Dickey BF. Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects. *Curr Opin Pulm Med* 2009;15:4-11.
108. Prakash YS, Iyanoye A, Ay B, Mantilla CB, Pabelick CM. Neurotrophin effects on intracellular Ca²⁺ and force in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L447-L456.
109. Jacobs ER, Zeldin DC. The lung HETEs (and EETs) up. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1-H10.
110. Bennedich KL, Gustafsson LE, Olgart HC. Brain-derived neurotrophic factor enhances histamine-induced airway responses and changes levels of exhaled nitric oxide in guinea pigs in vivo. *Eur J Pharmacol* 2008;595:78-83.
111. Bennedich KL, Gustafsson LE, Olgart HC. Brain-derived neurotrophic factor enhances histamine-induced airway responses and changes levels of exhaled nitric oxide in guinea pigs in vivo. *Eur J Pharmacol* 2008;595:78-83.
112. Sopi RB, Martin RJ, Haxhiu MA et al. Role of brain-derived neurotrophic factor in hyperoxia-induced enhancement of contractility and impairment of relaxation in lung parenchyma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295:L348-L355.

113. Cai D, Holm JM, Duignan IJ et al. BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart. *Physiol Genomics* 2006;24:191-7.

9 Lebenslauf und Publikationsliste

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Erklärung

Ich, Lina Sciesielski, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Mechanismen und (patho)physiologische Konsequenzen einer sauerstoffabhängigen Regulation des TrkB-Neurotrophinrezeptorgens“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 30. Juni 2009

Lina Sciesielski