

Die Bedeutung des Tyrosinkinase-Rezeptors TrkB
bzw. seiner Isoformen in der Pathogenese der
idiopatischen pulmonalarteriellen Hypertonie

Anna Speckens

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Die Bedeutung des Tyrosinkinase-Rezeptors TrkB
bzw. seiner Isoformen in der Pathogenese der
idiopatischen pulmonalarteriellen Hypertonie**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Anna C. Speckens

aus Tuttlingen

Gießen 2011

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. Moll

Gutachter: Prof. Dr. L. Fink

Gutachter: Prof. Dr. Dr. T. Braun

Tag der Disputation:

24.01.2013

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | IV |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Pulmonale Hypertonie..... | 1 |
| 1.2 Der Tyrosinkinase-Rezeptor TrkB..... | 5 |
| 1.2.1 Die Struktur des TrkB-Rezeptors..... | 7 |
| 1.3 Neurotrophine | 8 |
| 1.4 Die Signalübertragung durch Trk-Rezeptoren..... | 9 |
| 1.4.1 Der Ras-MAP-Kinase-Signalweg..... | 10 |
| 1.4.2 Der Akt-PI3-Kinase-Signalweg | 11 |
| 1.4.3 Der PLC- γ 1-Signalweg | 11 |
| 1.5 Die Bedeutung des TrkB-Rezeptors für die Zelle..... | 13 |
| 1.6 Die TrkB-Isoformen..... | 14 |
| 1.7 Die Bedeutung des TrkB-Rezeptors in der Pathogenese der IPAH..... | 17 |
| 1.8 Zielsetzungen und Fragestellungen dieser Arbeit..... | 18 |
| 2 Materialien..... | 20 |
| 2.1 Bakterienstämme | 20 |
| 2.2 Eukaryotische Zellen..... | 20 |
| 2.3 Geräte..... | 20 |
| 2.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien..... | 21 |
| 2.5 Puffer und Lösungen..... | 23 |
| 2.6 Kits..... | 24 |
| 2.7 Primer | 24 |
| 3 Methoden..... | 26 |
| 3.1 Zell-Lyse und RNA-Elution..... | 26 |
| 3.2 Reverse Transkription..... | 26 |
| 3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Gel-Elektrophorese..... | 27 |
| 3.4 DNA-Sequenzierung | 31 |
| 3.5 Klonierung mit dem pGEM-T Easy Vektor | 33 |
| 3.6 Kultivierung elektrokompeter E. coli-Bakterien..... | 34 |
| 3.6.1 Herstellung von LB-Medium | 35 |
| 3.6.2 Herstellung von Ampicillin-Selektionsplatten | 35 |
| 3.6.3 Herstellung von Ampicillin-IPTG-X-Gal-Selektionsplatten | 35 |
| 3.6.4 Präparation elektrokompeter E. coli-Bakterien | 35 |
| 3.7 Transformation elektrokompeter E. coli-Bakterien | 36 |
| 3.8 Minipräparation | 37 |
| 3.9 Restriktionskontrolle..... | 38 |
| 3.10 Klonierung mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1(+) | 38 |
| 3.11 Maxipräparation | 40 |
| 3.12 Kultivierung humaner glatter Muskelzellen aus Pulmonalarterien..... | 41 |
| 3.13 Transfektion von huPASMCM..... | 41 |
| 3.14 Real-Time-PCR (RTQ-PCR)..... | 42 |
| 3.15 Proliferationsassay mit Bromodesoxyuridin (BrdU)..... | 43 |
| 3.16 Migrationsassay | 45 |

| | |
|---|------------|
| 3.17 Adhäsionsassay | 46 |
| 3.18 Statistische Auswertung..... | 49 |
| 3.18.1 Auswertung der RTQ-PCR | 49 |
| 3.18.2 Auswertung des Proliferationsassays..... | 50 |
| 3.18.3 Auswertung des Migrationsassays | 51 |
| 3.18.4 Auswertung des Adhäsionsassays | 51 |
| 4 Ergebnisse | 53 |
| 4.1 Isolierung und Sequenzierung der TrkB-Isoformen..... | 53 |
| 4.2 Endogene Expression der TrkB-Isoformen in huPASM..... | 53 |
| 4.3 Überexpression der TrkB-Isoformen in huPASM..... | 55 |
| 4.4 Proliferationsassay | 59 |
| 4.5 Migrationsassay | 64 |
| 4.6 Adhäsionsassay | 67 |
| 4.7 Zusammenfassung..... | 71 |
| 5 Diskussion | 72 |
| 5.1 Pathomechanismen der IPAH..... | 72 |
| 5.1.1 Proliferation | 72 |
| 5.1.2 Migration..... | 76 |
| 5.1.3 Adhäsion | 79 |
| 5.2 Limitationen dieser Studie..... | 82 |
| 5.3 Ausblick und Therapieansätze | 85 |
| 6 Zusammenfassung | 89 |
| 6.1 Summary..... | 91 |
| 7 Literatur | 93 |
| Erklärung..... | 104 |
| Danksagung | 105 |
| Lebenslauf..... | 106 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung(en) |
| Akt | eine Kinase im Akt-PI3-Kinase-Signalweg, auch bekannt als Proteinkinase B |
| ANOVA | Varianzanalyse |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| B | Base(n) |
| BDNF | Brain-derived Neurotrophic Factor (ein Neurotrophin) |
| Bp | Basenpaar(e) |
| BrdU | Bromodesoxyuridin |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| C | Cytosin |
| cDNA | mRNA-Komplementärstrang |
| CT | Threshold Cycle (Zyklus, bei dem der exponentielle Verlauf der Amplifikationskurve der RTQ-PCR beginnt) |
| DAG | Diazylglyzerin |
| dATP(s) | Desoxyribose-Adenosin-Triphosphat(e) |
| ddNTP(s) | Didesoxyribose-Nukleosidtriphosphat(e) |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | DNA-spaltendes Enzym |
| dNTPs | Desoxyribose-Nukleosidtriphosphat(e) |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay (immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer Farbreaktion basiert) |
| ERK | extrazellulär signalregulierte Kinasen, ein Synonym für die MAP |
| Exp | Experiment |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| G | Guanin |
| Gab | ein Signalprotein im Akt-PI3-Kinase-Signalweg |
| Gbr2 | ein intrazelluläres Signalprotein |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| hu | human |
| huNT3 | humanes Neurotrophin-3 (ein Neurotrophin) |
| huNT4 | humanes Neurotrophin-4 (ein Neurotrophin) |
| huPASMC | humane glatte Muskelzellen aus Pulmonalarterien |
| huPBGD | humane Porphobilinogen-Deaminase |
| IP3 | Inositoltriphosphat |
| IPAH | idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie |
| IPTG | Isopropyl- β -D-1-Thiogalactopyranosid |
| kb | Kilobase(n) |
| kDa | Kilo-Dalton |
| MAP | mitogenaktivierte Proteinkinase(n) |
| MAP1/2 | mitogenaktivierte Proteinkinasen 1 und 2 |
| MEK1 | eine Proteinkinase in einigen intrazellulären Signalwegen |
| min | Minute(n) |
| mRNA | Boten-RNA |
| NCBI | National Center for Biotechnology |
| NGF | Nerve Growth Factor (ein Neurotrophin) |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NT | Neurotrophin(e) |
| NTR | Neurotrophin-Rezeptor |
| NTRK2 | Bezeichnung für das TrkB-Gen |
| OD600 | Messung in einem Spektralphotometer bei 600 nm; der gemessene Extinktionswert zeigt die Dichte einer Bakterienkultur |
| PAH | Pulmonalarterielle Hypertonie |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PH | Pulmonale Hypertonie |
| PI3-Kinase | Phosphatidylinositol-3-Kinase, ein Enzym im Akt-PI3-Kinase-Signalweg |
| PIP2 | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PIP3 | Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat |
| PKC | Proteinkinase C |

| | |
|-----------------|--|
| PKC δ | Proteinkinase C- δ , eine Isoform der PKC |
| PLC- γ 1 | Phospholipase C- γ 1 |
| POD | Peroxidase |
| Raf | eine Proteinkinase in einigen intrazellulären Signalwegen |
| Ras | ein Signalprotein im Ras-MAP-Kinase-Signalweg |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAse | RNA-spaltendes Enzym |
| RP | Rückwärts-Primer |
| RT | Raumtemperatur |
| RTK | Rezeptor-Tyrosin-Kinase(n) |
| RTQ-PCR | quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion |
| s | Sekunde(n) |
| s. a. | siehe auch |
| s. Abb. | siehe Abbildung |
| SDS | Sodium-Dodecyl-Sulfat |
| Shc | ein intrazelluläres Adapter-Protein |
| s. Kap. | siehe Kapitel |
| s. o. | siehe oben |
| SOS | ein Signalprotein im Ras-MAP-Kinase-Signalweg |
| Stim | Stimulation mit den Liganden BDNF oder huNT4 |
| s. u. | siehe unten |
| T | Thymin |
| TAE | Tris-Essigsäure-EDTA |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA |
| Trk | historisch: "Tropomyosin-Rezeptor-Kinase(n)", heute gängige Abkürzung für die Tyrosin-Rezeptor-Kinase(n) |
| TrkB | Tyrosin-Rezeptor-Kinase B |
| TrkB-b | Tyrosin-Rezeptor-Kinase B der Isoform b (Nukleinsäure) |
| TrkB-c | Tyrosin-Rezeptor-Kinase B der Isoform c (Nukleinsäure) |
| TrkB-e | Tyrosin-Rezeptor-Kinase B der Isoform e (Nukleinsäure) |
| TrkB-full | das vollständige TrkB-Rezeptor-Protein |
| TrkB-T1 | ein verkürztes TrkB-Rezeptor-Protein, kodiert durch TrkB-b |
| TrkB-T-Shc | ein verkürztes TrkB-Rezeptor-Protein, kodiert durch TrkB-e |
| U | Einheit(en) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| Vek | Vektor |
| VP | Vorwärts-Primer |
| vSMC | vaskuläre glatte Muskelzelle(n) |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid |

1 Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie

Per Definition besteht eine Pulmonale Hypertonie (PH) bei einem pulmonalarteriellen Mitteldruck über 25 mmHg in Ruhe und über 30 mmHg bei Belastung [1]. Unter den Begriff PH fallen demnach zahlreiche Erkrankungen äußerst heterogener Ätiologie, die sich durch die Druckerhöhung im kleinen Kreislauf auszeichnen. Wegen der unspezifischen Leitsymptome, wie Belastungsdyspnoe, rasche Ermüdung und Schwindel, wird die PH in der Regel erst mit großer zeitlicher Verzögerung diagnostiziert. Zur Erleichterung und Standardisierung der Diagnose wurde 1973 eine erste klinische Klassifikation der PH verfasst, die seitdem mehrfach modifiziert wurde. Nach der aktuellsten Klassifikation durch die internationale Fachtagung für PH in Dana Point 2008 wird die PH nach pathologischen und klinischen Kriterien, sowie therapeutischen Ansätzen in fünf Kategorien unterteilt [2]:

1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH): 1.1 idiopathisch, 1.2 hereditär, 1.3 medikamenten-/toxininduziert, 1.4 in Assoziation mit anderen Erkrankungen (Bindegewebserkrankungen, HIV-Infektion, portale Hypertonie, angeborene Herzfehler, Schistosomiasis, chronisch hämolytische Anämie), 1.5 persistierende PH des Neugeborenen

1'. Pulmonale venookklusive Erkrankung und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose

2. PH bei Linksherzerkrankungen: 2.1 systolische Dysfunktion, 2.2 diastolische Dysfunktion, 2.3 valvulär

3. PH bei Lungenerkrankungen/Hypoxie: 3.1 chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen, 3.2 interstitielle Lungenerkrankungen, 3.3 andere Lungenerkrankungen mit restriktiver und obstruktiver Komponente, 3.4 Schlafapnoe-Syndrom, 3.5 Hypoventilationssyndrome, 3.6 chronische Höhenkrankheit, 3.7 Fehlbildungen

4. PH aufgrund thrombotischer/embolischer Prozesse

5. PH mit unklarer multifaktorieller Genese: 5.1 hämatologisch, 5.2 systemisch, 5.3 metabolisch, 5.4 andere.

Die PAH zählt zu den primär vaskulären Lungenerkrankungen und zeichnet sich durch charakteristische Veränderungen im pulmonalarteriellen Gefäßbett aus. Die Gesamtheit dieser Veränderungen wird als vaskuläres Remodeling bezeichnet, welches eine zunehmende Widerstandserhöhung im kleinen Kreislauf zur Folge hat. Von den Remodeling-Prozessen sind alle Gefäßwandschichten betroffen [3].

Das gesunde arterielle Gefäß besteht aus den Schichten Intima, Media und Adventitia. Unter physiologischen Bedingungen besteht die Intima aus einschichtigem Endothel (das einer Basallamina aufsitzt) und einer subendothelialen Schicht. Die subendotheliale Schicht besitzt vorwiegend extrazelluläre Matrix (EZM) und nur wenige Zellen. Die Media, die breiteste Schicht der Gefäßwand, besteht aus glatten Muskelzellen (vSMC) und einer durch sie produzierten EZM. Die der Intima direkt angrenzenden vSMC sind durch myoendotheliale Kontakte mit den Endothelzellen der Intima verbunden und sind so vermutlich auch an der Regulation der Gefäßweite beteiligt. Die vSMC der Media sind keine homogene Zellpopulation, vielmehr handelt es sich um eine Bandbreite von verschiedenen Phänotypen. Endpunkte dieses Spektrums bilden auf der einen Seite der differenzierte, kontraktile Phänotyp, auf der anderen Seite der undifferenzierte Phänotyp mit der Fähigkeit zur Proliferation, Migration [4] und Produktion von EZM [5]. Umgeben wird die Media von der Adventitia, einer Bindegewebsschicht, die das Gefäß im umgebenden Gewebe verankert. Sie ist reich an Fibroblasten und EZM. In der Adventitia sind die Fibroblasten maßgeblich für die Neusynthese und die Überwachung des Abbaus der EZM verantwortlich [6]. Die EZM kommt in allen Gefäßwandschichten vor, unterscheidet sich aber von Schicht zu Schicht in Menge und Zusammensetzung. Ihre Hauptbestandteile sind Kollagenfibrillen und elastische Fasern, Glykosaminoglykane, Proteoglykane sowie Adhäsionsproteine [7]. Über diese Bestandteile werden mechanische Stabilisierung und Zellkommunikation ermöglicht.

Bei der PH ist eine endotheliale Dysfunktion vermutlich die früheste Störung im Remodeling-Prozess der pulmonalarteriellen Gefäße. Später folgen Endothelzell-Proliferationen und eine Fibrosierung der Intima durch die Einwanderung matrixbildender Zellen (s. u.). Die in der Intima ebenfalls beobachteten plexiformen Läsionen (sie entstehen durch ungeordnete

monoklonale Endothelzell-Proliferationen) gelten nach heutigem Kenntnisstand nicht mehr als PAH-spezifisch, da sie auch bei anderen hochdruckassoziierten Erkrankungen entdeckt wurden [8]. Bislang sind die genauen Signalwege, über welche die endotheliale Dysfunktion mit den Veränderungen in Media und Adventitia verknüpft sind, unbekannt. In der benachbarten Media zeigt sich zunächst eine Hypertrophie der dort ansässigen vSMC. Daneben erfolgt eine massive Dedifferenzierung (Rückentwicklung) differenzierter vSMC zu unreifen Phänotypen mit der Fähigkeit zur Proliferation, Migration und Sekretion von EZM [9, 10]. Die Proliferation der dedifferenzierten vSMC führt, zusammen mit der vSMC-Hypertrophie, zu einer Dickenzunahme der Media und somit zur Gefäßlumenverengung [11]. Außerdem wandern die dedifferenzierten vSMC vermehrt in die Intima ein, um dort ebenfalls zu proliferieren und Matrixproteine zu sezernieren [12]. Dieser Prozess, auch als Neointima-Bildung bezeichnet, begünstigt die weitere Lumenverengung. Die Migration der vSMC erfolgt nicht nur in benachbarte Gefäßwandschichten, sondern auch entlang der Gefäßachse in Richtung Peripherie. Auf diesem Weg kommt es zu einer Muskularisierung primär nichtmuskulärer Arteriolen. Die abnorm gesteigerte EZM-Synthese durch vSMC führt neben dem erhöhten EZM-Gehalt in den Gefäßwandschichten auch zu einer veränderten Zusammensetzung der EZM (durch die bevorzugte Produktion der Matrixproteine Kollagen und Fibronectin [3]). Beides bewirkt eine verminderte Gefäß-Compliance [13, 14]. Die modifizierte EZM beeinflusst wiederum vSMC im Hinblick auf Differenzierung, Proliferation, Migration und Sekretion von weiteren Matrixproteinen [15], wodurch ein Circulus virtiosus entsteht. Auch die Adventitia ist von den Remodeling-Prozessen betroffen: Olschewski et al. berichten von einer gesteigerten Fibroblastenproliferation und einer vermehrten Matrixproduktion (darunter vor allem Kollagen) [8]. Ähnlich den vSMC der Media wandern auch die Fibroblasten der Adventitia vermehrt in andere Gefäßwandschichten wie Media und Intima ein. Dort führen sie zu Fibrosierungen und tragen ebenfalls zur Neointima-Bildung bei (s. o.) [16]. Ferner wandeln sie sich zunehmend zu kontraktile Myofibroblasten um, deren Kontraktion die Wandspannung des Gefäßes potentiell erhöhen kann.

Insgesamt erfahren alle Gefäßwandschichten eine Dickenzunahme. Das Ausmaß der strukturellen Veränderungen korreliert dabei negativ mit dem

Gefäßdurchmesser: Je geringer das Gefäßkaliber, desto stärker ist das Ausmaß der Wandverdickung. Demzufolge sind bei der PH vorwiegend kleine Arterien und Arteriolen betroffen, während die großen Pulmonalisstämme nur geringfügig Veränderungen aufweisen [17]. Neben dem Remodeling des pulmonalarteriellen Gefäßbetts ist die Pathophysiologie der PAH durch eine gesteigerte Vasokonstriktion gekennzeichnet. Diese beruht einerseits auf der massiven Proliferation und Ausbreitung von kontraktilen vSMC. Daneben konnte eine Synthesesteigerung vasokonstringierender Mediatoren (z. B. Endothelin-1) und eine Syntheseminderung vasodilatierender Mediatoren (z. B. Prostazyklin, Stickstoffmonoxid (NO)) nachgewiesen werden [18, 19]. In der Summe führen die genannten Veränderungen zu einer verminderten Gefäß-Compliance und einer Verkleinerung des Gefäßlumens. Die Verdickung der Pulmonalarterienwände auf Kosten von Alveolen kann den Austausch der Atemgase erschweren und zu Hypoxie und Hyperkapnie führen. Durch die verminderte Gefäß-Compliance entsteht eine Anpassungsstörung der Perfusion an die Ventilation der Lunge, wodurch der Gasaustausch weiter eingeschränkt wird. In Anlehnung an das Hagen-Poiseuille'sche Gesetz führen bereits gering verkleinerte Gefäß-Lumina zu äußerst starken Druck- und Widerstandserhöhungen im kleinen Kreislauf. Dieser Grundsatz wird durch die Tatsache verständlich, dass das gleiche Herzzeitvolumen einen massiv verringerten Gesamtgefäßquerschnitt passieren muss. Die so resultierende gesteigerte Strömungsgeschwindigkeit des Blutes begünstigt durch erhöhten Scher-Stress die weitere Entstehung endothelialer Läsionen (s. o.). Durch die Widerstandserhöhung im pulmonalarteriellen Gefäßbett steigt die Nachlast des rechten Ventrikels. Dieser reagiert auf die Druckbelastung zunächst mit einer konzentrischen Hypertrophie (Cor pulmonale). Im weiteren Verlauf führt die PAH zu Rechtsherzinsuffizienz, Rechtsherzversagen und Tod.

Die idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH) ist eine Unterform der PAH (s. Klassifikation von Dana Point). Mit einer Inzidenz von 1-2 Fällen pro 1 Million Menschen pro Jahr in Deutschland handelt es sich um eine sehr seltene Erkrankung mit sporadischem Auftreten, für die bisher kein Auslöser identifiziert werden konnte [2]. Die IPAH ist durch einen sehr raschen und progressiven Verlauf gekennzeichnet. Unbehandelt beträgt die mittlere Lebenserwartung nach Diagnosestellung ungefähr drei Jahre [20]. Geringe

Veränderungen des Herzzeitvolumens induzieren schwerwiegende Druckerhöhungen im Lungenkreislauf, wodurch schon kleinste körperlichen Bewegungen zu einer Dekompensation führen können [20]. Die infauste Prognose und die maximal eingeschränkte Lebensqualität der Betroffenen machen es notwendig, die Genese dieser Erkrankung aufzuklären um neue Therapieansätze zu entwickeln.

1.2 Der Tyrosinkinase-Rezeptor TrkB

TrkB ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der neben TrkA und TrkC der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), Klasse VII, angehört [21]. Ein Tyrosinkinase-Rezeptor ist ein transmembranärer Rezeptor mit enzymatischen Eigenschaften. An der extrazellulären Domäne binden die Liganden des Rezeptors und das Signal wird über das intrazellulär gelegene katalytische Zentrum, die Tyrosinkinase, in das Zellinnere weitergeleitet.

Die Liganden der Trk-Rezeptoren sind die Neurotrophine (gr. „Nervennährstoffe“), die zuerst in neuronalem Gewebe identifiziert werden konnten. Ihre Funktionen sind dort bis heute am besten untersucht: Wie ihr Name verrät, vermitteln sie die Entwicklung und Erhaltung des Nervensystems, indem sie durch Trk-Rezeptor-Aktivierung die Differenzierung, Proliferation und das Überleben von Neuronen induzieren [22, 23]. In den letzten Jahren wurde bekannt, dass Neurotrophine und Trk-Rezeptoren auch außerhalb des Nervensystems eine weite Verbreitung aufweisen [24-26]. Beim Menschen wurde das Auftreten von TrkB bislang in folgenden Geweben beschrieben: In endokrinen Zellen und Gefäßwänden der Submukosa von Duodenum und Kolon [27], in α -Zellen des exokrinen Pankreas, in Monozyten und Makrophagen sowie im Stratum granulosum der Epidermis [26]. Im Knochenmark wurde das Vorkommen von TrkB in diversen hämatopoetischen Zellen beobachtet: In Erythroblasten (Erythropoese), in Metamyelozyten (Granulozytopoese) und Megakaryozyten (Thrombozytopoese) [28]. Ebenfalls nachgewiesen wurde der Rezeptor in Oozyten und Granulosazellen des humanen Ovars, wo eine Beteiligung an der Follikelreifung angenommen wird [29]. Des Weiteren scheint die Expression von TrkB eine wichtige Voraussetzung bei der Entwicklung des Koronargefäßsystems zu sein [30].

Nach heutigem Wissensstand wird der TrkB-Rezeptor auch in Lungengewebe exprimiert: TrkB wurde in den Pulmonalarterien in den Gefäßwandschichten Intima, Media und Adventitia [31], aber auch in Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Becherzellen der Bronchien nachgewiesen [32, 33]. Es zeigte sich außerdem eine Expression in alveolären und interstitiellen Makrophagen sowie neutrophilen Granulozyten und Mastzellen der Lunge [33-35]. Neueste Studien konnten eine essentielle Rolle des TrkB-Rezeptors für die Lungen-Organogenese im Tiermodell nachweisen [36].

Zudem häufen sich Hinweise, dass TrkB an der Genese verschiedenster Erkrankungen beteiligt sein könnte. Eine erhöhte TrkB-Expression wurde bei epithelialen [37-40], neuroendokrinen [37, 41], lymphatischen [42, 43] und insbesondere embryonalen Tumoren [44] beobachtet. Dabei ist das Auftreten von TrkB mit aggressivem und invasivem Tumorwachstum, Neigung zur Metastasierung und sehr schlechter Prognose assoziiert [38, 45]. Kürzlich konnte auch eine Beteiligung von TrkB an der Genese vaskulärer Erkrankungen nachgewiesen werden. Donovan et al. entdeckten TrkB in vSMC atherosklerotisch veränderter Koronargefäße [46] und eine weitere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass TrkB dort für Atherogenese und Plaque-Instabilität mitverantwortlich ist [47]. Es wird aber auch ein Zusammenhang zwischen TrkB und einigen Lungenerkrankungen vermutet. Dabei handelt es sich vorwiegend um Erkrankungen mit einem entzündlichen/allergischen Hintergrund. TrkB wurde in Immunzellen von Asthmatikern detektiert [48]. Einer seiner Liganden (s. Kap. 1.3) wies lokal sowie im Blut einen signifikanten Anstieg nach Allergenbelastung auf [48, 49] und steht unter Verdacht über TrkB eine Hyperreagibilität der Bronchien zu vermitteln [50, 51]. Eine erhöhte Expression des TrkB-Rezeptors und seiner Liganden zeigte sich auch bei Lungenerkrankungen, die mit einem Gewebsremodeling einhergehen, wie der idiopathischen Lungenfibrose [52], der interstitiellen Pneumonie [53, 54] und der Lungensarkoidose [55]. Bei letzterer konnte das erhöhte Vorkommen von TrkB in Alveolarmakrophagen und pulmonalen T-Zellen belegt werden [56]. Aktuellste Studienergebnisse weisen auf eine Gefäßtonus-regulierende Funktion von TrkB in Kombination mit seinen Liganden hin, weshalb eine Beteiligung des Rezeptors an der Pathogenese primär vaskulärer

Lungenerkrankungen, wie der pulmonalen Hypertonie (s. Kap. 1.1), vermutet wird [57].

1.2.1 Die Struktur des TrkB-Rezeptors

Wie oben erwähnt, ist TrkB ein transmembranärer, enzymgekoppelter Rezeptor. Es handelt es sich um ein Glykoprotein mit einer Molekülmasse von ca. 145 kDa [33]. Die Struktur des TrkB-Rezeptors ist in Abb. 1 dargestellt. Sein extrazellulärer Anteil setzt sich aus einer leucinreichen Domäne, zwei cysteinreichen Regionen und zwei immunglobulinähnlichen Domänen (Ig-C2) zusammen. Darauf folgt ein Transmembransegment, das die Lipidmembran in Form einer α -Helix durchzieht. Die intrazelluläre Domäne wird von der Tyrosinkinase gebildet [58]. Dieses Enzym wird bei seiner Aktivierung an seinen Tyrosinresten phosphoryliert, worauf seine Namensgebung beruht. In der Folge aktiviert es seine Substrate ebenfalls durch Phosphatgruppenübertragung (s. Kap. 1.4). Die Bindungsspezifität für die Neurotrophine wird primär durch die Ig-C2-Region des Rezeptors gewährleistet, wobei vermutlich auch der leucinreiche Abschnitt und die Cystein-Cluster eine Rolle spielen [59]. Bisläng sind die Funktionen der extrazellulären Domänen nicht ganz verstanden [60].

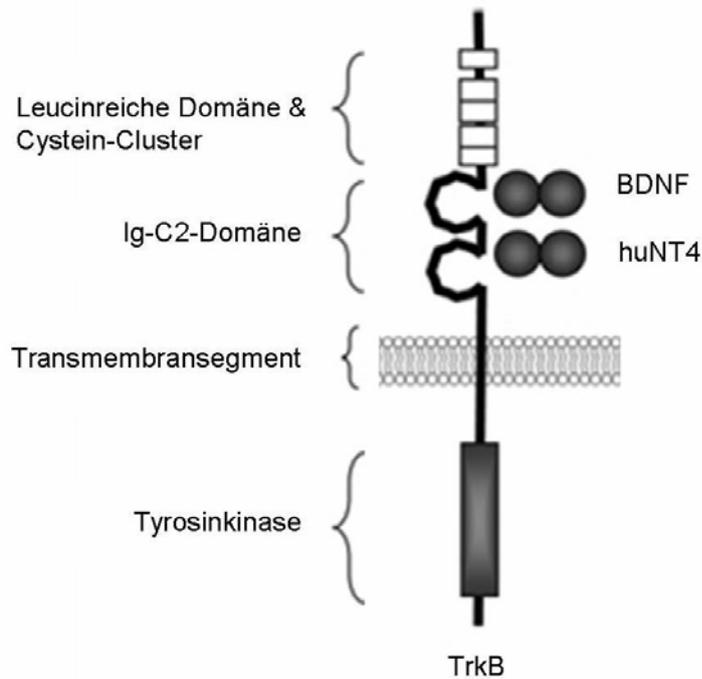


Abb.1: Die Struktur des TrkB-Rezeptors. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einer leucinreichen Domäne, zwei cysteinreichen Regionen und zwei immunglobulinähnlichen Domänen (Ig-C2). Es folgt das Transmembransegment und die intrazelluläre Domäne mit der Tyrosinkinase. Modifiziert nach Arevalo et al. [60].

1.3 Neurotrophine

Die Neurotrophine sind die Liganden der Trk-Rezeptoren. Es handelt sich um kleine, basische Proteine mit einer Molekülmasse von 13,2–15,9 kDa, die durch eine ähnliche Tertiärstruktur charakterisiert sind [61]. Neurotrophine werden in der Zelle in Form von Pro-Neurotrophinen synthetisiert [62]. Ihre Reifung erfolgt post-translational durch Proteasen [63]. Bisher konnten beim Menschen vier Neurotrophin-Typen identifiziert werden: Nerve Growth Factor (NGF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), humanes Neurotrophin-3 (huNT3) und humanes Neurotrophin-4 (huNT4) [64, 65]. Die drei Trk-Rezeptortypen (TrkA, TrkB, TrkC) besitzen unterschiedliche Affinitäten zu den Neurotrophinen: TrkB bindet mit hoher Affinität BDNF und huNT4 [66] und mit geringer Affinität huNT-3 [67].

Auch die unreifen Pro-Neurotrophine sind in der Lage mit den Rezeptoren zu interagieren. Demzufolge können sie den p75-Neurotrophin-Rezeptor (p75NTR) aktivieren [68]. Dieser Rezeptor gehört zu der Familie der

Tumor-Nekrose-Faktoren und bindet jeden Pro-Neurotrophin-Typ mit gleicher und hoher Affinität [69]. Zu reifen Neurotrophinen hat er nur eine sehr geringe Bindungsaffinität [70]. p75NTR kann als Ko-Rezeptor der Trk-Rezeptoren fungieren und deren Effekte modulieren [23, 71].

1.4 Die Signalübertragung durch Trk-Rezeptoren

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Interaktion mit einem Trk-Rezeptor ist das Vorliegen reifer Neurotrophine in Homodimer-Form (Verkettung zweier Neurotrophine des gleichen Typs) [72]. Die Affinität des Rezeptors zu einem Neurotrophin-Monomer ist im Vergleich sehr gering. Die unreifen Pro-Neurotrophine sind nicht zu einer Aktivierung der Trk-Rezeptoren befähigt [68].

Bindet ein Neurotrophin-Dimer an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, bilden zwei Trk-Rezeptormoleküle ihrerseits ein Dimer (s. Abb. 2). Der Kontakt ihrer intrazellulär benachbart liegenden Domänen bewirkt eine Aktivierung der Kinasefunktion durch Autophosphorylierung [73]. Diese wechselseitige Phosphorylierung erfolgt an den Tyrosinresten der zytosolischen Rezeptordomänen [74]. Intrazelluläre Signalproteine können sich nun an die phosphorylierten Tyrosinreste anlagern und werden dadurch selbst aktiviert [75]. Auf diesem Weg wird eine intrazelluläre Signalkaskade angestoßen. Die Inaktivierung des Rezeptors erfolgt durch zelleigene Protein-Tyrosin-Phosphatasen, die eine Phosphatabspaltung katalysieren. Alternativ dazu kann der gesamte Rezeptorkomplex internalisiert und lysosomal abgebaut werden [76]. In Abwesenheit von Neurotrophinen sorgt die Ig-C2-Region für eine Stabilisierung der Rezeptor-Monomere, wodurch eine ligandenunabhängige Aktivierung verhindert werden soll [60].

Ausgehend von dem oben beschriebenen Mechanismus der TrkB-Aktivierung können in der Zelle verschiedene Signalkaskaden angestoßen werden: Der Ras-MAP-Kinase-Signalweg, der Akt-PI3-Kinase-Signalweg und der PLC- γ 1-Signalweg [77] (s. Abb. 3).

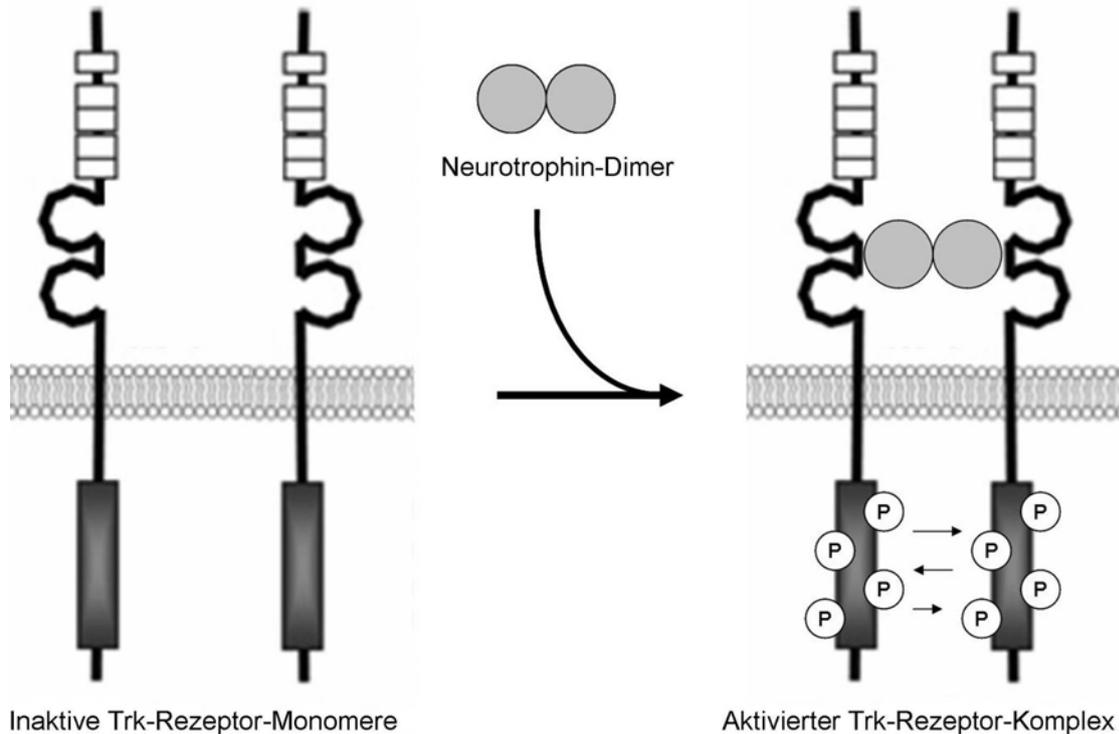


Abb. 2: Aktivierungsmechanismus der Trk-Rezeptoren. Die extrazelluläre Bindung eines Neurotrophin-Dimers bewirkt die Fusion zweier inaktiver Trk-Rezeptor-Monomere. Durch den resultierenden Kontakt der intrazellulären Domänen erfolgt die Aktivierung der Kinase durch Autophosphorylierung. Modifiziert nach Arevalo et al. [60].

1.4.1 Der Ras-MAP-Kinase-Signalweg

Wird ein intrazelluläres Adapter-Protein durch die phosphorylierten Tyrosinreste von TrkB aktiviert, setzt es seinerseits eine komplexe Phosphorylierungskaskade in Gang (s. Abb. 3 A): Das Adapter-Protein Shc kann über eine Verbindung mit den intrazellulären Signalproteinen Grb2 und SOS das Protein Ras aktivieren [78]. Ras ist ein kleines Protein, das mit seinem Lipidschwanz kovalent an die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran gebunden ist. Es spielt in diesem Signalweg eine Schlüsselrolle, da es eine Vielzahl nachgeschalteter Signalproteine aktivieren kann. Bei seiner Aktivierung durch den Nukleotidaustauschfaktor SOS wird sein GDP durch das energiereichere GTP ausgetauscht [79]. Es folgt eine komplexe Phosphorylierungskaskade, bei der sich eine Reihe von Proteinkinasen nacheinander aktivieren: Ras aktiviert die Kinase Raf, welche die Proteinkinase MEK1 anregt [80]. Diese wiederum aktiviert die Proteinkinasen MAPK1/2, die auch unter dem Namen ERK (extrazellulär signalregulierte Kinasen) bekannt

sind. Die phosphorylierten Proteinkinasen MAPK1/2 werden in den Zellkern transloziert. Über die Modulation von bestimmten Transkriptionsfaktoren kommt es zu einer Veränderung im Genexpressionsmuster der Zelle [81, 82].

Der Ras-MAP-Kinase-Signalweg fördert auf diesem Weg Zelldifferenzierung, Zellproliferation [83] und das Überleben von Zellen. Das Protein Ras spielt zudem bei Aktin-Polymerisationen eine wichtige Rolle. Diese Veränderungen des Zytoskeletts sind Voraussetzung für die Migration von Zellen [84]. Neben dem Protein Ras sollen aber auch die Proteinkinasen MAPK1/2 an der Zellmigration beteiligt sein. Es herrscht allerdings noch Uneinigkeit darüber, ob es sich um eine migrationsfördernde oder -hemmende Wirkung handelt [85, 86].

1.4.2 Der Akt-PI3-Kinase-Signalweg

Neben dem Ras-MAP-Kinase-Signalweg existiert ein zweiter Signalweg, der nach dem Enzym Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) benannt ist (s. Abb. 3 B). Die Stimulation des TrkB-Rezeptors aktiviert das (auch im Ras-MAP-Kinase-Signalweg) beteiligte Adapter-Protein Shc, das über eine Verbindung mit den Signalproteinen Grb2 und Gab die PI3-Kinase anregt [87]. Die aktivierte PI3-Kinase phosphoryliert das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) an der C3-Position seines Inositolrings. Aus PIP₂ entsteht so Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) [88]. PIP₃ aktiviert die Kinase Akt (auch bekannt als Proteinkinase B), welche nun über die Modulation von Transkriptionsfaktoren [89-92] das Genexpressionsmuster der Zelle variieren kann.

Der PI3-Kinase-Signalweg induziert so das Wachstum und Überleben von Zellen [93], sowie die Zelldifferenzierung [94] und Zellmigration [95].

1.4.3 Der PLC- γ 1-Signalweg

Der dritte, in diesem Zusammenhang wichtige, Signalweg verläuft über die Phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) (s. Abb. 3 C). Das Enzym wird ebenfalls durch die phosphorylierten Tyrosinreste des aktivierten TrkB-Rezeptors angeregt und hydrolysiert dann PIP₂ zu Diacylglycerin (DAG) und

Inositoltriphosphat (IP3) [96]. IP3 triggert die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und DAG aktiviert Isoformen der Proteinkinase C (PKC). Insbesondere die Isoform PKC δ ist über eine Phosphorylierung der Signalproteine Raf und MEK befähigt, die Proteinkinasen MAPK1/2 zu aktivieren [97].

Die MAPK1/2 induzieren über diesen Weg Zelldifferenzierung und Zellwachstum. Durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und die Aktivierung der Proteinkinase C kommt es in kontraktile Zellen (wie vSMC) zu einer Zellverkürzung. Der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel ist auch Voraussetzung für die Zellmigration [98], weshalb eine Beteiligung des PLC- γ 1-Signalwegs an der Migration denkbar wäre.

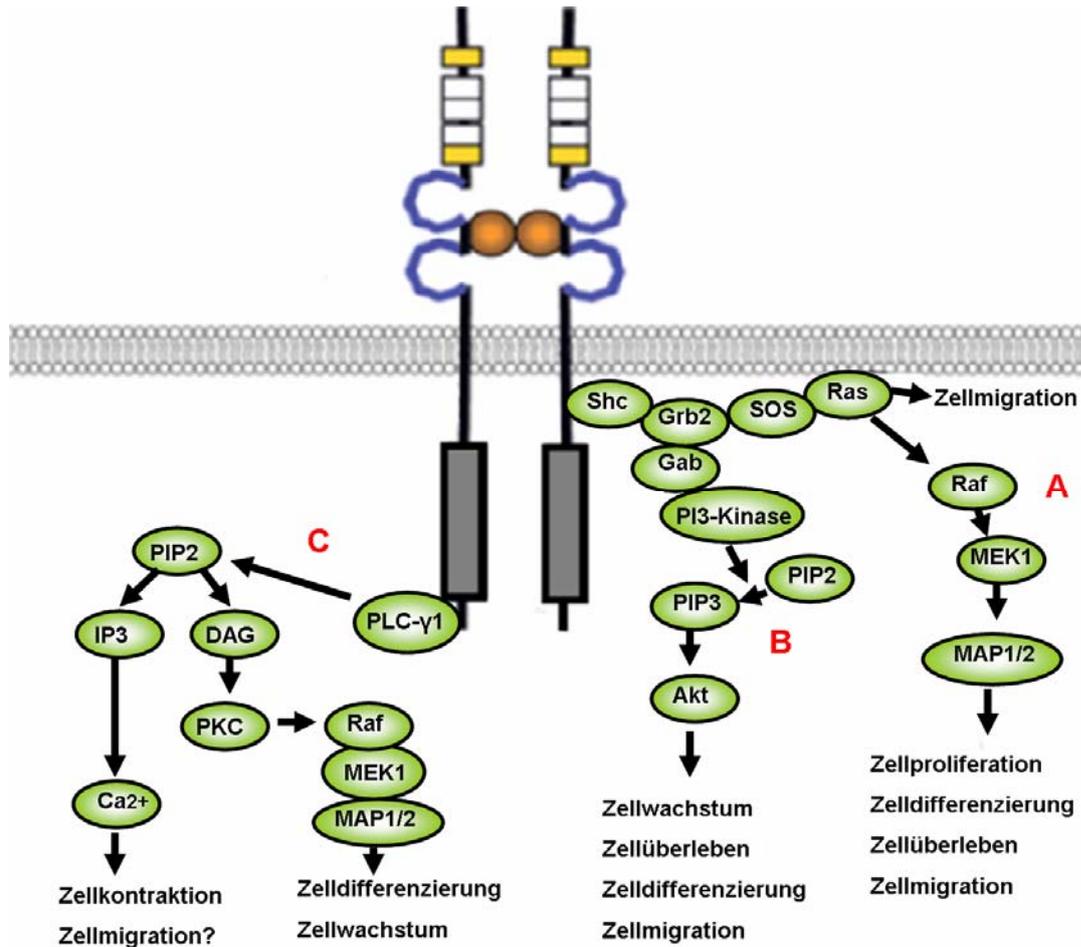


Abb. 3: TrkB-Rezeptor-assoziierte Signalwege. Dargestellt sind die drei wichtigsten Signalwege des TrkB-Rezeptors: Der Ras-MAP-Kinase-Signalweg (A), der Akt-PI3-Kinase-Signalweg (B) und der PLC- γ 1-Signalweg (C). Modifiziert nach Arevalo et al. [60].

1.5 Die Bedeutung des TrkB-Rezeptors für die Zelle

Durch die Interaktion von Trk-Rezeptor und Neurotrophin-Dimer wird das Genexpressionsmuster der Zelle verändert. Dadurch ändert sich auch das Verhalten der Zelle im Zellverband und der umgebenden EZM. Auf diesem Weg fördert TrkB die Zellproliferation, das Zellwachstum, das Zellüberleben, die Zelldifferenzierung und die Zellmigration, sowie die Verkürzung kontraktiler Zellen (s. Kap. 1.4.1 bis 1.4.3). Die leucinreiche Domäne und die Ig-C2-Domänen von TrkB (s. Kap. 1.2.1) stehen des Weiteren unter Verdacht Zell-Zell-Erkennung und Zellkommunikation zu vermitteln [99]. Ferner besteht die Annahme, dass auch zelluläre Adhäsionen über die Tyrosinkinase TrkB

vermittelt werden können [43]. Bisher sind die genauen Mechanismen, über welche TrkB proadhäsiv wirken soll, unbekannt. Offenbar regt TrkB insbesondere Zellfunktionen an, die auch bei der PAH charakteristischerweise verändert sind (s. Kap. 1.1). Demnach wäre es vorstellbar, dass TrkB an der Pathogenese der PAH beteiligt ist.

1.6 Die TrkB-Isoformen

Das humane *trkB*-Gen (auch NTRK2) liegt auf Chromosom 9 [100] und besitzt 24 Exons [101]. Durch alternatives Spleißen können in der Zelle bis zu fünf verschiedene Transkripte entstehen, die auch als Isoformen TrkB-a bis -e bezeichnet werden (s. Abb. 4). Diese Isoformen weisen starke Sequenzhomologien auf. Mit einer Länge von 2517 Basen ist TrkB-a die längste Isoform. Sie unterscheidet sich von der zweitlängsten Isoform TrkB-c nur durch einen Einschub von 48 Basen ab der 1396. Base. Gleiches gilt für die Isoformen TrkB-d und TrkB-e: Sie sind kürzer als TrkB-a und TrkB-c (es fehlen im Vergleich zu diesen 855 Basen am 3'-Ende), unterscheiden sich aber auch nur durch den sequenzidentischen Einschub ab Position 1396. TrkB-b ist mit 1434 B die kürzeste Isoform und stimmt nur bis Position 1396 mit den anderen Isoformen überein. Dann folgt eine abweichende Basensequenz (in Abb. 4 gestreift dargestellt).

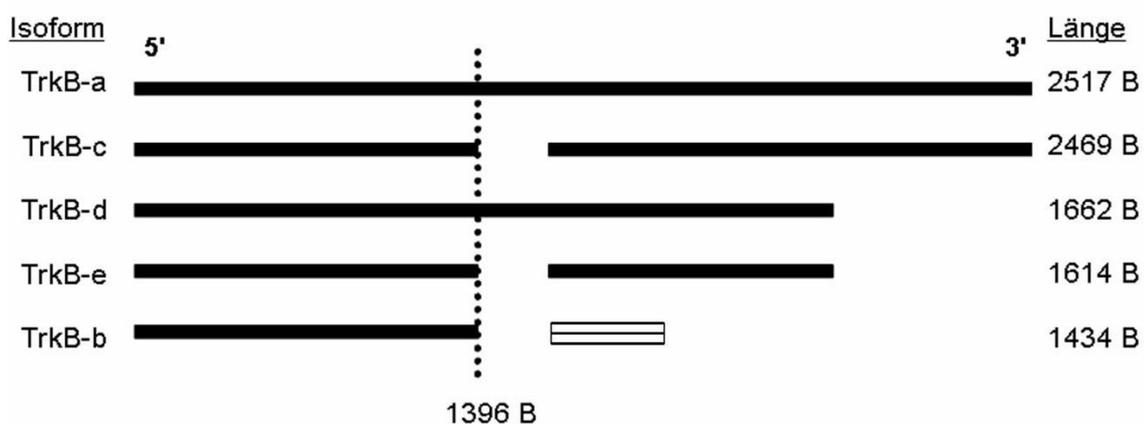


Abb. 4: Die fünf TrkB-Isoformen auf mRNA-Ebene. Gezeigt sind die mRNA-Stränge von 5' nach 3' (nicht maßstabsgetreu). Die übereinander liegenden Abschnitte der Isoformen sind in der Basenabfolge identisch, mit Ausnahme der Isoform TrkB-b, die sich ab der 1396. Base in ihrer Sequenz von den anderen Isoformen unterscheidet (gestreift dargestellt).

Den fünf mRNA-Isoformen stehen nur drei bekannte Protein-Isoformen gegenüber (s. Tabelle 1). TrkB-c kodiert den vollständigen TrkB-Rezeptor, der in der Literatur auch als TrkB-full bezeichnet wird [29] (struktureller Aufbau s. Kap. 1.2.1). Die Isoformen TrkB-b und TrkB-e verschlüsseln die verkürzten TrkB-Rezeptor-Varianten TrkB-T1 und TrkB-T-Shc. TrkB-Rezeptor-Proteine, die von den Isoformen TrkB-a und TrkB-d kodiert werden, sind in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

Tabelle 1: Kodierung der TrkB-Rezeptor-Proteine (Quelle: Protein-Datenbank Swiss-Prot, Registriernummer Q16620).

| Transkript-Isoform | Kodiertes TrkB-Rezeptor-Protein |
|---------------------------|--|
| TrkB-c | TrkB-full |
| TrkB-b | TrkB-T1 |
| TrkB-e | TrkB-T-Shc |

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 angesprochen, verfügt der vollständige TrkB-Rezeptor TrkB-full über eine extrazelluläre Domäne für die Neurotrophin-Bindung, eine transmembranäre Domäne und eine intrazelluläre Kinase-Domäne. Die verkürzten TrkB-Varianten entsprechen diesem in ihrer extrazellulären und transmembranären Struktur, unterscheiden sich aber in ihren intrazellulären Domänen (s. Abb. 5): TrkB-T1 fehlt die Kinase-Domäne, er besitzt nur einen kleinen intrazellulären Protein-Schwanz. Diese Variante wird in vielen Geweben exprimiert, insbesondere in Gehirn, Pankreas, Niere und Herz [101]. Die TrkB-Variante TrkB-T-Shc besitzt wie TrkB-T1 keine Kinase-Domäne, verfügt jedoch über einen längeren intrazellulären Proteinschwanz mit einer Bindungsstelle für das Adapterprotein Shc (s. Kap. 1.4.1 und 1.4.2). Das Vorkommen von TrkB-T-Shc wurde hauptsächlich im Gehirn beschrieben [101].

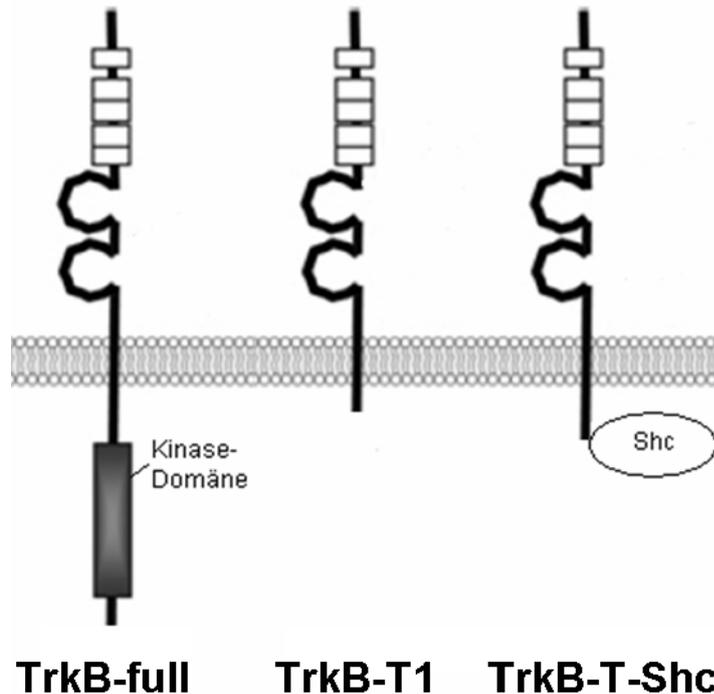


Abb. 5: Struktur der TrkB-Rezeptor-Proteine. Die drei TrkB-Rezeptoren stimmen in ihrer extrazellulären und transmembranären Struktur überein, unterscheiden sich aber in ihren intrazellulären Domänen: TrkB-T1 besitzt nur einen kleinen intrazellulären Protein-Schwanz, TrkB-T-Shc verfügt über einen längeren intrazellulären Proteinschwanz mit einer Bindungsstelle für das Adapterprotein Shc. Modifiziert nach Arevalo et al. [60].

Nach bisherigen Studienergebnissen wird die Fähigkeit der Trk-Rezeptoren, eine Signalkaskade anzustoßen, insbesondere durch ihre intrazelluläre Kinasefunktion gewährleistet [102]. Aufgrund des Kinaseverlustes wurde somit bisher angenommen, dass die TrkB-Varianten TrkB-T1 und TrkB-T-Shc nicht zu einer Signalübertragung in der Lage sind [29]. Die funktionelle Bedeutung der verkürzten Rezeptoren ist somit weiterhin unklar, v. a. weil sie ohne weiteres zu einer Ligandenbindung befähigt sind [103]. Zur Aufklärung dieser Frage wurden einige Theorien entwickelt, welche mehrheitlich einen regulierenden Einfluss der verkürzten TrkB-Rezeptoren auf den vollständigen Rezeptor erwägen: In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Ko-Expression von vollständigem und verkürztem Rezeptor zu einer Runterregulierung des vollständigen TrkB-Rezeptors an der Zelloberfläche führt [104]. Ferner werden andere Funktionen wie die Bindung und Entfernung überschüssiger Liganden diskutiert [103]. Konträr dazu wurde eine reversible

Ligandenbindung durch die verkürzten TrkB-Rezeptoren vorgeschlagen [105], welche dem Zweck einer kurzfristigen Bereitstellung an Liganden für den vollständigen TrkB-Rezeptor dienen soll.

Die genannten Erklärungsmodelle sind zum einen schwer in Einklang zu bringen, andererseits wird der energetische Aufwand, den eine Zelle für die Produktion der Rezeptor-Isoformen betreibt, durch die Theorien nicht ausreichend erklärt. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass die verkürzten TrkB-Rezeptoren durchaus zu einer Signaltransduktion fähig sind und dabei einen bislang unbekanntem Signalweg nutzen, für dessen Auslösung die Kinasefunktion nicht benötigt wird [106]. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die drei TrkB-Rezeptor-Isoformen in ganz unterschiedlichen Geweben bevorzugt exprimiert werden (s. o.). Wäre die Funktion der verkürzten TrkB-Rezeptoren nur auf die Modulation des vollständigen Rezeptors beschränkt, würden sie zumindest eine ähnliche Verteilung in den verschiedenen Geweben aufweisen.

1.7 Die Bedeutung des TrkB-Rezeptors in der Pathogenese der IPAH

Mittlerweile wurden zahlreiche körpereigene Botenstoffe untersucht und als Ursache für das Remodeling bei der IPAH in Erwägung gezogen. Für einige der untersuchten Substanzen konnte zumindest ein Einfluss auf einzelne Aspekte des Remodelings wie Proliferation, Migration und Interaktion mit EZM/Adhäsion der vSMC nachgewiesen werden (s. Kap. 5.3). Es wäre denkbar, dass ein Molekül beeinträchtigt ist, das in Zellproliferation, Zellmigration und Interaktion mit EZM/Zelladhäsion involviert ist und somit zentraler Auslöser der Gefäßveränderungen ist. Ein solches Potential besitzt möglicherweise der Tyrosinkinase-Rezeptor TrkB (s. Kap. 1.5).

1.8 Zielsetzungen und Fragestellungen dieser Arbeit

1. Klonierung der TrkB-Isoformen.

In dieser Arbeit soll die mRNA der TrkB-Isoformen aus Zellen gewonnen, durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion vervielfältigt werden. Anschließend sollen die Isoformen in ein Vektorsystem (pGEM-T Easy, pcDNA3.1(+)) eingefügt werden (Klonierung).

2. Transformation elektrokompetenter E. coli-Bakterien.

Elektrokompetente E. coli-Bakterien sollen mit den konstruierten Vektoren transformiert werden. Über eine anschließende Vermehrung der Bakterien sollen ausreichende Vektor-Mengen erzeugt werden.

3. Transfektion humaner glatter Muskelzellen.

Humane glatte Muskelzellen aus Pulmonalarterien (huPASMC) sollen mit den konstruierten Vektoren transfiziert werden, um eine Überexpression der TrkB-Isoformen in diesen Zellen zu erzielen.

4. Die huPASMC sollen auf die funktionellen Aspekte Proliferation, Migration und Adhäsion untersucht werden. Zudem soll der Einfluss der unterschiedlichen Vektorsysteme (pcDNA3.1(+)) (Leervektor), pcDNA3.1(+)+c, pcDNA3.1(+)+b, pcDNA3.1(+)+e) auf diese Aspekte ermittelt werden.

5. Schließlich wird nach dem Einfluss einer Stimulation mit den Liganden BDNF und huNT4 auf Proliferation, Migration und Adhäsion der transfizierten huPASMC gefragt.

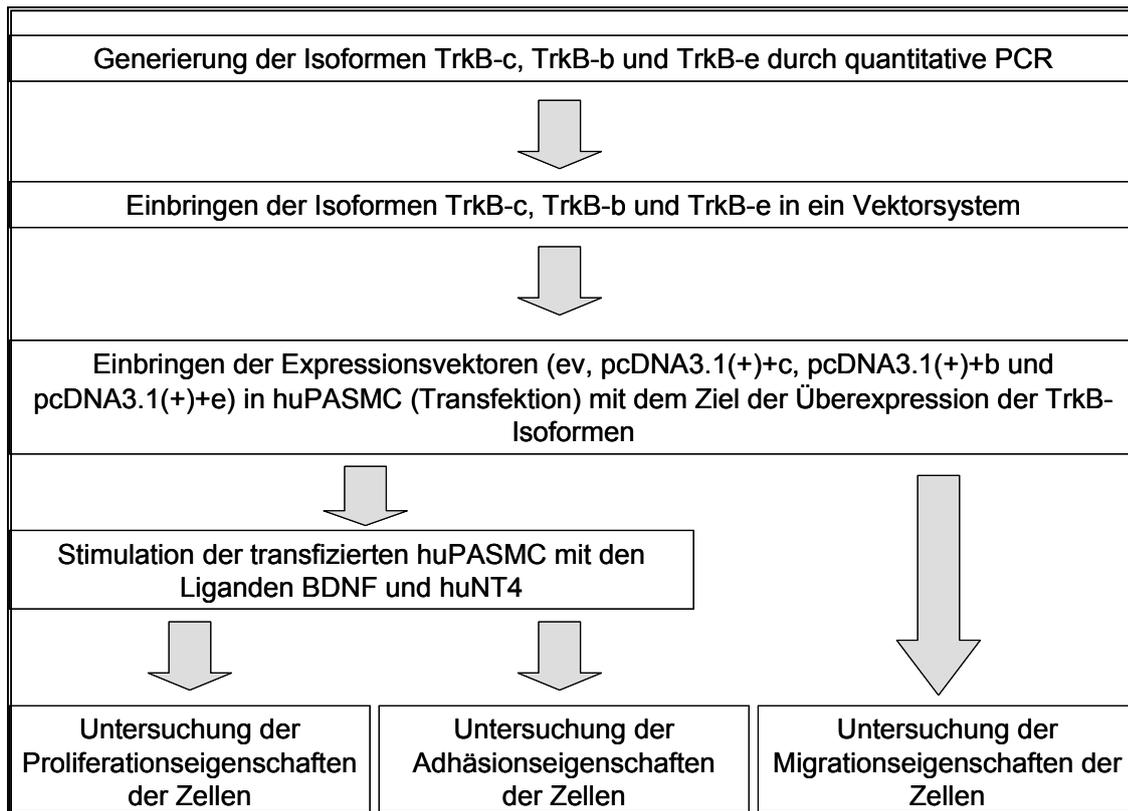


Abb. 6: Zielsetzungen dieser Arbeit.

2 Materialien

2.1 Bakterienstämme

Tabelle 2: Bakterienstämme.

Bakterienstämme

| | |
|---|---|
| Escherichia coli (E. coli) DH5 α | elektrokompetenter Bakterienstamm zur Amplifikation von rekombinanten Vektoren Invitrogen, Paisley, UK |
|---|---|

2.2 Eukaryotische Zellen

Tabelle 3: Eukaryotische Zellen.

Eukaryotische Zellen

| | |
|-------------|--|
| A549-Zellen | humane Karzinom-Zelllinie aus Alveolar-Epithelzellen (Typ II) von Sigma-Aldrich GmbH P.O., Steinheim |
| huPASC | humane glatte Muskelzellen aus Pulmonalarterien (Primärzellen) von Lonza, Basel, Schweiz |

2.3 Geräte

Tabelle 4: Geräte.

Geräte

Hersteller

| | |
|---------------------------|--|
| Autoklave 2540 ELC | Tüttnauer Systec, Wettenberg |
| Biofuge pico | Heraeus Instruments GmbH, Hanau |
| Brutschrank INB300 | Memmert GmbH, Schwabach |
| Consort EV231 | Consort NV, Turnhout, Belgium |
| Gene Amp PCR Systems 9700 | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Gene Pulser II | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| iCycler Thermal Cycler | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Kühlzentrifuge 15R | Heraeus Instruments GmbH, Hanau |

2 Materialien

| | |
|--|--|
| Kryostat Cryocut 3000 | Leica, Bensheim |
| NanoDrop UV-Spektrophotometer, ND-1000 | NanoDrop Technologies, Rockland, USA |
| Nucleofector II | Amaxa Biosystems, Köln |
| Packard Liquid Scintillation Analyzer | GMI, Inc., Ramsey, MN, USA |
| PCR Sprint | Hybaid, Heidelberg |
| PS 500 XT DC | |
| Electrophoresis Power Supply | Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA |
| Schüttler Typ REAX 2000 | Heidolph, Schwabach |
| Schüttler TH15 | Edmund Bühler Labortechnik, Hechingen |
| Sequence Detection System 7900 Ht | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf, Hamburg |
| Trio Thermoblock Biometra | Biometra, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen |
| UV-Transluminator Reprostar II | Camag, Berlin |
| Versamax tunable microplate Reader | MDS Analytical Technologies, Ismaning |
| Waage PM480 Delta Range | Mettler-Toledo GmbH, Gießen |
| Zentrifuge 5415D | Eppendorf, Hamburg |

2.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

| Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|--|---|
| Agarose TopvisionTM | MBI Fermentas, St. Leon-Roth |
| Ampicillin-Stammlösung (50 mg/ml) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O., Steinheim |

2 Materialien

| | |
|--------------------------------------|--|
| BamHI-Restriktionsenzym (10 U/μl) | Promega, Madison, WI, USA |
| Bench Top 1 kb DNA Ladder | Promega, Madison, WI, USA |
| Beta-Mercaptoethanol (98%) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O., Steinheim |
| BSA-Puder | Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O., Steinheim |
| dATP (100 mM) | Amersham Biosciences, Freiburg |
| DMEM (Gibco), 500 ml | Invitrogen, Paisley, UK |
| dNTP Mix (25 mM each) | MBI Fermentas, St. Leon-Roth |
| EcoRI-Restriktionsenzym (12 U/μl) | Promega, Madison, WI, USA |
| Elektroporationsküvetten, 1 mm | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Ethidium-Bromidlösung (1%) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Fibronektin, human | Innovative Research, Novi, MI, USA |
| GoTaq Buffer (5x) Colorless | Promega, Madison, WI, USA |
| GoTaq DNA Polymerase (0,5 U/μl) | Promega, Madison, WI, USA |
| Glycerin (87%) | Merck, Darmstadt |
| IPTG 0,5 M (1 g/ 8,4 ml) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Kollagen IV, human | Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Kristallviolett-Lösung | Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O., Steinheim |
| Kühl-Ampullen | Nunc GmbH, Wiesbaden |
| LB Agar, Puder | Invitrogen, Paisley, UK |
| Luria Broth Base (Miller`s) | Invitrogen, Paisley, UK |
| Methanol | Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH |
| Multi-CORE (10x) Puffer | Promega, Madison, WI, USA |
| Oligo(dT)15 Primer (0,5 μg/μl) | Promega, Madison, WI, USA |
| PBS (Dulbecco`s 1x) | PAA Laboratories GmbH, Pasching, AUS |
| pcDNA 3.1(+) Vektor | Invitrogen, Paisley, UK |
| Petri-Schalen, 15 mm | Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA |
| pGEM-T Easy Vector System I | Promega, Madison, WI, USA |
| PR-Röhrchen (15 ml, 50 ml) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |

2 Materialien

| | |
|--|--|
| Random Hexamers (50 mM) | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Rapid Ligation Buffer | Promega, Madison, WI, USA |
| rhBDNF (Ligand) | R&D-Systems, Minneapolis, MN, USA |
| rhNT-4 (Ligand) | R&D-Systems, Minneapolis, MN, USA |
| SMC growth medium 2 (Low Serum) & SupplementMix | PromoCell, Heidelberg |
| SOC-Medium | Invitrogen, Paisley, UK |
| SYBR Green Platinum | |
| qPCR SuperMix-UDG | Invitrogen, Paisley, UK |
| Transwell-Filter-System | Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Trypsin/EDTA (1x) | Invitrogen, Paisley, UK |
| T4 DNA Ligase | Promega, Madison, WI, USA |
| X-Gal 240 mM (100 mg/mg) | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Zell-Schaber | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Zellkultur-Flaschen (75 cm ²) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Zellkultur-Platten (6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |

2.5 Puffer und Lösungen

- Gel-Elektrophorese-Laufpuffer: TAE-Puffer (50x)
40 mM Tris-Puffer
20 mM Essigsäure (Acetat)
2 mM EDTA
in Aqua dest. lösen und auf 1 Liter auffüllen
Gebrauchsverdünnung: 1x
- Ladepuffer
900 µl 5x TBE
100 µl Glycerin (98%)
1 Spatelspitze Bromphenolblau

2.6 Kits

Tabelle 6: Kits.

| Kit | Hersteller |
|--|--|
| GeneAmp RNA PCR Kit HotStar High Fidelity Polymerase Kit | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Human AoSMC Nucleofector Kit | Qiagen, Hilden |
| PeqGOLD Total RNA Kit (S-Line) | Amaxa Biosystems, Köln |
| peqGOLD Gel Extraction Kit (C-Line) | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit (S-Line) | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| EndoFree Plasmid Maxi Kit | PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Cell Proliferation-ELISA Kit, BrdU | Qiagen, Hilden |
| | Roche, Mannheim |

2.7 Primer

Die Primer wurden nach den Angaben der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) in Zusammenarbeit mit Dr. PhD Jens Wolff konstruiert (Hersteller MWG BIOTECH, Ebersberg). Es wurde stets eine Gebrauchsverdünnung von 10 pmol/µl verwendet. Die Sequenzen der Zielgene sind in der Datenbank des NCBI unter den in Tabelle 8 genannten Registriernummern zu finden.

Tabelle 7: Primer.

| Name | Sequenz (5'→3') |
|---------------|---|
| TRK2_VPfull | ATGTCGTCCTGGATAAAGGTGGCAT |
| TRK_RPBfull | CTACCCATCCAGTGGGATCTTATG |
| TRK_RPD+Efull | TCAGGCGGTCTTGGGGGAACCTCT |
| TRK_RPA+Cfull | CTAGCCTAGAATGTCCAGGTAGAC |
| NTRK2_cIVP | ACTGACTGAGGATCCATGTTCGTCCTGGATAAAGGTGGCAT |
| NTRK2_cIRPB | ACTGACTGAGAATTCTACCCATCCAGTGGGATCTTATG |
| NTRK2_cIRPD+E | ACTGACTGAGAATTCTCAGGCGGTCTTGGGGGAACCTCT |
| NTRK2_cIRPA+C | ACTGACTGAGAATTCTAGCCTAGAATGTCCAGGTAGAC |
| B_VP | AACTGCAGCGAATGACATCG |
| CE_VP | GCATGAAAGGCCAGCC |
| B_RP | CCCATCCAGTGGGATCTTATG |
| AC_RP | TCGCCTAGCTCCCTTTTCAG |
| DE_RP | TCAGGCGGTCTTGGGG |
| VP_fullku | ATGTCGTCCTGGATAAAGGTG |
| RP_AC_fullku | CTAGCCTAGAATGTCCAGGT |
| RP_DE_fullku | TCAGGCGGTCTTGGGGGA |
| VP_AC_in | GGGACACCACGAACAGAAG |
| RP_AC_in | CACCACAGACGCAATCACC |
| VP_BDE_in | GAAGCAGATCTCTTGTGTGG |
| RP_BDE_in | CGAGAAATGTGATAGTTGGTG |

Tabelle 8: Registriernummern der TrkB-Isoformen (Datenbank des NCBI).

| TrkB-Isoform | Registriernummer |
|---------------------|-------------------------|
| TrkB-c | NM_001010064+1 |
| TrkB-b | NM_001007097+1 |
| TrkB-e | NM_001010066+1 |

3 Methoden

3.1 Zell-Lyse und RNA-Elution

Ausgangsmaterial waren kultivierte A549-Zellen. Verwendet wurde das peqGOLD Total RNA Kit (S-Line) nach Herstellerangaben. Die Zellen wurden zunächst homogenisiert und unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Das Lysat wurde auf eine Zentrifugensäule geladen und die Gesamt-RNA vorübergehend über Wasserstoffbrücken an der Silica-Membran der Zentrifugensäule gebunden. Ebenfalls an der Membranoberfläche gebundene DNA wurde durch DNAsen abgebaut. Durch das Waschen mit speziellen Puffern wurde die Gesamt-RNA von Kontaminationen befreit. Die Zugabe von Diethylpyrocarbonat (DEPC)-haltigem Wasser ermöglichte die Elution der Gesamt-RNA durch eine Änderung des pH-Wertes und dem damit einhergehenden Affinitätsverlust der RNA zur Membranoberfläche der Zentrifugensäule. Die Konzentration der gewonnenen Gesamt-RNA wurde UV-spektrophotometrisch mit einem NanoDrop UV-Spektrophotometer bestimmt.

3.2 Reverse Transkription

Die Gesamt-RNA wurde durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden Oligo(dT)₁₅ Primer und das GeneAmp RNA PCR Kit nach Herstellerangaben verwendet. Pro Ansatz wurden 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Das jeweilige Volumen wurde mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Der 10minütigen RNA-Denaturierung (Streckung der RNA zur besseren Primerhybridisierung) bei 70°C im Trio-Thermoblock folgte eine 5minütige Abkühlungsphase auf Eis. Dann wurden 10 µl Mastermix hinzugefügt. An die 10minütige Temperatur-Angleichungsphase bei 20°C schloss sich eine 75minütige Transkriptionsphase bei 43°C an. Die Reverse Transkription endete mit einer 5minütigen Inkubationsphase bei 99°C, wodurch das Enzym inaktiviert und von der cDNA gelöst wurde.

3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Gel-Elektrophorese

Die PCR ist ein temperaturgesteuerter, zyklischer Prozess mit dem Ziel der Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in ihre Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Dann folgt die spezifische Anlagerung der Primer an den DNA-Abschnitt, der vervielfältigt werden soll (Primerhybridisierung). Die optimale Hybridisierungstemperatur ist variabel und hängt von der Primerlänge, sowie dem Gehalt an den Basen G/C bzw. A/T ab. Anschließend synthetisiert eine thermostabile Polymerase an den 3'-Enden der angelagerten Primer komplementäre DNA-Stränge (Elongation), wodurch wieder doppelsträngige DNA entsteht. Auf die Elongation folgt ein neuer PCR-Zyklus. Idealerweise nimmt die Menge an spezifischem PCR-Produkt exponentiell zu.

Zur Vervielfältigung der, durch Reverse Transkription gewonnenen, cDNA der TrkB-Isoformen wurde das HotStar High Fidelity Polymerase Kit nach Herstellerangaben verwendet. In einem ersten PCR-Lauf wurden Primer mit einer Länge von 24 Bp verwendet. Die Primerhybridisierung-Temperatur lag, abhängig von den verwendeten Primern, bei 58-59°C (s. Tabelle 9). Aufgrund der identischen Basensequenz der TrkB-Isoformen am 5'-Ende konnten die gleichen Vorwärtsprimer (TRK2_VPfull) verwendet werden. Die Rückwärtsprimer richteten sich nach der jeweils gesuchten Isoform: TrkB-c (TRK2_RPA+Cfull), TrkB-b (TRK_RPBfull) und TrkB-e (TRK2_RPD+Efull) (Primersequenzen s. Tabelle 7). In jedem PCR-Lauf wurde eine Negativkontrolle ohne Template mitgeführt.

Tabelle 9: Erster PCR-Lauf.

| Zielgen | Primer | PCR-Programm | |
|---------|-------------------------------|--------------|--|
| TrkB-c | TRK2_VPfull TRK2_RPA+Cfull | 1x | 6 min 95°C (Vorlauf) |
| | | 45x | { 10 sec 94°C (Denaturierung) 20 sec 59°C (Primerhybridisierung) 4 min 72°C (Elongation) |
| | | 1x | 10 min 72°C (finale Elongation) |
| TrkB-b | TRK2_VPfull TRK2_RPBfull | 1x | 5 min 95°C (Vorlauf) |
| | | 45x | { 15 sec 94°C (Denaturierung) 20 sec 59°C (Primerhybridisierung) 3,5 min 72°C (Elongation) |
| | | 1x | 10 min 72°C (finale Elongation) |
| TrkB-e | TRK2_VPfull TRK2_RPD+Efull | 1x | 5 min 95° C (Vorlauf) |
| | | 45x | { 15 sec 94°C (Denaturierung) 30 sec 58°C (Primerhybridisierung) 3,5 min 72°C (Elongation) |
| | | 1x | 10 min 72°C (finale Elongation) |

Um die durch PCR gewonnenen DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu nutzt man deren Eigenschaften als Polyanionen. Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente zum Pluspol (Anode). Das Agarose-Gel übernimmt dabei die Funktion eines „molekularen Siebs“: Kleine Anionen wandern schnell zur Anode, große Anionen werden vermehrt zurückgehalten.

Um eine Auftrennung der großen TrkB-Isoformen mit einer Länge von 1,4-2,5 kb zu ermöglichen, wurden Gele niedriger Agarose-Konzentration

(1,4%) hergestellt. Dazu wurden 0,7 g Agarose mit 50 ml des TAE-Puffers (Zusammensetzung s. Kap. 2.5) versetzt. Der Ansatz wurde in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 70°C wurden 3 µl 1%ige Ethidium-Bromidlösung hinzugegeben. Ethidium-Bromid interkaliert in die DNA und dient später dem Sichtbarmachen der DNA-Banden (s. u.). Das flüssige Agarose-Gel wurde zum Aushärten in eine horizontale Gel-Elektrophorese-Kammer gegossen. Ein eingesetzter Kunststoffkamm formte die Geltaschen, in welche die Proben nach dem Aushärten hineinpipettiert wurden. Noch vor dem Einfüllen wurde der Probe ein glycerinhaltiger Ladepuffer (Volumenverhältnis Puffer/DNA 1:6) (Zusammensetzung s. Kap. 2.5) zugegeben, der das spezifische Gewicht der Proben erhöhte und so ein besseres Absinken in die Geltasche ermöglichte. Es wurden 25 µl Probe je Geltasche verwendet. Die Gel-Elektrophorese lief 1h bei einer Spannung von 120 V. Zwecks Dokumentation und Extraktion der DNA-Banden mussten diese sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Gel auf eine UV-Licht-Platte (UV-Transluminator) transferiert. Die DNA absorbierte das UV-Licht und die Energie wurde durch Förster- und Dexter-Energietransfer im Molekül verteilt, bis ein interkaliertes Ethidium-Bromid-Molekül (s. o.) angeregt wurde und fluoreszierte. Durch diesen Mechanismus wurde die DNA im Gel sichtbar. War in dem Gel eine Bande mit der entsprechenden Größe der gesuchten TrkB-Isoform zu sehen, wurde diese unter UV-Licht ausgeschnitten und nach dem Protokoll des peqGOLD Gel Extraction Kit (C-Line) aufgereinigt. In jedem PCR-Lauf wurde eine Negativkontrolle ohne Template mitgeführt.

Um ausreichend DNA-Material für die anschließende Klonierung zu erzeugen, wurde die aus dem Gel extrahierte und aufgereinigte DNA in einem zweiten PCR-Lauf als Template eingesetzt (s. Tabelle 10). Dabei wurden 1 µl der aufgereinigten Probe verwendet. Der zweite PCR-Lauf beinhaltete Primer mit Restriktionsstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI (Länge 39 Bp, Primerhybridisierung-Temperatur 58-59°C), um ein späteres Einfügen der DNA in den Expressionsvektor zu ermöglichen (s. Kap. 3.10). Auch hier wurde für die TrkB-Isoformen der gleiche Vorwärtsprimer verwendet (NTRK2_cIVP). Der Rückwärtsprimer richtete sich nach der jeweiligen Isoform: TrkB-c (NTRK2_cIRPA+C), TrkB-b (NTRK2_cIRPB) und TrkB-e (NTRK2_cIRPD+E)

(Primersequenzen s. Tabelle 7). In jedem PCR-Lauf wurde eine Negativkontrolle ohne Template mitgeführt.

Tabelle 10: Zweiter PCR-Lauf.

| Zielgen | Primer | PCR-Programm | |
|---------|-----------------------------|--------------|--|
| TrkB-c | NTRK2_cIVP NTRK2_clRPA+C | 1x | 6 min 95°C (Vorlauf) |
| | | 30x | <ul style="list-style-type: none"> 10 sec 94°C (Denaturierung) 20 sec 59°C (Primerhybridisierung) 4 min 72°C (Elongation) |
| | | 1x | 10 min 72°C (finale Elongation) |
| TrkB-b | NTRK2_cIVP NTRK2_clRPB | 1x | 5 min 95°C (Vorlauf) |
| | | 25x | <ul style="list-style-type: none"> 15 sec 94°C (Denaturierung) 20 sec 59°C (Primerhybridisierung) 3,5 min 72°C (Elongation) |
| | | 1x | 10 min 72°C (finale Elongation) |
| TrkB-e | NTRK2_cIVP NTRK2_clRPD+E | 1x | 5 min 95° C (Vorlauf) |
| | | 30x | <ul style="list-style-type: none"> 15 sec 94°C (Denaturierung) 30 sec 58°C (Primerhybridisierung) 3,5 min 72°C (Elongation) |
| | | 1x | 10 min 72°C (finale Elongation) |

3.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der TrkB-Isoformen erfolgte über das Kettenabbruch- bzw. Didesoxynukleotidverfahren. Dieses Verfahren ist methodisch mit der PCR verwandt, da es auch auf einer temperaturgesteuerten, zyklischen Replikation von DNA-Strängen durch eine DNA-Polymerase basiert (PCR-Programm der Sequenzierung s. Tabelle 11). Im Vergleich zur PCR mit dem Ziel der DNA-Amplifizierung wurden hier, neben Desoxyribose-Nukleosidtriphosphaten (dNTPs), Didesoxyribose-Nukleosidtriphosphate (ddNTPs) verwendet. Die ddNTPs waren je nach Typ (ddATP, ddGTP, ddTTP und ddCTP) mit einem anderen Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt und besaßen keine 3'-OH-Gruppe. Wurde ein ddNTP von der DNA-Polymerase in den entstehenden Strang eingebaut, war aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe keine Verlängerung an dieser Stelle möglich und es kam zu einem Kettenabbruch. Abhängig von der Replikationsabbruchstelle entstanden unterschiedlich lange DNA-Stränge. Durch Kapillar-Elektrophorese wurden die Stränge der Länge nach aufgetrennt. Ein Laser regte die fluoreszenzmarkierten Nukleotide zum Fluoreszieren an und ein Detektor registrierte die so entstandenen Farbsignale und gab sie als Basensequenz wieder.

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit nach Herstellerangaben. Jede TrkB-Isoform wurde in vier Ansätzen sequenziert. Je Ansatz wurden 50 ng Template und ein Primer verwendet: ein Vorwärts-Primer (5'→3'), ein Rückwärts-Primer (3'→5'), ein innerer Vorwärts-Primer (5'→3') und ein innerer Rückwärts-Primer (3'→5') (s. Abb. 7). Mit dieser Technik waren die sequenzierten Abschnitte ca. 700 Bp lang (s. Tabelle 12).

Die Basenabfolge der sequenzierten DNA wurde in Zusammenarbeit mit Dr. PhD Jens Wolff (im Institut für Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Justus-Liebig-Universität in Gießen) mit der Originalsequenz der TrkB-Isoformen nach den Angaben der Datenbank des NCBI auf ihre Richtigkeit überprüft.

Tabelle 11: Programm der Sequenzierungs-PCR.

PCR-Programm

25x { 10 sec 96°C (Denaturierung)
5 sec 59°C (Primerhybridisierung)
4 min 60°C (Elongation)

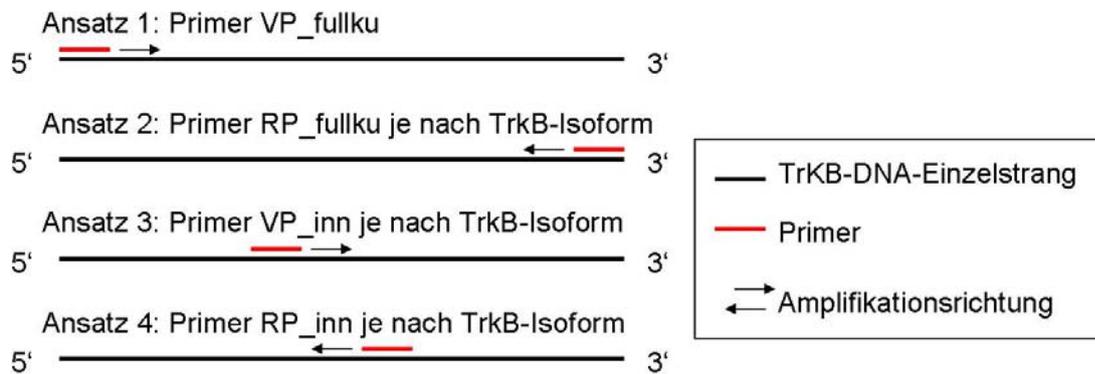


Abb. 7: Sequenzierungsansätze. Jede TrkB-Isoform wurde in vier Ansätzen sequenziert: Ansatz 1 beinhaltet einen Vorwärts-Primer (5'→3'), Ansatz 2 einen Rückwärts-Primer (3'→5'), Ansatz 3 einen inneren Vorwärts-Primer (5'→3') und Ansatz 4 einen inneren Rückwärts-Primer (3'→5'). Die verwendeten Primer variierten je nach TrkB-Isoform (s. Tabelle 12).

Tabelle 12: Sequenzierungsprimer. Primersequenzen s. Tabelle 7.

| Sequenzierungsprimer | | |
|-----------------------------|---------------|----------------------|
| Zielgen | Primer | Amplikonlänge |
| TrkB-c | VP_fullku | 741 Bp |
| | RP_AC_fullku | 706 Bp |
| | VP_AC_in | 787 Bp |
| | RP_AC_in | 666 Bp |
| TrkB-b | VP_fullku | 748 Bp |
| | TRK_RPBfull | 749 Bp |
| | VP_BDE_in | 732 Bp |
| | RP_BDE_in | 647 Bp |
| TrkB-e | VP_fullku | 664 Bp |
| | RP_DE_fullku | 711 Bp |
| | VP_BDE_in | 649 Bp |
| | RP_BDE_in | 679 Bp |

3.5 Klonierung mit dem pGEM-T Easy Vektor

Für die Klonierung der TrkB-Isoformen wurde zunächst das pGEM-T Easy Vektor-System verwendet. Der pGEM-T Easy Vektor ist, mit einer Länge von 3015 Bp, ein einfaches System zur Klonierung von PCR-Produkten. Er liegt als linearer DNA-Strang mit Thymidin-Überhängen vor. Der Vektor besitzt ein lacZ-Gen, welches das Enzym β -Galaktosidase kodiert und so eine Blau-Weiß-Selektion ermöglicht (s. Kap 3.7). Ferner besitzt er ein Ampicillin-Resistenzgen und einige Restriktionsstellen, um das eingefügte DNA-Fragment später wieder ausschneiden zu können.

In getrennten Ansätzen wurden die TrkB-Isoformen in den Vektor eingefügt (Insertion). Dazu wurden den 3'-Enden der TrkB-DNA Adenosin-Überhänge (dATP) durch die GoTaq-Polymerase in einer 10minütigen Reaktion bei 72°C nach Herstellerangaben angefügt. Diese Adenosin-Überhänge waren komplementär zu den Thymidin-Überhängen des Vektors und ermöglichten so das Einfügen der TrkB-Isoformen in den Vektor. Die in den Vektor integrierte DNA der TrkB-Isoformen wird im folgenden Text auch als „Insert“ (lat. inserere: einfügen) bezeichnet.

Insertionssansatz:

- 0,1 µl GoTaq DNA Polymerase (5 U)
- 4 µl GoTaq (5x) Puffer Colorless
- 0,5 µl dATP
- x µl Insert (~500 ng)
- Aqua dest. ad 20 µl

Die Verbindung von Insert und Vektor musste in einem anschließenden Schritt durch eine Ligation (lat. ligare: binden, verknüpfen) stabilisiert werden. Dazu wurde ein Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 gewählt. Die benötigte Insert-Menge wurde individuell nach Größe der jeweiligen TrkB-Isoform berechnet (Formel s. u.). Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben durch das Enzym T4-Ligase bei Raumtemperatur für 3h (Zusammensetzung des Ligationsansatzes s. u.). Zur anschließenden Entsalzung wurde der Ligationsansatz mit 60 µl 100%-Ethanol versetzt und 15min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang mit 60 µl 70%-Ethanol wiederholt. Das DNA-Pellet wurde mit 10 µl Aqua dest. resuspendiert.

$$\frac{\text{Vektor (ng)} \times \text{Größe des Inserts (kb)}}{\text{Größe des Vektors (kb)}} \times 3 = \text{Insert-Menge (ng)}$$

Ligationssansatz:

- x µl Insert (nach Berechnung durch obige Formel)
- 1 µl T4 Ligase
- 2 µl Vektor (~50 ng/µl)
- 10 µl (2x) Rapid Ligation Buffer
- Aqua dest. ad 20 µl

3.6 Kultivierung elektrokompetenter E. coli-Bakterien

Um ausreichende Mengen der konstruierten Vektoren zu erzeugen, mussten elektrokompetente E. coli-Bakterien mit den konstruierten Vektoren transformiert werden. Über eine anschließende Vermehrung der Bakterien sollten ausreichende Vektor-Mengen erzeugt werden. Voraussetzung für die

Kultivierung der Bakterien waren geeignetes Nährmedium sowie Nähr- und Selektionsplatten (s. Kap. 3.6.1 bis Kap. 3.6.3).

3.6.1 Herstellung von LB-Medium

Es wurden 25 mg Luria-Broth-Base-Pulver je 1 Liter Aqua dest. angesetzt und 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 55°C wurde unter sterilen Bedingungen Ampicillin mit der Gebrauchsverdünnung von 1ml/l zugesetzt. Das LB-Medium wurde bei 4°C gelagert.

3.6.2 Herstellung von Ampicillin-Selektionsplatten

Es wurden 32 mg LB-Agar-Pulver je 1 Liter Aqua dest. angesetzt und 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 55°C wurde unter sterilen Bedingungen Ampicillin mit der Gebrauchsverdünnung von 1 ml Stammlösung/l zugesetzt. Danach wurde die Lösung auf Petri-Schalen verteilt. Nach dem Härten des Agars wurden die Platten bei 4°C gelagert. Diese Platten wurden für E. coli-Zellen verwendet, die mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1(+) transformiert wurden (s. Kap. 3.10).

3.6.3 Herstellung von Ampicillin-IPTG-X-Gal-Selektionsplatten

Die ersten Schritte der Herstellung der Ampicillin-IPTG-X-Gal-Selektionsplatten waren mit denen der Herstellung der Ampicillin-Selektionsplatten (s. Kap. 3.6.2) identisch. Zusätzlich wurden 238 mg Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid (IPTG) und 200 mg 5-Brom-4-chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal) je 10 ml Agar-Lösung unter sterilen Bedingungen zugegeben. Diese Platten wurden für E. coli-Zellen verwendet, die mit dem pGEM-T Easy Vektor transformiert wurden (s. Kap. 3.7).

3.6.4 Präparation elektrokompetenter E. coli-Bakterien

Verwendet wurden DH5α-E.coli, ein elektrokompetenter Bakterienstamm zur Amplifikation von rekombinanten Vektoren. Ausgehend von einer DH5α-

Glycerinkultur vom Hersteller wurde eine Vorkultur mit 50 ml LB-Medium (Herstellung s. Kap. 3.6.1) angesetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Für die Hauptkultur (Gesamtvolumen 510 ml) wurden 500 ml LB-Medium mit 10 ml der Vorkultur angeimpft. Dieser Ansatz wurde im Rundschtüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ (optische Dichtemessung bei 600 nm) von 0,9 angezchtet. Es folgte eine 30minütige Inkubation auf Eis. Danach wurden die Zellen 15 min bei 0°C und 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde 3x wiederholt. Danach wurde das Pellet in 40 ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde auch hier verworfen. Es folgte eine weitere Konzentrierung durch Resuspension mit 2 ml Glycerinlösung. Anschließend wurden die Zellen zu je 80 µl aliquotiert und bei - 80°C gelagert.

3.7 Transformation elektrokompenter E. coli-Bakterien

Je Transformationsansatz wurden 80 µl der E. coli-Glycerin-Suspension (s. Kap. 3.6.4) auf Eis aufgetaut und mit 10 µl des rekombinanten Vektors (ca. 100 ng) versetzt (s. Kap. 3.5). Der Transformationsansatz wurde in eine vorgekühlte 1 mm-Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte im Gene Pulser II durch einen kurzen elektrischen Impuls. Die transformierten Bakterien wurden mit 300 µl SOC-Medium resuspendiert und in ein steriles 15 ml-PR-Röhrchen überführt. Es folgte eine Inkubation im Rundschtüttler bei 37°C für 1h. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Inkubationslösung auf einer Ampicillin-IPTG-X-Gal-Selektionsplatte (s. Kap. 3.6.3) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation war am Folgetag ein Wachstum der Bakterien auf den ampicillinhaltigen Agarplatten mithilfe des Ampicillin-Resistenzgens des rekombinanten Vektors möglich.

Eine weitere Sicherheit zur Identifikation erfolgreich transformierter E. coli-Bakterien bot das lacZ-Gen des pGEM-T Easy Vektors. Voraussetzung dafür ist die Verwendung von Ampicillin-IPTG-X-Gal-Selektionsplatten (s. Kap. 3.6.3). Das Molekül IPTG der Ampicillin-IPTG-X-Gal-Selektionsplatten induzierte das auf dem Vektor lokalisierte lacZ-Gen. (s. Kap. 3.5). Die durch

das lacZ-Gen kodierte und von den Bakterien produzierte β -Galaktosidase konnte das Molekül X-Gal der Selektionsplatte zu dem blauen Farbstoff Indigo verstoffwechseln, was die Kolonien blau färbte. Bei erfolgreicher Insertion der TrkB-DNA in den Vektor wurde das lacZ-Gen unterbrochen und die E. coli-Zellen konnten keine β -Galaktosidase produzieren. Es erfolgte keine Verstoffwechslung von X-Gal zu Indigo, die Kolonien blieben weiß. Dieser Mechanismus ermöglichte eine Identifikation der E. coli-Kolonien, bei denen der transformierte Vektor tatsächlich das Insert beinhaltet. Einzelne weiße Kolonien wurden entnommen und jeweils in 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (s. Kap. 3.6.1) zur Vermehrung über Nacht bei 37°C im Rundschtüttler inkubiert.

3.8 Minipräparation

Zur Isolation der Vektoren aus den, über Nacht vermehrten, E. coli-Bakterien wurde das E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit nach Herstellerangaben verwendet. Das Kit beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterien durch einen Natrium-Dodecyl-Sulfat-(SDS)- und NaOH-haltigen Puffer. Zunächst erfolgte die Auflösung der Phospholipidmembran durch das Tensid SDS. Durch die Zugabe von NaOH kommt es zu einem Anstieg des pH-Wertes mit folgender Denaturierung von Proteinen und DNA. Aufgrund ihrer geringen Größe konnte die Vektor-DNA schnell wieder hybridisieren, während die chromosomale DNA größtenteils einzelsträngig blieb. Durch die Zugabe eines Kaliumacetat-haltigen Puffers wurden Proteine, Zelltrümmer, chromosomale DNA und SDS ausgefällt. Die Ausfällungsprodukte wurden abzentrifugiert. Im Überstand befand sich die Vektor-DNA. Diese wurde auf eine Zentrifugationssäule transferiert und an die enthaltene Silica-Membran gebunden. Sich anschließende Waschschriffe befreiten die Vektor-DNA von Kontaminationen. Die Elution der Vektor-DNA aus der Zentrifugationssäule erfolgte nach dem Prinzip der RNA-Elution (s. Kap. 3.1). Die Konzentration der gewonnenen Vektor-DNA wurde für jeden Ansatz UV-spektrophotometrisch mit dem NanoDrop UV-Spektrophotometer bestimmt.

3.9 Restriktionskontrolle

Zur Überprüfung der Klonierung der TrkB-Isoformen wurden die, in der Minipräparation gewonnenen, Vektoren mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI versetzt (Zusammensetzung des Restriktionsansatzes s. u.). Der Restriktionsverdau erfolgte über Nacht bei 37°C. Zur Auftrennung von Vektor und Insert wurde eine Gel-Elektrophorese mit einem 1%igem Agarose-Gel durchgeführt (s. Kap. 3.3). Dazu wurden 10 µl des Restriktionsansatzes je Geltasche verwendet. Die Gel-Elektrophorese lief 1h bei einer Spannung von 120 V. Bei einer erfolgreichen Klonierung (Einbau der TrkB-Isoformen in den Vektor) wurde das Insert an den Restriktionsstellen geschnitten. In diesem Fall waren im Gel jeweils eine Bande des Vektors und eine Bande des Inserts auf der entsprechenden Höhe sichtbar. Die Inserts (TrkB-Isoformen) wurden mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit aus dem Gel nach Herstellerangaben extrahiert.

Restriktionsansatz:

- 3 µl Vektor(~300 ng)
- 2 µl Multi-CORE (10x) Puffer
- 1 µl BamHI (10 U/µl)
- 1 µl EcoRI (12 U/µl)
- Aqua dest. ad 20 µl

3.10 Klonierung mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1(+)

Um eine Überexpression der TrkB-Isoformen in humanen glatten Muskelzellen aus Pulmonalarterien zu erzeugen, mussten die Isoformen in einen Expressionsvektor integriert werden. Verwendet wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1(+) mit einer Länge von 5428 Bp (s. Abb. 8). Dieser Vektor besitzt Restriktionsstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI. Den TrkB-Isoformen wurden diese Restriktionsstellen über spezielle Primer in der PCR angehängt (s. Kap. 3.3). Vektor und Inserts (pcDNA3.1(+), TrkB-c, TrkB-b, TrkB-e) wurden jeweils über Nacht bei 37°C mit dem Restriktionsenzym BamHI inkubiert (Restriktionsansatz 1). Es wurden ca. 600

ng Vektor/ μ l und ca. 30 ng Insert/ μ l verwendet (Zusammensetzung der Restriktionsansätze s. u.). Anschließend wurden die Ansätze mit dem Restriktionsenzym EcoRI für 3h bei 37°C inkubiert (Restriktionsansatz 2).

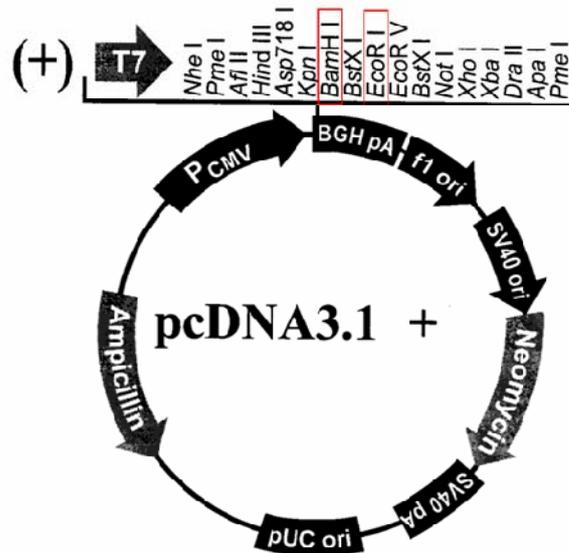


Abb. 8: Der Expressionsvektor pcDNA3.1(+). Die Vektorkarte zeigt die Restriktionsstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI, modifiziert nach www.invitrogen.com.

Restriktionsansatz 1 (Vektor):

- 20 μ l Vektor (~600 ng/ μ l)
- 3 μ l Multi-CORE (10x) Puffer
- 3 μ l BamHI (10 U/ μ l)
- Aqua dest. ad 30 μ l

Restriktionsansatz 2 (Vektor):

- 30 μ l von Restriktionsansatz 1
- 4 μ l Multi-CORE (10x) Puffer
- 5 μ l EcoRI (12 U/ μ l)
- Aqua dest. ad 40 μ l

Restriktionsansatz 1 (Insert):

- 20 μ l Insert (~30 ng/ μ l)
- 3 μ l Multi-CORE (10x) Puffer
- 3 μ l BamHI (10 U/ μ l)
- Aqua dest. ad 30 μ l

Restriktionsansatz 2 (Insert):

- 30 μ l Restriktionsansatz 1
- 4 μ l Multi-CORE (10x) Puffer
- 5 μ l EcoRI (12 U/ μ l)
- Aqua dest. ad 40 μ l

Durch die, durch Restriktion geschaffenen, klebrigen Enden von Insert und Vektor konnten sich diese zu einem geschlossenen Vektor zusammenfügen (der Schritt der Insertion durch eine Polymerase entfiel hier im Vergleich zu der Klonierung mit dem pGEM-T Easy Vektor). Dann erfolgte die Ligation wie in Kap. 3.5 beschrieben. Insgesamt wurden vier Expressionsvektoren konstruiert (s. Tabelle 13). Um ausreichende Mengen der konstruierten Vektoren zu erzeugen, wurden elektrokompente E. coli-Bakterien transformiert (s. Kap. 3.7). Hier konnte keine Blau-Weiß-Selektion vorgenommen werden, weil der Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kein lacZ-Gen besitzt. Zur Selektion wurden reine Ampicillin-Selektionsplatten (s. Kap. 3.6.2) verwendet. Je Transformationsansatz wurden einzelne Kolonien ausgewählt und zur Vermehrung über Nacht inkubiert (s. Kap. 3.7). Zur Gewinnung der rekombinanten Vektoren wurde eine Minipräparation, wie in Kap. 3.8 beschrieben, durchgeführt. Nach der Restriktionskontrolle (s. Kap. 3.9) wurden die Inserts aus dem Gel extrahiert (s. Kap. 3.9) und anschließend sequenziert (s. Kap. 3.4).

Tabelle 13: Konstruierte Expressionsvektoren.

| Name des Expressionsvektors | Eingefügte TrkB-Isoform |
|------------------------------------|--------------------------------|
| pcDNA3.1(+) (Leervektor) | - |
| pcDNA3.1(+)+c | TrkB-c |
| pcDNA3.1(+)+b | TrkB-b |
| pcDNA3.1(+)+e | TrkB-e |

3.11 Maxipräparation

Stimmte die Sequenz der in den Vektor integrierten TrkB-Isoformen mit der Originalsequenz nach den Angaben des NCBI (s. Tabelle 8) überein, wurde eine Maxipräparation durchgeführt. Die Maxipräparation wurde mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Methodisch war dieses Verfahren mit dem der Minipräparation (s. Kap. 3.8) identisch, mit dem einzigen Unterschied, dass hier größere Ansatzvolumina zur Generierung sehr großer Vektormengen gewählt wurden. Anschließend wurde die

Konzentration der gewonnenen Vektor-DNA UV-spektrophotometrisch mit dem NanoDrop UV-Spektrophotometer bestimmt.

3.12 Kultivierung humaner glatter Muskelzellen aus Pulmonalarterien

Es wurden humane glatte Muskelzellen aus Pulmonalarterien (huPASMC) von Lonza der Passagen 4 bis 8 verwendet. Die Primärzellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt. Nach zügigem Auftauen der Zellen in einem Wasserbad bei 37°C wurden diese mit 7 ml Vollmedium (Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 mit zugesetztem SupplementMix) in eine Zellkultur-Flasche ausgesät. Der SupplementMix enthielt die, für das Wachstum von Kulturzellen notwendigen, Wachstumsfaktoren. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 , 21% O_2 und einer relativen Luftfeuchte von 95%. Das Vollmedium wurde im Abstand von zwei Tagen gewechselt. Bei einer Konfluenz von 80% (d. h. 80 % der Oberfläche der Zellkultur-Flasche waren bewachsen) konnten die Zellen für Experimente genutzt werden. Dafür wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA (1x) vom Boden der Zellkultur-Flasche gelöst und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

3.13 Transfektion von huPASMC

Um eine Überexpression der TrkB-Isoformen in huPASMC zu erzeugen, mussten die konstruierten Vektoren (s. Tabelle 13) in den Zellkern der Zellen transportiert werden (Transfektion bzw. Nukleofektion). Dazu wurde das Human AoSMC Nucleofector Kit nach Herstellerangaben verwendet. Durch einen kurzen elektrischen Impuls mit der Folge einer Membrandepolarisierung und durch die Verwendung spezieller Puffer sollten die Vektoren direkt in den Zellkern gelangen. Für jeden Expressionsvektor (s. Tabelle 13) wurde eine Zellkultur-Flasche mit huPASMC verwendet. Die Zellen wurden trypsiniert (s. Kap. 3.12) und in 15 ml-PR-Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 500 g für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet mit jeweils 100 μl Basic Nucleofector Solution resuspendiert. Nach Zugabe von 2 μg des jeweiligen Expressionsvektors wurde die Suspension zügig in eine

Nukleofektionsküvette transferiert. Die Transfektion erfolgte im Nukleofektor II mit dem Programm „U25“. Die transfizierten Zellen wurden vorsichtig mit 500 µl Vollmedium (s. Kap. 3.12) resuspendiert und auf eine 6-Loch-Zellkultur-Platte mit 1 ml Vollmedium/Loch ausgesät. Aufgrund der hohen Toxizität der Nukleofektionslösung wurde das Vollmedium nach 6h (nach Adhäsion der Zellen) ersetzt.

3.14 Real-Time-PCR (RTQ-PCR)

Zur Überprüfung der Überexpression der TrkB-Isoformen in den transfizierten huPASCs wurde eine quantitative Real-Time-PCR (RTQ-PCR) durchgeführt. Die RTQ-PCR bot die Möglichkeit der Quantifizierung von PCR-Produkten durch Fluoreszenzmessungen. Der, zur Detektion der amplifizierten doppelsträngigen DNA (dsDNA) eingesetzte, Farbstoff war SYBR Green. Die Messungen erfolgten 1x während jedes PCR-Zyklus. Die Fluoreszenz war proportional zur Menge der PCR-Produkte; somit konnte die Produktentstehung in Echtzeit verfolgt werden. Zur Kontrolle, dass es sich bei den gebildeten Produkten um ein spezifisches Amplifikat handelte, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei kam es durch kontinuierliche Temperaturerhöhung zu einem Denaturieren der DNA, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme registriert wurde. In der ersten negativen Ableitung zeigte sich die, mit der Temperatur am steilsten abfallende, Fluoreszenz als temperaturspezifischer Peak, wodurch eine Unterscheidung von unspezifischen Produkten möglich war. Zur Bestimmung der Regulation des Ziel-Gens musste dessen Expression auf ein Referenzgen bezogen werden. Verwendet wurde dazu die humane Porphobilinogen-Deaminase (huPBGD). Seine Verwendung diente dem Zweck die Messwerte auf eine eingesetzte Menge an Probematerial zu normalisieren.

Die transfizierten Zellen (s. Kap. 3.13) wurden über Nacht im Brutschrank verwahrt und am folgenden Tag trypsiniert (s. Kap. 3.12). Im Anschluss an eine Zellzählung mit einer Neubauer-Zählkammer wurden jeweils 15.000 huPASCs in 500 µl Vollmedium pro Loch einer 12-Loch-Zellkultur-Platte ausgesät. Nach 48h wurden die Zellen durch ein 2-maliges Waschen mit PBS (1x) abgestoppt. Es folgte die Zell-Lyse und RNA-Elution wie in Kap. 3.1

beschrieben. Daran schloss sich die Reverse Transkription (s. Kap. 3.2) an. Für die RTQ-PCR wurde ein Mastermix für jedes Zielgen angesetzt (Zusammensetzung des Mastermixes s. u.). Davon wurden 23 µl in jedes Loch einer 96-Loch-Platte pipettiert und anschließend 2 µl cDNA hinzugefügt. Die RTQ-PCR wurde jeweils im Doppelansatz durchgeführt. In jedem PCR-Lauf wurden Negativkontrollen ohne Template mitgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem SDS 7900 Ht-Gerät.

Mastermix:

- 13 µl SYBR Green Platinum qPCR SuperMix-UDG
- 1 µl MgCl₂
- 0,5 µl Vorwärts-Primer (s. Tabelle 14)
- 0,5 µl Rückwärts-Primer (s. Tabelle 14)
- Aqua dest. ad 23 µl

Tabelle 14: Primer der RTQ-PCR.

| Primer der RTQ-PCR | | |
|---------------------------|---------------|----------------------|
| Zielgen | Primer | Amplikonlänge |
| TrkB-c | CE_VP/AC_RP | 250 Bp |
| TrkB-b | B_VP/B_RP | 229 Bp |
| TrkB-e | CE_VP/DE_RP | 226 Bp |

3.15 Proliferationsassay mit Bromodesoxyuridin (BrdU)

Im Proliferationsassay sollten die proliferativen Eigenschaften der huPASC in Abhängigkeit von den transfizierten Vektoren (s. Tabelle 13) und von der Stimulation mit den Liganden BDNF und huNT4 (s. Kap. 1.3) untersucht werden. Die transfizierten Zellen (s. Kap. 3.13) wurden über Nacht im Brutschrank verwahrt und am folgenden Tag trypsinisiert (s. Kap. 3.12). Im Anschluss an eine Zellzählung mit einer Neubauer-Zählkammer wurden jeweils 10.000 huPASC in 100 µl Vollmedium pro Loch einer 96-Loch-Zellkultur-Platte ausgesät. Zur Vorbereitung der Zellen auf die anschließende Stimulation mit den TrkB-Liganden BDNF und huNT4, wurde das Vollmedium durch 100 µl SupplementMix-freies Medium ersetzt, wodurch die Zellen für 12h in einen

Hungerzustand versetzt wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe der Liganden in einer Gebrauchsverdünnung von 10 ng/ml. Die Stimulation erfolgte über Nacht im Brutschrank. Dabei beinhalteten drei Zeilen der 96-Loch-Zellkultur-Platte huPASC, die mit dem gleichen Expressionsvektor transfiziert wurden (s. Abb. 9). Von diesen drei Zeilen wurde jeweils eine Zeile mit BDNF und eine Zeile mit huNT4 stimuliert, eine Zeile blieb unstimuliert. Als Kontrollen dienten zum Einen die Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, zum Zweiten die Zellen, die nicht stimuliert waren. Pro Behandlungskombination (Vektor/Stimulation) erfolgte der Versuch in 8-fachem Ansatz.

Zur Detektion der Zellproliferation wurde das Cell Proliferation-ELISA (BrdU) Kit nach Herstellerangaben verwendet. Es beinhaltete 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU), ein chemisches Analogon des Nucleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin, das von Zellen resorbiert und während der S-Phase der Mitose in die neu synthetisierte DNA eingebaut wurde. Je stärker die Zellen proliferierten, desto mehr BrdU wurde in die zelleigene DNA eingebaut. Nach einer Denaturierung der DNA durch Säure wurde das inkorporierte BrdU durch spezifische, monoklonale Antikörper gebunden. Die Antikörper waren an das Enzym Peroxidase gekoppelt, das durch die Zugabe des Peroxidase-Substrates Tetramethylbenzidin eine kolorimetrische Auswertung mit Hilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 370 nm (Enzyme-linked Immunosorbent Assay-Reader) ermöglichte (statistische Auswertung s. Kap. 3.18.2).

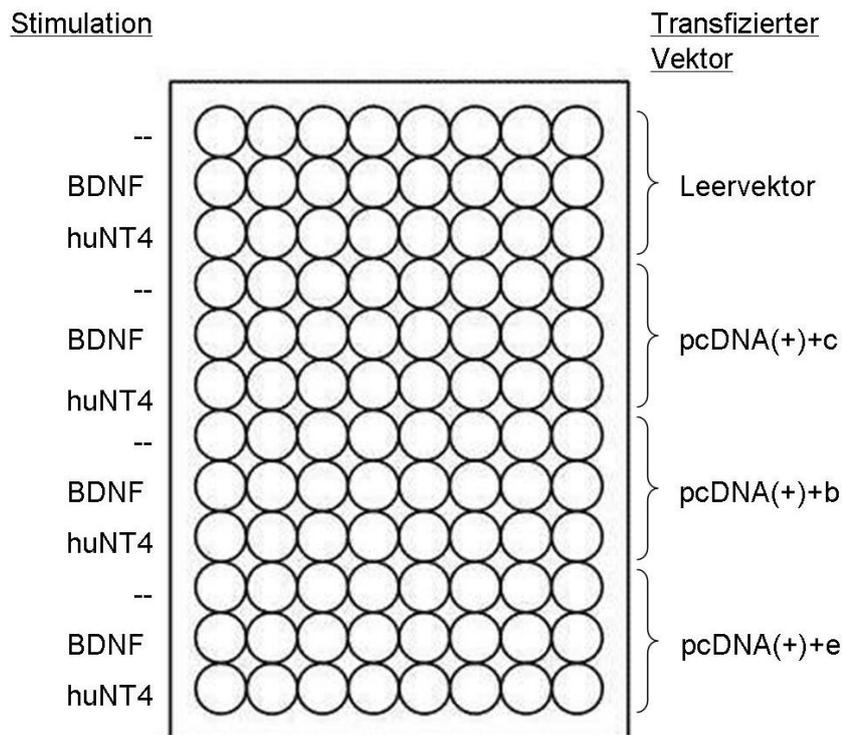


Abb. 9: Stimulationsschema (Proliferationsassay). Rechts der 96-Loch-Zellkultur-Platte ist angezeigt, mit welchem Vektor die Zellen der einzelnen Zeilen transfiziert wurden. Links der Platte ist angezeigt, ob und mit welchem Liganden die transfizierten Zellen stimuliert wurden.

3.16 Migrationsassay

Im Migrationsassay sollten die chemotaktischen Eigenschaften der huPASC bezogen auf den TrkB-Liganden BDNF (s. Kap. 1.3) in Abhängigkeit der transfizierten Expressionsvektoren untersucht werden. Dazu wurden Transwell-Filter-Systeme mit einer Porengröße von 8 µm verwendet. Ein solches Filtersystem wurde jeweils in ein Loch einer 12-Loch-Zellkultur-Platte eingehängt (s. Abb. 10). Die transfizierten Zellen wurden über Nacht im Brutschrank verwahrt und am folgenden Tag trypsinisiert. Im Anschluss an eine Zellzählung mit einer Neubauer-Zählkammer wurden 7.500 huPASC auf jeden Filter ausgesät und mit Vollmedium 3h im Brutschrank inkubiert. Pro Behandlung (Vektor) erfolgte der Versuch in 3-fachem Ansatz. Danach wurde das Vollmedium sorgfältig abgesaugt und durch SupplementMix-freies Medium ersetzt (500 µl in das Loch unterhalb des Filters; 200 µl auf den Filter). In jedes Loch unterhalb des Filters wurden 0,5 µl BDNF (Gebrauchsverdünnung:10 ng/ml) appliziert und der Ansatz über Nacht im Brutschrank inkubiert. Somit war

der Ligand BDNF für die huPASCs nur durch Chemotaxis durch die Filterporen erreichbar. Am Folgetag wurden die Filtersysteme mit DMEM-Medium gewaschen, um die auf dem Filter verbliebenen, nicht migrierten huPASCs zu entfernen. Um die migrierten huPASCs an der Filterunterseite darstellen zu können, wurden diese 10min mit Kristallviolett-Lösung gefärbt (600 µl in das Loch; 200 µl auf den Filter) und dann mit Aqua dest. gewaschen. Nach Trocknung wurde der Filterboden auf einem Objektträger fixiert und die migrierten Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Dies erfolgte verblindet in Ansätzen mit Triplikaten, von denen der Mittelwert berechnet wurde (statistische Auswertung s. Kap. 3.18.3).

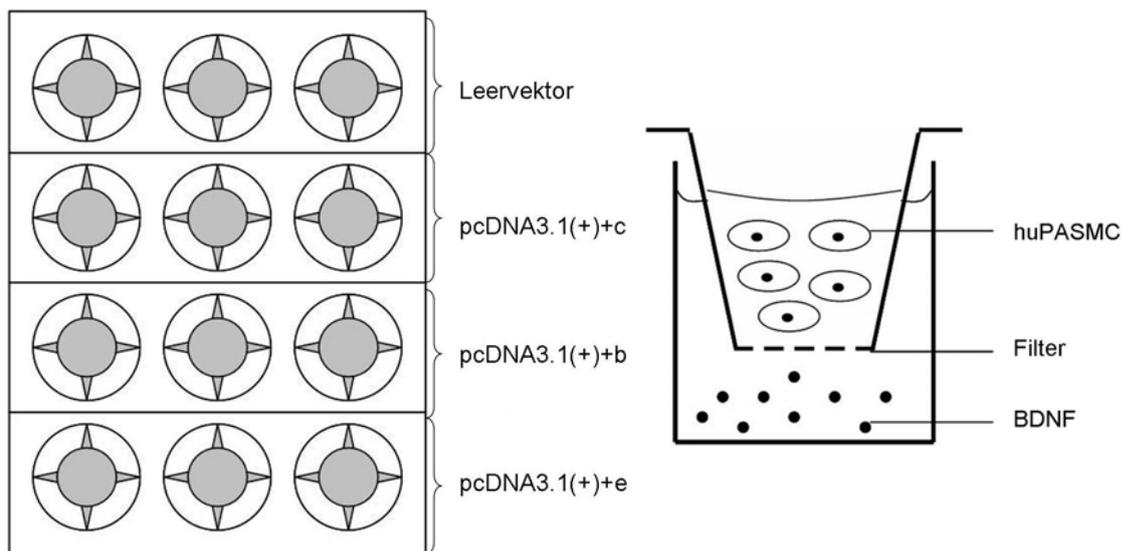


Abb. 10: Migrationsassay. Links ist die 12-Loch-Zellkultur-Platte dargestellt. Die Beschriftung rechts der Platte zeigt, mit welchem Vektor die Zellen der einzelnen Zeilen transfiziert wurden (s. Kap. 3.13). In jedes Loch der 12-Loch-Zellkultur-Platte wurde ein Transwell-Filter-System eingehängt, das rechts skizziert ist.

3.17 Adhäsionsassay

Im Adhäsionsassay sollten die adhäsiven Eigenschaften der huPASCs bezogen auf die Matrixproteine Kollagen und Fibronectin in Abhängigkeit von den transfizierten Vektoren (s. Tabelle 13) und von der Stimulation mit den Liganden BDNF und huNT4 (s. Kap. 1.3) untersucht werden. Dazu wurde eine 96-Loch-Zellkultur-Platte zur Hälfte mit humanem Kollagen IV bzw. Fibronectin

(50 µl/Loch, Konzentration 2 µg/ml) über Nacht bei 4°C benetzt. Anschließend wurde jedem Loch 50 µl 3%iges Bovines Serumalbumin (BSA) über 30min bei Raumtemperatur hinzugefügt, um unspezifische Bindungsstellen der Matrixproteine zu blockieren. Währenddessen wurden die transfizierten Zellen trypsinisiert und in insgesamt zwölf Fraktionen aufgeteilt (s. Abb. 11). Pro transfiziertem Vektor blieb eine Fraktion unstimuliert (Negativkontrolle), die verbleibenden zwei Fraktionen wurden mit den Liganden BDNF bzw. huNT4 (Gebrauchsverdünnung: 10 ng/ml) stimuliert. Es folgte eine einstündige Inkubation der Zellen im Brutschrank. Nach Absaugen des BSAs von der 96-Loch-Zellkultur-Platte wurden 10.000 huPASC/Loch ausgesät und bei 37°C inkubiert. Pro Behandlungskombination (Matrixprotein/Vektor/Stimulation) erfolgte der Versuch in 4-fachem Ansatz (s. Abb. 12). Mittels eines Lichtmikroskops wurde der Zeitpunkt der beginnenden Adhäsion abgewartet. D. h. es wurde der Zeitpunkt abgewartet, bei dem die Zellen aus ihrer Kugel-Form in einen flächenhaften Zustand mit ausgestreckten Zellausläufern wechseln. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Reaktion durch ein 2-maliges Waschen mit PBS (1x) abgestoppt, um eine weitere Adhäsion der Zellen zu unterbinden. Dann wurden die huPASC 15 min mit jeweils 100 µl eiskaltem Methanol-Azeton (Verhältnis 1:2) fixiert. Nach dem Trocknen erfolgte die Färbung der Zellen mit 100 µl Kristallviolett-Lösung je Loch für 30 min. Es folgte ein 5-maliges Waschen mit Aqua dest. und eine anschließende Trocknungsphase von 5 min. Die Absorption wurde mit einem ELISA-Reader bei 550 nm gemessen (statistische Auswertung s. Kap. 3.18.4). Als Kontrollen dienten zum Einen die Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, zum Zweiten die Zellen, die nicht stimuliert waren.

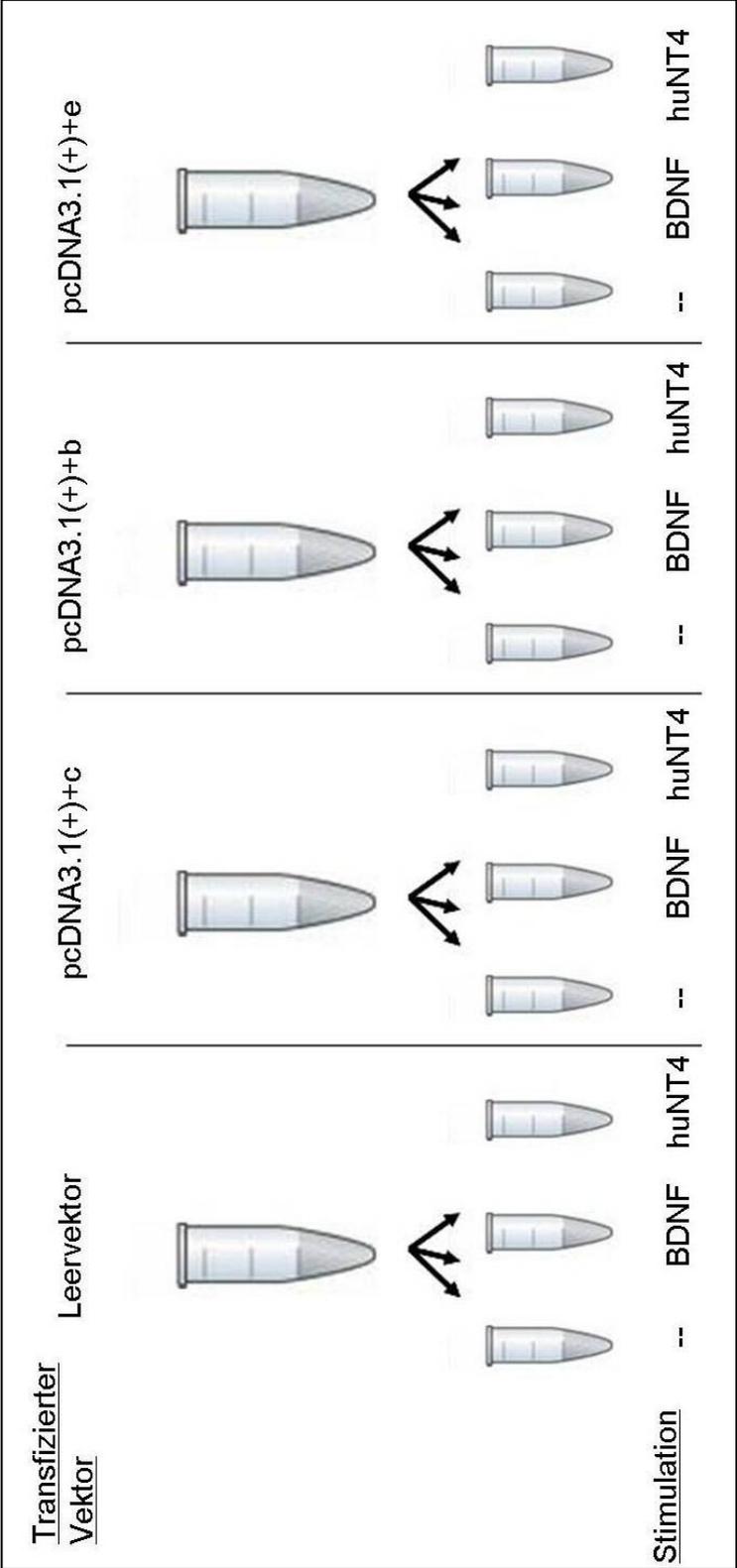


Abb. 11: Stimulationsschema (Adhäsionsassay). Die transfizierten Zellen wurden in zwölf Fraktionen aufgeteilt. Pro transfiziertem Vektor blieb eine Fraktion unstimuliert, die verbleibenden zwei Fraktionen wurden mit den Liganden BDNF bzw. huNT4 stimuliert.

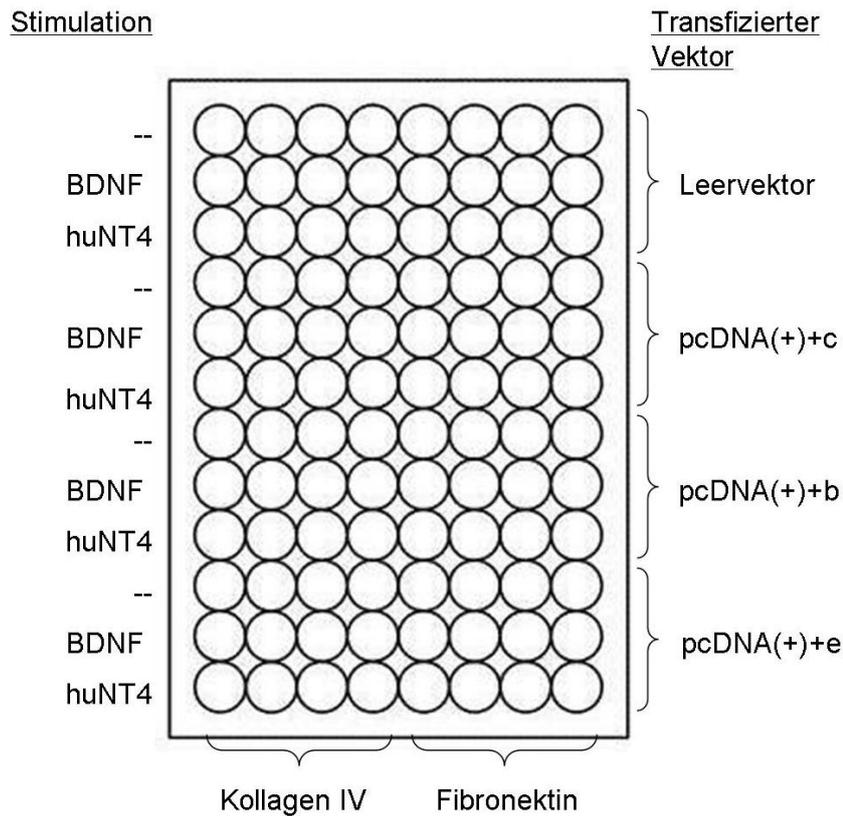


Abb. 12: Pipettierschema (Adhäsionsassay). Die 96-Loch-Zellkultur-Platte wurde zuvor zur Hälfte mit Kollagen oder Fibronectin benetzt. Rechts der Platte ist angezeigt, mit welchem Vektor die Zellen der einzelnen Zeilen transfiziert wurden. Links der Platte ist angezeigt, ob und mit welchem Liganden die transfizierten Zellen stimuliert wurden.

3.18 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Dr. rer. nat. Jochen Wilhelm. Als Computersoftware für die Datenverarbeitung und -auswertung dienten Microsoft Excel und R [107].

3.18.1 Auswertung der RTQ-PCR

Für die Auswertung der Messwerte wurden die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte berechnet. Dafür wurde für jede Kurve der Schnittpunkt mit dem Threshold berechnet. Der Threshold ist das Zehnfache des Mittelwerts der Standardabweichungen aller Kurven zwischen dem zweiten und zehnten Zyklus. Der Schnittpunkt mit dem Threshold wird als Threshold-Cycle (CT-Wert) bezeichnet. Bei diesem Zyklus beginnt in der RTQ-PCR die exponentielle Phase. Um die relative Expression

zu bestimmen, wurde der CT-Wert des Zielgens auf den CT-Wert des Housekeeping-Gens huPBGD bezogen:

$$\text{CT (Zielgen)} - \text{CT (huPBGD)} = \Delta\text{CT}$$

Dann erfolgte der Vergleich des ΔCT -Werts mit der Kontrollgruppe (Leervektor, s. a. Kap. 3.13):

$$\Delta\text{CT} - \Delta\text{CT (Leervektor)} = \Delta\Delta\text{CT}$$

Zur Ermittlung der relativen Expression wurde der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert in folgende Formel eingesetzt (die relative Expression gibt die n-fache Expressionsänderung des Zielgens im Vergleich zur Kontrollgruppe an):

$$\text{Relative Expression} = 2^{(\Delta\Delta\text{CT})}$$

3.18.2 Auswertung des Proliferationsassays

Es wurden insgesamt drei 96-Loch-Zellkultur-Platten ausgewertet (N=3). Die acht Messwerte pro Platte wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst. Die statistische Auswertung der Daten der Proliferationsassays erfolgte durch eine zweifaktorielle ANOVA (Varianzanalyse) mit Messwiederholung. Die getesteten Faktoren waren „Vektor“ (Vek) und „Stimulation“ (Stim). Neben den Haupteffekten Vek und Stim war die Interaktion Vek x Stim von besonderem Interesse (d. h. hat die Stimulation bei unterschiedlichen Vektoren eine unterschiedliche Wirkung). Die Messwiederholung wurde in Form von Fehlertermen im Modell berücksichtigt, durch welche die nicht interessierenden Varianzen aus den Daten herausgerechnet wurden (vergleichbar dem gepaarten t-Test im Zweistichprobenfall). Erster Fehlerterm war das Experiment, da sich die Zellen von Experiment zu Experiment unterschieden. Da sich auch die Transfektionen in ihrem Wirkungsgrad unterschieden (die Transfektionen erfolgten getrennt für jedes Experiment), wurde der Fehler der Transfektion im Faktor „Experiment“ (Exp) abgebildet. Es lagen keine Informationen über die, durch die Stimulation bedingte, Varianz vor, weil je

Experiment und Transfektion nur eine Stimulation erfolgte. In der Modellrechnung wurde die Stimulation im Fehlerausdruck angegeben, sie wirkt sich jedoch aus genanntem Grund nicht auf das Ergebnis aus. Die Residuen des Modells wurden grafisch auf grobe Verletzungen der Modellannahmen von Normalverteilung und Varianzhomogenität untersucht (Quantil-Quantil- und Residuen-Plots). Signifikanzen multipler Vergleiche innerhalb der Interaktionen wurden nach Dunnett korrigiert. Die Dunnett-Korrektur ist ein Verfahren für Vergleiche multipler Bedingungen mit derselben Kontrollgruppe [108] [109].

3.18.3 Auswertung des Migrationsassays

Es wurden insgesamt vier 12-Loch-Zellkultur-Platten ausgewertet (N=4). Die Rohdaten wurden zuvor logarithmiert und dann gemittelt, d. h. drei Messwerte wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst. Die statistische Auswertung der Mittelwerte der Migrationsassays erfolgte durch eine einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung. Der getestete Faktor war der „Vektor“ (Vek). Die Residuen des Modells wurden grafisch auf grobe Verletzungen der Modellannahmen von Normalverteilung und Varianzhomogenität untersucht (Quantil-Quantil- und Residuen-Plots). Um festzustellen welche Gruppen sich in ihren Mittelwerten unterschieden, mussten multiple Vergleiche angestellt werden. Dafür wurden paarweise gepaarte t-Tests durchgeführt. Anschließend wurden die ermittelten p-Werte nach Holm adjustiert [110].

3.18.4 Auswertung des Adhäsionsassays

Es wurden insgesamt fünf 96-Loch-Zellkultur-Platten ausgewertet (N=5). Die Rohdaten wurden zuvor gemittelt, d. h. vier Messwerte wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst. Die statistische Auswertung der Mittelwerte der Adhäsionsassays erfolgte separat für jedes Matrixprotein durch eine zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung. Die getesteten Faktoren waren „Vektor“ (Vek) und „Stimulation“ (Stim). Neben den Haupteffekten Vek und Stim war die Interaktion Vek x Stim von besonderem Interesse. Die Auswertung erfolgte analog zu Auswertung der Proliferationsassays (s. Kap. 3.18.4).

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die Daten Evidenz für eine veränderte Adhäsion der huPASC (unabhängig von Transfektion und Stimulation) an den Matrixproteinen Fibronectin bzw. Kollagen liefern. Dafür wurden Differenzwerte (Fibronectin - Kollagen) gebildet. Zur Prüfung auf relevante Abweichungen zur Normalverteilung der Differenzwerte wurden ein Histogramm und ein Quantil-Quantil-Plot angefertigt sowie ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Wegen starken Abweichungen der empirischen Verteilung von der Normalverteilung wurde die Signifikanz der Abweichung der Differenzwerte von Null mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung und Sequenzierung der TrkB-Isoformen

Die mRNA der Isoformen TrkB-c, TrkB-b und TrkB-e konnte aus A549-Zellen gewonnen werden. Nach der Transkription in cDNA und der Vervielfältigung per PCR (s. Abb. 13) erfolgte die Sequenzierung. Die Basensequenzen stimmten mit den Originalsequenzen nach Angaben der Datenbank des NCBI überein. Nach der Klonierung in den Expressionsvektor wurden die TrkB-Isoformen erneut sequenziert. Auch hier stimmten die Basensequenzen mit den Originalsequenzen überein.

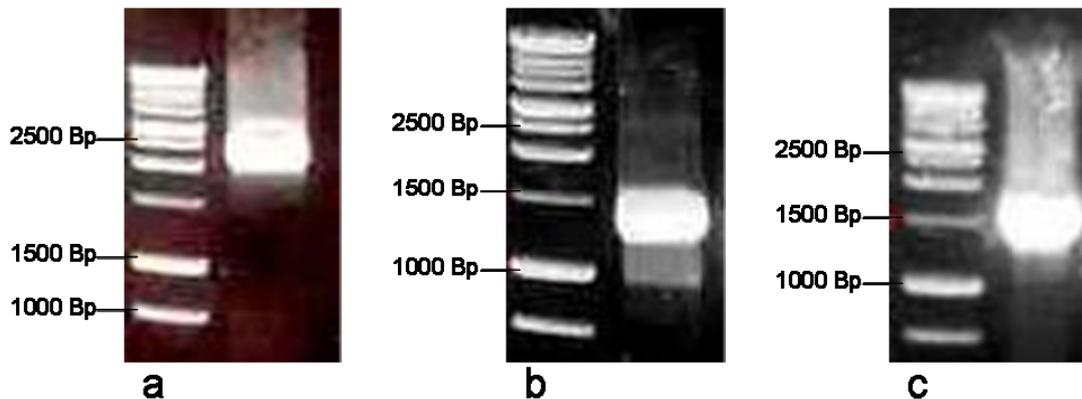


Abb. 13: Gel-Elektrophorese. a zeigt TrkB-c (Länge 2469 Bp), b zeigt TrkB-b (Länge 1434 Bp) und c zeigt TrkB-e (Länge 1614 Bp).

4.2 Endogene Expression der TrkB-Isoformen in huPASC

Durch RTQ-PCR (Methodik s. Kap. 3.14, statistische Auswertung s. Kap. 3.18.1) konnte die endogene Expression der drei TrkB-Isoformen in huPASC erstmalig gezeigt werden (s. Abb. 14 und 15).

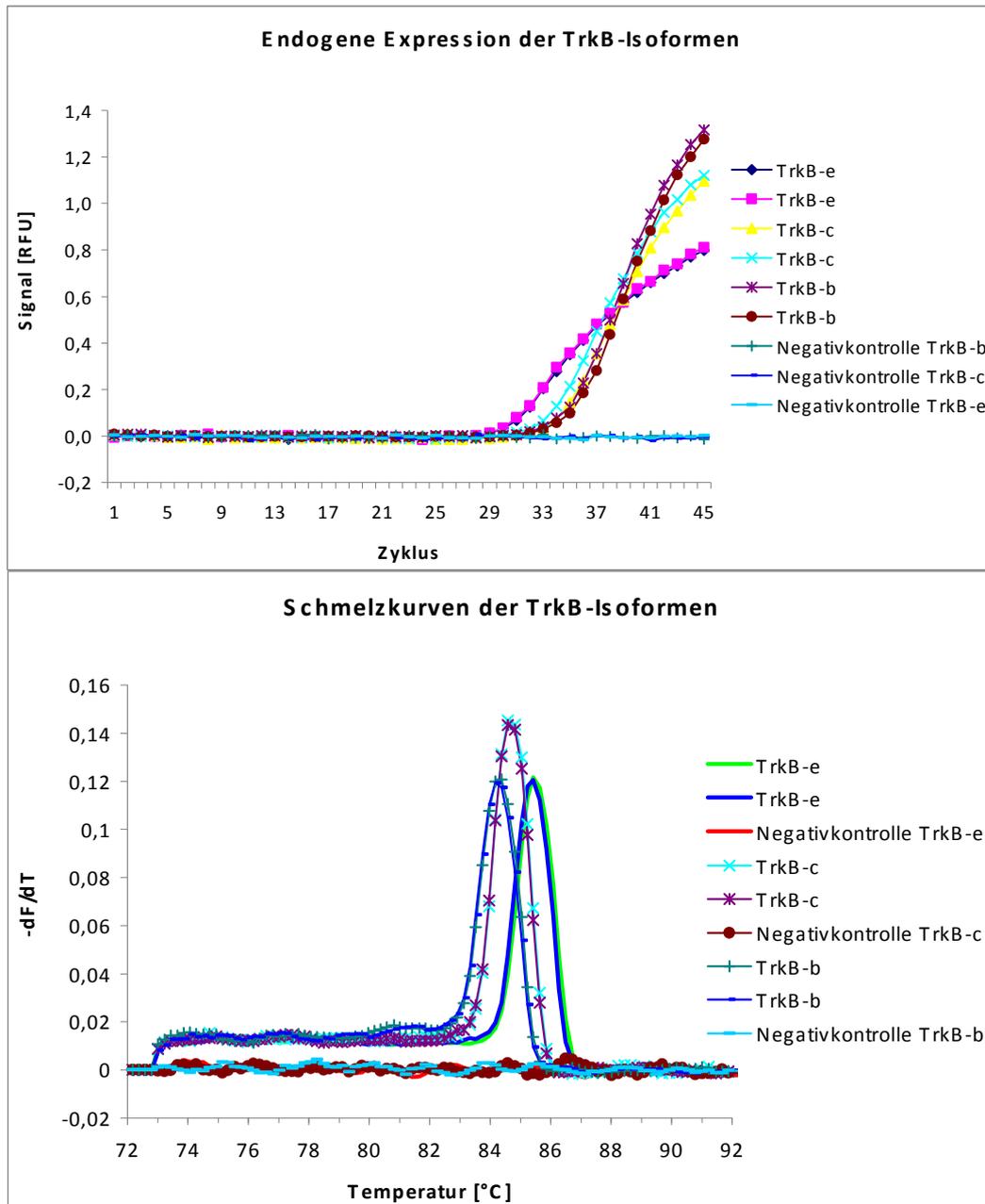


Abb. 14: Endogene Expression der TrkB-Isoformen in huPASCs. Der Amplification-Plot oben (Abszisse: Zyklanzahl, Ordinate: Fluoreszenz) zeigt die endogene Expression der TrkB-Isoformen jeweils im Doppelansatz. Für die Isoformen TrkB-c und TrkB-b beginnt die exponentielle Phase im Mittel mit dem 33. Zyklus, während die Isoform TrkB-e bereits ab dem 30. Zyklus exponentiell ansteigt (CT-Werte gerundet). Die zugehörige Schmelzkurvenanalyse unten (Abszisse: Temperatur in °C, Ordinate: 1. negative Ableitung der Fluoreszenzabnahme) zeigt durch die temperaturspezifischen Peaks, dass es sich um drei Amplifikate handelt.

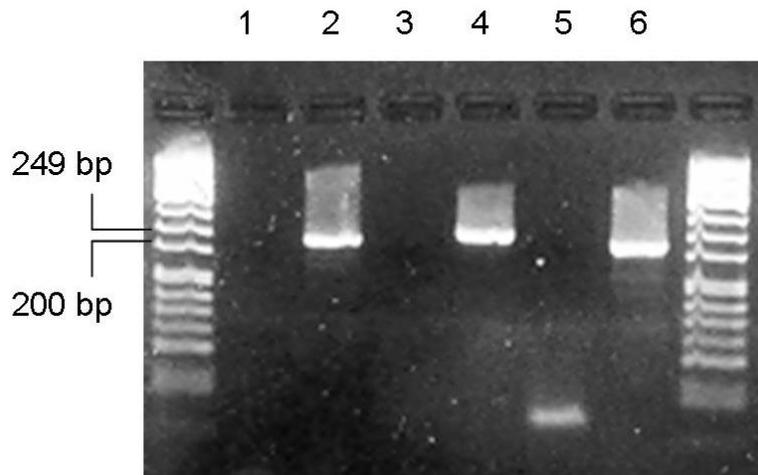


Abb. 15: Endogene Expression der TrkB-Isoformen in huPASC (Gel-Elektrophorese). **1** zeigt die Negativkontrolle für TrkB-b, **2** die endogene Expression von TrkB-b (Amplikonlänge 229 Bp). **3** zeigt die Negativkontrolle für TrkB-c, **4** die endogene Expression von TrkB-c (Amplikonlänge 250 Bp). **5** zeigt die Negativkontrolle für TrkB-e, **6** die endogene Expression von TrkB-e (Amplikonlänge 226 Bp).

4.3 Überexpression der TrkB-Isoformen in huPASC

Durch RTQ-PCR (Methodik s. Kap. 3.14, statistische Auswertung s. Kap. 3.18.1) konnte die Überexpression der drei TrkB-Isoformen nach Transfektion der huPASC mit den Expressionsvektoren gezeigt werden (s. Tabelle 15 und s. Abb. 16-18).

Tabelle 15: $\Delta\Delta CT$ -Werte und Relative Expressionen.

| Zielgen | $\Delta\Delta CT$ -Wert | Relative Expression |
|---------|-------------------------|---------------------|
| TrkB-c | -19,81 | ~900.000 |
| TrkB-b | -21,61 | ~3.200.000 |
| TrkB-e | -20,30 | ~1.300.000 |

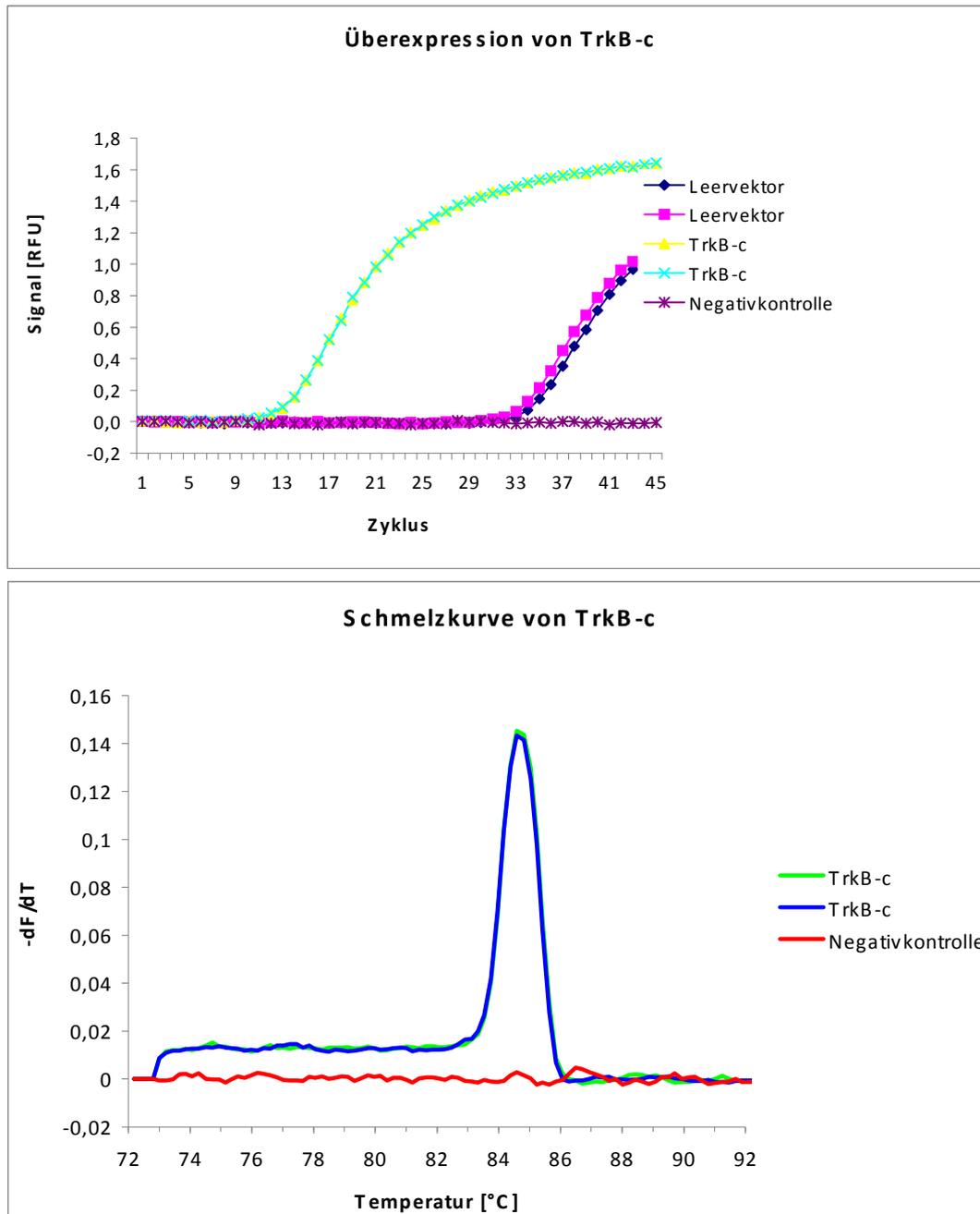


Abb. 16: Überexpression der Isoform TrkB-c in huPASC. Der Amplification-Plot oben (Abszisse: Zyklanzahl, Ordinate: Fluoreszenz) zeigt die endogene Expression (rechte Kurve) und die durch Transfektion erzeugte Überexpression (linke Kurve) von TrkB-c. Es konnte eine $0,9 \times 10^6$ -fache Expressionserhöhung im Vergleich zur endogenen Expression erzielt werden (s. Tabelle 15). Die zugehörige Schmelzkurvenanalyse unten (Abszisse: Temperatur in °C, Ordinate: 1. negative Ableitung der Fluoreszenzabnahme) zeigt durch den temperaturspezifischen Peak, dass es sich um ein Amplifikat handelt.

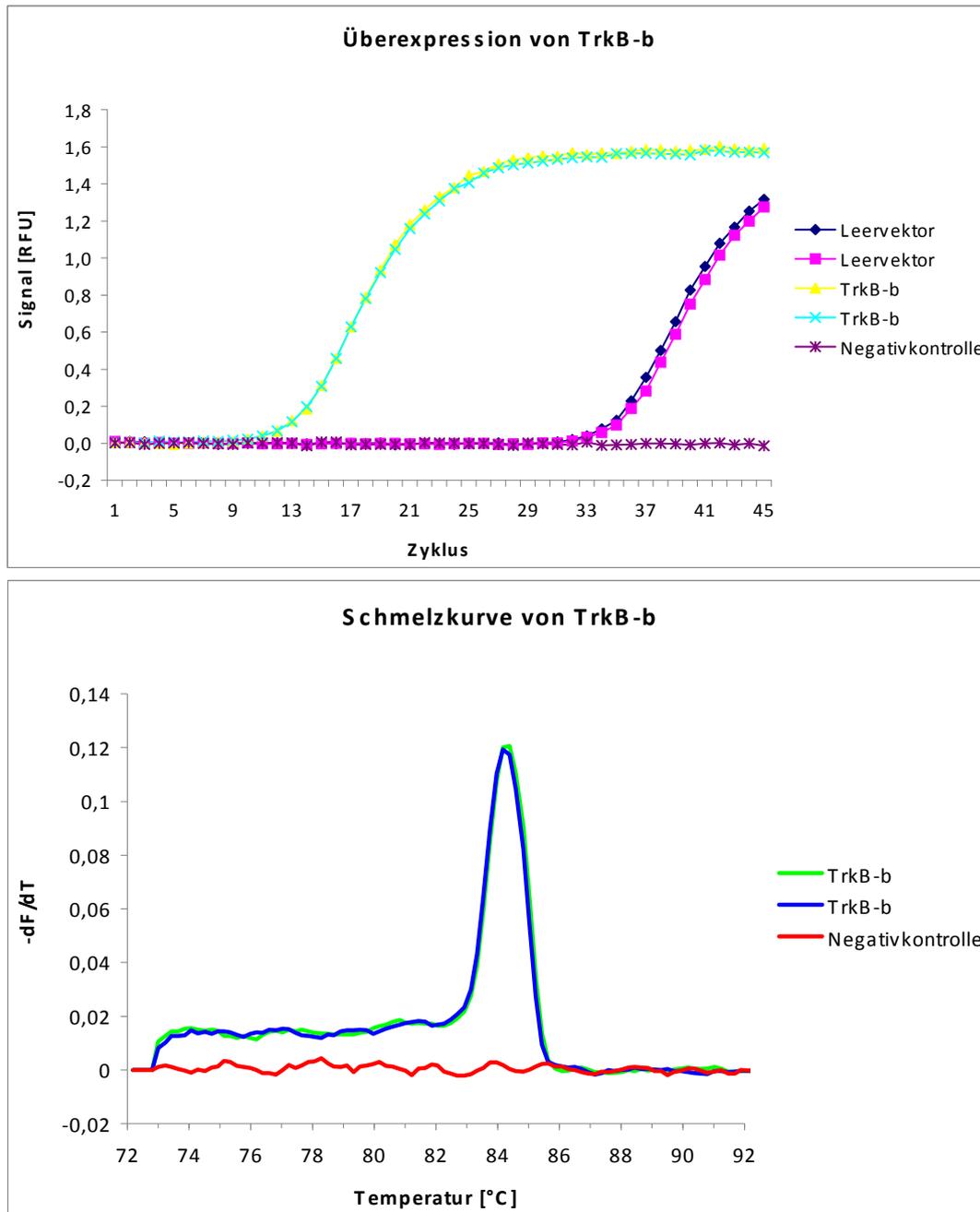


Abb. 17: Überexpression der Isoform TrkB-b in huPASC. Der Amplification-Plot oben (Abszisse: Zyklusanzahl, Ordinate: Fluoreszenz) zeigt die endogene Expression (rechte Kurve) und die durch Transfektion erzeugte Überexpression (linke Kurve) von TrkB-b. Es konnte eine $3,2 \times 10^6$ -fache Expressionserhöhung im Vergleich zur endogenen Expression erzielt werden (s. Tabelle 15). Die zugehörige Schmelzkurvenanalyse unten (Abszisse: Temperatur in °C, Ordinate: 1. negative Ableitung der Fluoreszenzabnahme) zeigt durch den temperaturspezifischen Peak, dass es sich um ein Amplifikat handelt.

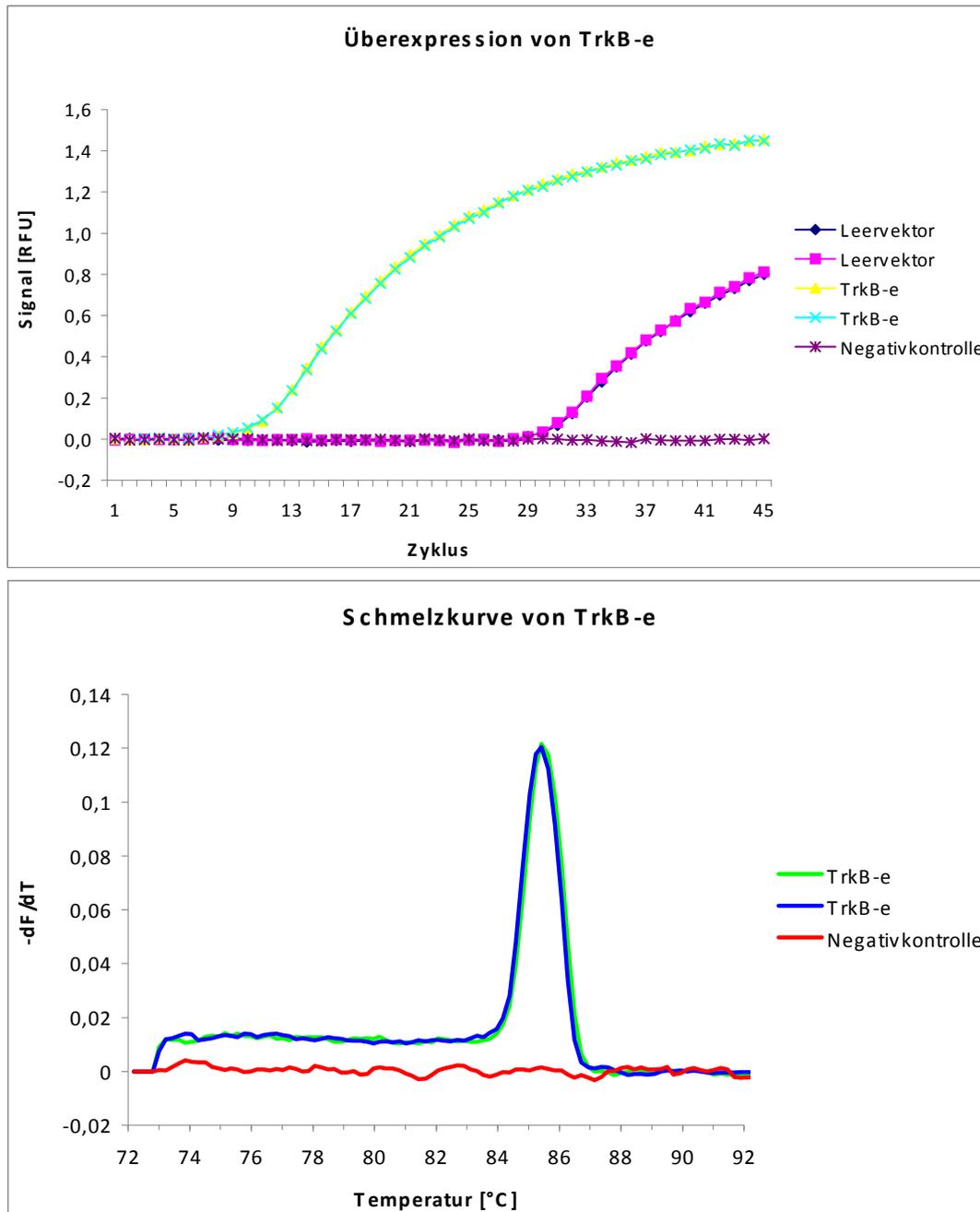


Abb. 18: Überexpression der Isoform TrkB-e in huPASC. Der Amplification-Plot oben (Abszisse: Zyklanzahl, Ordinate: Fluoreszenz) zeigt die endogene Expression (rechte Kurve) und die durch Transfektion erzeugte Überexpression (linke Kurve) von TrkB-e. Es konnte eine $1,3 \times 10^6$ -fache Expressionserhöhung im Vergleich zur endogenen Expression erzielt werden (s. Tabelle 15). Die zugehörige Schmelzkurvenanalyse unten (Abszisse: Temperatur in °C, Ordinate: 1. negative Ableitung der Fluoreszenzabnahme) zeigt durch den temperaturspezifischen Peak, dass es sich um ein Amplifikat handelt.

4.4 Proliferationsassay

Im Proliferationsassay wurden die proliferativen Eigenschaften der huPASC in Abhängigkeit von den transfizierten Vektoren und von der Stimulation mit den Liganden BDNF und huNT4 untersucht (Methodik s. Kap. 3.16, statistische Auswertung s. Kap. 3.19.2). Die grafische Analyse der Residuen zeigte keine relevanten Verletzungen der Annahme von Normalverteilung und Varianzhomogenität. Die Ergebnisse der ANOVA sind in Tab. 16 gezeigt. Die Daten liefern Evidenz für eine veränderte Proliferation der Zellen nach Stimulation in Abhängigkeit der transfizierten Vektoren (Vek:Stim, p-Wert: 0,0266). Durch die signifikante Interaktion können die Haupteffekte Vek und Stim nicht mehr separat betrachtet werden. Tab. 17 zeigt die verwendeten Mittelwerte und die Beiträge der einzelnen Interaktionen zur Varianzaufklärung.

Tabelle 16: ANOVA-Tafel (Proliferationsassay). Der F-Wert gibt die Varianz der Residuen an. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an unter der Nullhypothese einen größeren als den beobachteten F-Wert zu erhalten (* p-Wert < 0,05).

| ANOVA-Tafel | | | | | |
|--------------------|------------|--------------|---------|--------|---------|
| Fehler: Exp | | | | | |
| | Freiheits- | Fehler- | | | |
| | grade | quadratsumme | Varianz | F-Wert | p-Wert |
| Fehlervarianzen | 2 | 0,2108 | 0,1054 | | |
| Fehler: Exp:Vek | | | | | |
| | Freiheits- | Fehler- | Varianz | F-Wert | p-Wert |
| | grade | quadratsumme | | | |
| Vek | 3 | 0,0008 | 0,0003 | 0,1318 | 0,9376 |
| Fehlervarianzen | 6 | 0,0116 | 0,0019 | | |
| Fehler: | | | | | |
| Exp:Vek:Stim | | | | | |
| | Freiheits- | Fehler- | Varianz | F-Wert | p-Wert |
| | grade | quadratsumme | | | |
| Stim | 2 | 0,0007 | 0,0003 | 3,9128 | 0,0414* |
| Stim:Vek | 6 | 0,0017 | 0,0003 | 3,2852 | 0,0266* |
| Fehlervarianzen | 16 | 0,0013 | 0,0001 | | |

Tabelle 17: Mittelwerte (Proliferationsassay).

| Mittelwert | | | | |
|--------------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| e | | | | |
| Gesamtmittelwert: 0,3963 | | | | |
| Stim | | | | |
| | -- | BDNF | huNT4 | |
| | 0,4012 | 0,3969 | 0,3908 | |
| Vek | | | | |
| | Leer-vektor | pcDNA3.1(+)+b | pcDNA3.1(+)+c | pcDNA3.1(+)+e |
| | 0,4022 | 0,3956 | 0,3979 | 0,3894 |
| | Leer-vektor | pcDNA3.1(+)+b | pcDNA3.1(+)+c | pcDNA3.1(+)+e |
| -- | 0,3966 | 0,4101 | 0,3989 | 0,3991 |
| BDNF | 0,4053 | 0,3874 | 0,3989 | 0,3959 |
| huNT4 | 0,4046 | 0,3893 | 0,396 | 0,3731 |
| Standard-Fehler | | | | |
| | Stim | Vek | Stim:Vek | |
| | 0,0026 | 0,0147 | 0,0053 | |
| Wiederhol. | 12 | 9 | 3 | |

Tabelle 18 zeigt die einzelnen Interaktionseffekte, die p-Werte sind nicht für multiples Testen korrigiert. Erkennen lässt sich hier bereits die Tendenz, dass die Daten Evidenz für einen Effekt für die Kombinationen BDNF_pcDNA3.1(+)+b und huNT4_pcDNA3.1(+)+e liefern.

Tabelle 18: Einzelne Interaktionseffekte (Proliferationsassay). Für jeden Interaktionseffekt gilt ein Freiheitsgrad von 1.

| Interaktionen | | | | |
|-------------------------|-------------------------|----------|---------|--------|
| | Fehler- quadratsumme | Varianz | F-Wert | p-Wert |
| BDNF_ pcDNA3.1(+)+b | 0,0005 | 0,0005 | 5,5586 | 0,0315 |
| huNT4_ pcDNA3.1(+)+b | 0,0002 | 0,0002 | 2,5812 | 0,1277 |
| BDNF_ pcDNA3.1(+)+c | < 0,0001 | < 0,0001 | 0,5345 | 0,4753 |
| huNT4_ pcDNA3.1(+)+c | < 0,0001 | < 0,0001 | 0,4495 | 0,5121 |
| BDNF_ pcDNA3.1(+)+e | < 0,0001 | < 0,0001 | 0,2973 | 0,5931 |
| huNT4_ pcDNA3.1(+)+e | 0,0009 | 0,0009 | 10,2902 | 0,0055 |

Um die Interaktionseffekte näher darzustellen, wurden Dunnett's Kontraste berechnet (s. Tabelle 19). Die Daten liefern Evidenz für eine verminderte Proliferation der huPASCs bei Stimulation mit den Liganden BDNF nach Transfektion der huPASCs mit dem Vektor pcDNA3.1(+)+b (p-Wert: 0,0423) (s. Abb. 19 und Abb. 21). Ferner besteht Evidenz für einen ebenfalls negativen Effekt auf die Proliferation der huPASCs bei Stimulation mit den Liganden huNT4 nach Transfektion der huPASCs mit dem Vektor pcDNA3.1(+)+e (p-Wert: 0,0268) (s. Abb. 20 und Abb. 21). Es besteht die Tendenz, dass auch die Stimulation mit dem Liganden huNT4 nach Transfektion mit dem Vektor pcDNA3.1(+)+b die Proliferation der huPASCs vermindert, wobei die Evidenz hierfür aber gering ist (p-Wert: 0,0692) (s. Abb. 20). Der Standardfehler ist über die Kombinationen der Faktoren gerechnet, deshalb haben alle Interaktionen den gleichen Fehler (s. Tabelle 19). Die genannten Interaktionseffekte sind zusammengefasst in Abb. 21 dargestellt.

Tabelle 19: Dunnett-Korrektur (Proliferationsassay). Differenzen der Stimulationseffekte von Vektor zu Leervektor für die Kombinationen aus Ligand und TrkB-Isoform. Der Standardfehler beträgt 0,0106 (* p-Wert < 0,05).

| Lineare Hypothese | | Schätzung | t-Wert | p-Wert |
|---------------------|----|-----------|--------|---------|
| BDNF_pcDNA3.1(+)+b | =0 | -0,0315 | -2,975 | 0,0423* |
| huNT4_pcDNA3.1(+)+b | =0 | -0,0288 | -2,722 | 0,0692 |
| BDNF_pcDNA3.1(+)+c | =0 | -0,0087 | -0,824 | 0,9139 |
| huNT4_pcDNA3.1(+)+c | =0 | -0,0108 | -1,023 | 0,8166 |
| BDNF_pcDNA3.1(+)+e | =0 | -0,012 | -1,132 | 0,7516 |
| huNT4_pcDNA3.1(+)+e | =0 | -0,034 | -3,208 | 0,0268* |

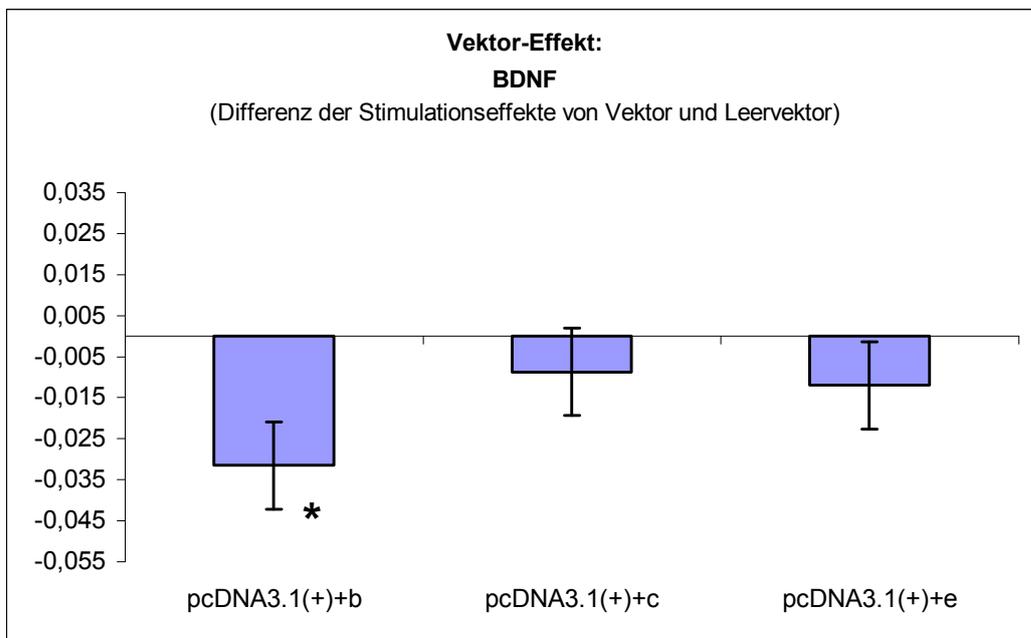


Abb. 19 Vektor-Effekt in Abhängigkeit vom Liganden BDNF (Proliferationsassay). Dargestellt sind die Differenzen der Stimulationseffekte Vektor – Leervektor (* p-Wert < 0,05). Die gezeigten p-Werte sind für multiples Testen korrigiert.

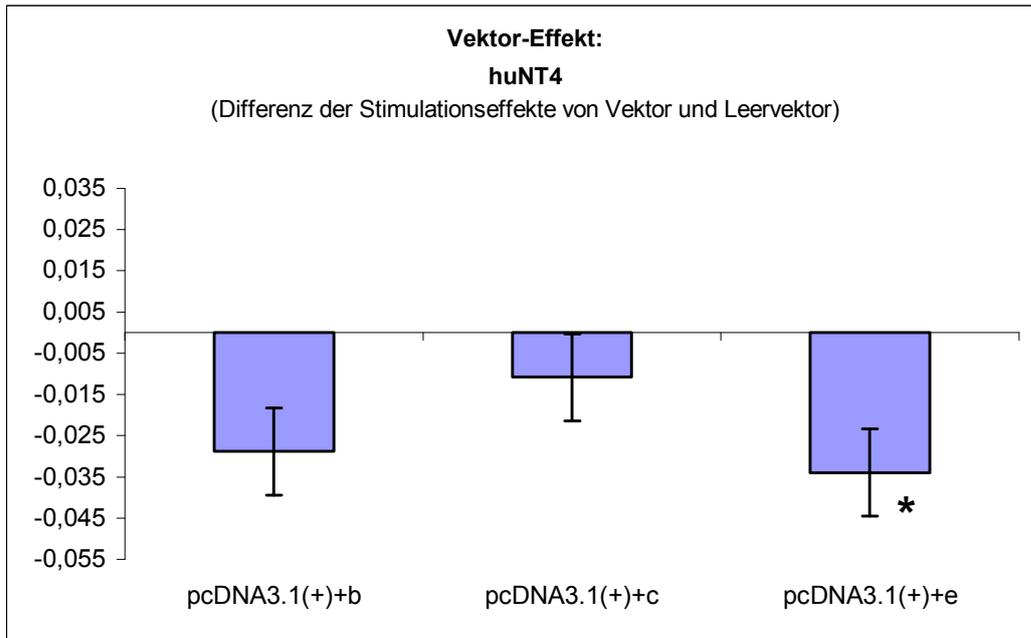


Abb. 20 Vektor-Effekt in Abhängigkeit vom Liganden huNT4 (Proliferationsassay). Dargestellt sind die Differenzen der Stimulationseffekte Vektor – Leervektor (* p-Wert < 0,05). Die gezeigten p-Werte sind für multiples Testen korrigiert.

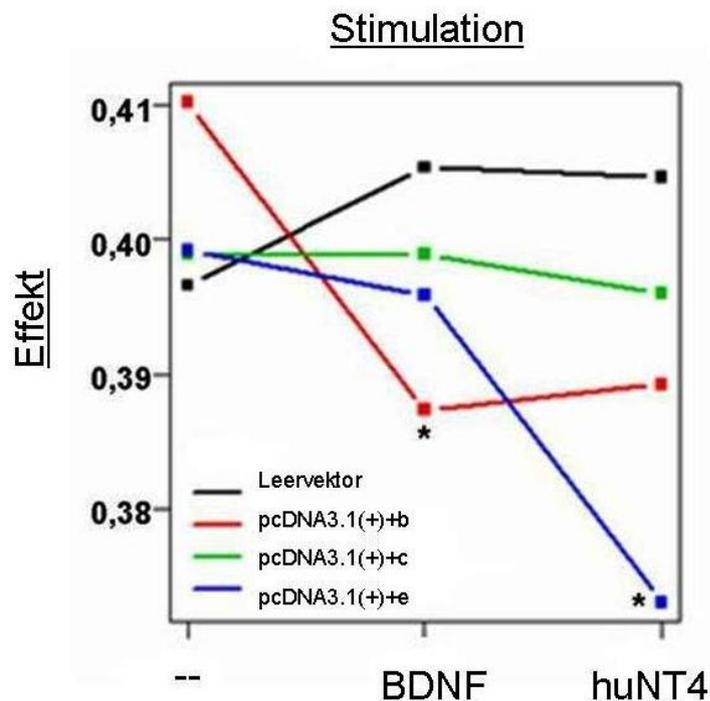


Abb. 21: Interaktionsplot (Proliferationsassay). Gezeigt ist der Stimulationseffekt in Abhängigkeit vom transfizierten Vektor. Die signifikante Interaktion zwischen Vektor und Stimulation spiegelt sich darin wieder, dass die Linien sich kreuzen, anstelle parallel zu verlaufen. (* p-Wert < 0,05).

4.5 Migrationsassay

Im Migrationsassay wurden die chemotaktischen Eigenschaften der huPASCs bezogen auf den TrkB-Liganden BDNF in Abhängigkeit der transfizierten Expressionsvektoren untersucht (Methodik s. Kap. 3.17, statistische Auswertung s. Kap. 3.19.3). Die grafische Analyse der Residuen zeigte keine relevanten Verletzungen der Annahme von Normalverteilung und Varianzhomogenität. Die Ergebnisse der ANOVA sind in Tab. 20 gezeigt. Die Daten liefern Evidenz für eine veränderte Migration der Zellen in Abhängigkeit der transfizierten Vektoren (p-Wert: 0,0049) (s. Tabelle 20), wobei die Migration der huPASCs nach Transfektion mit dem Vektor pcDNA3.1(+)+c im Vergleich zum Leervektor (Negativkontrolle) erhöht ist (p-Wert: 0,0084) (s. Tabelle 21 und Abb. 22-24).

Tabelle 20: ANOVA-Tafel (Migrationsassay).(** p-Wert < 0,01).

| ANOVA-Tafel | | | | | |
|--------------------|------------|----------------|---------|--------|----------|
| Fehler: Daten | | | | | |
| Experiment | | | | | |
| | Freiheits- | Fehlerquadrat- | | | |
| | grade | summe | Varianz | F-Wert | p-Wert |
| Daten Gruppe | 1 | 0,5131 | 0,5131 | 0,4214 | 0,5828 |
| Fehlervarianzen | 2 | 2,4351 | 1,2175 | | |
| Interner Fehler | | | | | |
| | Freiheits- | Fehlerquadrat- | Varianz | F-Wert | p-Wert |
| | grade | summe | | | |
| Daten Gruppe | 3 | 1,1547 | 0,3849 | 5,083 | 0,0049** |
| Fehlervarianzen | 36 | 2,7261 | 0,0757 | | |

Tabelle 21: Paarweise gepaarte T-Tests, Holm-adjustierte p-Werte (Migrationsassay). (** p-Wert < 0,01).

| Paarweise gepaarte t-Tests, Holm-adjustierte p-Werte: | | | |
|--|---------------|---------------|---------------|
| | pcDNA3.1(+)+b | pcDNA3.1(+)+c | pcDNA3.1(+)+e |
| Leervektor | 0,3620 | 0,0084** | 0,4332 |
| pcDNA3.1(+)+c | 0,4332 | - | - |
| pcDNA3.1(+)+e | 0,5984 | 0,3620 | - |

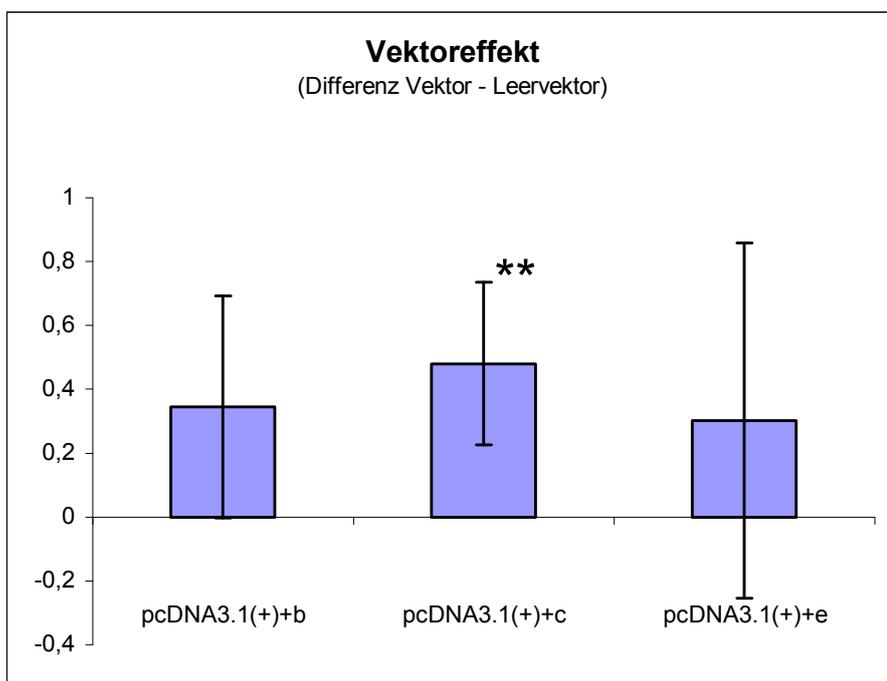


Abb. 22: Vektoreffekt (Differenz Vektor – Leervektor) (Migrationsassay). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwertsdifferenzen für die einzelnen Vektoren im Vergleich zur Kontrolle (** p-Wert < 0,01).



Abb. 23: Migrierte huPASC nach Transfektion der Zellen mit dem Konstrukt pcDNA3.1(+)+c.

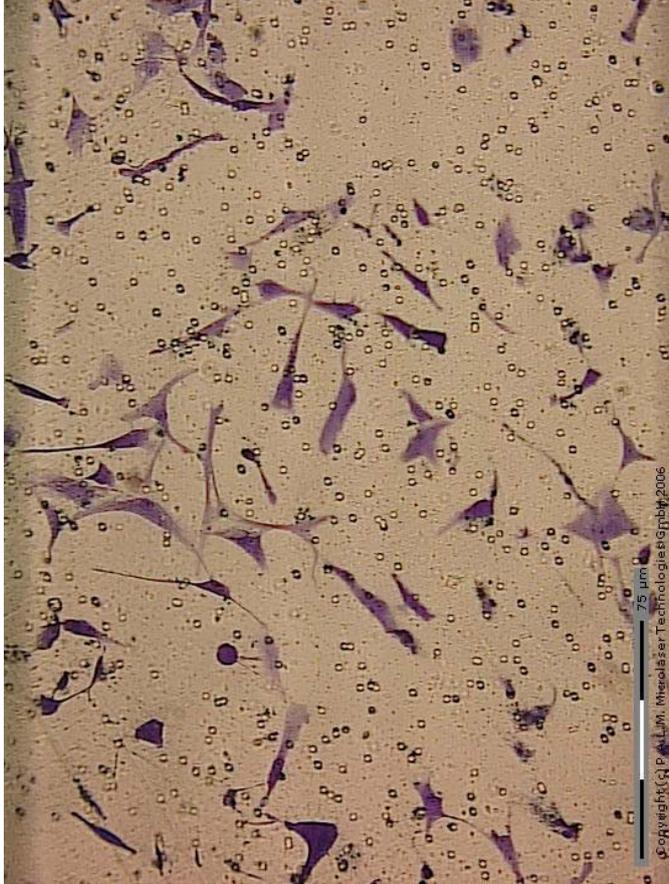


Abb. 24: Migrierte huPASC nach Transfektion der Zellen mit dem Leervektor (Kontrolle).

4.6 Adhäsionsassay

Im Adhäsionsassay wurden die adhäsiven Eigenschaften der huPASCs bezogen auf die Matrixproteine Kollagen und Fibronectin in Abhängigkeit von den transfizierten Vektoren und von der Stimulation mit den Liganden BDNF und huNT4 untersucht (Methodik s. Kap. 3.18, statistische Auswertung s. Kap. 3.19.4). Die grafische Analyse der Residuen zeigte keine relevanten Verletzungen der Annahme von Normalverteilung und Varianzhomogenität. Die Ergebnisse der ANOVA sind in Tab. 22 und 23 gezeigt. Die Daten lieferten nicht genug Evidenz für eine veränderte Adhäsion der huPASCs nach Transfektion mit den verschiedenen Vektoren bzw. nach Stimulation mit den verschiedenen Liganden.

Tabelle 22: ANOVA-Tafel für das Matrixprotein Kollagen (Adhäsionsassay).

ANOVA-Tafel

Fehler: Exp

| | Freiheits- grade | Fehlerquadrat- summe | Varianz | F-Wert | p-Wert |
|-----------------|---------------------|-------------------------|---------|--------|--------|
| Fehlervarianzen | 4 | 5,5872 | 1,3968 | | |

Fehler: Exp:Vek

| | Freiheits- grade | Fehlerquadrat- summe | Varianz | F-Wert | p-Wert |
|-----------------|---------------------|-------------------------|---------|--------|--------|
| Vek | 3 | 0,0343 | 0,0114 | 1,2025 | 0,3507 |
| Fehlervarianzen | 12 | 0,1141 | 0,0095 | | |

Fehler:

Exp:Vek:Stim

| | Freiheits- grade | Fehlerquadrat- summe | Varianz | F-Wert | p-Wert |
|-----------------|---------------------|-------------------------|---------|--------|--------|
| Stim | 2 | 0,0066 | 0,0033 | 1,2348 | 0,3044 |
| Stim:Vek | 6 | 0,0157 | 0,0026 | 0,9777 | 0,4562 |
| Fehlervarianzen | 32 | 0,0857 | 0,0027 | | |

Tabelle 23: ANOVA-Tafel für das Matrixprotein Fibronectin (Adhäsionsassay).**ANOVA-Tafel**

Fehler: Exp

| | Freiheits- grade | Fehlerquadrat- summe | Varianz | F-Wert | p-Wert |
|-----------------|---------------------|-------------------------|---------|--------|--------|
| Fehlervarianzen | 4 | 6,7534 | 1,6884 | | |

Fehler: Exp:Vek

| | Freiheits- grade | Fehlerquadrat- summe | Varianz | F-Wert | p-Wert |
|-----------------|---------------------|-------------------------|---------|--------|--------|
| Vek | 3 | 0,0533 | 0,0178 | 0,8999 | 0,4696 |
| Fehlervarianzen | 12 | 0,2367 | 0,0197 | | |

Fehler:

Exp:Vek:Stim

| | Freiheits- grade | Fehlerquadrat- summe | Varianz | F-Wert | p-Wert |
|-----------------|---------------------|-------------------------|---------|--------|--------|
| Stim | 2 | 0,024 | 0,012 | 3,2317 | 0,0527 |
| Stim:Vek | 6 | 0,0189 | 0,0031 | 0,8469 | 0,5436 |
| Fehlervarianzen | 32 | 0,119 | 0,0037 | | |

Histogramm und ein Q-Q-Plot der Differenzwerte (Fibronectin – Kollagen) zeigen deutliche Abweichungen von einer Normalverteilung (s. Abb. 25). Nach dem Shapiro-Wilk-Test kann die Hypothese, dass die Differenzwerte normalverteilt sind, auf einem Niveau von 1% abgelehnt werden (W : 0,9433, p -Wert: 0,008). Eine Wurzel- oder log-Transformation war aufgrund der negativen Werte nicht sinnvoll.

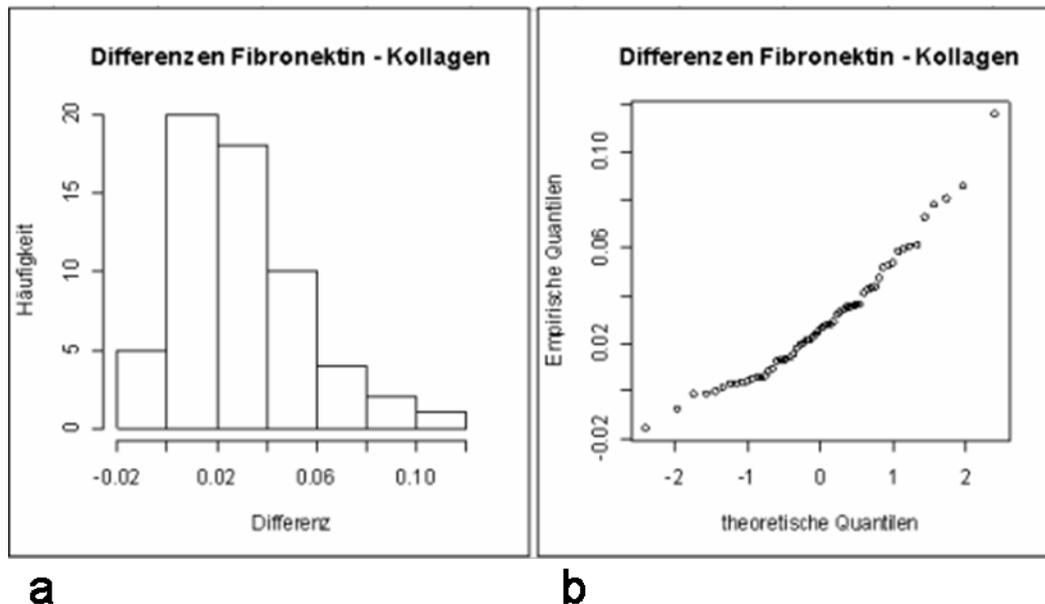


Abb. 25: Histogramm und Q-Q-Plot zur Prüfung der Daten auf Normalverteilung (Adhäsionsassay). **a** Histogramm. Die Verteilung der Differenzwerte ist rechtsschief. **b** Q-Q-Plot. Die betrachteten Werte liegen nicht auf einer Geraden.

Das Histogramm in Abb. 25 zeigt bereits eine positive mediane Differenz (höhere Adhäsion an Fibronectin als an Kollagen). Die Signifikanz dieses Unterschiedes wurde mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest bestimmt: $V: 1788$, $p\text{-Wert} < 0,0001$. Demnach liefern die Daten Evidenz für eine stärkere Adhäsion der huPASCs an das Matrixprotein Fibronectin als an Kollagen (unabhängig von der Behandlung der Zellen) (s. Abb. 26).

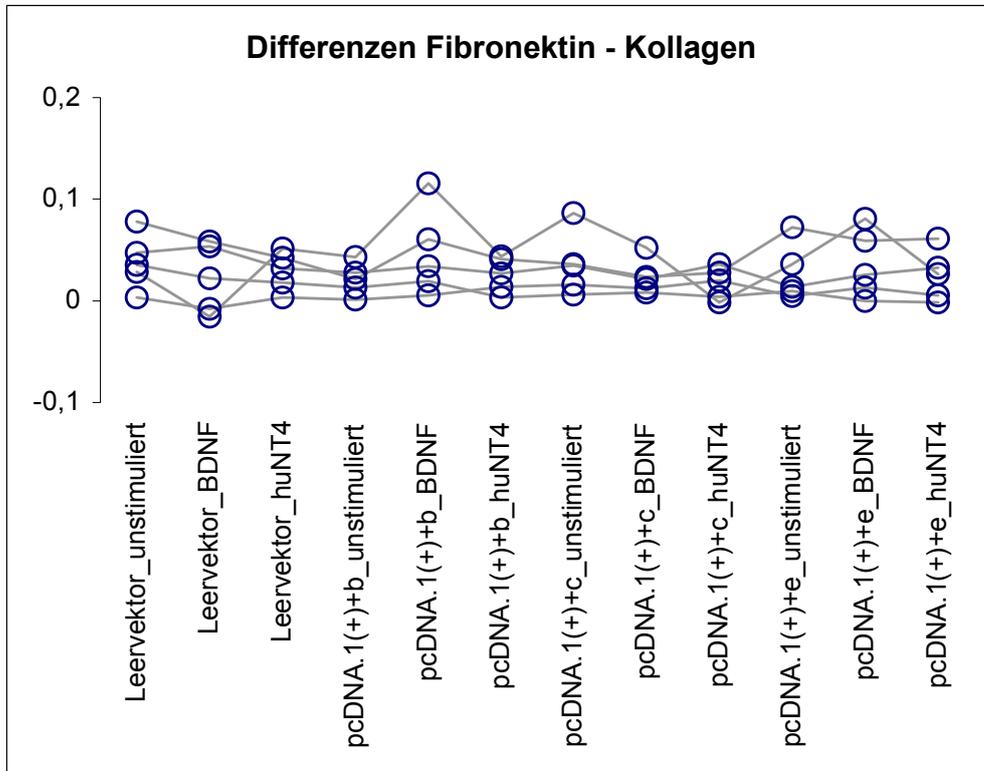


Abb. 26: Differenzwerte (Fibronectin-Kollagen) (Adhäsionsassay). Das Diagramm zeigt die signifikant höhere Adhäsion der huPASMCM an Fibronectin im Vergleich zu Kollagen IV (unabhängig von der Behandlung der Zellen).

4.7 Zusammenfassung

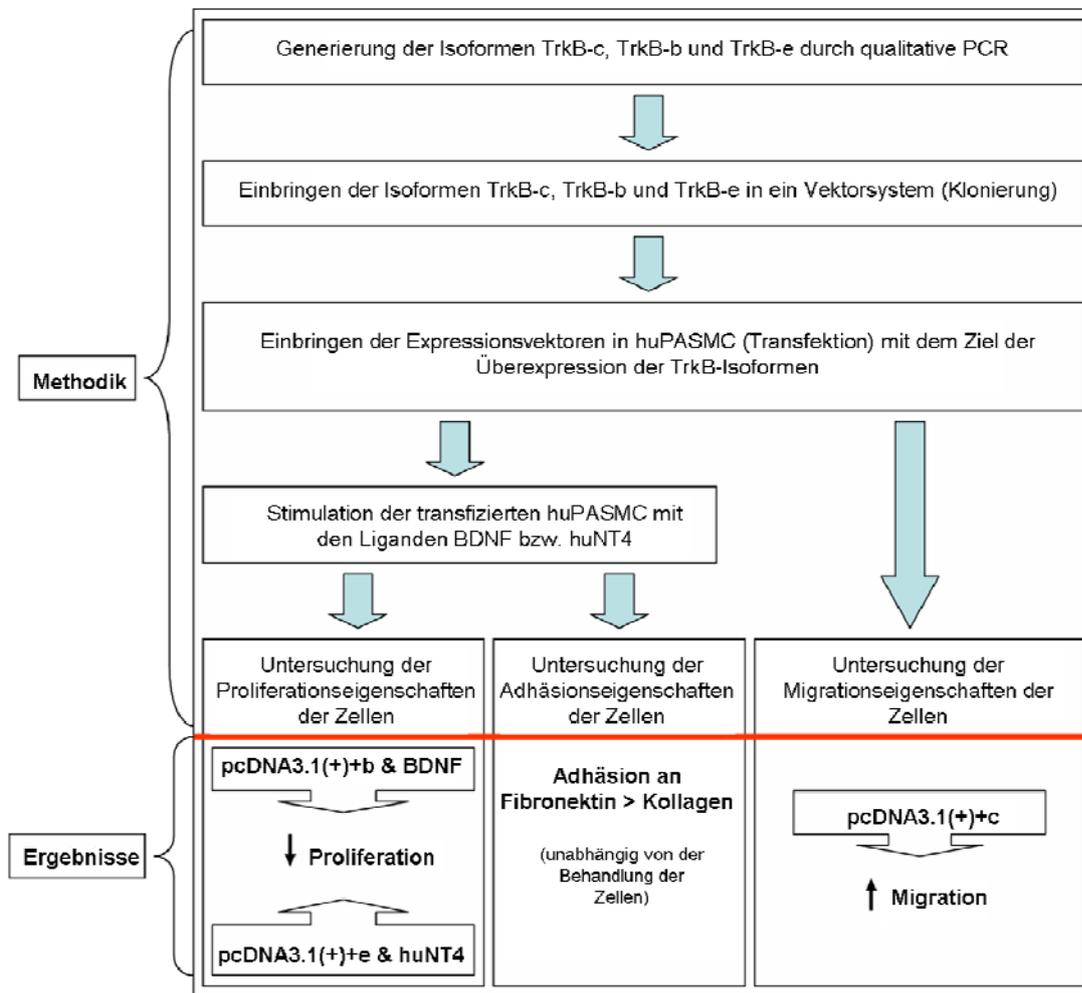


Abb. 27: Flussdiagramm. Gezeigt sind die wesentliche Methodik und die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit.

5 Diskussion

5.1 Pathomechanismen der IPAH

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass huPASMCM in vitro die beschriebenen Isoformen TrkB-c, TrkB-b und TrkB-e exprimieren (s. Abb.14). Bisher haben zwar einige Arbeitsgruppen TrkB in vSMC der humanen Lunge auf RNA- bzw. Protein-Ebene beschrieben [32, 33, 46], eine genaue Differenzierung in die drei Isoformen blieb bisher jedoch aus. Falls eine Unterscheidung vorgenommen wurde, beschränkte sich diese auf die Trennung von vollständigem und verkürztem TrkB (sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene) [33]. Die Differenzierung der verkürzten TrkB-Isoformen in TrkB-b und TrkB-e (RNA-Ebene) bzw. TrkB-T1 und TrkB-T-Shc (Protein-Ebene) erfolgte nicht.

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, sind alle drei Gefäßwandschichten der Pulmonalarterien an den Remodeling-Prozessen der IPAH beteiligt. Dabei kommt es in jeder Schicht zu einer Proliferation des dominierenden Zelltyps (Endothelzellen, huPASMCM, Fibroblasten) und einer EZM-Anhäufung. Die Verkleinerung der pulmonalarteriellen Gefäß-Lumina und die daraus resultierenden hämodynamischen Veränderungen beruhen jedoch vorwiegend auf den Veränderungen in der Media. Bis heute besteht Unklarheit darüber, welche Stimuli für die erhöhte Proliferation, Migration und EZM-Synthese der dort ansässigen huPASMCM ursächlich sind. Mit der Detektierung von TrkB in huPASMCM mittels RTQ-PCR stellte sich die Frage, inwiefern der Rezeptor an der Pathogenese der IPAH beteiligt sein könnte. Außerdem bot dieser Ansatz die Möglichkeit die TrkB-Isoformen bezogen auf die funktionellen Aspekte Proliferation, Migration und Adhäsion zu vergleichen.

5.1.1 Proliferation

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten liefern Hinweise für Unterschiede im Proliferationsverhalten der huPASMCM nach Stimulation mit den Liganden BDNF und huNT4 in Abhängigkeit der transfizierten Vektoren (s. Abb. 19 und 20). Es konnte eine Proliferationssenkung der huPASMCM bei

Überexpression der Isoform TrkB-b bei gleichzeitiger Stimulation mit BDNF beobachtet werden (p-Wert: 0,0423). Ein ebenfalls negativer Effekt auf die Proliferation der huPASC MC zeigte sich bei Überexpression der Isoform TrkB-e bei gleichzeitiger Stimulation mit huNT4 (p-Wert: 0,0268).

Die Proliferation der huPASC MC in der Media von Pulmonalarterien zählt zu den wichtigsten Charakteristika der IPAH. Mehr noch als die Zellmigration bzw. Zelladhäsion sind Gefäßwand-Verdickung und Lumeneinengung der Pulmonalarterien auf diesen Pathomechanismus zurückzuführen. In der Folge kann der niedrige Druck nicht mehr gewährleistet werden, durch den sich die gesunde Lunge als Niederdrucksystem auszeichnete. Es resultiert ein erhöhter vaskulärer Widerstand im arteriellen Schenkel des Lungenkreislaufs. Bis heute ist, trotz intensiven Untersuchungen, nicht vollends verstanden, welche Faktoren die übermäßige Proliferation von huPASC MC bei der IPAH hervorrufen. Für eine mögliche Beteiligung des TrkB-Rezeptors an der Proliferation der huPASC MC spricht zunächst, dass TrkB in huPASC MC in vitro (s. Kap. 4.2) und in vivo [31] exprimiert wird. Zudem ist bekannt, dass TrkB die Proliferation von Zellen durch eine Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs induzieren kann (s. Kap. 1.4.1) [83]. Auch der TrkB-assoziierte PLC- γ 1-Signalweg scheint eine Zellproliferation zu vermitteln. Durch die Aktivierung des PLC- γ 1-Signalwegs kann TrkB auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration Einfluss nehmen. Sweeney et al. konnten nachweisen, dass gerade ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration eine Grundvoraussetzung für die Proliferation von huPASC MC darstellt [111]. Neben der Ca^{2+} -Erhöhung verursacht der PLC- γ 1-Signalweg auch eine Aktivierung des Enzyms PKC (s. Kap. 1.4.3). Dempsey et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der Proliferationssteigerung von huPASC MC und der PKC-Induktion nachweisen [112]. Eine weitere Arbeitsgruppe fand Hinweise für eine Beteiligung des dritten TrkB-assoziierten Signalwegs (über die Akt-PI3-Kinase) an der Proliferation (s. Kap. 1.4.2). So konnten Dahia et al über eine Hemmung von PIP3 des Akt-PI3-Kinase-Signalwegs die Zellproliferation unterdrücken [113]. Ein proproliferativer Effekt von TrkB in Interaktion mit BDNF auf huPASC MC wurde zudem durch Kwapiszewska et al. gefunden, die dies neben einer Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs auch auf eine Aktivierung des Akt-PI3-Kinase-Signalwegs zurückführten (bisher unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Beispiele zeigen,

dass die proliferationsfördernde Wirkung von TrkB heute allgemein anerkannt ist.

Überraschenderweise liefern die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise auf einen antiproliferativen Effekt der TrkB-Isoformen TrkB-b mit BDNF und TrkB-e mit huNT4 auf huPASMC. Dieser scheinbare Widerspruch könnte darin begründet sein, dass bei bisherigen Untersuchungen nicht zwischen den TrkB-Isoformen differenziert wurde. D. h. es wurde bis jetzt nicht bewiesen, welche TrkB-Isoform den allgemein anerkannten proproliferativen Effekt in Kombination mit welchem Neurotrophin hervorruft.

Wenn man hypothetisch davon ausginge, dass es sich bei der proliferationssteigernden TrkB-Isoform um TrkB-c handelt, könnten diese scheinbar gegensätzlichen Beobachtungen durch einen Ansatz von Ninkina et al. in Einklang gebracht werden. Diese Arbeitsgruppe geht davon aus, dass die Ko-Expression von verkürzten und vollständigen TrkB-Rezeptoren zu einer Runterregulation des vollständigen Rezeptors in der Zelle führt [104]. Demzufolge würde die proliferationsinduzierende Wirkung des endogenproduzierten vollständigen TrkB-Rezeptors in den huPASMC durch die, durch Transfektion erreichte, Überexpression der verkürzten TrkB-Isoformen TrkB-b und TrkB-e aufgehoben und ins Gegenteil verkehrt werden. Infolgedessen wäre die beobachtete antiproliferative Wirkung TrkB-b und TrkB-e eine Folge der Suppression des proproliferativ-wirkenden TrkB-c. Aber auch die spekulierte Funktion der TrkB-Isoformen als Absorptionsrezeptoren für überschüssige Liganden zu fungieren [103] wäre mit dem Ergebnis dieser Arbeit kompatibel. In diesem Fall würden die überexprimierten verkürzten TrkB-Isoformen die, für den endogen exprimierten vollständigen Rezeptor, verfügbaren Liganden reduzieren. Die proproliferative Wirkung von TrkB-c wäre so vermindert. Die Annahme von Beck et al., dass die verkürzten TrkB-Isoformen einer kurzfristigen Ligandenbereitstellung für den vollständigen Rezeptor dienen [105], scheint in diesem Zusammenhang eher unwahrscheinlich. In diesem Fall müssten die überexprimierten verkürzten Isoformen die proproliferative Wirkung von TrkB-c auf die Zellen erhöhen. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit nicht gemacht werden. Gegen die spekulierten, rein regulatorischen Funktionen der verkürzten TrkB-Isoformen (wie die Runterregulation des vollständigen TrkB-Rezeptors an der Zelloberfläche oder

die Entfernung überschüssiger Liganden) spricht das unterschiedliche Expressionsmuster der TrkB-Isoformen in verschiedenen Zelltypen (s. Kap. 1.6). Könnte in zukünftigen Studien gezeigt werden, dass bestimmte Zellen nur eine TrkB-Isoform an der Zelloberfläche exprimieren wird, wäre die Hypothese einer rein regulativen Wirkung der verkürzten Isoformen auf den vollständigen TrkB-Rezeptor hinfällig. Dazu müssten zumindest beide Moleküle an der Zelloberfläche einer Zelle exprimiert werden. Ferner ist die Möglichkeit der Nutzung eines eigenen, unbekanntes Signalwegs zu erwägen [106], über welchen die verkürzten Isoformen den beobachteten antiproliferativen Effekt (trotz Fehlen der Tyrosinkinase) generieren könnten. Es bleibt allerdings fraglich, ob es sich bei der als proliferationsinduzierend postulierten TrkB-Isoform tatsächlich um TrkB-c handelt. In dieser Arbeit konnte zumindest kein Hinweis auf einen Effekt dieser Isoform auf die Proliferation der huPASC nachgewiesen werden. Die Ursache dafür ist unklar.

Der oben beschriebene Hinweis auf einen Effekt der TrkB-Isoformen auf die Proliferation von huPASC darf nur in Kombination mit dem zugehörigen Neurotrophin beurteilt werden. Ein Hinweis auf eine Proliferationshemmung wurde in dieser Arbeit nur für die Interaktionen TrkB-b/BDNF und TrkB-e/huNT4 gefunden. Es kann daher nicht geschlussfolgert werden, ob die verkürzten TrkB-Isoformen TrkB-b und TrkB-e auch in Kombination mit dem anderen Neurotrophin antiproliferativ wirken und ob dies über einen eigenen Signalweg oder über eine gegenseitige Expressionsregulation bzw. Ligandenregulation stattfindet (s. o.). Um einen möglichen Einfluss auf das Gefäßremodeling bei der IPAH festzustellen, wäre es sinnvoll die Relation der exprimierten TrkB-Isoformen und der Neurotrophine zueinander (auf RNA- sowie Protein-Ebene) in IPAH-Lungen im Vergleich zu gesunden Lungen zu analysieren. Dies könnte durch Untersuchungen an IPAH-Lungen post explantiv oder post mortem (beispielsweise mittels PCR, Western-Blot und Immunhistochemie) verwirklicht werden. Der Nachteil dieses Ansatzes ist die Entkopplung des Organs von in Blut und Lymphe zirkulierenden Transmittern sowie die Entkopplung von neuronalen Signalen, was zu Ergebnissen führen könnte, die nicht die in-vivo-Situation widerspiegeln. Dem vorzuziehen wären in-vivo-Messungen der lokal in der Lunge zirkulierenden Neurotrophine bei IPAH-Patienten über ein Pulmonalis-Kathetersystem. Für diesen Zweck gibt es

bereits hochsensitive Detektionssysteme, die über zwischengeschaltete Antikörper Neurotrophinkonzentrationen im Pikogrammbereich (je ml) nachweisen können (sogn. Immuno-Assays) [47]. Ergänzend dazu wäre auch die Lungenbiopsie mit einer nachfolgenden immunhistochemischen Detektierung von TrkB-Isoformen und Neurotrophen sinnvoll. Bei diesen invasiven Verfahren sind jedoch die Komplikationen für den Patienten und die so gewonnenen medizinischen Erkenntnisse sorgfältig gegeneinander abzuwägen.

5.1.2 Migration

Auch bezüglich des Migrationsverhaltens von huPASMC liefern die gewonnenen Daten Hinweise für Unterschiede in Abhängigkeit der transfizierten Vektoren (s. Abb. 22). Es konnte eine Migrationssteigerung von huPASMC bei Überexpression von TrkB-c in Richtung eines BDNF-Gradienten beobachtet werden (p-Wert: 0,0084).

Die Zellmigration ist ein komplizierter Prozess, an dem zahlreiche Moleküle (u. a. die Proteine Aktin und Myosin) beteiligt sind. Dabei bildet die Zelle vorübergehend Zellfortsätze aus, die sich an einer Unterlage verankern. Nach der Anheftung am vorderen Zellpol strömt die Masse des Zytoplasmas nach vorne und der hintere Pol der Zelle wird nach Ablösung von der Unterlage nachgezogen. Durch die ständige Wiederholung dieser Abfolge kommt die Zelle kriechend voran [84]. Die Zellmigration ist ein wesentlicher Pathomechanismus beim Gefäßremodeling der IPAH. Die erhöhte Migration dedifferenzierter huPASMC erfolgt dabei in zwei verschiedene Richtungen. Zum einen migrieren sie von der Media ausgehend in benachbarte Gefäßwandschichten wie Intima und Adventitia, wodurch es auch zur Ausbildung der charakteristischen Neointima kommt (s. Kap.1.1). Zum anderen sind huPASMC durch ihre Migration entlang der Gefäßachse für die Muskularisierung distaler, primär nonmuskulärer Arteriolen verantwortlich. Beide Phänomene führen zur Gefäßwandverdickung mit resultierender Gefäßlumen-Einengung. Die Ursache für diese gesteigerte Migrationsneigung von huPASMC konnte bislang nicht ermittelt werden. TrkB könnte aufgrund seiner Eigenschaften (s. Kap. 1.5) als potentieller Kandidat für diese

Fragestellung in Betracht kommen. Für eine Beteiligung am Gefäßremodeling der IPAH spricht, dass er von huPASMCM exprimiert wird (s. Kap. 4.2). Des Weiteren ist er in der Lage über den Ras-MAP-Kinase-Signalweg (s. Kap. 1.4.1) und den Akt-PI3-Kinase-Signalweg (s. Kap. 1.4.2) die Migration von Zellen zu induzieren. Dieser Effekt wird von den Untersuchungen von Jin et al. bekräftigt, die durch eine Hemmung des Signalproteins Akt des Akt-PI3-Kinase-Signalwegs und der MAP1/2 des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs eine resultierende Migrationssenkung von glatten Muskelzellen der humanen Aorta ermitteln konnten [114]. Das schon mehrfach in Zusammenhang mit der Zellmigration gebrachte Protein Ras des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs soll speziell migrationsrelevante Zytoskelettveränderungen in Form von „Membran-Ruffling“, Aktin-Polymerisation und fokale Adhäsionen vermitteln [115]. Derzeit wird auch eine Beteiligung des TrkB-assoziierten PLC- γ 1-Signalwegs an der Migration diskutiert (s. Kap. 1.4.3). Bornfeldt et al. nehmen eine migrationsfördernde Wirkung der Signalmoleküle PIP₂, DAG und Ca²⁺ des PLC- γ 1-Signalwegs auf vSMC der humanen Aorta an [116]. Diese Ansicht wird von weiteren Arbeitsgruppen geteilt, nachdem diese zeigen konnten, dass das Molekül DAG die Aktin-Polymerisation fördert [117] und Phosphatidylinositol-Bisphosphate (wie beispielsweise PIP₂) mit migrationsvermittelnden Proteinen interagieren [118, 119]. Auch das im PLC- γ 1-Signalweg involvierte Ca²⁺ steht unter Verdacht eine essentielle Rolle für die Zellmigration zu spielen: Migrierende, polarisierte Zellen weisen einen intrazellulären Ca²⁺-Gradienten auf, wobei Ca²⁺ vermutlich auch die Polymerisation von Aktinfilamenten reguliert [119, 120]. Einen Zusammenhang dieser Signalwege mit der IPAH konnten Schermuly et al. darstellen, die herausfanden, dass die Signalwege Ras-MAP-Kinase, Akt-PI3-Kinase und PLC- γ 1 an dem Gefäßremodeling bei der IPAH beteiligt sind [121]. Ungeklärt ist diesbezüglich allerdings, ob die genannten Signalwege von TrkB/BDNF angestoßen werden, da auch andere Rezeptoren die beschriebenen Wege für ihre Signaltransduktion nutzen [122]. Bis auf die Ergebnisse dieser Arbeit gibt es zum jetzigen Zeitpunkt keine Veröffentlichung, die explizit den Einfluss von TrkB/BDNF bzw. der TrkB-Isoformen auf das Migrationsverhalten von huPASMCM untersucht hat. Demnach gibt es keine Veröffentlichungen deren Ergebnisse zum direkten Vergleich herangezogen werden könnten. Die migrationsfördernden

Eigenschaften von TrkB/BDNF wurden zuerst bei der Entwicklung des Nervensystems beschrieben, wo sie eine zielgerichtete Migration von Neuronen in die einzelnen Hirnregionen fördern [123, 124]. Mittlerweile ist bekannt, dass Neurotrophine auch die Migration von vSMC induzieren. Donovan et al. beschrieben in diesem Zusammenhang eine gesteigerte Migration von vSMC der humanen Aorta nach der Stimulation mit dem Neurotrophin NGF, welches mit dem TrkA-Rezeptor interagiert [46]. Dagnell et al. konnten eine dosisabhängige Migrationszunahme von bronchialen glatten Muskelzellen in Richtung der höheren BDNF-Konzentration feststellen (signifikante Werte ab 200 ng BDNF/ml) [32]. Diese Beobachtung ist mit dem Ergebnis dieser Arbeit, dass BDNF die Chemotaxis von glatten Muskelzellen induzieren kann, vereinbar. Im Vergleich zu Dagnell et al. konnte der chemotaktische Effekt in dieser Arbeit bereits bei einer BDNF-Konzentration von 10 ng/ml hervorgerufen werden. Ein Grund für die unterschiedliche Empfindlichkeit dieser artverwandten Zelltypen mit der stärkeren Sensibilität der huPASMC gegenüber Neurotrophinen könnte darin liegen, dass das pulmonale Gefäßsystem in vivo im Vergleich zum bronchialen System größeren Anpassungs-/Umbauvorgängen unterliegen könnte. Die Rekrutierung und Neubildung von pulmonalarteriellen Gefäßen setzt ein höchstsensibles Reagieren der huPASMC auf chemische Reize voraus, um ein optimales Ventilations-Perfusions-Verhältnis zu gewährleisten.

Darüber hinaus stellten Martens et al. durch ihre Untersuchungen einen weiterführenden Denkansatz zur Diskussion. Sie fanden eine 2-fach gesteigerte Zellmigration von Neuroblastomzellen unter Hypoxie (1% O₂) in Richtung eines BDNF-Gradienten (50 ng/ml BDNF) [125]. Interessanterweise war in diesen Zellen im Vergleich zu Normoxie eine 30-fach erhöhte TrkB-Expression zu detektieren. In Abwesenheit von BDNF oder unter Zugabe eines Tyrosinkinase-Hemmstoffs war die Zellmigration signifikant reduziert [125]. Diese Beobachtungen bekräftigen den bereits oben geschlussfolgerten Zusammenhang zwischen TrkB/BDNF und der Zellmigration. Die erstmalige Beschreibung der O₂-regulierten TrkB-Expression ist vor dem Hintergrund interessant, dass bei der IPAH durch Gefäßremodeling und Vasokonstriktion ebenso eine Hypoxie auftritt. Es wäre demnach denkbar, dass in den bereits veränderten Gefäßwandschichten bei IPAH der TrkB-Rezeptor infolge einer

Hypoxie reaktiv erhöht exprimiert wird, wodurch er eine Veränderung im Migrationsverhalten der huPASC (evtl. auch von Proliferation und Adhäsion) triggert und so das Fortschreiten des Gefäßremodelings begünstigt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen diese Schlussfolgerung nur für TrkB-c zu, über die anderen TrkB-Isoformen ist eine Aussage aufgrund mangelnder Evidenz nicht möglich. Ein Vergleich der TrkB-Isoformen bezogen auf das Migrationsverhalten der huPASC ist so nicht möglich. Das Ergebnis dieser Arbeit, dass sich die Isoformen TrkB-b und TrkB-e bezüglich der Migration der huPASC nicht von der Kontrolle unterscheiden, könnte ein Hinweis auf die weit verbreitete Hypothese sein, dass diese Isoformen aufgrund der fehlenden Tyrosinkinase nicht zu einer Signaltransduktion imstande sind [29]. Die Ergebnisse der Proliferationsassays (s. Kap. 5.1.1) sprechen allerdings gegen diese Theorie und lassen einen bisher noch unentdeckten Signalweg für die verkürzten Isoformen vermuten.

5.1.3 Adhäsion

Die Daten lieferten keine ausreichende Evidenz für eine veränderte Adhäsion der huPASC an den Matrixproteinen Kollagen IV und Fibronectin nach Transfektion mit den verschiedenen Vektoren und gleichzeitiger Stimulation mit den Liganden BDNF bzw. huNT4. Die Daten lieferten jedoch Evidenz für eine stärkere Adhäsion der huPASC an das Matrixprotein Fibronectin als an Kollagen IV (unabhängig von Transfektion und Stimulation) (p -Wert: 0,00006) (s. Abb. 26).

Wie in Kap. 1.1 beschrieben sind bei der IPAH der Gehalt und die Zusammensetzung der EZM in den Gefäßwänden verändert. Davon sind auch die Adhäsions- und Strukturproteine Kollagen IV und Fibronectin betroffen. Demzufolge fanden Botney et al. in den verdickten Gefäßwänden hypertensiver Pulmonalgefäße eine erhöhte Expression von Kollagen und Fibronectin im Vergleich zur Genexpression in Pulmonalgefäßen gesunder Lungen [126]. Ferner wurde in der Media von IPAH-Patienten eine Störung im Kollagen- und Fibronectin-abbauenden Enzymsystem (sogn. Matrix-Metalloproteinasen) gefunden [127]. Die EZM ist für die zelluläre Adhäsion essentiell. Durch sie werden die Zellen zum einen an den Matrixproteinen der EZM selbst verankert

(Zell-Matrix-Kontakte), zum anderen vermittelt die EZM die Adhäsion von Zellen an ihren Nachbarzellen (interzelluläre Adhäsion). Kommt es nun zu der beschriebenen Modifizierung der EZM zieht dies eine Veränderung der zellulären Adhäsionseigenschaften (hier der huPASC) nach sich. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Adhäsionseigenschaften der huPASC bezogen auf die Matrixproteine Kollagen IV und Fibronectin in Abhängigkeit von den überexprimierten TrkB-Isoformen und von den Liganden BDNF und huNT4 untersucht. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, exprimieren huPASC TrkB (s. Kap. 4.2) und es liegen zudem Hinweise vor, dass TrkB zelluläre Adhäsionsprozesse vermittelt. Schneider et al. beschrieben in der extrazellulären Domäne von TrkB mehrere Adhäsionsmotive [128]. Diese Beobachtung wird von Kobe et al. unterstützt, die nachweisen konnten, dass die extrazelluläre Leucin-Domäne und die Ig-C2-Domänen (s. Kap. 1.2.1) (auch als Bestandteil anderer Rezeptoren) eine zelluläre Adhäsion vermitteln [99]. Zhou et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der zellulären Adhäsion und der exprimierten TrkB-Rezeptor-Menge nachweisen. Ferner konnten sie zeigen, dass Zellen in Abhängigkeit von der TrkB-Expression auch andere Adhäsionsproteine (wie Cadherine) synthetisieren [129]. Die von dieser Arbeitsgruppe in Immunfluoreszenz-Färbungen dargestellte, enge räumliche Nachbarschaft von TrkB zu Adhäsionsproteinen und Zell-Zell-Kontakten in der Zellmembran bekräftigt die adhäsionfördernde Rolle von TrkB. Es wird vermutet, dass TrkB in Synergismus mit Cadherinen proadhäsiv wirkt, da eine Adhäsion nur bei einer Ko-Expression beider Moleküle beobachtet wurde [129]. Douma et al. konnten zeigen, dass die Überexpression von TrkB die Ausbildung von Zellverbänden in Suspensionen induziert [130], wodurch die Zellen überleben und proliferieren (eine Zellablösung aus dem Zellverband führt bekannterweise zu einer Apoptose-Induktion). Diese Arbeitsgruppe sieht die proadhäsive Wirkung von TrkB jedoch in einer intrazellulären Signaltransduktion über die Tyrosinkinase begründet und nicht, wie allgemein angenommen und oben beschrieben, in den extrazellulären Domänen des Rezeptors [130]. Eine weitere Arbeitsgruppe erbrachte den Nachweis, dass BDNF-defiziente Zellen weniger interzelluläre Adhäsionen eingehen [30].

Die EZM kann durch ihre Verknüpfung zum intrazellulären Zytoskelett auch intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse anstoßen. Zell-Zell-Adhäsion

und Zell-Matrix-Adhäsion beeinflussen auf diesem Weg zelluläre Eigenschaften. So konnte beispielsweise von Thyberg et al. gezeigt werden, dass Fibronectin die Dedifferenzierung von vSMC begünstigt [131]. Diese unreifen, sekretorisch aktiven Phänotypen sind wiederum in der Lage mehr und in ihrer Zusammensetzung veränderte EZM zu bilden, welche die Proliferations-, Migrations- und Adhäsionseigenschaften der huPASCs beeinflusst [127, 132, 133]. In der Folge entsteht ein Remodeling-Kreislauf, der sich selbst unterhält. Es wäre theoretisch denkbar, dass der TrkB-Rezeptor das gesuchte Bindeglied zwischen modifizierter EZM und den veränderten Eigenschaften der huPASCs bei der IPAH darstellt.

Aufgrund mangelnder Evidenz der gewonnenen Daten kann hier keine Aussage über einen möglichen Einfluss der TrkB-Isoformen bei gleichzeitiger Stimulation auf die Adhäsionseigenschaften von huPASCs gemacht werden.

Es zeigte sich aber, dass huPASCs (unabhängig von der Behandlung) stärker an das Matrixprotein Fibronectin als an Kollagen IV adhären (p -Wert: 0,00006). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit gibt es keine Veröffentlichung, die das Adhäsionsverhalten von huPASCs an Kollagen im Vergleich zu Fibronectin explizit untersucht hat. Der verwendete Kollagen-Typ IV bildet in vivo durch stabile kovalente Bindungen ein molekulares Netz, welches das Grundgerüst aller Basallaminae im menschlichen Organismus darstellt [134]. Durch das Anhaften der Zellen auf diesem zweidimensionalen Netz, gewährleistet es primär eine Zell-Matrix-Adhäsion und sorgt so für die mechanische Stabilisierung der Zellen auf einer festen Unterlage. Auch in vitro (d.h. unter Zellkulturbedingungen) ist davon auszugehen, dass sich die stabförmigen Kollagen-Typ-IV-Moleküle zu einem netzförmigen Verband zusammenlagern und den kultivierten Zellen so die Möglichkeit geben, auf dem Boden des Zellkultur-Gefäßes eine sichere Verankerung zu finden. Fibronectin ist als extrazelluläres Adhäsionsmolekül in der Lage über zellmembranständige Rezeptoren (Integrine) eine Quervernetzung von Zellen zu bewirken. Es ist daher vor allem für die Zell-Zell-Adhäsion von großer Bedeutung. Durch seine zahlreichen Bindestellen hat es zusätzlich die Fähigkeit Zellen auf anderen Matrixbestandteilen/Oberflächen zu verankern. Interessanterweise ist die beobachtete Adhäsion der huPASCs signifikant höher auf einer Unterlage, die mit dem Adhäsionsprotein Fibronectin benetzt wurde. Dieses Ergebnis könnte

durch die Tatsache erklärt werden, dass Fibronectin, wie beschrieben, zwei Adhäsionsmechanismen induziert (interzelluläre Adhäsion und Zell-Matrix-Adhäsion). Die huPASMC sind somit zweifach verankert. Kollagen hingegen vermittelt nur einen Adhäsionsmechanismus (Zell-Matrix-Adhäsion), was die insgesamt geringere Adhäsionsfähigkeit der Zellen *in vitro* erklären könnte. Die stärkere Adhäsion der huPASMC an Fibronectin könnte ferner darin begründet sein, dass diese Zellen *in vivo* primär einen stabilen Zellverband in der Media ausbilden. Dies wird u. a. durch Fibronectin vermittelt. Es besteht für diese Zellen nicht die Notwendigkeit, wie beispielsweise für Endothelzellen, sich palisadenförmig auf einer Unterlage zu verankern. Für ein solches Verhalten würde man eine stärkere Adhäsion an Kollagen IV erwarten. Diese Eigenschaften der huPASMC zeigten sich unabhängig von der Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Vektoren bzw. Stimulanzen. Es handelt sich somit vermutlich um ein physiologisches Verhalten der huPASMC.

5.2 Limitationen dieser Studie

Um die IPAH in ihrer Entstehung zu erforschen, wurden bisher hauptsächlich Tiermodelle herangezogen. Die Problematik dieses experimentellen Ansatzes liegt darin, dass es sich dabei um eine künstlich erzeugte PAH handelt. Studienergebnisse zeigen, dass die so gemachten Beobachtungen je nach verwendeter Tierspezies bzw. nach verwendetem PAH-induzierendem Stimulus (z. B. durch Hypoxie, oder durch das Alkaloid Monocrotalin) stark variieren [3]. Auch das Ansprechen auf verschiedene Therapieansätze unterscheidet sich in Abhängigkeit von der verwendeten Tierspezies bzw. vom verwendeten Induktionsstimulus. Aufgrund dieser Beobachtungen ist das Tiermodell zur Untersuchung der IPAH des Menschen nur von eingeschränktem Nutzen. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit eine huPASMC-Primärkultur von Lonza verwendet. Das Ausgangsmaterial dieser Primärkulturen sind humane Lungenexplantate, aus denen die gewünschten Zellen aus Pulmonalarterien isoliert wurden. Für den Einsatz der huPASMC-Primärkultur für experimentelle Zwecke spricht, dass sie den Bedingungen im humanen Organismus am nächsten kommen. Sie behalten *in vitro* erfahrungsgemäß die meisten Charakteristika bei, durch die

sie in vivo gekennzeichnet waren. Durch diese Eigenschaften eignen sich die Zellen besser als jedes Tiermodell stellvertretend an ihnen die Pathomechanismen der IPAH zu erforschen.

Nachteilig beim Gebrauch dieser Primärkulturen ist zum einen, dass die Lebensdauer der Zellen unter in-vitro-Bedingungen limitiert ist (finite Kulturen). Im Kulturverlauf primärer Zellen treten Veränderungen wie z. B. Verringerung der Zellteilungsrate und Zellalterung auf. In dieser Arbeit wurde die Verwendung der Zellen auf die Passagen 4 bis 8 beschränkt. Allerdings können bereits diese „Altersunterschiede“ zu einer Variabilität im Verhalten der Zellen geführt haben. Ein weiterer Nachteil beim Gebrauch von Primärzellen sind herkunftsbedingte Schwankungen bezüglich Morphologie und Stoffwechsel, dadurch, dass die Zellen von verschiedenen Zelldonatoren stammen. Auch das kann die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse erschweren. Bei der Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit muss zudem die kleine Stichprobengröße (Proliferationsassay: 10.000 huPASC je Treatment, Migrationsassay: 7.500 huPASC je Treatment, Adhäsionsassay 10.000 huPASC je Treatment) sowie die geringe Anzahl der Experiment-Wiederholungen berücksichtigt werden (Proliferationsassay N = 3, Migrationsassay N = 4, Adhäsionsassay N = 5). Eine Erhöhung der Experiment-Wiederholungen sowie des Stichprobenumfangs war im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Komplexität der einzelnen Versuche nicht möglich.

Außerdem muss darauf hingewiesen werden, dass nach den Transfektionen der huPASC mit den Expressionsvektoren keine Messung der Transfektionseffizienz (tatsächlich erfolgreich transfizierte Zellen in %) erfolgt ist. Eine Transfektionseffizienz < 20% kann den Effekt der Transfektion maskieren. D. h. ein auf der Transfektion beruhendes, verändertes Verhalten der erfolgreich transfizierten Zellen wird aufgrund ihrer geringen Anzahl nicht erkannt und in der Messung überwiegt das Verhalten der nicht transfizierten Zellen. Demnach ist weder bekannt, wie hoch die Transfektionseffizienz der einzelnen Transfektionen war, noch inwieweit sich die Transfektionseffizienzen zwischen den einzelnen Transfektionen voneinander unterscheiden. Für an diese Arbeit anschließende Untersuchungen ist somit eine Ermittlung der Transfektionseffizienz (z. B. über fluoreszenzfarbstoff-markierte Vektoren per Durchflusszytometrie) empfehlenswert. Die unterschiedlichen Zellpassagen, die

verschiedenen Zelldonatoren sowie die unbekannte Transfektionseffizienz wurden jedoch in der statistischen Auswertung der Daten (in Form von Fehlertermen) berücksichtigt (s. Kap. 3.18.2 bis 3.18.4), sodass die Ergebnisse interpretiert werden durften. Ferner muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass trotz der überwältigenden Überexpression der TrkB-Isoformen auf RNA-Ebene (19,8- bis 21,6-fach) eine Expression auf Proteinebene nicht untersucht wurde. Folglich bleibt es Spekulation, ob die beobachteten Unterschiede im Zellverhalten auf einen tatsächlich erhöhten Rezeptoren-Gehalt an der Zelloberfläche zurückzuführen sind. Um diese Frage zu klären, ist ein weiterer Ansatz nötig, der die, durch Überexpression der TrkB-Isoformen auf RNA-Ebene resultierenden, Veränderungen auf Proteinebene (z. B. durch Western Blot) untersucht.

Erwähnenswert ist noch der nicht ausgereifte Versuchsaufbau des Adhäsionsassays. Die Problematik liegt dabei in der Geschwindigkeit der Zelladhäsion an die Matrixmoleküle Kollagen und Fibronectin (diese liegt im Bereich von Minuten), während die manuelle Verteilung der huPASCs auf die 96-Loch-Zellkultur-Platte bereits mindestens die doppelte Zeit in Anspruch nimmt. Dieser Umstand führt zu hohen Schwankungen, die die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse beträchtlich erschweren. Möglicherweise gemessene Unterschiede in der Zelladhäsion sind mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf die Transfektion und Stimulation der Zellen zurückführbar. Auch der Gebrauch eines Multipipetten-Systems bietet für dieses Problem keine adäquate Lösung, da die einzelnen Eppendorf-Gefäße vor der Verteilung auf die 96-Loch-Zellkultur-Platte sorgfältig mit der Pipette resuspendiert werden müssen. Ein Vortexer ist zu diesem Zweck, aufgrund der hohen mechanischen Stresseinwirkung auf die Zellen, nicht geeignet. Für nachfolgende Arbeiten ist eine Optimierung des Versuchsaufbaus unabdingbar. Vorzuschlagen wäre ein computergesteuertes Pipettiersystem, welches eine simultane Übertragung der Zellsuspensionen auf alle 96 Löcher der Zellkultur-Platte gewährleistet. Dies würde einen zeitgleichen Beginn des Adhäsionsassays garantieren.

5.3 Ausblick und Therapieansätze

Bis in die 80er Jahre wurde versucht dem erhöhtem Druck im pulmonalen Kreislauf mit unselektiven Vasodilatoren zu begegnen [135]. Positive und nachhaltige Effekte konnten nur mit hohen Dosen von Ca^{2+} -Antagonisten erzielt werden, wobei nur 10% bis 15% der IPAH-Patienten auf eine solche Therapie ansprachen [136]. Der Nachteil bei dem Gebrauch von Ca^{2+} -Antagonisten ist deren unselektive Wirkung, indem sie neben einer Dilatation der Lungengefäße auch eine Drucksenkung im arteriellen Schenkel des großen Kreislaufs induzieren. Durch die systemische Hypotension kommt es reaktiv zu einer Sympathikus-Stimulation mit Reflextachykardie [19], wodurch sich die rechtsventrikuläre Funktion weiter verschlechtert. Neue Therapieansätze zielen auf die Antagonisierung einzelner Komponenten des Gefäßremodelings ab. Zum jetzigen Zeitpunkt werden drei Signalwege medikamentös verstärkt bzw. gehemmt: Der Endothelin-Signalweg durch Endothelin-Rezeptor-Antagonisten [137, 138], der NO-Signalweg durch Phosphodiesterase-Hemmer [139, 140] und der Prostazyklin-Signalweg durch Prostazyklin-Analoga [141]. Durch diese Interventionen sollen, neben einer Vasodilatation der Pulmonalarterien, auch eine Proliferationshemmung der huPASMC erreicht werden [142-144]. Die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen in Tiermodellen weisen darauf hin, dass auf diesem Weg die Media-Verdickung und Muskularisierung primär nonmuskulärer Arteriolen vermindert und infolgedessen eine Senkung des pulmonalarteriellen Drucks erzielt werden kann [145-147]. Durch diese aktuellen therapeutischen Ansätze konnte bei IPAH-Patienten eine Verbesserung der physischen Belastbarkeit, eine Symptom-Linderung und einen daraus resultierenden Gewinn an Lebensqualität in gewissen Grenzen erzielt werden [148-150]. Nachteile dieser neuen Therapieoptionen sind hohe Kosten [151] und Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Myalgien, Flush, Verdauungsstörungen, periphere Ödeme, Störungen der Leber-Transaminasen und Teratogenität [149, 152, 153]. Zudem ist der Gebrauch dieser Wirkstoffe in der Anwendung sehr aufwändig: Für die intravenös verabreichten Medikamente (z. B. das Prostazyklin-Analogon Epoprostenol) ist ein Venenverweilkatheter zur kontinuierlichen Infusionstherapie erforderlich [154], wodurch ein Infektionsrisiko gegeben ist.

Die inhalativ verabreichten Medikamente (z. B. das Prostazyklin-Analogen Iloprost) haben eine sehr kurze Halbwertszeit und verpflichten den Patienten so zu regelmäßigen engmaschigen Inhalationen [155]. Die genannten Therapieoptionen haben die Lebensqualität von IPAH-Patienten zwar in beträchtlichem Maß verbessert, dennoch stellen sie, durch die fehlende kurative Komponente, nur eine Überbrückung bis zur Lungentransplantation dar [156].

Wie in Kap. 1.1 beschrieben ist die IPAH eine Erkrankung, die durch die abnorme Proliferation, Migration und Interaktion mit EZM/Adhäsion von huPASMC charakterisiert ist. Eine Therapie, die spezifisch jeden dieser Pathomechanismen hemmt, ist demnach denkbar effektiver als eine Monotherapie. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten liefern Hinweise darauf, dass die TrkB-Isoformen die Proliferation und Migration von huPASMC beeinflussen können (s. Kap. 5.1.1 und 5.1.2). Sollten sich diese Beobachtungen in weiteren Untersuchungen bestätigen, könnte dies in Zukunft als Ansatzpunkt für neue Therapien zur Hemmung des Gefäßremodelings genutzt werden. Voraussetzung für die Entwicklung einer neuen TrkB-assoziierten Therapie ist jedoch die Untersuchung, wie die TrkB-Isoformen ihren Effekt ausüben (gegenseitige Expressionsregulation, Ligandenbereitstellung/-absorption bzw. durch einen eigenen Signalweg, s. Kap. 5.1.1). Ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt wäre eine Inhibition der intrazellulären Signaltransduktion der Isoform TrkB-c, falls sich diese auch in zukünftigen Studien als proliferationsfördernd herausstellt. Dies wäre durch den Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren möglich. Tyrosinkinase-Inhibitoren, die durch Hemmung der Autophosphorylierung der Kinase-Domäne die nachgeschaltete Signalkaskade unterbrechen [157], finden bereits Anwendung bei Erkrankungen mit starker Proliferationskomponente (z. B. bei Karzinomen) [158]. Tyrosinkinase-Inhibitoren wurden kürzlich auch in PAH-Tiermodellen erprobt und nach der Beobachtung günstiger Effekte auf das Gefäßremodeling auch als mögliche Alternative zu den derzeit gängigen Methoden bei hypertensiven Erkrankungen der Lunge vorgeschlagen [121, 157]. Problematisch bei einer solchen systemischen Therapie ist, dass zahlreiche Zell-Rezeptoren im menschlichen Organismus den Rezeptor-Tyrosinkinasen zugerechnet werden. Eine relativ unspezifische Hemmung der Tyrosinkinasen

birgt so ein gewaltiges Nebenwirkungspotential. Eine Verbesserung dieses therapeutischen Ansatzes wären Tyrosinkinase-Inhibitoren, die zusätzlich die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren spezifisch binden. So könnten gezielt einzelne Rezeptor-Untergruppen (beispielsweise TrkB-c) inhibiert werden. Die proliferative Wirkung von TrkB-c auf huPASMC könnte so möglicherweise geblockt und ein Fortschreiten der IPAH gehemmt werden.

Sollten zukünftige Analysen bestätigen, dass TrkB-b und TrkB-e einen antiproliferativen Effekt auf huPASMC haben, könnte dies auch zur Inhibition des Gefäßremodelings genutzt werden. Eine Möglichkeit wäre die gezielte Überexpression dieser Isoformen in der Lunge. Durch ihre exponierte Lage bietet die Lunge den Vorteil selektiv über die Atemwege zugänglich zu sein. Eine Überexpression wäre durch die Inhalation eines Aerosols möglich, welches mit den Genen der erwünschten TrkB-Isoformen angereichert ist. Als effiziente Genübertragungsvehikel gelten heute adenovirale Vektoren. Sie bieten den Vorteil, dass sie ein sehr breites Wirkspektrum aufweisen, d. h. sie können teilungsaktive, ruhende sowie ausdifferenzierte Zellen „infizieren“ [159]. So könnten sie auch zur Transduktion gewünschter Gene in huPASMC geeignet sein. Ein weiteres wichtiges Merkmal der adenoviralen Vektoren ist, dass sie nach der Aufnahme in die Wirtszelle nicht in die Wirtszell-DNA integriert werden (im Gegensatz zu retroviralen Gentransfersystemen), sondern als Episom in freier Form neben der Wirtszell-DNA im Zellkern vorliegen. Somit besteht nicht die Gefahr Tumorsuppressorgene oder Onkogene durch Insertionsmutagenese zu verändern [159]. Der virale Vektor kann jedoch infolge der Zellkern-Auflösung bei der Zellteilung verloren gehen, weshalb er in regelmäßigen Intervallen substituiert werden müsste. Die Verwendung von viralen Vektorsystemen birgt allerdings auch einige Risiken: So besteht die Gefahr der Entstehung von infektiösen und/oder replikationskompetenten Viruspartikeln durch Rekombinationsprozesse [160, 161]. Außerdem ist die Verträglichkeit einer solchen Therapie noch nicht ausreichend erprobt. Durch die Applikation eines vektorhaltigen Aerosols könnte es zu Entzündungs- und Unverträglichkeitsreaktionen kommen [19]. Um die Gentherapie bei IPAH-Patienten zu etablieren, sind zudem noch einige weitere Hürden zu meistern, wie u. a. die Optimierung von Vektorkonstruktion und -produktion, die gezielte

Anreicherung in huPASMC sowie die Kontrolle einer ausreichenden Transgenexpression nach der Zelltransduktion.

6 Zusammenfassung

Die idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (IPAH) ist eine seltene und schwerwiegende Erkrankung der Lunge, bei der es durch Remodeling-Prozesse der Pulmonalarterien zu einer Erhöhung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks kommt. Obwohl das vaskuläre Remodeling alle Gefäßwandschichten betrifft, beruhen die resultierenden hämodynamischen Veränderungen überwiegend auf der abnormen Proliferation, Migration und EZM-Synthese/Adhäsion glatter Muskelzellen (huPASMC) in der Media. Diese huPASMC exprimieren einen Tyrosinkinase-Rezeptor namens TrkB, der die zelluläre Proliferation und Migration sowie vermutlich auch die zelluläre Adhäsion beeinflusst. Vor diesem Hintergrund wäre es denkbar, dass TrkB ursächlich für das abnorme Verhalten der huPASMC bei der IPAH ist. In dieser Studie wurde erstmalig nachgewiesen, dass huPASMC drei TrkB-Isoformen exprimieren (die vollständige Isoform TrkB-c und die verkürzten Varianten TrkB-b und TrkB-e). Die Funktion der verkürzten TrkB-Isoformen ist nahezu unbekannt. Die Fragestellung dieser Arbeit war somit, ob und inwiefern die einzelnen TrkB-Isoformen in Interaktion mit ihren Liganden BDNF und huNT4 die Proliferation, Migration und Adhäsion von huPASMC beeinflussen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die mRNA der Isoformen TrkB-c, TrkB-b und TrkB-e aus A549-Zellen gewonnen, in cDNA umgeschrieben und mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt. Nach Integration der cDNA in Vektorsysteme (Klonierung) wurden diese in huPASMC, mit dem Ziel einer Isoform-Überexpression, eingeschleust (Transfektion). In einem weiteren Schritt wurden die transfizierten huPASMC mit den Liganden BDNF bzw. huNT4 stimuliert. Daraufhin wurden die Proliferations-, Migrations- und Adhäsionseigenschaften der transfizierten und stimulierten huPASMC untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lieferten Hinweise für einen antiproliferativen Effekt der Kombinationen TrkB-b/BDNF und TrkB-e/huNT4 sowie für einen migrationssteigernden Effekt durch TrkB-c. Hinweise für einen Einfluss der TrkB-Isoformen bzw. der Liganden auf die Adhäsion der huPASMC lagen nicht vor. Ob die antiproliferative Wirkung der verkürzten Isoformen auf einer Runterregulation des vollständigen TrkB-Rezeptors an der Zelloberfläche, einer Ligandenreduktion für den vollständigen Rezeptor oder auf einem

eigenen, bisher unbekanntem Signalweg beruht, bedarf weiterer Untersuchungen. Die vermehrte Expression der TrkB-Isoformen TrkB-b und TrkB-e sowie die Runterregulierung der TrkB-c-Expression mit dem Ziel der Proliferationshemmung der huPASMC könnten als therapeutische Angriffspunkte für die Behandlung von IPAH-Patienten in Frage kommen.

6.1 Summary

Idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) is a rare and serious lung disease that is caused by remodeling processes in the wall layers of pulmonary arteries which lead to an increase in mean pulmonary artery pressure. Even though vascular remodeling affects all layers of the vascular wall, the resulting hemodynamic changes mainly occur due to an abnormal proliferation, migration and adhesion of smooth muscle cells (huPASMC) in the media. These huPASMC express a tyrosine-kinase-receptor named TrkB which influences the cellular proliferation, migration and presumably the cellular adhesion. Hence, TrkB is conceivably the cause of the abnormal behaviour of the huPASMC in IPAH. This study demonstrated for the first time that huPASMC express three TrkB isoforms (full-length TrkB-c and the truncated versions TrkB-b and TrkB-e). The function of truncated TrkB isoforms is largely unknown. The aim of this research study was to investigate the influence of TrkB isoforms on the proliferation, migration and adhesion of huPASMC in interaction with their ligands BDNF and huNT4. For this purpose, the mRNA of TrkB-c, TrkB-b and TrkB-e was extracted from a549-cells and transcribed into cDNA. Subsequently the cDNA was amplified by means of the polymerase chain reaction (PCR). After integrating the cDNA in an expressionvector system (cloning), huPASMC were transfected with the aim of isoform overexpression. As a next step, the transfected huPASMC were stimulated with the ligands BDNF or huNT4. Afterwards, the proliferation, migration and adhesion properties of the transfected and stimulated huPASMC were analysed. The results of this analysis provide evidence for an antiproliferative effect caused by TrkB-b/BDNF and TrkB-e/huNT4. There is also evidence for a migration-enhancing effect of TrkB-c. Indicators for an influence of TrkB isoforms on the adhesion of huPASMC (in combination with their ligands) were nonexistent. Further research is required on whether the antiproliferative effect of the truncated isoforms occurs due to a down-regulation of the full-length TrkB receptor on the cell surface, due to ligand reduction or due to a different signaling pathway that was previously unknown. In the future, increased expression of TrkB isoforms TrkB-b and TrkB-e and down-regulation of TrkB-c

with the aim of inhibiting proliferation of huPASMC might be used as therapeutic targets for the treatment of IPAH.

7 Literatur

1. Wilkens, H., [Pulmonary hypertension. Pathophysiology and current concepts of medication therapy]. *Anaesthesist*, 2004. **53**(8): p. 734-40.
2. Simonneau, G., et al., Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(1 Suppl): p. S43-54.
3. Jeffery, T.K. and J.C. Wanstall, Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther*, 2001. **92**(1): p. 1-20.
4. Birukov, K.G., et al., Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem*, 1995. **144**(2): p. 131-9.
5. Clowes, A.W., et al., Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. V. Role of acute distension in the induction of smooth muscle proliferation. *Lab Invest*, 1989. **60**(3): p. 360-4.
6. Stenmark, K.R., et al., Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda)*, 2006. **21**: p. 134-45.
7. Camejo, G., et al., The extracellular matrix on atherogenesis and diabetes-associated vascular disease. *Atheroscler Suppl*, 2002. **3**(1): p. 3-9.
8. Olschewski, H., et al., Cellular pathophysiology and therapy of pulmonary hypertension. *J Lab Clin Med*, 2001. **138**(6): p. 367-77.
9. Nemoto, K., et al., Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **245**(1): p. 284-8.
10. Stenmark, K.R. and R.P. Mecham, Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol*, 1997. **59**: p. 89-144.
11. Jeffery, T.K. and J.C. Wanstall, Pulmonary vascular remodelling in hypoxic rats: effects of amlodipine, alone and with perindopril. *Eur J Pharmacol*, 2001. **416**(1-2): p. 123-31.
12. Reidy, M.A., A reassessment of endothelial injury and arterial lesion formation. *Lab Invest*, 1985. **53**(5): p. 513-20.
13. Keeley, F.W. and L.A. Bartoszewicz, Elastin in systemic and pulmonary hypertension. *Ciba Found Symp*, 1995. **192**: p. 259-73; discussion 273-8.
14. Tozzi, C.A., et al., Excess collagen in hypertensive pulmonary arteries decreases vascular distensibility. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. **149**(5): p. 1317-26.
15. Hedin, U., et al., Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol*, 1988. **107**(1): p. 307-19.
16. Humbert, M., et al., Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **43**(12 Suppl S): p. 13S-24S.

17. Tanaka, Y., et al., The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling. *J Clin Invest*, 1996. **98**(2): p. 434-42.
18. Tuder, R.M., et al., Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. **159**(6): p. 1925-32.
19. Archer, S. and S. Rich, Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation*, 2000. **102**(22): p. 2781-91.
20. Runo, J.R. and J.E. Loyd, Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, 2003. **361**(9368): p. 1533-44.
21. Hanks, S.K., Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol*, 2003. **4**(5): p. 111.
22. Chao, M.V., R. Rajagopal, and F.S. Lee, Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)*, 2006. **110**(2): p. 167-73.
23. Lykissas, M.G., et al., The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res*, 2007. **4**(2): p. 143-51.
24. Noga, O., et al., 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**(12): p. 1906-12.
25. Yamamoto, M., et al., 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**(8): p. 929-38.
26. Shibayama, E. and H. Koizumi, Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol*, 1996. **148**(6): p. 1807-18.
27. Esteban, I., et al., Neurotrophin receptor proteins immunoreactivity in human gastrointestinal endocrine cells. *Brain Res Bull*, 1995. **38**(6): p. 539-43.
28. Labouyrie, E., et al., Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol*, 1999. **154**(2): p. 405-15.
29. Harel, S., et al., Tyrosine kinase B receptor and its activated neurotrophins in ovaries from human fetuses and adults. *Mol Hum Reprod*, 2006. **12**(6): p. 357-65.
30. Donovan, M.J., et al., Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development*, 2000. **127**(21): p. 4531-40.
31. Ricci, A., et al., Neurotrophins and neurotrophin receptors in human pulmonary arteries. *J Vasc Res*, 2000. **37**(5): p. 355-63.
32. Dagnell, C., et al., Effects of neurotrophins on human bronchial smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Transl Res*, 2007. **150**(5): p. 303-10.

33. Ricci, A., et al., Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004. **30**(1): p. 12-9.
34. Ricci, A., et al., Neurotrophin and neurotrophin receptor expression in alveolar macrophages: an immunocytochemical study. *Growth Factors*, 2000. **18**(3): p. 193-202.
35. Nockher, W.A. and H. Renz, Neurotrophins in allergic diseases: from neuronal growth factors to intercellular signaling molecules. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(3): p. 583-9.
36. Garcia-Suarez, O., et al., TrkB is necessary for the normal development of the lung. *Respir Physiol Neurobiol*, 2009. **167**(3): p. 281-91.
37. Perez-Pinera, P., et al., The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Mol Cell Biochem*, 2007. **295**(1-2): p. 19-26.
38. Sclabas, G.M., et al., Overexpression of tropomyosin-related kinase B in metastatic human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(2 Pt 1): p. 440-9.
39. Satoh, F., et al., Autocrine expression of neurotrophins and their receptors in prostate cancer. *Int J Urol*, 2001. **8**(7): p. S28-34.
40. McGregor, L.M., et al., Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(8): p. 4540-5.
41. Ricci, A., et al., Neurotrophin system expression in human pulmonary carcinoid tumors. *Growth Factors*, 2005. **23**(4): p. 303-12.
42. Renne, C., et al., Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4051-9.
43. Geiger, T.R. and D.S. Peeper, Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis. *Cancer Res*, 2007. **67**(13): p. 6221-9.
44. Stephan, H., et al., Neurotrophin receptor expression in human primary retinoblastomas and retinoblastoma cell lines. *Pediatr Blood Cancer*, 2008. **50**(2): p. 218-22.
45. Han, L., et al., Neurotrophic receptor TrkB: Is it a predictor of poor prognosis for carcinoma patients? *Med Hypotheses*, 2007. **68**(2): p. 407-9.
46. Donovan, M.J., et al., Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol*, 1995. **147**(2): p. 309-24.
47. Ejiri, J., et al., Possible role of brain-derived neurotrophic factor in the pathogenesis of coronary artery disease. *Circulation*, 2005. **112**(14): p. 2114-20.
48. Nassenstein, C., S. Kerzel, and A. Braun, Neurotrophins and neurotrophin receptors in allergic asthma. *Prog Brain Res*, 2004. **146**: p. 347-67.

49. Virchow, J.C., et al., Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **158**(6): p. 2002-5.
50. Rochlitzer, S., C. Nassenstein, and A. Braun, The contribution of neurotrophins to the pathogenesis of allergic asthma. *Biochem Soc Trans*, 2006. **34**(Pt 4): p. 594-9.
51. Braun, A., et al., Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to neuronal dysfunction in a model of allergic airway inflammation. *Br J Pharmacol*, 2004. **141**(3): p. 431-40.
52. Avcuoglu, S., et al., Neurotrophic tyrosine kinase receptor b/neurotrophin 4 signaling axis is perturbed in clinical and experimental pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. **45**(4): p. 768-80.
53. Hope-Gill, B.D., et al., A study of the cough reflex in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **168**(8): p. 995-1002.
54. Ricci, A., et al., Increased pulmonary neurotrophin protein expression in idiopathic interstitial pneumonias. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 2007. **24**(1): p. 13-23.
55. Dagnell, C., et al., Neurotrophins and neurotrophin receptors in pulmonary sarcoidosis - granulomas as a source of expression. *Respir Res*, 2010. **11**: p. 156.
56. Ricci, A., et al., Neurotrophin system activation in bronchoalveolar lavage fluid immune cells in pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 2005. **22**(3): p. 186-94.
57. Prakash, Y., et al., Neurotrophins in lung health and disease. *Expert Rev Respir Med*, 2010. **4**(3): p. 395-411.
58. Urfer, R., et al., An immunoglobulin-like domain determines the specificity of neurotrophin receptors. *Embo J*, 1995. **14**(12): p. 2795-805.
59. MacDonald, J.I. and S.O. Meakin, Deletions in the extracellular domain of rat trkA lead to an altered differentiative phenotype in neurotrophin responsive cells. *Mol Cell Neurosci*, 1996. **7**(5): p. 371-90.
60. Arevalo, J.C. and S.H. Wu, Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci*, 2006. **63**(13): p. 1523-37.
61. Mowla, S.J., et al., Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*, 2001. **276**(16): p. 12660-6.
62. Lessmann, V., K. Gottmann, and M. Malcangio, Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol*, 2003. **69**(5): p. 341-74.
63. Seidah, N.G., et al., Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett*, 1996. **379**(3): p. 247-50.

64. Skaper, S.D., The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2008. **7**(1): p. 46-62.
65. Rodriguez-Tebar, A., G. Dechant, and Y.A. Barde, Neurotrophins: structural relatedness and receptor interactions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1991. **331**(1261): p. 255-8.
66. Ip, N.Y., et al., Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron*, 1993. **10**(2): p. 137-49.
67. Klein, R., et al., The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*, 1991. **66**(2): p. 395-403.
68. Lee, R., et al., Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 2001. **294**(5548): p. 1945-8.
69. Blochl, A. and R. Blochl, A cell-biological model of p75NTR signaling. *J Neurochem*, 2007. **102**(2): p. 289-305.
70. Chao, M.V., Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 2003. **4**(4): p. 299-309.
71. Benedetti, M., A. Levi, and M.V. Chao, Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(16): p. 7859-63.
72. Hartmann, M., et al., Truncated TrkB receptor-induced outgrowth of dendritic filopodia involves the p75 neurotrophin receptor. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 24): p. 5803-14.
73. Jing, S., P. Tapley, and M. Barbacid, Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron*, 1992. **9**(6): p. 1067-79.
74. Kaplan, D.R., D. Martin-Zanca, and L.F. Parada, Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature*, 1991. **350**(6314): p. 158-60.
75. Obermeier, A., et al., Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J Biol Chem*, 1993. **268**(31): p. 22963-6.
76. Eveleth, D.D. and R.A. Bradshaw, Internalization and cycling of nerve growth factor in PC12 cells: interconversion of type II (fast) and type I (slow) nerve growth factor receptors. *Neuron*, 1988. **1**(10): p. 929-36.
77. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 2003. **72**: p. 609-42.
78. Stephens, R.M., et al., Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron*, 1994. **12**(3): p. 691-705.
79. Takahashi, E. and B.C. Berk, MAP kinases and vascular smooth muscle function. *Acta Physiol Scand*, 1998. **164**(4): p. 611-21.

80. English, J., et al., New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res*, 1999. **253**(1): p. 255-70.
81. Segal, R.A. and M.E. Greenberg, Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci*, 1996. **19**: p. 463-89.
82. Lopez-Illasaca, M., Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol*, 1998. **56**(3): p. 269-77.
83. Weber, A.A. and K. Schror, The significance of platelet-derived growth factors for proliferation of vascular smooth muscle cells. *Platelets*, 1999. **10**(2-3): p. 77-96.
84. Stossel, T.P., On the crawling of animal cells. *Science*, 1993. **260**(5111): p. 1086-94.
85. Graf, K., et al., Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1997. **29**(1 Pt 2): p. 334-9.
86. Heldin, C.H., A. Ostman, and L. Ronnstrand, Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1378**(1): p. F79-113.
87. Holgado-Madruga, M., et al., Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(23): p. 12419-24.
88. Chan, T.O., S.E. Rittenhouse, and P.N. Tsichlis, AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 965-1014.
89. Datta, S.R., et al., Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 1997. **91**(2): p. 231-41.
90. Zhou, F.Q., et al., NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron*, 2004. **42**(6): p. 897-912.
91. Foehr, E.D., et al., NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J Neurosci*, 2000. **20**(20): p. 7556-63.
92. Zheng, W.H., S. Kar, and R. Quirion, FKHRL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *J Neurochem*, 2002. **80**(6): p. 1049-61.
93. Brunet, A., S.R. Datta, and M.E. Greenberg, Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. **11**(3): p. 297-305.
94. Yuan, X.B., et al., Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(1): p. 38-45.

95. Derman, M.P., et al., The lipid products of phosphoinositide 3-kinase increase cell motility through protein kinase C. *J Biol Chem*, 1997. **272**(10): p. 6465-70.
96. Obermeier, A., et al., Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *Embo J*, 1993. **12**(3): p. 933-41.
97. Corbit, K.C., D.A. Foster, and M.R. Rosner, Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(6): p. 4209-18.
98. Bilato, C., et al., Intracellular signaling pathways required for rat vascular smooth muscle cell migration. Interactions between basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor. *J Clin Invest*, 1995. **96**(4): p. 1905-15.
99. Kobe, B. and J. Deisenhofer, The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci*, 1994. **19**(10): p. 415-21.
100. Nakagawara, A., et al., Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics*, 1995. **25**(2): p. 538-46.
101. Stoilov, P., E. Castren, and S. Stamm, Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **290**(3): p. 1054-65.
102. Ullrich, A. and J. Schlessinger, Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 1990. **61**(2): p. 203-12.
103. Biffo, S., et al., Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development*, 1995. **121**(8): p. 2461-70.
104. Ninkina, N., et al., Expression and function of TrkB variants in developing sensory neurons. *Embo J*, 1996. **15**(23): p. 6385-93.
105. Beck, K.D., et al., Induction of noncatalytic TrkB neurotrophin receptors during axonal sprouting in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 1993. **13**(9): p. 4001-14.
106. Wiedemann, F.R., et al., The neurotrophin receptor TrkB is colocalized to mitochondrial membranes. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006. **38**(4): p. 610-20.
107. RDC, T., R: A language and environment for statistical computing, in R Foundation for Statistical Computing. 2006.
108. Dunnett, C.W., A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the Am. Statistical Association* 1955. **50**: p. 1096-1121.
109. Dunnett, C.W., Pairwise multiple comparisons in the homogeneous variance, unequal sample size case. *Journal of the American Stat. Association*, 1980. **75**: p. 789-795.
110. Holm, S., A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 1979. **6**: p. 65-70.

111. Yu, Y., et al., PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. **284**(2): p. C316-30.
112. Dempsey, E.C., I.F. McMurtry, and R.F. O'Brien, Protein kinase C activation allows pulmonary artery smooth muscle cells to proliferate to hypoxia. *Am J Physiol*, 1991. **260**(2 Pt 1): p. L136-45.
113. Dahia, P.L., PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocr Relat Cancer*, 2000. **7**(2): p. 115-29.
114. Jin, U.H., et al., Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* BUNGE inhibits human aortic smooth muscle cell migration and MMP-9 activity through AKT signaling pathway. *J Cell Biochem*, 2008. **104**(1): p. 15-26.
115. Duronio, V., M.P. Scheid, and S. Ettinger, Downstream signalling events regulated by phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Cell Signal*, 1998. **10**(4): p. 233-9.
116. Bornfeldt, K.E., et al., Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest*, 1994. **93**(3): p. 1266-74.
117. Shariff, A. and E.J. Luna, Diacylglycerol-stimulated formation of actin nucleation sites at plasma membranes. *Science*, 1992. **256**(5054): p. 245-7.
118. Fukami, K., et al., Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature*, 1992. **359**(6391): p. 150-2.
119. Anand-Apte, B. and B. Zetter, Signaling mechanisms in growth factor-stimulated cell motility. *Stem Cells*, 1997. **15**(4): p. 259-67.
120. Fay, F.S., S.H. Gilbert, and R.A. Brundage, Calcium signalling during chemotaxis. *Ciba Found Symp*, 1995. **188**: p. 121-35; discussion 136-40.
121. Schermuly, R.T., et al., Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest*, 2005. **115**(10): p. 2811-21.
122. Schramm, A., et al., Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Lett*, 2005. **228**(1-2): p. 143-53.
123. Polleux, F., et al., Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development*, 2002. **129**(13): p. 3147-60.
124. Chiaramello, S., et al., BDNF/ TrkB interaction regulates migration of SVZ precursor cells via PI3-K and MAP-K signalling pathways. *Eur J Neurosci*, 2007. **26**(7): p. 1780-90.
125. Martens, L.K., et al., Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a transcriptional activator of the TrkB neurotrophin receptor gene. *J Biol Chem*, 2007. **282**(19): p. 14379-88.
126. Botney, M.D., et al., Extracellular matrix protein gene expression in atherosclerotic hypertensive pulmonary arteries. *Am J Pathol*, 1992. **140**(2): p. 357-64.

127. Lepetit, H., et al., Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 2005. **25**(5): p. 834-42.
128. Schneider, R. and M. Schweiger, A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene*, 1991. **6**(10): p. 1807-11.
129. Zhou, H., A.A. Welcher, and E.M. Shooter, BDNF/NT4-5 receptor TrkB and cadherin participate in cell-cell adhesion. *J Neurosci Res*, 1997. **49**(3): p. 281-91.
130. Douma, S., et al., Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature*, 2004. **430**(7003): p. 1034-9.
131. Thyberg, J. and A. Hultgardh-Nilsson, Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. *Cell Tissue Res*, 1994. **276**(2): p. 263-71.
132. Abedi, H. and I. Zachary, Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res*, 1995. **30**(4): p. 544-56.
133. Uzui, H., et al., The role of protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 2000. **149**(1): p. 51-9.
134. Laurie, G.W., et al., Localization of binding sites for laminin, heparan sulfate proteoglycan and fibronectin on basement membrane (type IV) collagen. *J Mol Biol*, 1986. **189**(1): p. 205-16.
135. Wanstall, J.C. and T.K. Jeffery, Recognition and management of pulmonary hypertension. *Drugs*, 1998. **56**(6): p. 989-1007.
136. Rich, S., E. Kaufmann, and P.S. Levy, The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 1992. **327**(2): p. 76-81.
137. Dupuis, J. and M.M. Hoeper, Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 2008. **31**(2): p. 407-15.
138. Rubin, L.J., et al., Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 2002. **346**(12): p. 896-903.
139. Wilkins, M.R., et al., Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 2008. **32**(1): p. 198-209.
140. Schermuly, R.T., et al., Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **169**(1): p. 39-45.
141. Gombert-Maitland, M. and H. Olschewski, Prostacyclin therapies for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 2008. **31**(4): p. 891-901.

142. Langleben, D., et al., Continuous infusion of epoprostenol improves the net balance between pulmonary endothelin-1 clearance and release in primary pulmonary hypertension. *Circulation*, 1999. **99**(25): p. 3266-71.
143. McLaughlin, V.V., et al., Reduction in pulmonary vascular resistance with long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 1998. **338**(5): p. 273-7.
144. Thomae, K.R., et al., The effect of nitric oxide on fetal pulmonary artery smooth muscle growth. *J Surg Res*, 1995. **59**(3): p. 337-43.
145. Hill, N.S., et al., Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol*, 1997. **83**(4): p. 1209-15.
146. Kodama, K. and H. Adachi, Improvement of mortality by long-term E4010 treatment in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **290**(2): p. 748-52.
147. Geraci, M.W., et al., Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *J Clin Invest*, 1999. **103**(11): p. 1509-15.
148. Galie, N., et al., Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation*, 2008. **117**(23): p. 3010-9.
149. Galie, N., et al., Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 2009. **119**(22): p. 2894-903.
150. Simonneau, G., et al., Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **165**(6): p. 800-4.
151. Pitsioui, G.G., et al., Successful up-front combination therapy in a patient with idiopathic pulmonary hypertension and patent foramen ovale: an alternative to epoprostenol therapy? *J Heart Lung Transplant*, 2009. **28**(6): p. 651-3.
152. Montani, D., et al., Phosphodiesterase type 5 inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *Adv Ther*, 2009.
153. Kingman, M., R. Ruggiero, and F. Torres, Ambrisentan, an endothelin receptor type A-selective endothelin receptor antagonist, for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Opin Pharmacother*, 2009. **10**(11): p. 1847-58.
154. McLaughlin, V.V., A. Shillington, and S. Rich, Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation*, 2002. **106**(12): p. 1477-82.
155. Krug, S., et al., Inhaled iloprost for the control of pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag*, 2009. **5**(1): p. 465-74.
156. Hall, S., et al., Contribution of inflammation to the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension in children. *Thorax*, 2009. **64**(9): p. 778-83.

157. Merklinger, S.L., et al., Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation*, 2005. **112**(3): p. 423-31.
158. Wolf, D. and H. Rumpold, A benefit-risk assessment of imatinib in chronic myeloid leukaemia and gastrointestinal stromal tumours. *Drug Saf*, 2009. **32**(11): p. 1001-15.
159. Cornetta, K., et al., Amphotropic murine leukemia retrovirus is not an acute pathogen for primates. *Hum Gene Ther*, 1990. **1**(1): p. 15-30.
160. Hehir, K.M., et al., Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. *J Virol*, 1996. **70**(12): p. 8459-67.
161. Lochmuller, H., et al., Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther*, 1994. **5**(12): p. 1485-91.

Erklärung

„Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in dieser Arbeit verwendet wurde oder auf das direkten Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Ludger Fink für die Themenstellung dieser Arbeit und für die Realisierung einer zusätzlichen Doktorandenstelle am Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Ich danke Dr. biol. hom. Grazyna Kwapiszewska für die Unterstützung bei der Umsetzung der Fragestellung in praktikable Versuchsaufbauten.

Besonders danke ich Dr. med. Jens Wolff für die ausführliche Einarbeitung in das wissenschaftliche Arbeiten, für die Unterstützung bei Primerdesign und Sequenzierung sowie für das Korrekturlesen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Dr. rer. nat. Jochen Wilhelm für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten sowie für das Korrekturlesen.

Für die Ratschläge bezüglich der praktischen Durchführung der Experimente danke ich der „guten Seele“ des damaligen Großraumlabor Maria M. Stein.

Mein Dank gilt auch Dr. rer. nat Markus Roth und Dr. rer. nat. Michael Seimetz für die Einarbeitung in die Arbeitstechniken der Klonierung in der Medizinischen Klinik II Seltersberg, Haus C.

Außerdem danke ich Sara Höweler für das Korrekturlesen der englischsprachigen Zusammenfassung.

Zuletzt danke ich Gerald Münzel für das wiederholte geduldige Korrekturlesen, die Unterstützung bei der Formatierung sowie für zahlreiche Hilfestellungen zu jeder Zeit.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

