

Aus dem Institut für Pharmakologie der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

# **„Regulation der BDNF-Expression in Endothelzellen“**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

**Petra Czerwinski**

geb. in Wiesbaden

Mainz, 2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>x</b>
<b>II. Tabellenverzeichnis</b>	<b>xiii</b>
<b>III. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>xiv</b>
<b>1. Einleitung</b>	
<b>1.1. Der „brain-derived neurotrophic factor“ – BDNF</b>	
1.1.1. Die Familie der Neurotrophine	1
1.1.2. Das BDNF-Gen – Transkription und regulatorische Elemente	2
1.1.3. Das BDNF-Protein – Synthese und Sekretion	3
1.1.4. Die BDNF-Rezeptoren TrkB und p75 <sup>NTR</sup>	4
<b>1.2. BDNF - Physiologische Funktionen</b>	
1.2.1. Funktionelle Bedeutung von BDNF im neuronalen System	6
1.2.2. Funktionelle Bedeutung von BDNF im peripheren System	8
<b>1.3. BDNF unter pathologischen Bedingungen</b>	
1.3.1. BDNF und Epilepsie	10
1.3.2. BDNF und Depression	11
1.3.3. BDNF und Morbus Alzheimer	11
1.3.4. BDNF und Morbus Parkinson	12
1.3.5. BDNF und Ischämie	13
<b>1.4. Pharmakologische Regulation der BDNF-Expression</b>	
1.4.1. BDNF als therapeutisches Schlüsselgen	16
1.4.2. Problematik bisheriger neuroprotektiver Therapien und die Notwendigkeit zusätzlicher Vasoprotektion	17
1.4.3. Vasoaktive Pharmaka mit pleiotropen Funktionen	18
<b>2. Ziel der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>3. Materialien</b>	
<b>3.1. Laborgeräte</b>	<b>21</b>
<b>3.2. Chemikalien</b>	
3.2.1. Allgemeine Chemikalien	23
3.2.2. Spezielle Chemikalien	25

---

3.2.3. Radiobiochemika	26
<b>3.3. Verbrauchsmaterialien</b>	
3.3.1. Allgemeine Verbrauchsmaterialien	26
3.3.2. Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur	27
<b>3.4. Puffer und Lösungen</b>	
3.4.1. Puffer und Lösungen für die Gewinnung von Gesamt-RNA	28
3.4.2. Puffer und Lösungen für die Proteinextraktion aus Zellen	29
3.4.3. Puffer und Lösungen für die Western-Blot-Analyse	30
3.4.4. Puffer und Lösungen für den RFL-6-Reporterzell-Assay	32
<b>3.5. Nährmedien, Zusätze und Beschichtungslösungen für die Zellkultur</b>	34
<b>3.6. Zelllinien und verwendete primäre Zellen</b>	35
<b>3.7. Antikörper</b>	
3.7.1. Primäre Antikörper	35
3.7.2. Sekundäre Antikörper	35
<b>3.8. Marker</b>	36
<b>3.9. Kits und Reagenzien</b>	36
<b>3.10. Oligonukleotide</b>	36
<b>3.11. Versuchstiere</b>	37
<b>4. Methoden</b>	
<b>4.1. Zellbiologische Arbeitsmethoden</b>	
4.1.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	38
4.1.2. Bestimmung der Zellzahl	39
4.1.3. Stimulation der Zellen	40
4.1.4. Matrigel <sup>TM</sup> -Angiogenese-Assay	40
4.1.5. Bestimmung der Zellvitalität	41
<b>4.2. Molekularbiologische Arbeitsmethoden</b>	
4.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	41
4.2.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben	42
4.2.3. Photometrische Bestimmung der RNA Konzentration	43
4.2.4. Quantitative „real time“ RT-PCR	43

---

<b>4.3. Proteinbiochemische Arbeitsmethoden</b>	
4.3.1. Isolierung von Gesamtprotein aus Zellen	45
4.3.2. Isolierung der Cytosol- und Membranfraktion aus Zellen	46
4.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	46
4.3.4. Proteinkonzentration durch Fällung mit Methanol und Chloroform	47
4.3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
4.3.6. Western-Blot-Analyse	49
4.3.7. BDNF-Proteinquantifizierung mittels ELISA	50
<b>4.4. RFL-6-Reporterzell-Assay</b>	<b>51</b>
4.4.1. Transfer	51
4.4.2. Radioimmunassay	52
<b>4.5. <i>In vivo</i> Versuche an C57BL/J6 Mäusen</b>	<b>53</b>
<b>4.6. Statistik</b>	<b>54</b>
<b>5. Ergebnisse</b>	
<b>5.1. Der Einfluss von BDNF auf die Angiogenese in HUVEC</b>	
5.1.1. BDNF stimuliert die Angiogenese in HUVEC	55
5.1.2. Der stimulierende Einfluss von BDNF auf die Angiogenese in HUVEC wird durch die Inhibition des Rezeptors TrkB aufgehoben	57
<b>5.2. TNF-<math>\alpha</math> reduziert die BDNF-Expression in peripheren Endothelzellen</b>	
5.2.1. TNF- $\alpha$ reduziert konzentrations- und zeitabhängig die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen und HUVEC	59
5.2.2. Die reduzierende Wirkung von TNF- $\alpha$ auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch den TNFR1-Antagonisten WP9QY aufgehoben	62
5.2.3. TNF- $\alpha$ hat keine Wirkung auf die BDNF-mRNA-Stabilität	64
5.2.4. Durch die Inhibition der Transkription durch DRB wird der reduzierende Einfluss von TNF- $\alpha$ auf die BDNF-mRNA-Expression aufgehoben	66
5.2.5. TNF- $\alpha$ reduziert konzentrationsabhängig die Angiogenese in HUVEC	68

### **5.3. PKC-Aktivierung reduziert die BDNF-Expression in peripheren Endothelzellen**

- 5.3.1. PKC-Aktivatoren reduzieren die BDNF-mRNA-Expression  
in EA.hy 926-Zellen und HUVEC konzentrations- und zeitabhängig **70**
- 5.3.2. PMA vermindert die mRNA-Stabilität von BDNF  
in EA.hy 926-Zellen nicht **73**
- 5.3.3. Der reduzierende Einfluss einer PKC-Aktivierung  
auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch die  
Inhibition der Transkription aufgehoben **75**
- 5.3.4. Der Einfluss von PMA auf die PKC-Isoform  $\delta$  in EA.hy 926-Zellen **77**
- 5.3.5. Die PKC-Inhibitoren Rottlerin und Gö 6983  
heben den reduzierenden Einfluss von PMA auf die  
BDNF-mRNA-Expression auf **79**
- 5.3.6. Der reduzierende Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die  
BDNF-mRNA-Expression wird durch den  
PKC-Inhibitor Gö 6983 nicht aufgehoben **81**
- 5.3.7. PMA reduziert die BDNF-Protein-Expression in HUVEC **83**

### **5.4. Nebivolol stimuliert die BDNF-Expression in zerebralen Endothelzellen**

- 5.4.1. Die Wirkung vasoaktiver Pharmaka auf die  
BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen **84**
- 5.4.2. Nebivolol erhöht die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen **86**
- 5.4.3. Nebivolol-behandelte Mäuse zeigen  
eine erhöhte BDNF-mRNA-Expression im Herz **88**
- 5.4.4. Die  $\beta_1$ -Adrenozeptorantagonisten Atenolol und Metoprolol  
verändern die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen nicht **90**
- 5.4.5. Der  $\beta_3$ -Adrenozeptorantagonist Cyanopindolol hebt  
die stimulierende Wirkung von Nebivolol auf die  
BDNF-mRNA-Expression nicht auf **92**
- 5.4.6. Die Wirkung von Nebivolol auf die  
BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen ist NO-unabhängig **94**

5.4.6.1. Der stimulierende Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen wird durch den NOS-Inhibitor L-NAME nicht aufgehoben	94
5.4.6.2. Die BDNF-mRNA-Expression von bEnd.3-Zellen wird durch exogenes NO nicht verändert	94
5.4.6.3. Nebivolol hat keinen Einfluss auf die eNOS-mRNA-Expression und eNOS-Aktivität in bEnd.3-Zellen	95
<b>6. Diskussion</b>	
<b>6.1. Die stimulierende Wirkung von BDNF auf die Angiogenese in HUVEC wird durch die Rezeptoren TrkB und p75<sup>NTR</sup> vermittelt</b>	<b>100</b>
<b>6.2. TNF-<math>\alpha</math> reduziert die BDNF-Expression in peripheren Endothelzellen</b>	<b>102</b>
6.2.1. Die reduzierende Wirkung von TNF- $\alpha$ auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch den TNFR1 vermittelt	103
6.2.2. TNF- $\alpha$ reguliert die BDNF-mRNA-Expression auf dem Niveau der Transkription	103
6.2.3. TNF- $\alpha$ reduziert die Angiogenese in HUVEC	105
<b>6.3. PKC-Aktivierung reduziert die BDNF-Expression in peripheren Endothelzellen</b>	<b>106</b>
6.3.1. PKC-Aktivierung reguliert die BDNF-mRNA-Expression auf dem Niveau der Transkription	108
6.3.2. Die Reduktion der BDNF-mRNA-Expression durch PMA wird über eine Aktivierung der PKC-Isoformen $\delta$ vermittelt	109
6.3.3. TNF- $\alpha$ reduziert die BDNF-mRNA-Expression PKC-unabhängig	110
<b>6.4. Nebivolol stimuliert die BDNF-Expression in zerebralen Endothelzellen und Mäuseherzen</b>	<b>111</b>
6.4.1. Die Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression ist substanzspezifisch	113
6.4.2. Die stimulierende Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression verläuft NO-unabhängig und wird nicht über den $\beta_3$ -Adrenozeptor vermittelt	113

<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>116</b>
<b>8. Veröffentlichungen</b>	<b>118</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>119</b>

## I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Synthese und Freisetzung von BDNF (Lessmann *et al.*, 2003)

Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen TrkB-Rezeptorisoformen (Tapia-Arancibia *et al.*, 2004)

Abb. 3: Physiologische Funktionen von BDNF im neuronalen und peripheren System (Duda and Jain, 2005)

Abb. 4: Schematische Darstellung der zellulären Prozesse während einer akuten Ischämie (Danton and Dietrich, 2004)

Abb. 5a: BDNF stimuliert die Angiogenese in HUVEC.

Abb. 5b: BDNF stimuliert die Angiogenese in HUVEC – Quantitative Auswertung.

Abb. 6: Der stimulierende Einfluss von BDNF auf die Angiogenese in HUVEC wird durch die Inhibition der Rezeptoren TrkB und p75<sup>NTR</sup> aufgehoben.

Abb. 7: TNF- $\alpha$  reduziert konzentrationsabhängig die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen.

Abb. 8: TNF- $\alpha$  reduziert konzentrationsabhängig die BDNF-mRNA-Expression in HUVEC.

Abb. 9: TNF- $\alpha$  reduziert zeitabhängig die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen.

Abb. 10: Die reduzierende Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch den TNFR1-Antagonisten WP9QY aufgehoben.

Abb. 11: TNF- $\alpha$  hat keine Wirkung auf die BDNF-mRNA-Stabilität.

Abb. 12: Durch die Inhibition der Transkription durch DRB wird der reduzierende Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression aufgehoben.

Abb. 13a: TNF- $\alpha$  reduziert die Angiogenese in HUVEC.

Abb. 13b: TNF- $\alpha$  reduziert konzentrationsabhängig die Angiogenese in HUVEC.

Abb. 14: PKC-Aktivatoren reduzieren die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen.

Abb. 15: PMA reduziert die BDNF-mRNA-Expression konzentrationsabhängig in EA.hy 926-Zellen.

Abb. 16: PMA reduziert zeitabhängig die BDNF-mRNA-Expression in HUVEC.



- Abb. 17: PMA vermindert die mRNA-Stabilität von BDNF in EA.hy 926-Zellen nicht.
- Abb. 18: Der reduzierende Einfluss von PMA auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch die Inhibition der Transkription mit Actinomycin D aufgehoben.
- Abb. 19: Der Einfluss von PMA auf die PKC-Isoform  $\delta$  in EA.hy 926-Zellen
- Abb. 20: Die PKC-Inhibitoren Rottlerin und Gö 6983 heben den reduzierenden Einfluss von PMA auf die BDNF mRNA Expression auf.
- Abb. 21: Der reduzierende Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch den PKC-Inhibitor Gö 6983 nicht aufgehoben.
- Abb. 22: PMA reduziert die BDNF-Protein-Expression HUVEC.
- Abb. 23: Der Einfluss vasoaktiver Pharmaka auf die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen
- Abb. 24: Nebivolol erhöht konzentrationsabhängig die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen.
- Abb. 25: Nebivolol-behandelte Mäuse zeigen eine erhöhte BDNF-mRNA-Expression im Herz.
- Abb. 26: Die  $\beta_1$ -Adrenozeptorantagonisten Atenolol und Metoprolol verändern die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen nicht.
- Abb. 27: Der  $\beta_3$ -Adrenozeptorantagonist Cyanopindolol hebt die stimulierende Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression nicht auf.
- Abb. 28: Die stimulierende Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen wird durch den NOS-Inhibitor L-NAME nicht aufgehoben.
- Abb. 29: Die BDNF-mRNA-Expression von bEnd.3-Zellen wird durch exogenes NO nicht verändert.
- Abb. 30: Nebivolol verändert die eNOS-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen nicht.
- Abb. 31: Nebivolol hat keinen Einfluss auf die eNOS-Aktivität in bEnd.3-Zellen.

## II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Medien und Medienzusätze für die Kultivierung eukaryotischer Zellen

Tab. 2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Tab. 3: Inkubationspuffer für die Blockierung und der Primär- und Sekundärantikörper bei der Western-Blot-Analyse

Tab. 4: Zusammensetzung des Radioimmunassays beim RFL-6-Reporterzell-Assay

Tab. 5: Eingesetzte PKC-Inhibitoren mit ihrem Wirkspektrum für die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$

### III. Abkürzungsverzeichnis

A549/8	humane Alveolarepithel-Karzinomzelllinie
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	“Brain-derived neurotrophic factor”
bEnd.3	murine zerebrale Endothelzelllinie
BH <sub>4</sub>	(6R-)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
cpm	Zählrate pro Minute (“counts per minute”)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	“Dulbecco’s modified Eagle’s medium”
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRB	5,6-Dichloro-1-β-D-Ribofuranosylbenzimidazol
DTT	3,4-Dithiothreitol
EA.hy 926	Fusionsprodukt aus der A549/8 Zelllinie mit HUVEC
ECGS/H	“Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin“

---

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
Fa.	Firma
FCS	fetales Kälberserum ("fetal calf serum")
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
HBSS	"Hanks' buffered saline solution"
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HUVEC	humane Umbilikalvenen-Endothelzellen
HWZ	Halbwertszeit
Hz	Hertz
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin-Methylester
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
mRNA	messenger-RNA
MW	Mittelwert
NaAcetat	Natriumacetat

---

nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NONOate	N-(2-Aminoethyl)-N-(2-Hydroxy-2-Nitrosohydrazino)-1,2-Ethylendiamin
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysi
PBS	“Phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDBu	Phorbol-12,13-Dibutyrat
4 $\alpha$ PDD	4 $\alpha$ -Phorbol-12,13-Didecanoat
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RFL-6	fetale Rattenlungen-Fibroblastenzelllinie
RIA	Radioimmunassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	reverse Transkription
qRT-PCR	quantitative real time RT-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SEM	“Standard error of mean“
SIN-1	3-Morpholino-Sydnonimin

SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TBS	“Tris-buffered saline”
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VEGF	“vascular endothelial growth factor”
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1. Der „brain-derived neurotrophic factor“ – BDNF

### 1.1.1. Die Familie der Neurotrophine

Der in den frühen 1950er Jahren von Rita Levi-Montalcini, Stanley Cohen und Victor Hamburger entdeckte und charakterisierte „nerve growth factor“ (NGF) (Cohen, 1954; Levi-Montalcini, 1987) galt für eine lange Zeit als das prototypische Neurotrophin. 1982 gelang es Barde *et al.* (Barde *et al.*, 1982) ein neuronales Protein aus Schweinehirn zu isolieren, welches das Zellüberleben sensorischer Neurone förderte. Dieses Protein nannte er „brain-derived neurotrophic factor“, oder kurz BDNF. Es zeigte sich, dass BDNF und NGF untereinander eine sehr hohe Homologie in der Proteinsequenz aufwiesen (Leibrock *et al.*, 1989). Mittlerweile umfasst die Familie der Neurotrophine eine Gruppe aus sechs basischen Proteinen: Neben BDNF und NGF konnten die Neurotrophine -3 (NT3) (Ernfors *et al.*, 1990; Hohn *et al.*, 1990; Maisonpierre *et al.*, 1990), -4/5 (NT4/5) (Berkemeier *et al.*, 1991; Hallbook *et al.*, 1991), -6 (NT6) (Gotz *et al.*, 1994) und -7 (NT7) (Lai *et al.*, 1998) isoliert und charakterisiert werden, wobei die Neurotrophine NT6 und NT7 nur in Fischen vorkommen. Die Gruppe der Neurotrophine zeichnet sich durch eine Reihe von Gemeinsamkeiten aus. So bestehen sie alle aus einer ähnlichen Anzahl an Aminosäuren (118-120 AS), besitzen ein ähnliches Molekulargewicht von ca. 12 kDa und weisen eine 50%-ige Homologie in ihrer Proteinsequenz auf. Alle Neurotrophine werden als Propeptide synthetisiert, durch Convertasen zum reifen Protein gespalten und agieren als Dimere. Der Begriff Neurotrophin wurde mit der Aufstellung der Neurotrophinhypothese durch Rita Levi-Montalcini und Stanley Cohen geprägt (Hamburger, 1982; Oppenheim, 1991; Purves, 1988). Diese Hypothese beschreibt Neurotrophine als trophische Faktoren, die von Zielzellen in limitierter Zahl ausgeschüttet werden und an bestimmte Oberflächenrezeptoren neuronaler Zellen binden. Neurone konkurrieren um die Bindung dieser Neurotrophine. Können sie genügend Neurotrophine binden, so wird durch deren Bindung eine Kaskade ausgelöst, die die Apoptose, den programmierten Tod der Zelle, verhindert. Neurone,

die nicht genügend trophische Faktoren binden können, werden apoptotisch und sterben.

### **1.1.2. Das BDNF-Gen – Transkription und regulatorische Elemente**

Das BDNF-Gen ist im humanen Genom auf Chromosom 11 lokalisiert (11p13) (Maisonpierre *et al.*, 1991) und besteht 5´ aus vier nicht kodierenden Exonen I-IV, die verschiedene Promotoren enthalten. Das 3´ gelegene Exon V kodiert für das reife BDNF-Protein (Timmusk *et al.*, 1993). Durch den Start der Transkription an den vier möglichen Promotoren entstehen vier mRNA-Transkripte mit je zwei möglichen Polyadenylierungsstellen, was letztendlich zu der Entstehung von acht verschiedenen mRNA-Transkripten führt. Die biologische Funktion der acht unterschiedlichen mRNA-Transkripte ist bisher noch unbekannt, da alle acht Transkripte für ein identisches BDNF-Protein kodieren. Bisher nimmt man an, dass die Existenz mehrerer Promotoren auf eine gewebsspezifische Expression des BDNF-Gens zurückzuführen ist bzw. gewebsspezifisch unterschiedliche Promotoren aktiviert werden. So konnte man in der Ratte zeigen, dass mRNA-Transkripte, die die Exone I, II und III enthalten, hauptsächlich im Gehirn vorkommen, wohingegen Exon IV enthaltende mRNA-Transkripte vorwiegend peripher exprimiert werden (Bishop *et al.*, 1994; Timmusk *et al.*, 1993). Nach der Prozessierung der prä-mRNA entstehen durch zwei mögliche Polyadenylierungsstellen letztendlich zwei reife mRNA-Transkripte mit einer Länge von 1,6 bzw. 4,2 kb.

Mehrere regulatorische Elemente konnten bisher auf dem BDNF-Gen identifiziert werden. Hierzu gehört das „neuron-restrictive silencer element“ (NRSE) (Timmusk *et al.*, 1999), ein „estrogen-responsive element“ (ERE) (Sohrabji *et al.*, 1995), drei „calcium-responsive elements“ (CaRE1, CaRE2 und CaRE3/CRE) (Finkbeiner, 2000) und ein „glucocorticoid-responsive element“ (GRE) (Schaaf *et al.*, 2000).



### 1.1.3. Das BDNF-Protein – Synthese und Sekretion

Das BDNF-Protein wird als 249 AS langes Prä-Pro-Vorläuferprotein an ER- (Endoplasmatisches Reticulum) gebundenen Ribosomen synthetisiert und anschließend in das Lumen des ER sekretiert (Halban and Irminger, 1994; Merighi, 2002). Nach der Sekretion wird die 18 AS lange Prä-Signalsequenz abgespalten und das Pro-Vorläuferprotein, bestehend aus der 113 AS langen Pro-Sequenz und der 118 AS langen Sequenz des reifen BDNF-Proteins, wird in Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert. Im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) akkumulieren die BDNF-Vorläuferproteine und werden dann über den konstitutiven oder regulierten Signalweg sekretiert (Merighi, 2002). Bei der konstitutiven Sekretion spalten Convertasen die Pro-Sequenz des BDNF-Proteins bereits im TGN ab. Die Abspaltung durch Convertasen findet typischerweise am C-Terminus der Pro-Sequenz hinter einem Paar basischer Aminosäuren (Arginin-Arginin oder Lysin-Arginin) statt (Seidah *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999). Das reife BDNF-Protein wird in Vesikeln zur Zellmembran transportiert; eine Freisetzung des BDNF-Proteins verläuft unabhängig von einem intrazellulären Calciumanstieg und benötigt keine zusätzliche Stimulation (Halban and Irminger, 1994; Hokfelt *et al.*, 2000). Der konstitutive Signalweg der BDNF-Sekretion ist in allen Zelltypen vorhanden und aktiv. Bei der regulatorischen Sekretion hingegen wird die Pro-Sequenz des BDNF-Proteins erst auf dem Weg zur Zellmembran in sekretorischen Vesikeln durch Convertasen abgespalten. Das reife BDNF-Protein verweilt in diesen sekretorischen Vesikeln an der Zellmembran; eine Fusion mit der Zellmembran und eine Freisetzung des BDNF-Proteins verläuft streng calciumabhängig. Die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran findet sehr häufig in Bereichen statt, die stark cholesterinhaltig sind (Lang *et al.*, 2001). Eine Übersicht der BDNF-Synthese und -Freisetzung ist in Abb. 1 zusammenfassend dargestellt.

Nach der Freisetzung von BDNF bindet es an seinen spezifischen Rezeptor TrkB, einer Tropomyosin-verwandten Tyrosin-Kinase, oder an den unselektiven und niedrig affinen Rezeptor p75<sup>NTR</sup>. Beide Rezeptoren werden im nächsten Kapitel näher beschrieben.

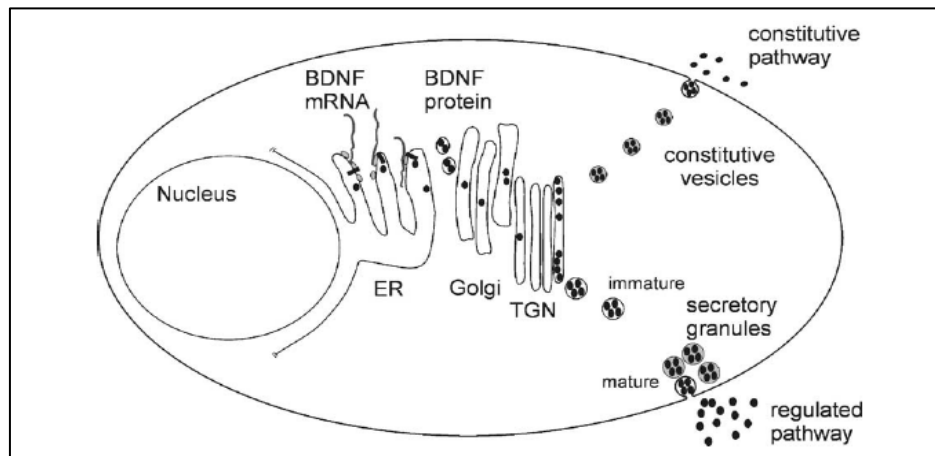


Abb. 1: Synthese und Freisetzung von BDNF (Lessmann *et al.*, 2003)

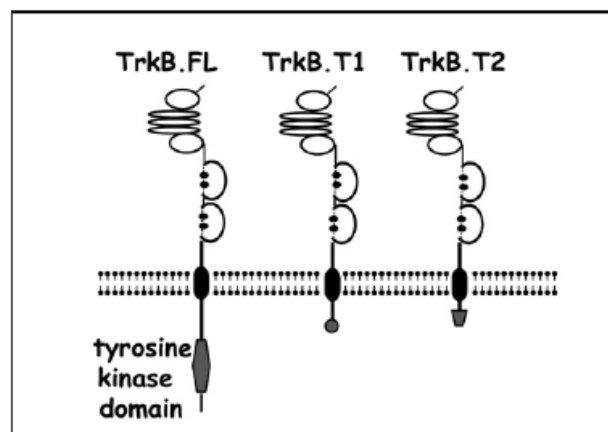
#### 1.1.4. Die BDNF-Rezeptoren TrkB und p75<sup>NTR</sup>

Eine selektive Bindung der Neurotrophine findet über die hoch affinen Rezeptoren der Trk-Rezeptorfamilie statt. Hierbei handelt es sich um Tropomyosin-verwandte Tyrosin-Kinasen, die in drei unterschiedlichen Isoformen existieren. TrkA bindet hierbei selektiv NGF. BDNF und NT4 werden durch TrkB gebunden und NT3 interagiert mit TrkC. Mit einer sehr geringen Affinität kann NT3 auch an den TrkB-Rezeptor binden (Lee *et al.*, 2001).

Trk-Rezeptoren beschreiben eine Gruppe aus transmembranären Tyrosin-Kinasen mit einer stark konservierten intrazellulären Domäne. Eine Bindung von BDNF an seinen Rezeptor TrkB bewirkt die Dimerisierung und Phosphorylierung des Rezeptors. Intrazellulär wird die Tyrosin-Kinase-Domäne aktiviert, die dann unterschiedliche Signalkaskaden induzieren kann. Hierzu gehören Signalwege, die durch MAPK („Mitogen-activated protein kinase“), PI3K („Phosphoinositide-3-kinase“), PLC- $\gamma$  („Phospholipase C- $\gamma$ “), Ras oder die Cdc42/Rac/RhoG-Proteinfamilie kontrolliert werden (Chao, 2003; Kaplan and Miller, 2000; Patapoutian and Reichardt, 2001).

Durch alternatives Spleißen der TrkB-mRNA können drei verschiedene TrkB-Rezeptoren entstehen (Klein *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 1989; Middlemas *et al.*, 1991). Hierzu gehört der vollständige und unverkürzte Rezeptor TrkB.FL, der ausschließlich

im ZNS exprimiert wird (Klein *et al.*, 1990), sowie zwei verkürzte Formen des TrkB-Rezeptors (TrkB.T1 und TrkB.T2). Den verkürzten Formen fehlt die intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne, sie besitzen nur einen kurzen zyttoplasmatischen Fortsatz (Klein *et al.*, 1990; Middlemas *et al.*, 1991). Dennoch sind die verkürzten Formen der TrkB-Rezeptoren biologisch aktiv. So konnte für den TrkB.T1-Rezeptor in Gliazellen gezeigt werden, dass er die Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>)-vermittelte Calciumfreisetzung reguliert (Rose *et al.*, 2003). Weiterhin sollen die verkürzten Formen als Ligandenfänger fungieren, um die lokale Verfügbarkeit von Neurotrophinen zu regulieren (Biffo *et al.*, 1995; Fryer *et al.*, 1997). Mehrere Studien zeigten außerdem ihre funktionelle Bedeutung während Entwicklung und Gedächtnisbildung oder nach verletzungsbedingten Gewebsveränderungen (Goutan *et al.*, 1998; Saarelainen *et al.*, 2000a; Saarelainen *et al.*, 2000b; Venero and Hefti, 1998; Yacoubian and Lo, 2000). Eine schematische Darstellung der verschiedenen TrkB-Rezeptoren ist in Abb. 2 gezeigt.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen TrkB-Rezeptorisoformen (Tapia-Arancibia *et al.*, 2004)**

Neben der Bindung der Neurotrophine an ihre jeweiligen hoch affinen Trk-Rezeptoren werden alle Neurotrophine auch von dem unselektiven und niedrig affinen Rezeptor p75<sup>NTR</sup> gebunden. Dieser Rezeptor gehört zur TNF-Rezeptor Superfamilie (Bothwell,

1995; Kaplan and Miller, 2000). Ihm fehlt eine intrazelluläre katalytische Domäne; eine Signalweiterleitung erfolgt über Protein-Protein-Interaktionen und über die für den Rezeptor typische intrazelluläre Todesdomäne (Hempstead, 2002; Lee *et al.*, 2001). Ähnlich wie für den TNF- $\alpha$  Rezeptor 1 (TNFR1), ebenfalls einem Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie, konnte auch für den p75<sup>NTR</sup> eine Interaktion der Todesdomäne mit Mitgliedern der „TNF receptor-associated factor“ (TRAF) Proteinfamilie und dem „TNF receptor-associated death domain protein“ (TRADD) gezeigt werden (El Yazidi-Belkoura *et al.*, 2003; Gentry *et al.*, 2004; Khursigara *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 1999). Die Induktion von verschiedenen Signalwegen durch den p75<sup>NTR</sup> ist vielfältig. Hierzu gehört zum einen die Induktion der Apoptose durch p75<sup>NTR</sup>, zum anderen konnte durch Aktivierung des p75<sup>NTR</sup> aber auch eine Förderung von Zellüberleben, Zellmigration, synaptischer Plastizität und neuronalem Wachstum gezeigt werden (Barrett, 2000; Dechant and Barde, 2002). Wird der p75<sup>NTR</sup> mit dem Trk-Rezeptor koexprimiert, so kann er die Affinität der Neurotrophine für ihre jeweiligen Trk-Rezeptoren erhöhen (Bibel *et al.*, 1999; Hempstead, 2002).

## 1.2. BDNF - Physiologische Funktionen

### 1.2.1. Funktionelle Bedeutung von BDNF im neuronalen System

Durch immunhistochemische Analysen im Rattenhirn konnte gezeigt werden, dass BDNF in sehr vielen zerebralen Arealen exprimiert wird. So fand sich eine Expression des BDNF-Proteins im Cortex, Cerebellum, Vorderhirn, Hippocampus, Hypothalamus, Striatum und Stammhirn (Kato-Semba *et al.*, 1997; Kawamoto *et al.*, 1996; Nawa *et al.*, 1995). Hierbei sind der Hippocampus und der Hypothalamus die Gehirnregionen, die BDNF am stärksten exprimieren (Yan *et al.*, 1997). Nach der klassischen Neurotrophinhypothese (siehe Kapitel 1.1.1.) sind die Funktionen von BDNF als limitierter trophischer Faktor, der die Zelle vor der Apoptose schützt, während der neuronalen Entwicklung sehr vielfältig (Henderson, 1996; Lewin and Barde, 1996; McAllister *et al.*, 1999). So hat BDNF einen stimulierenden Einfluss auf die neuronale Zellproliferation und Migration, auf das neuronale Zellüberleben, die Neurogenese und Morphogenese. BDNF wirkt neuroprotektiv, besitzt chemotaktische Wirkung und

soll bei Prozessen wie z.B. der synaptischen Plastizität eine Rolle spielen. So kann die funktionelle Vielfalt von BDNF während der neuronalen Entwicklung beliebig weiter ausgeführt werden, lässt sich aber mit den folgenden drei Hauptfunktionen zusammenfassen: Förderung von Überleben, Wachstum und Differenzierung neuronaler Zellen.

Eine starke Expression von BDNF ist allerdings nicht nur während der neuronalen Entwicklung zu beobachten, auch im adulten Stadium können hohe Konzentrationen an Neurotrophinen im Rattenhirn festgestellt werden. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass BDNF eine physiologische Funktion auch nach der Embryogenese besitzt. So zeigen mehrere Studien, dass Neurotrophine Mediatoren synaptischer und morphologischer Plastizität sind (McAllister *et al.*, 1999; Schinder and Poo, 2000; Thoenen, 1995; Thoenen, 2000). Neurotrophine sowie ihre Rezeptoren werden in Gehirnregionen hoher Plastizität stark exprimiert. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Lerntraining sowie die Bildung von Kurz- und Langzeitgedächtnis BDNF-mRNA-Spiegel erhöhen (Alonso *et al.*, 2002; Mizuno *et al.*, 2003; Yamada and Nabeshima, 2003). Des Weiteren kann die BDNF-mRNA und -Proteinexpression durch Faktoren wie Stress und physische Aktivität beeinflusst werden (Tapia-Arancibia *et al.*, 2004). Zwei weitere wichtige und interessante Funktionen von BDNF sind sein stimulierender Einfluss auf die Neurogenese und seine protektive Wirkung unter ischämischen Bedingungen (siehe auch Kapitel 1.3.5.). So konnte die Rekrutierung neuronaler Vorläuferzellen um das 2,5-Fache in BDNF-überexprimierenden Gehirnregionen von Rattenhirnen erhöht werden (Benraiss *et al.*, 2001). Mongolische Wüstenmäuse, denen ein BDNF-exprimierender Vektor injiziert wurde, wiesen eine um 70% reduzierte Apoptose im Vergleich zu Kontrolltieren nach induzierter Ischämie auf (Shirakura *et al.*, 2004). Somit wird deutlich, dass BDNF sowohl während der Embryogenese als auch im adulten Stadium ein wichtiger Mediator von Wachstum, Differenzierung, Überleben und Protektion neuronaler Zellen ist.

### 1.2.2. Funktionelle Bedeutung von BDNF im peripheren System

Nachdem eine deutlich stimulierende Wirkung von BDNF auf Wachstum, Differenzierung, Überleben und Protektion neuronaler Zellen zu beobachten war (siehe Kapitel 1.2.1.), lag die Frage nahe, ob BDNF auch außerhalb des neuronalen Systems exprimiert wird und dort eine mögliche funktionelle Bedeutung hat. So konnte man BDNF-Expressionen im Darm (Hoehner *et al.*, 1996) und in der Milz (Yamamoto, 1996) während der Entwicklungsphase und im Plasma von Mensch und Ratte nachweisen (Nakahashi *et al.*, 2000). Aktivierte B- und T-Zellen sowie Monozyten setzen ebenfalls BDNF frei (Kerschensteiner *et al.*, 1999). Dies konnte *in vitro* aber auch *in vivo* in entzündlichen Gehirnregionen nachgewiesen werden.

Auch wird BDNF von vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert, die in Herz, Skelettmuskulatur und großen Gefäßen vorkommen (Donovan *et al.*, 2000; Donovan *et al.*, 1995). Die Expression von BDNF ist hier während der späten Entwicklung bis ins Erwachsenenstadium zu beobachten. Hier konnte BDNF eine funktionelle Bedeutung bei der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques und Läsionen zugeschrieben werden. Ahmte man eine vaskuläre Verletzung durch künstliche Entfernung des Endothels in Rattenaorten nach, so stieg die Expression von BDNF und seines Rezeptors TrkB im Bereich der vaskulären Verletzung als auch bei der Neointimabildung stark an (Donovan *et al.*, 1995). Die Neointimabildung ist ein wichtiger Prozess bei der Entstehung von atherosklerotischen Plaques. Weiterhin konnten Kraemer *et al.* zeigen, dass BDNF eine chemotaktische Wirkung auf vaskuläre glatte Muskelzellen besitzt (Kraemer *et al.*, 2005). So führte die reduzierte Expression des TrkB-Rezeptors zu einer stark verminderten Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen in Mäusen, die mit einer stark fetthaltigen Nahrung gefüttert wurden. BDNF scheint also die Rekrutierung vaskulärer glatter Muskelzellen regulieren zu können, welches ein kritischer Prozess bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen ist.

Weiterhin konnte ein Vorkommen und eine Funktion von BDNF in Endothelzellen beobachtet werden. So wird BDNF sowohl von zerebralen (Bayas *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004) als auch peripheren Endothelzellen, wie humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC), exprimiert (Bayas *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006). Mehrere physiologische Funktionen konnten BDNF im Endothel

zugeschrieben werden. So hat die BDNF-Expression in arteriellen und kapillaren intramyokardialen Endothelzellen während der Herzentwicklung eine besondere Bedeutung (Donovan *et al.*, 2000). BDNF fördert hier den Zell-Zell-Kontakt der Endothelzellen untereinander und hemmt deren Apoptose. So zeigen BDNF-defiziente Mäuse eine gestörte Herzgefäßentwicklung und eine gesteigerte Apoptoserate der Endothelzellen. Dies führt zu Blutungen, einer verminderten Kontraktilität des Herzens und zu einem frühen postnatalen Tod der Tiere. BDNF-überexprimierende Tiere hingegen zeigen eine stark erhöhte Kapillardichte im sich entwickelnden Herz. BDNF hat somit einen deutlichen Einfluss auf die Angiogenese. Die stimulierende Wirkung von BDNF auf die Angiogenese von Endothelzellen bestätigen ebenfalls Daten von *Hu et al.* und *Sun et al.* (Hu *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* stimuliert BDNF die Migration und Tubulusbildung von Endothelzellen. Neben der Fähigkeit von BDNF Neoangiogenese induzieren zu können, konnten Kermani *et al.* zusätzlich eine chemotaktische Wirkung von BDNF auf hämatopoetische Vorläuferzellen beobachten (Kermani *et al.*, 2005). BDNF-transfizierte Mäuse zeigten eine stark erhöhte Anzahl an hämatopoetischen Vorläuferzellen im Blut im Vergleich zu Kontrolltieren. Gleichzeitig zeigten diese Tiere einen verbesserten Blutfluss nach induzierter Ischämie. Die durch BDNF induzierte Neoangiogenese scheint somit ein kombinierter Effekt aus direkter Wirkung auf lokal vorhandene Endothelzellen und Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen zu sein.

Durch die Aspekte, die unter Kapitel 1.2.1. und 1.2.2. beschrieben worden sind, wird deutlich, dass sich die Funktionalität von BDNF nicht nur auf das neuronale System beschränkt. Abb. 3 fasst die wichtigsten Funktionen und Wirkorte von BDNF zusammen.

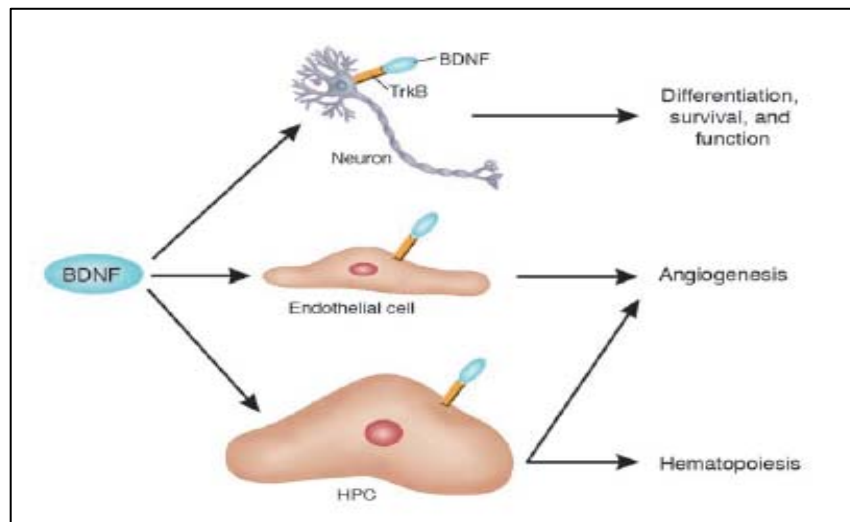


Abb. 3: Physiologische Funktionen von BDNF im neuronalen und peripheren System (Duda and Jain, 2005)

### 1.3. BDNF unter pathologischen Bedingungen

#### 1.3.1. BDNF und Epilepsie

Mehrere neurodegenerative Erkrankungen lassen sich mit einer veränderten BDNF-Expression in Verbindung bringen. So ist eine erhöhte BDNF-mRNA- und -Proteinexpression nach induzierten epileptischen Anfällen in Hippocampus, Hypothalamus und Cortex von adulten Ratten zu beobachten (Isackson *et al.*, 1991). Des Weiteren konnte man für BDNF in Epilepsie-Rattenmodellen zeigen, dass das Auslösen eines epileptischen Anfalls durch intrahippocampale Infusion von BDNF verhindert bzw. verzögert wird (Larmet *et al.*, 1995). Die Gabe von Antiepileptika in Pilocarpin-behandelten Ratten führte außerdem zu einer erhöhten Synthese von



BDNF in Gehirnregionen des *Status epilepticus* (Biagini *et al.*, 2001). Die Bedeutung von BDNF bei Epilepsie scheint so unumstritten zu sein. Erste Studien zeigen, dass BDNF die Aktivität und Expression von GABA-Rezeptoren PKC-abhängig reguliert (Palma *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2006).

### 1.3.2. BDNF und Depression

Auch bei dem Krankheitsbild der Depression spielt BDNF eine Rolle. Zwar kann eine genetische Prädisposition eine Rolle bei dem Ausbruch der Krankheit spielen und Faktoren wie Stress haben ebenso Einfluss auf den Krankheitsverlauf (Kessler, 1997). Mittlerweile zieht man allerdings als Ursache für die Krankheit Mechanismen in Betracht, die das Zellüberleben und die neuronale Plastizität regulieren. So weisen Patienten mit diagnostizierter schwerer Depression erniedrigte BDNF-Spiegel im Serum auf (Karege *et al.*, 2002). Gleichzeitig wurden erhöhte BDNF-Konzentrationen postmortal im Hippocampus von depressiven Patienten beobachtet, die mit Antidepressiva behandelt wurden (Chen *et al.*, 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass nicht nur BDNF, sondern auch sein Rezeptor TrkB im zerebralen Cortex durch Antidepressiva in seiner Aktivität gesteigert wird (Saarelainen *et al.*, 2003). BDNF scheint also auch hier ein wichtiger Modulator im Krankheitsbild der Depression zu sein. So fordert z.B. Shelton für die weitere Erforschung der Depression eine Analyse der Regulation bestimmter Signalwege, wie der Proteinkinase A und C (PKA und PKC), die wiederum bestimmte Schlüsselgene regulieren, zu denen er auch BDNF zählt (Shelton, 2007).

### 1.3.3. BDNF und Morbus Alzheimer

Neben der Depression ist Morbus (M.) Alzheimer eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen älterer Menschen (Murer *et al.*, 2001), die sich durch einen massiven Verlust der kognitiven Fähigkeiten auszeichnet. Die Ursachen des Krankheitsbildes sind viel diskutiert. So nimmt man zum einen eine reduzierte Expression von Neurotrophinen und ihrer Rezeptoren als eine Ursache der Alzheimerentstehung an (Connor and Dragunow, 1998). Tatsächlich zeigen Hippocampus und parietaler

Cortex reduzierte BDNF-Spiegel in postmortal untersuchten Alzheimer-Patienten (Hock *et al.*, 2000). Auch ist die Konzentration von BDNF im Serum von Alzheimer-Patienten erniedrigt (Yasutake *et al.*, 2006). Eine veränderte bzw. reduzierte TrkB-Expression und -Aktivität konnte ebenfalls in Alzheimer-Patienten gefunden werden (Allen *et al.*, 1999; Boissiere *et al.*, 1997). Eine typische pathologische Erscheinung des M. Alzheimer ist die Degeneration cholinergischer Neurone (Lindsay *et al.*, 1994; Siegel and Chauhan, 2000), die als Folge einer reduzierten BDNF-Expression angenommen wird. So konnte eine schützende und stimulierende Wirkung von BDNF *in vivo* als auch *in vitro* auf das Zellüberleben cholinergischer Neurone im Hippocampus nachgewiesen werden (Connor and Dragunow, 1998; Murer *et al.*, 2001). Ist die trophische Wirkung von BDNF bei der Alzheimer-Krankheit reduziert, führt dies zur Degeneration cholinergischer Neurone und Entstehung der Krankheit.

Weiterhin konnte eine regulierende Wirkung von BDNF auf den Promotor des „beta-amyloid-precursor-protein“ (APP) beobachtet werden (Ruiz-Leon and Pascual, 2001). Die Regulation dieses Proteins scheint ein wichtiger Prozess bei der Ausbildung von Plaques zu sein, die zur Senilität führen können.

Ein genetischer Polymorphismus in der Prosequenz des BDNF-Vorläuferproteins wurde ebenfalls mit degenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer in Zusammenhang gebracht (Hariri *et al.*, 2003). Dieser Polymorphismus hat zwar keinen Einfluss auf die Funktion des reifen BDNF-Proteins, jedoch ist der Transport und die Sekretion von BDNF (siehe 1.1.3.) verändert, was reduzierte BDNF-Spiegel in Alzheimer-Patienten erklären könnte.

Eine weitere Erforschung der Rolle von BDNF bei M. Alzheimer, vor allem auch als therapeutisches Zielgen, scheint so viel versprechend zu sein.

#### **1.3.4. BDNF und Morbus Parkinson**

Eine weitere neurodegenerative und weit verbreitete Erkrankung ist M. Parkinson. Hier führt ein Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra zu motorischen Dysfunktionen (Siegel and Chauhan, 2000). Bis heute sind die Ursachen dieser Erkrankung noch wenig verstanden, aber auch hier konnte ein Zusammenhang zu einer veränderten BDNF-Expression gefunden werden. So zeigen

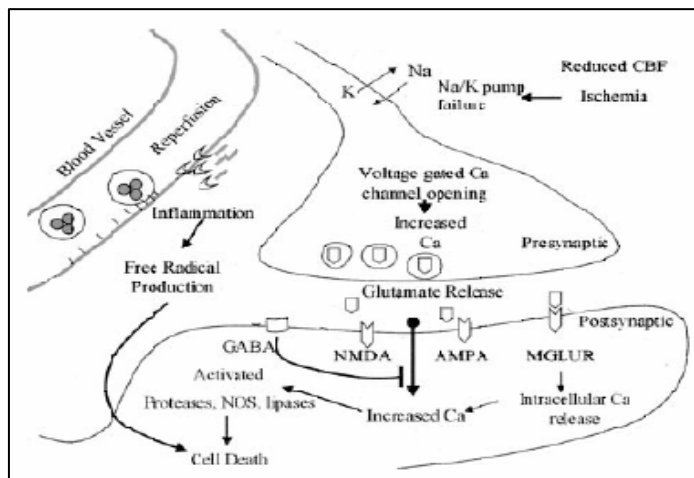
Patienten, die an M. Parkinson erkrankt sind, eine reduzierte BDNF-Proteinexpression in der Substantia nigra (Parain *et al.*, 1999). Sawada *et al.* beobachteten in aktivierten Mikrogliazellen von Substantia nigra und Hippocampus, die aus Autopsiegewebe von Parkinson-Patienten stammten, erniedrigte BDNF-mRNA- und -Proteinspiegel (Nagatsu and Sawada, 2005; Sawada *et al.*, 2006). Gleichzeitig war die Konzentration von TNF- $\alpha$  in diesen Regionen stark erhöht. Ähnliche Ergebnisse zeigen die Daten von Nagatsu *et al.*. Auch hier ist die BDNF-Expression in der Substantia nigra von Parkinson-Patienten stark erniedrigt (Nagatsu *et al.*, 2000). Eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration korreliert auch hier mit der erniedrigten BDNF-Expression. Außerdem konnten Nagatsu *et al.* zusätzlich zeigen, dass die Expression des TNF- $\alpha$ -Rezeptors 1 (TNFR1) ebenfalls in der Substantia nigra von Parkinson-Patienten erhöht ist. Nagatsu *et al.* sehen die Ursache des M. Parkinson in einer erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentration und eines erniedrigten Neurotrophinspiegels. Beide Ereignisse führen letztendlich zur Apoptose dopaminerger Neurone. Therapeutische Maßnahmen sollten demnach antiinflammatorisch sein und Neurotrophinkonzentrationen erhöhen. Ob eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration Ursache einer reduzierten BDNF-Expression ist, ist noch ungeklärt.

Das Antiparkinsonmedikament Rasagilin, ein irreversibler und selektiver Monoamin-Oxidase-B-Inhibitor, führte in PC12-Zellen der Ratte und humanen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zu einer erhöhten BDNF-Expression (Weinreb *et al.*, 2006). Gleichzeitig war durch die Behandlung eine erhöhte Phosphorylierung der PKC zu beobachten, als auch erhöhte mRNA- und Protein-Expressionen der PKC-Isoformen  $\alpha$  und  $\epsilon$ . Inwieweit ein Zusammenhang zwischen PKC-Aktivierung und BDNF-Expression besteht, bleibt noch zu klären.

### 1.3.5. BDNF und Ischämie

Die dritthäufigste Todesursache in industrialisierten Ländern ist der zerebrale Infarkt oder Schlaganfall (Saraceno, 2002). Hierbei kommt es in Folge einer Gefäßverletzung oder eines Gefäßverschlusses zu einer Minderversorgung der Neurone mit Sauerstoff und Glukose. Ohne Energiequelle versagen die Ionenpumpen

der Membran und die Membran depolarisiert. Es kommt zu einem Einstrom von Natrium und einem Ausstrom von Kalium, in Folge steigt die Calciumkonzentration intrazellulär an. Der Neurotransmitter Glutamat wird präsynaptisch freigesetzt, dessen postsynaptische Bindung an seine Rezeptoren (die ionotropen Rezeptoren AMPA und NMDA sowie metabotrope Glutamatrezeptoren) dort wiederum zu einem intrazellulären Calciumanstieg führt. Dieser Anstieg der Calciumkonzentration aktiviert unter anderem Proteasen und Lipasen, die letztendlich zum Tod der Zelle führen. Eine Wiederdurchblutung der betroffenen Gefäße ist zwar notwendig, zieht aber auch inflammatorische Zellen an, die wiederum Gefäße verengen oder sogar verschließen können. In Folge der Entzündungsreaktion werden Zytokine als auch reaktive Sauerstoffradikale gebildet, die ebenfalls Apoptose induzieren. Abb. 4 zeigt eine Übersicht zu den wichtigsten zellulären Prozessen während einer akuten Ischämie.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der zellulären Prozesse während einer akuten Ischämie (Danton and Dietrich, 2004)**

Auch bei der Ischämie ist eine Regulation und funktionelle Bedeutung von BDNF beschrieben worden. So ist im Cortex und Hippocampus der Ratte eine gesteigerte BDNF-Expression nach einer zerebralen Ischämie zu beobachten (Rickhag *et al.*,

2007). Als frühzeitig reguliertes Gen wird BDNF auch zur Gruppe der so genannten „immediate early genes“ gezählt. Ebenfalls konnte die BDNF-Expression in zerebralen Endothelzellen durch TNF- $\alpha$ -Behandlung und Hypoxie, zwei Faktoren, die auch während einer Ischämie von Bedeutung sind, erhöht werden (Bayas *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004). Periphere Endothelzellen hingegen zeigten eine reduzierte BDNF-Expression durch TNF- $\alpha$ -Behandlung (Bayas *et al.*, 2002). Wang *et al.* konnten in murinen zerebralen Endothelzellen zeigen, dass die erhöhte BDNF-Freisetzung ausgelöst durch Hypoxie von anwesenden reaktiven Sauerstoffradikalen abhängig ist (Wang, 2006), die ebenfalls bei einem zerebralen Infarkt vermehrt produziert werden (siehe Abb. 4). BDNF wird unter ischämischen Bedingungen also deutlich reguliert.

Weiterhin wird BDNF eine schützende Funktion bei Schlaganfällen zugeschrieben. Wie bereits unter Punkt 1.2.1. erwähnt, wirkte BDNF protektiv in Ischämie-Modellen der Mongolischen Wüstenmaus (Shirakura *et al.*, 2004). BDNF-behandelte Mäuse wiesen im Vergleich zu Kontrolltieren eine um 70% reduzierte Zelltodrate im Hippocampus nach induzierter zerebraler Ischämie auf. Somit ist BDNF ein interessantes Zielgen bei einer therapeutischen Behandlung von Schlaganfällen.

Ifendopril, ein NMDA-Rezeptor-Antagonist mit bereits bekannten zytoprotektiven Wirkungen in Tiermodellen der zerebralen Ischämie und bei M. Parkinson, erhöht die BDNF- als auch NGF-Expression in Astrozyten (Toyomoto *et al.*, 2005). Der schützende Einfluss von Ifendopril wird also möglicherweise über eine erhöhte Neurotrophinproduktion vermittelt. Hierbei verläuft die erhöhte NGF-Expression PKC-abhängig. Eine Aktivierung der PKC unter ischämischen Bedingungen ist ebenfalls bereits beschrieben worden. Hierbei werden verschiedene Isoformen der PKC in unterschiedlichen Stadien der Ischämie aktiviert und haben zum Teil gegensätzliche Funktionen (Bright and Mochly-Rosen, 2005; Murriel and Mochly-Rosen, 2003). So soll eine Aktivierung der PKC  $\epsilon$  neuroprotektiv wirken, eine Aktivierung der PKC-Isoform  $\delta$  während der Wiederdurchblutung hingegen fördert die Apoptose. PKC  $\gamma$  kann sowohl schädigend zu Beginn der Ischämie als auch schützend während der Wiederdurchblutung sein.

Eine weitere Studie mit dem Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Reduktase-Inhibitor Atorvastatin im Mausmodell der zerebralen Ischämie zeigt

ebenfalls eine Beteiligung von BDNF bei der Regeneration nach einem Schlaganfall (Chen *et al.*, 2005b). Mäuse, die nach induzierter Ischämie für 14 Tage mit Atorvastatin behandelt wurden, zeigten eine bessere Regeneration im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Anzahl migrierender und sich entwickelnder Neurone als auch die Angiogenese war in Atorvastatin-behandelten Tieren deutlich verbessert. Gleichzeitig zeigten diese Tiere eine erhöhte BDNF- und VEGF-Expression in neuronalen und endothelialen Zellen, die aus ischämischem Gewebe stammten. Für BDNF konnte *in vitro* eine chemotaktische Wirkung auf die Migration neuronaler Zellen gezeigt werden. Zerebrale murine Endothelzellen reagierten auf eine Atorvastatin-Behandlung ebenfalls mit einer erhöhten BDNF-Expression (Chen *et al.*, 2005b).

Die vielen Beispiele zeigen, dass BDNF unter ischämischen Bedingungen deutlich reguliert wird. Auf Grund einer erhöhten BDNF-Expression ist die Regeneration nach einem zerebralen Infarkt deutlich verbessert, wodurch BDNF zu einem interessanten therapeutischen Zielgen wird. Eine weitere Erforschung der Mechanismen der BDNF-Regulation, wie z.B. über PKC-Aktivierung oder Faktoren wie TNF- $\alpha$ , ist deshalb wünschenswert.

## **1.4. Pharmakologische Regulation der BDNF-Expression**

### **1.4.1. BDNF als therapeutisches Schlüsselgen**

Wie bereits in Kapitel 1.3. beschrieben, wird BDNF unter sehr vielen pathologischen Bedingungen und Prozessen reguliert. So sind bei Erkrankungen wie M. Alzheimer, M. Parkinson und Depression erniedrigte BDNF-Konzentrationen bzw. -Expressionen vorzufinden. In einigen Fällen, wie z.B. der Ischämie und Epilepsie, ist sogar eine zellschützende Wirkung durch erhöhte BDNF-Expression/-Konzentration nach künstlicher Induktion der Krankheit im Tiermodell beobachtet worden. Weiterhin konnte eine gesteigerte BDNF-Expression im Tiermodell bzw. in Patienten beobachtet werden, die mit Antiepileptika bzw. Antidepressiva behandelt wurden. BDNF besitzt außerdem auch unter nicht pathologischen Bedingungen vielfältige zellschützende Eigenschaften (siehe Kapitel 1.2.). Eine pharmakologische Regulation

der BDNF-Expression als eine therapeutische Strategie ist somit von Interesse. Bisher allerdings sind klinisch keine Pharmaka bekannt, die BDNF gezielt regulieren. Veränderte BDNF-Expressionen sind bisher nur als pleiotrope Wirkung der jeweiligen Substanz beschrieben worden (siehe Kapitel 1.3.). Eine medikamentöse Gabe von BDNF bei verschiedenen Krankheitsbildern wirft außerdem das Problem auf, ob und wie BDNF an seinen Wirkort gelangen soll. Eine weitere Erforschung der expressionellen Veränderung von BDNF durch verschiedene Pharmaka oder zelleigene Prozesse unter pathologischen Bedingungen ist deshalb von Interesse.

#### **1.4.2. Problematik bisheriger neuroprotektiver Therapien und die Notwendigkeit zusätzlicher Vasoprotektion**

Wie bereits in Kapitel 1.2.2. erläutert, wird BDNF auch im Endothel exprimiert. Dort konnte für BDNF eine stimulierende Wirkung auf die Angiogenese, Tubulusbildung und Migration von Endothelzellen und deren Vorläuferzellen gezeigt werden. Des Weiteren fördert BDNF das Endothelzellüberleben und deren Zell-Zell-Kontakt.

Die Autoren *Danton et al.* und *Fagan et al.* zeigten am Beispiel der Ischämie sehr deutlich die Notwendigkeit ergänzender vasoprotektiver Therapien zu den bisher angewandten neuroprotektiven Behandlungsmöglichkeiten (Danton and Dietrich, 2004; Fagan *et al.*, 2004). Bisherige Studien beschränken sich auf zwei Angriffspunkte, um die Folgen eines zerebralen oder kardialen Infarkts zu minimieren. Zum einen wird versucht, die ischämische Kaskade, die durch die minimierte Versorgung der Zelle mit Sauerstoff und Glukose in Gang gesetzt wird (siehe Abb. 4), zu inhibieren. Hierzu gehören Natrium- und Calciumkanalblocker, Kaliumkanalmodulatoren und Inhibitoren der ionotropen Glutamatrezeptoren AMPA und NMDA sowie der metabotropen Glutamatrezeptoren. Eine Verwendung von Agonisten für den GABA-Rezeptor soll die Zelle ebenfalls vor Schäden schützen, die durch die ausgelöste ischämische Kaskade entstehen. Der GABA-Rezeptor arbeitet hierbei gegenläufig zum Glutamatrezeptor und verhindert bei Aktivierung einen postsynaptischen Calciumeinstrom in die Zelle, der wiederum apoptotische Prozesse fördern würde (Kapitel 1.3.5.). Zum anderen wird versucht, schädigende zelluläre Prozesse zu unterdrücken, die durch eine Wiederdurchblutung der verschlossenen

Gefäße entstehen. Die Wiederdurchblutung ist zwar notwendig, gleichzeitig führt sie aber auch zu einer erhöhten Radikal- und Zytokinproduktion durch rekrutierte inflammatorische Zellen. Inflammatorische Zellen haften über Adhäsionsmoleküle an Endothelzellen an, die nach einer Ischämie in ihrer Expression gesteigert werden. So werden als therapeutische Behandlungsmöglichkeiten Radikalfänger, antiinflammatorische Substanzen sowie Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle in Betracht gezogen. Obwohl die verschiedenen beschriebenen Behandlungsmöglichkeiten bereits erfolgreich schädigende Prozesse einer Ischämie in experimentellen Studien und Tiermodellen minimierten, so zeigte der Einsatz der jeweiligen Substanzen in klinischen Studien keinen Erfolg. Die Autoren Danton und Fagan begründen eine erfolglose neuroprotektive Therapie mit dem Fehlen einer vasoprotektiven Therapie. Solange nicht eine regenerierende Behandlung von Endothelzellen in Betracht gezogen würde, könnten neuroprotektive Strategien keine Verbesserung zeigen. Beschädigte Gefäße könnten zum einen eine ausreichende Versorgung der umliegenden Gewebe mit Nährstoffen nicht gewährleisten, zum anderen könnten auch schützende und regenerierende Faktoren über ein beschädigtes Gefäßnetz nicht zu ihrem Zielgewebe gelangen.

Somit ist die expressionelle Regulation von BDNF, einem Faktor, der unter vielen pathologischen Bedingungen reguliert wird und zusätzlich die Angiogenese stimuliert, in zerebralen und peripheren Endothelzellen, die für eine ausreichende Versorgung von beschädigtem Gewebe unter pathologischen Bedingungen notwendig sind, von Interesse.

#### **1.4.3. Vasoaktive Pharmaka mit pleiotropen Funktionen**

Mehrere vasoaktive Pharmaka mit pleiotropen Funktionen sind bis heute beschrieben worden. Hierbei bezeichnet eine pleiotrope Funktion einer bestimmten Substanz einen Wirkmechanismus, der für die Substanz noch nicht beschrieben worden ist. Ein typisches Beispiel sind die pleiotropen Funktionen von Statinen. Als HMG-CoA Reduktase Inhibitoren werden Statine zur Senkung des Cholesterinspiegels im Blut eingesetzt. Neben dieser Funktion erhöhen Statine außerdem die NO-Bioaktivität und verbessern somit die Endothelfunktion. Sie wirken antioxidativ, antithrombotisch und



inhibieren Entzündungsreaktionen (Endres, 2005). Durch diese zusätzlichen pleiotropen Funktionen wird Statinen eine schützende Funktion bei einer Ischämie zugeschrieben (Laufs *et al.*, 2000). Mit Statinen behandelte Tiere zeigen hier nach induzierter Ischämie im Vergleich zu Kontrolltieren einen erhöhten zerebralen Blutfluss in betroffenen Geweben und eine verringerte Infarktgröße.

Neben Statinen wird auch anderen vasoaktiven Substanzen eine pleiotrope Funktion zugeschrieben (Garcia-Donaire *et al.*, 2004). Blutdrucksenkende Substanzen wie Angiotensin-Converting-Enzym- (ACE-) Inhibitoren, Antagonisten des Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1 (AT1-Antagonisten) oder Antagonisten des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors ( $\beta$ -Blocker) zeigten in mehreren klinischen Studien (z.B. HOPE, PROGRESS, LIFE, ACCESS, EUROPA) ein reduziertes Schlaganfallrisiko bedingt durch die antihypertensive Therapie. Eine Blutdrucksenkung fiel hier allerdings meist geringer aus als durch die antihypertensive Therapie erwartet bzw. war die Reduktion des Schlaganfallrisikos größer als erwartet. Vor allem die Beobachtung, dass auch bei nicht hypertensiven Patienten die Behandlung zu einem reduzierten Schlaganfallrisiko führte, erweckte den Verdacht, dass andere pleiotrope Funktionen und schützende Mechanismen der Pharmaka hier von Bedeutung sind, die blutdruckunabhängig die Zelle schützen. So wird vermutet, dass vasoaktive Pharmaka möglicherweise Faktoren regulieren, von denen bekannt ist, dass sie das vaskuläre System schützen. Zu diesen Faktoren zählt man z.B. Angiopietin 1/2, VEGF („vascular endothelial growth factor“), bFGF („basic fibroblast growth factor“), SOD (Superoxid-Dismutase), Bcl2 sowie Iap (Fagan *et al.*, 2004).

Ob möglicherweise BDNF, welches die Angiogenese in Endothelzellen stimuliert und ihr Überleben fördert, ebenfalls durch antihypertensive Medikamente oder Statine reguliert wird, und somit das Überleben der Zelle z.B. bei einer Ischämie fördert, ist bisher noch unbekannt.

## 2. Ziel der Arbeit

Bei mehreren Krankheitsbildern ist eine veränderte BDNF-Expression zu beobachten. Parallel tritt oft ein erhöhter TNF- $\alpha$ -Spiegel bzw. eine Aktivierung der PKC auf. Ob ein erhöhter TNF- $\alpha$ -Spiegel bzw. eine PKC-Aktivierung Ursache der veränderten BDNF-Expression ist, ist bis heute noch ungeklärt.

Weiterhin ist von mehreren vasoaktiven Pharmaka bekannt, dass sie unabhängig von ihrer bekannten blutdruck- bzw. cholesterinsenkenden Wirkung das Schlaganfallrisiko reduzieren. Aus diesem Grund werden weitere Mechanismen und Gene in Betracht gezogen, die durch diese Pharmaka reguliert werden könnten, so z.B. auch BDNF, und so die Zelle schützen.

Ziel der Arbeit war deshalb die Analyse der Regulation der BDNF-Expression durch TNF- $\alpha$ , PKC-Aktivierung und vasoaktive Pharmaka wie Statine, ACE-Inhibitoren, AT1-Rezeptorantagonisten und  $\beta$ -Adrenozeptorantagonisten in peripheren und zerebralen Endothelzellen.

Sollte ein regulierender Einfluss verschiedener Substanzen auf die BDNF-Expression gefunden werden, so sollten weitere Mechanismen der Regulation untersucht werden. Weiterhin sollte der Einfluss von BDNF bzw. TNF- $\alpha$  auf die Angiogenese von HUVEC analysiert werden.

Ein besseres Verständnis der expressionellen Veränderungen von BDNF unter pathologischen Bedingungen bzw. der Einfluss verschiedener Pharmaka auf die BDNF-Expression könnte dann genutzt werden, um weitere therapeutische Strategien zu entwickeln.

### 3. Materialien

#### 3.1. Laborgeräte

<u>Art des Gerätes</u>	<u>Gerätebezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Brutschrank	Hera Cell	Heraeus
	Function Line	
Gefrierschrank		Liebherr
Gelelektrophoresekammer	Mini Protean II für Protein	BIO-RAD
Gewebehomogenisator	Tissue Lyser	Qiagen
Heizplatte mit Magnetrührer	Ikamag RCT	Janke&
		Kunkel
Hochgeschwindigkeitszentrifuge	J2-MC mit Rotor: JA 14	Beckmann
Kamera	Digital Camera DXM 1200	Nikon
Kreisschüttler	Polymax 1040	Heidolph
Kühlschrank		Liebherr
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Mikroplatten Lesegerät	Sunrise	Tecan
	Fluostar Optima	BMG
		Lab-
		technologies
Mikroskop		Olympus
Multipipette	Multipipette	Eppendorf
PCR-Maschine	iCycler	BIO-RAD
pH-Meter	inoLab	Labotec

Photometer	GeneQuant RNA/DNA	Pharmacia
	Calculator	
Pipetten, verstellbar	1-10 µl	Gilson
	10- 100 µl	Gilson
	100-1000 µl	Gilson
Sonicator (Ultraschallstab)	Ultrasonic processor XL	Heat Systems
Stahlkugeln		Retsch
Stromgeber	Power PAC 300	BIO-RAD
Sterile Werkbank	Biohazard	BDK
Szintillationszähler	Tri-Carb 460 CD Cobra QC	Packard
Thermo-Inkubationsmischer	Thriller	PeQLab
Tischzentrifuge	Biofuge 13 Centrifuge 5417C Microfuge Lite	Heraeus Eppendorf Beckmann
Vakuumzentrifuge	Speed Vac SC-110 mit Kühlfalle, Vapor Trap RVT 100	Sarvant
Vortexer	Vortexer VF2	Janke& Kunkel
	Vortex-Genie 2	Scientific Ind.
Waagen	Analytic Explorer Pro Adventurer Pro	Sartorius Ohaus Ohaus
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Plus	Millipore/ Waters

---

Wasserbad	Certomat WR	Braun
$\gamma$ -Strahlen-Zähler	Cobra 5200	Packard

## 3.2. Chemikalien

### 3.2.1. Allgemeine Chemikalien

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma, Roth oder Calbiochem/Merck bezogen.

Acrylamid-Lösung, 30% (37,5:1)	Applichem
ActinomycinD	Calbiochem/Merck
Adenosintriphosphat (ATP)	Biomol
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma
Bicinchonininsäure (BCA)	Sigma
Bradford-Reagenz, 40%-ige Lösung	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Applichem
Butanol	Sigma
Calciumionophor, A23187	Sigma
Cantharidin	Calbiochem/Merck
Chloroform	Riedel-de Häen
Collagenase B	Roche
5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-Ribofuranosylbenzimidazol (DRB)	Calbiochem/Merck
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma

---

3,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
$\gamma$ -Globulin	Sigma
Glucose	Roth
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma
Isopropanol	Roth
Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat Lösung	Sigma
2-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
3-Morpholino-Sydnominin (SIN-1)	Sigma
Natriumacetat	Roth
N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME)	Sigma
Ortho-Vanadat	Sigma
Pefabloc <sup>®</sup>	Roth
Phenol	Roth
Sepiapterin	Sigma
Szintillationsflüssigkeit Luma Safe	Perkin Elmer
Superoxid-Dismutase (SOD)	Roche
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Tris	Roth
Triton-X	Sigma
Tween <sup>®</sup> -20	Roth

Wortmannin

Calbiochem/Merck

**3.2.2. Spezielle Chemikalien**4 $\alpha$ -PDD

Calbiochem/Merck

Atenolol

Sigma

Atorvastatin

freundlicherweise zur  
Verfügung gestellt von  
Hartmut Kleinert

BDNF (rekombinant, human)

R&amp;D Systems

Captopril

Sigma

Cyanopindolol

Sigma

Gö 6976

Calbiochem/Merck

Gö 6983

Calbiochem/Merck

K-252a

Calbiochem/Merck

Losartan

Cayman Chemicals

Metoprolol

Sigma

Mevastatin

Sigma

Nadolol

Sigma

Nebivololhydrochlorid

Janssen Pharmaceutica

(Spermine-) NONOate

Calbiochem/Merck

p75<sup>NTR</sup> Signalling Inhibitor (TAT-Pep5)

Calbiochem/Merck

PDBu

Calbiochem/Merck

PMA

Calbiochem/Merck

Ramipril

Sigma

D77

25

Rottlerin	Calbiochem/Merck
Telmisartan	Sigma
TNF- $\alpha$	Strathmann
VEGF	BD Biosciences
WP9QY	Calbiochem/Merck

### 3.2.3. Radiobiochemika

$^{125}\text{I}$ -cGMP	Biotrend
Spezifische Aktivität: 81,4 Tbq/mmol	
$\gamma$ - Strahler, HWZ: 60 Tage	

## 3.3. Verbrauchsmaterialien

### 3.3.1. Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Entwickler, LX 24	Kodak
Fixierer, AL 4	Kodak
Mikroplatten, 96-Loch	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• für PCR</li> <li>• für Proteinbestimmung, klar</li> </ul>	PeQLab
Nitrozellulose-Transfermembran, Protran®	Sarstedt/Greiner
Parafilm® „M“	Schleicher & Schuell
Pasteur-Kapillarpipetten, 150 mm	Merck
PCR-Film	Roth
Polystyrolröhrchen (15 ml, 50 ml)	PeQLab
	Sarstedt/Greiner



Pipettenspitzen	Sarstedt /Greiner
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,5-10 µl</li> <li>• 10-100 µl</li> <li>• 100-1000 µl</li> </ul>	
Reaktionsgefäße	Sarstedt/Greiner
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,5 ml</li> <li>• 1,5 ml</li> <li>• 2 ml</li> </ul>	
Röntgenfilm, Hyperfilm™ ECL	Amersham
Sterilfilter, 0,2 µM	Schleicher & Schuell
Szintillationsröhrchen mit Stopfen (5 ml, 75 x 12 mm)	Greiner
Whatman-Papier 3MM	Machery & Nagel

### 3.3.2. Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden steril von Greiner oder Sarstedt bezogen.

Einweg-Auslaufpipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml
Gewebekultur-Petrischalen	Durchmesser/Wachstumsfläche (cm/cm <sup>2</sup> ): 14,5/145; 9,4/58 und 6,0/21
Kryo-Röhrchen	2 ml
Makroplatten	24-Loch, 12-Loch, 6-Loch Wachstumsfläche pro Loch (cm <sup>2</sup> ): 2,0; 3,9; 9,5

Mikroplatten	96-Loch; schwarz, weiß oder klar Wachstumsfläche pro Loch (cm <sup>2</sup> ): 0,35
Transfektionsröhrchen	Polystyrol, Durchmesser/Länge (mm): 18,0/95 und 12,4/75
Zellkulturflaschen, Filter Top	Kulturfläche/Volumen (cm <sup>2</sup> /ml): 75/250, 25/50
Zellschaber	25 cm

### 3.4. Puffer und Lösungen

Alle folgenden Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit *Aqua bidest.* angesetzt. Puffer und Lösungen, die zur Bearbeitung und Aufbewahrung von RNA dienen, wurden mit DEPC-Wasser hergestellt. HBSS und PBS wurden steril von der Fa. Invitrogen bezogen. Die Konzentration, die hinter der jeweiligen Substanz angegeben ist, bezeichnet die Endkonzentration im Puffer.

#### 3.4.1. Puffer und Lösungen für die Gewinnung von Gesamt-RNA

##### Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

##### DEPC-Wasser

500 ml *Aqua bidest.* wird mit 100 µl DEPC-Wasser versetzt, über Nacht bei 37°C geschüttelt und anschließend 60 Minuten autoklaviert.

GIT-Puffer

Guanidiniumisothiocyanat, 4 M	250 g
Natriumcitrat, 25 mM, pH 7	17,6 ml
Laurylsarcosin, 0,5%	26,4 ml
DEPC-Wasser	293 ml

Guanidinisothiocyanat wird in DEPC-Wasser bei 60°C gelöst. Unmittelbar vor Gebrauch wird 2-Mercaptoethanol (0,1 M) zugesetzt. Der Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert.

Wasser-gesättigtes Phenol

1 kg des bei 4°C gelagerten, kristallinen Phenols wird bei 68°C im Wasserbad geschmolzen. Anschließend werden 1,3 l DEPC-Wasser zugegeben. Die Lösung wird über Nacht bei 4°C gerührt und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

TE-Puffer, 1x

Tris Ultra, 10 mM, pH 8,0	5 ml, 1 M Lösung
EDTA, 1 mM, pH 8,0	1 ml, 0,5 M Lösung

Die Lösungen werden mit *Aqua bidest.* auf 500 ml aufgefüllt und vor Gebrauch autoklaviert. Der Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert.

**3.4.2. Puffer und Lösungen für die Proteinextraktion aus Zellen**Puffer A

Tris Ultra, 50 mM, pH 7,4	3,03 g
EDTA, 0,5 mM	93,06 mg
EGTA, 0,5 mM	95,09 mg

Die Substanzen werden mit *Aqua bidest.* auf 500 ml aufgefüllt und der Grundpuffer wird bei 4°C gelagert.

Vor Gebrauch werden auf 100 ml Grundpuffer folgende Substanzen frisch zugegeben:

DTT, 2 mM	30,84 mg
Glutathion, 7 mM	215,11 mg
Glycerin, 10%	10 g
Pefabloc <sup>®</sup> , 25 µM	500 µl
CHAPS, 20 mM	1,2 g (Zugabe nur bei Isolierung von Membranproteinen)
NaCl, 1 M	5,844 g (Zugabe nur bei Isolierung von Membranproteinen)

Der pH-Wert wird gemessen und gegebenenfalls auf pH 7,4 neu eingestellt.

#### RIPA-Puffer

Tris Ultra, 50 mM, pH 8,0	605,7 mg
NaCl, 150 mM	87,66 mg
NP-40 (Igepal CA-630), 1%	1 g
Natriumdesoxycholat, 0,5%	500 mg
SDS, 0,1%	100 mg

Die Substanzen werden auf 100 ml mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.

Der Puffer wird bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wird der Proteaseinhibitor Pefabloc<sup>®</sup> (25 µM) frisch zugefügt.

### **3.4.3. Puffer und Lösungen für die Western-Blot-Analyse**

#### Elektroblotting Puffer

Tris Ultra, 25 mM	3,03 g
Glycin, 192 mM	14,4g
Methanol, 20%	200 ml

Die Substanzen werden auf 1 Liter mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.

Der Puffer wird bei 4°C gelagert.

Laufpuffer für die Elektrophorese, 5x

Tris Ultra, 125 mM	15 g
Glycin, 960 mM	72 g
SDS, 0,5%	5 g

Die Substanzen werden auf 1 Liter mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.

Der Puffer wird bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wird die Stammlösung 1:5 mit *Aqua bidest.* verdünnt.

Ponceau S-Färbelösung

Ponceau S, 0,5%

Eisessig, 1%

Probenpuffer, 2-fach konzentriert

Tris-HCl, 125 mM, pH 6,8	1,51 g
SDS, 4%	4,0 g
EDTA, 2 mM	74,4 mg
Glycerin, 20%	20,0 g
Bromphenolblau, 0,02%	20 mg

Die Substanzen werden auf 100 ml mit *Aqua bidest.* aufgefüllt und anschließend filtriert. Vor Gebrauch werden dem Puffer 10% 2-Mercaptoethanol frisch zugefügt.

Der Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert.

TBS-Puffer, 10-fach konzentriert, pH 7,6

Tris Base, 0,5 M	61,0 g
------------------	--------

NaCl, 9 %	90,0 g
-----------	--------

Die Substanzen werden zu 1 Liter mit *Aqua bidest.* gelöst und der pH-Wert mit HCl auf pH 7,6 eingestellt. Vor Gebrauch wird der Puffer mit *Aqua bidest.* 1:10 verdünnt. Der Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert.

**3.4.4. Puffer und Lösungen für den RFL-6-Reporterzell-Assay**Antikörper-Verdünnungspuffer

Natriumacetat-Puffer	50 mM
----------------------	-------

BSA	0,01%
-----	-------

Der Puffer wird bei 4°C gelagert.

Anti-cGMP-Antikörper-Verdünnung, 10 µM

## Antikörper-Verdünnungspuffer

Anti-cGMP-Antikörper, 10 mM	1:1000 im Puffer
-----------------------------	------------------

γ-Globulin-Lösung, 1%

γ-Globulin, 1%	1 g
----------------	-----

NaAcetat, 50 mM	100 ml
-----------------	--------

1 g γ-Globulin wird mit NaAcetat (50 mM) auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei 4°C gelagert.

Locke's Lösung, 10-fach konzentriert

NaCl, 154 mM	90 g
KCl, 5,6 mM	4,18 g
MgCl <sub>2</sub> , 1 mM	2,03 g
HEPES, 10 mM	23,83 g
NaHCO <sub>3</sub> , 3,6 mM	3,02 g

Die Substanzen werden mit *Aqua bidest.* auf 900 ml aufgefüllt und ein pH von 7,4 wird mit NaOH eingestellt. Anschließend wird die Lösung auf 1 Liter mit *Aqua bidest.* ergänzt und autoklaviert.

Der Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert.

Vor Gebrauch wird die 10-fache Stammlösung mit *Aqua bidest.* 1:10 verdünnt und 50,5 mg Glucose sowie 14,7 mg CaCl<sub>2</sub> werden pro 100 ml Lösung zugesetzt.

Natriumacetat-Puffer, 20-fach konzentriert (1000 mM)

NaAcetat, 1M	41,02 g/ auffüllen auf 500 ml mit <i>Aqua bidest.</i>
Essigsäure, 1M	28,5 ml /auffüllen auf 500 ml mit <i>Aqua bidest.</i>

NaAcetat wird zur Essigsäure gegeben, bis ein pH von 4,0 erreicht ist. Dies entspricht etwa 250 ml NaAcetat auf 500 ml Essigsäure. Vor Gebrauch wird der 20-fache Puffer 1:20 auf 50 mM verdünnt.

Der Puffer wird bei 4°C gelagert.

### 3.5. Nährmedien, Zusätze und Beschichtungslösungen für die Zellkultur

DMEM (ohne Phenolrot, mit 1000mg/l Glucose, Pyridoxin-HCl und Natriumhydrogencarbonat)	Sigma
DMEM (mit Phenolrot, 4500mg/l Glucose und L-Glutamin)	PAA
ECGS/H-2	Promocell
FCS	Perbio
Gelatine, 2%-ige Lösung	Sigma
GlutaMAX™	Invitrogen
HAT	Invitrogen
Ham's F12 Medium (mit GlutaMAX™)	Invitrogen
Matrigel™ Matrix (ohne Phenolrot, wachstumsfaktorreduziert)	BD Biosciences
Medium 199 (M 199) (mit GlutaMAX™ und Earle's Salzen)	Invitrogen
Natrium-Pyruvat-Lösung	PAA
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
PBS	Invitrogen
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA



### 3.6. Zelllinien und verwendete primäre Zellen

<u>Zellen</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Bezug</u>
bEnd.3	murine zerebrale Endothelzelllinie	ATCC (CRL-2299)
EA.hy 926	humane Endothelzelllinie (Fusionsprodukt aus A549/8 und HUVEC)	Cora-Jean S. Edgell University of North Carolina (USA)
HUVEC	primäre humane Umbilikalvenen- Endothelzellen	Hildegardis- Krankenhaus, Mainz (Bezug der Nabelschnüre für die Isolierung)
RFL-6	fetale Rattenlungen- Fibroblastenzelllinie	ATCC (CCL-192)

### 3.7. Antikörper

#### 3.7.1. Primäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>mono-/polyklonal</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Bezug</u>
$\beta$ -Tubulin	monoklonal	1:5000	Sigma
PKC $\delta$	polyklonal	1:2000	Santa Cruz Biotech.

#### 3.7.2. Sekundäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Bezug</u>
Anti-Maus IgG aus Kaninchen, Peroxidase-konjugiert	1:5000	Sigma
Anti-Kaninchen IgG aus der Ziege, Peroxidase-konjugiert	1:5000	Sigma

### 3.8. Marker

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (11-170 kDa) Fermentas

### 3.9. Kits und Reagenzien

CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay	Promega
BDNF E <sub>max</sub> ® ImmunoAssay System	Promega
peqGOLD TriFast™	peqLab
QuantiTect® Probe RT-PCR Kit	Qiagen
TRI REAGENT™	Sigma
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer

### 3.10. Oligonukleotide

Alle Primer und Sonden für die quantitative „real time“ RT-PCR wurden von Applied Biosystems bezogen. Der „TaqMan® Gene Expression Assay“ besteht aus einem vorgefertigten 20-fach Mix, der genspezifische unmarkierte PCR Primer und die markierte TaqMan® Sonde enthält. Diese ist am 5'-Ende mit dem Reporterfluorophor FAM™ und am 3'-Ende mit einem nicht fluoreszierenden Quencher markiert.

<u>Gen</u>	<u>Assay-ID</u>
BDNF	HS00156058_m1
eNOS	HS00167166_m1
TBP	HS00427620_m1
GAPDH	HS99999905_m1

### **3.11. Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden männliche C57BL/6J Mäuse verwendet. Der Umgang mit den Tieren fand in Übereinstimmung mit den Vorschriften des Landesuntersuchungsamts Rheinland-Pfalz statt (AZ: 177-07/031-25).

## 4. Methoden

### 4.1. Zellbiologische Arbeitsmethoden

#### 4.1.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der adhärennten Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% (HUVEC, RFL-6) bzw. 10% (bEnd.3, EA.hy 926) CO<sub>2</sub>-Begasung in entsprechenden Kulturgefäßen. Ein Medienwechsel erfolgte je nach Zelllinie alle zwei bis vier Tage. Von den jeweiligen Zellen benötigte Medien und Medienzusätze sind in Tab.1 aufgeführt. Alle Arbeiten mit den Zellen fanden unter einer „Laminar Flow“ unter keimarmen Bedingungen statt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium der Zellen abgesaugt und die Zellen wurden dann mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und ein Teil der Zellen weiter kultiviert. Je nach Bedarf wurden die restlichen Zellen gezählt (siehe Kapitel 4.1.2.) und in entsprechende Kulturschalen oder Lochplatten für Versuche ausgesät. Hierbei wurden die HUVEC in Kulturflaschen bzw. -schalen oder Lochplatten ausgesät, die mit Kollagen oder Gelatine beschichtet waren. Alle anderen Zellen konnten in unbeschichteten Flaschen, Schalen oder Lochplatten in Kultur genommen werden.

Tab. 1: Medien und Medienzusätze für die Kultivierung eukaryotischer Zellen

Zellen	Medium	Medienzusätze
bEnd.3	DMEM (mit Phenolrot, 4500 mg/l Glucose und L-Glutamin)	FCS, 10 % Penicillin/Streptomycin, 1x
EA.hy 926	DMEM (ohne Phenolrot, mit 1000 mg/l Glucose)	FCS, 10%; GlutaMAX™, 1x; HAT, 1x Natrium-Pyruvat-Lösung, 1x Penicillin/Streptomycin, 1x
HUVEC	M199	FCS, 20% ECGS/H, 0,2% Penicillin/Streptomycin, 1x
RFL-6	Ham's F12	FCS, 15% Penicillin/Streptomycin, 1x

#### 4.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer, die auch als Hämocytometer bezeichnet wird. Hierbei werden die Zellen in Zellsuspension nach der Ablösung durch Trypsin/EDTA (siehe Kapitel 4.1.1.) am Rand der Kammer aufgetragen. Die Kapillarkräfte saugen dann die Zellsuspension in die Kammer, die ein definiertes Volumen von 0,9 µl fassen kann. Anschließend erfolgt die Auszählung der Zellen in den vier großen Eckquadraten des Hämocytometers. Aus dem Mittelwert der vier Zellzählungen multipliziert mit  $10^4$  ergibt sich die Zellzahl pro Milliliter. Eventuell erstellte Verdünnungen vor der Zählung müssen bei der Berechnung mit einbezogen werden. Nach Ermittlung der Zellzahl in der Suspension können dann je Versuchsbedingung Zellen in bestimmter Dichte in Kulturschalen oder Lochplatten ausgesät werden.

#### 4.1.3. Stimulation der Zellen

Die Stimulation der Zellen für die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte in 6- bzw. 12-Lochplatten. Für den BDNF-ELISA zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden ebenfalls 6-Lochplatten verwendet. Die Stimulation von Zellen für die Isolierung von Protein wurde in Gewebekultur-Petrischalen mit einem Durchmesser von 14,5 oder 6cm durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in den jeweiligen Platten oder Schalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. 24 Stunden vor Beginn des Versuchs wurde das Kulturmedium gegen ein FCS reduziertes Medium von 1% FCS ausgetauscht. Durch diese Serumreduktion befinden sich alle Zellen im gleichen Zellzyklusstadium; eine bessere Stimulierbarkeit der Zellen ist gegeben. Am darauf folgenden Tag erfolgte dann die Stimulation der Zellen mit den jeweiligen Substanzen im Kulturmedium. Bei Einsatz von Inhibitoren wurden diese 30 min vor Zugabe der jeweiligen Substanz vorinkubiert. Unstimulierte Zellen erhielten als Kontrolle das jeweilige Lösungsmittel der eingesetzten Substanz in entsprechender Konzentration.

#### 4.1.4. Matrigel™-Angiogenese-Assay

Die Untersuchung des Einfluss von BDNF und TNF- $\alpha$  auf die Angiogenese, dem Prozess der Gefäßbildung, erfolgte mit Hilfe der „Matrigel™ Matrix“. Diese „Matrigel™ Matrix“ ist ein Extrakt aus dem Engelbreth-Holm-Swarm Tumor und besteht aus einer löslichen Basalmembran mit den Hauptbestandteilen Laminin, Kollagen IV, Entactin und zahlreichen Wachstumsfaktoren. Auf dieser Basalmembran ist es Endothelzellen möglich, morphologisch zu kapillarähnlichen Strukturen zu differenzieren. Nachdem die „Matrigel™ Matrix“ bei Raumtemperatur bzw. 37°C geliert ist, können Zellen auf dem Matrigel ausplattiert werden. Nach 12 bis 24 Stunden bilden die Zellen auf dem Matrigel ein Netzwerk aus kapillarähnlichen Strukturen aus. Durch Zugabe verschiedener Substanzen kann deren stimulierender oder inhibitorischer Einfluss auf die Angiogenese untersucht werden.

Die Durchführung des „Matrigel™-Angiogenese-Assays“ erfolgte mit konfluenten HUVEC. Sechs Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium der Zellen gegen ein serumreduziertes Medium von 1% FCS (inkl. ECGS/H) gewechselt, um die Konzentration möglichst vorhandener Wachstumsfaktoren zu reduzieren, die im Serum

enthalten sein können und Einfluss auf die Angiogenese haben könnten. In 96-Lochplatten wurden pro Loch 80 µl des bei 4°C noch flüssigen Matrigels ausplattiert und 30 min bei 37°C inkubiert, damit eine Gelierung des Matrigels stattfindet. Währenddessen wurden HUVEC durch Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst, gezählt und eine Zellsuspension von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml hergestellt (Medium 199, 1% FCS, ohne ECGS/H). Hiervon wurden 100 µl pro Loch inklusive der zu analysierenden Substanzen auf das gelierte Matrigel ausplattiert, was einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/Loch entspricht. Teilweise eingesetzte Inhibitoren wurden vor Zugabe der Testsubstanz 15 min in der Zellsuspension bei 37°C vorinkubiert. Die Ausbildung der Kapillar-ähnlichen Strukturen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung. Nach 18h wurden die einzelnen 96-Loch-Vertiefungen mikroskopiert und mit einer Nikon Digitalkamera (DXM 1200) fotografiert. Die Auswertung der inhibitorischen bzw. stimulierenden Wirkung der einzelnen Substanzen auf die Angiogenese erfolgte durch Auszählung der Verzweigungspunkte der Zellen untereinander. Hierbei wird jeder von einer Zelle ausgehende Tubulus als eine Verzweigung gezählt. Stößt dieser Tubulus auf eine andere Zelle, so wird dies ebenfalls als eine Verzweigung gezählt. Somit erhält man für einen vorhandenen Tubulus zwischen zwei Zellen zwei Verzweigungspunkte. Pro Behandlung und Versuch wurden jeweils drei 96-Loch-Vertiefungen ausgezählt und hieraus der Mittelwert gebildet.

## **4.2. Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **4.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen**

Um eine Degradierung von RNA durch RNasen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten mit RNA unter Einhaltung bestimmter Vorsichtsmaßnahmen durchgeführt. Hierzu gehört das Tragen von Handschuhen, die Hitzebehandlung aller verwendeten Gefäße und das Behandeln von Wasser, welches für ein Lösen der RNA genutzt wurde, mit DEPC.

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte entweder nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987), oder mit Hilfe der

Reagenzien „peqGOLD TriFast™“ bzw. „TRI REAGENT™“. Hierbei wurde die ursprüngliche Methode von Chomczynski und Sacchi weiter entwickelt, so dass hier gleichzeitig RNA, DNA und Proteine isoliert werden können (Chomczynski, 1993). Die Isolierung von RNA mit Hilfe der Reagenzien „peqGOLD TriFast™“ bzw. „TRI REAGENT™“ erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Die Isolierung von Gesamt-RNA nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987) wurde wie folgt durchgeführt:

Nach der Stimulation (siehe Kapitel 4.1.3.) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 300 µl GIT-Puffer pro Vertiefung einer 6-Lochplatte lysiert. Die Isolierung der RNA erfolgte durch Zugabe von 30 µl NaAcetat (2 M, pH 4,0), 300 µl saurem-wassergesättigtem Phenol und 150 µl einer Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24:1). Die Probe wurde für 15 sec kräftig geschüttelt und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min wurde die obere wässrige Phase abgenommen und die RNA durch Zugabe von 700 µl Isopropanol aus dieser Phase gefällt (1h bei -20°C). Ein Pelletieren der RNA erfolgte durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das RNA Pellet zweimal mit je 1 ml Ethanol (80%) gewaschen, um Reste des Isopropanols zu entfernen. Das getrocknete RNA Pellet wurde in DEPC-Wasser aufgenommen und die gelöste RNA bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **4.2.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben**

Nebivolol-behandelte Mäuse (siehe Kapitel 4.5.) wurden nach der Behandlung getötet, Herz und Gehirn wurden entnommen. Das Gewebe wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Isolierung von RNA bei -70°C gelagert.

Das aufgetaute Gewebe wurde zunächst mit einem Skalpell grob zerkleinert. Die Gewebestücke wurden anschließend in 1 ml GIT-Puffer aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Ein weiterer Gewebeaufschluß fand mit Hilfe des „Tissue Lyser“ der Fa. Qiagen statt. Hierfür wurde in das Reaktionsgefäß eine Stahlkugel zugegeben und das Gewebe im GIT-Puffer bei 30 Hz für 3 min kräftig geschüttelt. 300 µl der erhaltenen Lösung wurden entnommen. Die Isolation der RNA



erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987) wie bereits in Kapitel 3.2.1. beschrieben.

#### 4.2.3. Photometrische Bestimmung der RNA Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer. Bei dieser Wellenlänge absorbieren doppelsträngige Nucleinsäuren. Hierbei entspricht ein OD-Wert von 1 einer RNA Konzentration von 40 µg/ml (doppelsträngige RNA). In einer Quarzküvette wurden 2 µl RNA-Lösung in 98 µl DEPC-Wasser bzw. TE-Puffer verdünnt und die optische Dichte dieser Verdünnung bestimmt. Die Konzentration der RNA in der Lösung berechnete sich dann nach folgender Formel:

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} * \text{Verdünnungsfaktor der RNA} * 40$$

Durch das Verhältnis der optischen Dichte gemessen bei 260 und 280 nm ist eine Aussage über die Reinheit der RNA-Lösung möglich, da Proteine, insbesondere aromatische Aminosäuren, bei 280 nm absorbieren. Proteinfreie Nucleinsäurelösungen haben demnach einen  $\text{OD}_{260/280}$  Quotienten von 1,8-2,0.

#### 4.2.4. Quantitative „real time“ RT-PCR

Mit Hilfe der quantitativen „real time“ RT-PCR (qRT-PCR) können vergleichende Aussagen über die Menge an spezifischer mRNA in einer bestimmten RNA-Lösung getroffen werden. Zum Vergleich dient ein konstitutiv exprimiertes Haushaltsgens wie z.B. TBP oder GAPDH.

Während der qRT-PCR wird zunächst im ersten Schritt die mRNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in eine cDNA komplementär transkribiert. Hierauf folgt eine PCR-Reaktion mit sequenzspezifischen Primern für das zu untersuchende Zielgen. Die mRNA bzw. transkribierte cDNA wird nun durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden quantifiziert. Diese sequenzspezifischen Oligonukleotide sind am 5'-Ende mit einem Reporterfluorophor (FAM<sup>TM</sup>) und am 3'-Ende mit einem nicht fluoreszierenden Quencher (TAMRA) markiert und binden

gemäß der komplementären Basenpaarung an ihre „Ziel-DNA“. Der Bindungsbereich der Sonde liegt hierbei innerhalb des Bereiches, der durch die beiden sequenzspezifischen Primer eingefasst wird. Ist die Sonde intakt, wird auf Grund der räumlichen Nähe von Fluorophor und Quencher die Fluoreszenzemission verhindert. Während der Elongationsphase der PCR wird nun durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase die Sonde in Folge der Strangauffüllung abgebaut. Fluorophor und Quencher werden nun räumlich voneinander getrennt, so dass eine Lichtemission durch den Fluoreszenzfarbstoff entstehen kann. Diese Lichtemission ist proportional zur gebundenen Sonde bzw. zur Menge an vorhandener mRNA/cDNA. Je höher die Konzentration einer bestimmten mRNA/cDNA in der Lösung, desto früher akkumuliert das jeweilige PCR-Produkt. Dementsprechend kann mehr Sonde binden und eine Lichtemission, die einen bestimmten Schwellenwert überschreiten muss, kann zu einem früheren Zyklus in der PCR detektiert werden.

Die qRT-PCR wurde mit dem „QuantiTect® Probe RT-PCR Kit“ der Fa. Qiagen durchgeführt. Sequenzspezifische Primer und Sonden wurden von der Fa. Applied Biosystems bezogen („TaqMan® Gene Expression Assay“). Die Konzentration der Primer in dem 20x Mix beträgt 18 µM pro Primer, die der Sonden 5 µM. Ein qRT-PCR Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

▪ QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix, 2x	10 µl
▪ TaqMan® Gene Expression Assay, 20x	1 µl
▪ QuantiTect® RT Mix	0,2 µl
▪ RNase-freies Wasser	4,8 µl
▪ RNA, 20 ng/µl	4 µl

---

Endvolumen	20 µl
------------	-------

Die Durchführung der „one-step“ qRT-PCR erfolgte im „iCycler“ unter folgenden Bedingungen:

- Reverse Transkription 50°C, 20 min
- Initiale Aktivierung der HotStarTaq Polymerase, 95°C, 15 min  
 Inaktivierung der reversen Transkriptasen  
 (Omniscript™, Sensiscript™)
- PCR-Zyklen (40 Wiederholungen)
  - Denaturierung 94°C, 15 sec
  - Annealing/Extension 60°C, 1 min

Mit Hilfe der durch die Software des iCyclers berechneten  $C_T$ -Werte („threshold cycle“) wurde dann nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001) die relative Expression berechnet. Der  $C_T$ -Wert bezeichnet hierbei den PCR-Zyklus, in dem die Lichtemission einen bestimmten Wert übersteigt und die Amplifikate in die exponentielle Phase übergehen. Die  $C_T$ -Werte der zu untersuchenden Gene werden auf die  $C_T$ -Werte der gleichzeitig analysierten Haushaltsgene normiert.

### 4.3. Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

#### 4.3.1. Isolierung von Gesamtprotein aus Zellen

Nach der Stimulation der Zellen (siehe Kapitel 4.1.3.) wurde das Inkubationsmedium der Zellen abgesaugt und die Zellen auf Eis mit PBS gewaschen. Wurde nicht sofort mit der Isolierung des Gesamtproteins fortgefahren, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Die Isolierung von Gesamtprotein erfolgte durch Lyse der Zellen in RIPA-Puffer. Pro 6cm-Gewebekultur-Petrischale wurden 150 µl RIPA-Puffer zugegeben und die Zellen auf Eis mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend

wurden die Zellen für 15 min bei 4°C geschüttelt, um den Aufschluss der Zellen zu gewährleisten. Alle nicht löslichen Bestandteile der Zelle wurde durch den folgenden Zentrifugationsschritt (14.000 g, 15 min, 4°C) pelletiert. Das Gesamtprotein befindet sich nun im Überstand und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Kapitel 4.3.3.) wurden die Proben bis zur Western-Blot-Analyse bei -70°C gelagert.

#### **4.3.2. Isolierung der Cytosol- und Membranfraktion aus Zellen**

Nach Stimulation der Zellen in einer 14,5cm-Gewebekultur-Petrischale (siehe Kapitel 4.1.3.) wurde das Medium der Zellen abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen der Zellen erfolgten alle weiteren Arbeiten auf Eis. Die Zellen wurden in 800 µl Puffer A mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mit einem Ultraschallstab wurden die Zellen lysiert (Stufe 4, 2x 15 Pulse) und anschließend 1h bei 4°C und 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand mit dem enthaltenen Cytosolprotein wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zur Konzentrationsbestimmung bzw. der Western-Blot-Analyse bei -70°C gelagert. Das verbleibende Pellet wurde erneut in 800 µl Puffer A (inkl. NaCl, 1M) aufgenommen und resuspendiert. Die Lösung wurde bei 4°C und 100.000 g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 800 µl Puffer A (inkl. CHAPS, 20 mM) resuspendiert. Das Lysat wird 30 min bei 4°C geschüttelt und anschließend erneut zentrifugiert (1h, 100.000 g, 4°C). Im Überstand befinden sich nun die durch das Detergenz CHAPS gelösten Membranproteine. Dieser wird wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

#### **4.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA-Test, der auf dem Prinzip der Biuret-Reaktion basiert (Smith *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1988). Hierbei bilden Proteine in alkalischer Lösung mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen einen Komplex aus. Nach Reduzierung der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen können diese einen violetten

Farbkomplex mit Bicinchonininsäure (BCA) bilden. Hierbei ist die Farbintensität direkt proportional zur Proteinkonzentration. Die Absorption kann dann bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden.

In einer klaren 96-Lochplatte wurden 2 µl der Proteinprobe mit 48 µl Wasser verdünnt. Anschließend wurde pro Probe 4 µl CuSO<sub>4</sub> und 196 µl der BCA-Lösung zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C konnte dann die Extinktion bei 595 nm bestimmt werden. Mit Hilfe einer BSA-Verdünnungsreihe, die zur Erstellung einer Eichgeraden diente, konnte dann die Proteinkonzentration in µg/µl berechnet werden.

#### **4.3.4. Proteinkonzentration durch Fällung mit Methanol und Chloroform**

Bei sehr niedrig konzentrierten Proteinlösungen wurden die Proteine durch Methanol und Chloroform gefällt und somit aufkonzentriert (Wessel and Flugge, 1984), da sonst das Fassungsvermögen der Geltasche bei der Gelelektrophorese überschritten wird (siehe Kapitel 4.3.5.). Hierbei werden wässrige Proteinlösungen mit Methanol versetzt und durch Chloroform ausgefällt. Eine Zugabe von Wasser trennt die Lösung in zwei Phasen auf, wobei sich die Proteine in der Interphase befinden. Im Einzelnen wurde wie folgt verfahren:

Die gewünschte Menge Protein (µg) wurde mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und mit 400 µl Methanol, 100 µl Chloroform und 300 µl Wasser versetzt und gemischt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C wurde die obere wässrige Phase abgenommen und verworfen. Die Proteine in der Interphase wurden anschließend mit 300 µl Methanol versetzt, gemischt und 5min bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 10 µl Wasser und 10 µl 2x Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen (siehe Kapitel 4.3.5.) oder bis zum Auftrag bei -20°C gelagert.

#### 4.3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit der eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (Laemmli, 1970). Hierbei bindet die Seife SDS Proteine zu einem negativ geladenen SDS-Protein-Komplex. Zusätzlich denaturiert SDS die Proteine und verhindert die Ausbildung von Tertiär- und Quartärstrukturen. Somit ist eine Auftrennung der Proteine im Netzwerk des Acrylamidgels von Kathode zu Anode möglich, die nur vom Molekulargewicht der Proteine abhängig ist. Hochmolekulare Proteine werden hierbei in einem niedrigprozentigen Acrylamidgel aufgetrennt, niedermolekulare in einem höher prozentigen Gel. Ein niedrigprozentiges Sammelgel, in dem die Proteine räumlich gesammelt werden, überschichtet das Trenngel, in dem dann die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Für die Gelelektrophorese wurde das „Mini Protean II-System“ der Fa. BIO-RAD genutzt. Trenn- und Sammelgel wurden nacheinander gegossen und setzen sich wie folgt zusammen (Tab. 2):

Tab. 2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

	<b>Trenngel 7,5%</b>	<b>Sammelgel 3,9%</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3600 µl	3050 µl
<b>Tris-Ultra; 1,5 M; pH 8,8</b>	1875 µl	
<b>Tris-Ultra; 0,5 M; pH 6,8</b>		1250 µl
<b>Acrylamidlösung, 30% (Mix 37,5:1)</b>	1875 µl	650 µl
<b>SDS, 10%</b>	75 µl	50 µl
<b>TEMED</b>	10 µl	10 µl
<b>APS, 10%</b>	100 µl	100 µl

15 µg Protein wurden mit Wasser und 2x Probenpuffer zu einem Volumen von 20 µl aufgefüllt, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen bzw. bis zum Auftrag bei -20°C gelagert. Überstieg auf Grund einer geringen Proteinkonzentration das Probenvolumen die maximale Füllmenge der Geltasche von

20 µl, so wurde die Probe durch eine Methanol/Chloroform-Fällung eingeeengt (siehe Kapitel 4.3.4.). Die Gelelektrophorese erfolgte in 1x Laufpuffer bei 20 mA (konstant) pro Gel. Ein gleichzeitig auf das Gel aufgetragener Molekulargewichtsmarker diente zur Identifizierung der gesuchten Proteinbande.

#### 4.3.6. Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse werden die in der SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert. Auf dieser Membran können dann durch Zugabe spezifischer Primärantikörper und Enzymgekoppelter Sekundärantikörper einzelne Proteine aus dem Proteingemisch sichtbar gemacht werden (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979).

Der Transfer der Proteine erfolgte bei 200 mA (konstant) für 2h oder bei 90 mA (konstant) über Nacht bei 4°C auf eine Nitrocellulosemembran in Elektrobloiting Puffer. Vor dem Aufbau des Blots wurden Membran und Gel 15 min in Elektrobloiting Puffer bei Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde der Blot wie folgt von der Anode zur Kathode hin aufgebaut:

Anode (+)	Schwammtuch (in Elektrobloiting Puffer getränkt)
	3 Lagen Whatman Papier (in Elektrobloiting Puffer getränkt)
	Nitrocellulosemembran
	Gel
	3 Lagen Whatman Papier (in Elektrobloiting Puffer getränkt)
Kathode (-)	Schwammtuch (in Elektrobloiting Puffer getränkt)

Der gesamte Blot wurde luftblasenfrei in die Blotkammer gestellt, die Kammer mit Elektrobloiting Puffer gefüllt und anschließend wurden die Proteine im elektrischen Feld auf die Membran transferiert. Der Erfolg des Transfers wurde durch eine Färbung des Gels mit Ponceau S-Lösung kontrolliert. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, und im Anschluss kurz mit TBS-Waschlösung gewaschen (TBS, 1x; Tween<sup>®</sup>-20, 0,05%). Die Inkubation der Membran

mit dem Primärantikörper erfolgte eingeschweißt in eine Plastiktüte über Nacht bei 4°C in einem Überkopf-Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x für je 5 min in TBS-Waschlösung gewaschen (TBS, 1x; Tween<sup>®</sup>-20, 0,05%) und anschließend für 1h bei Raumtemperatur mit dem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde erneut gewaschen (3x 5 min in TBS-Waschlösung (TBS, 1x; Tween<sup>®</sup>-20, 0,05%)). Die Visualisierung des Signals erfolgte mit dem „Western Lightning<sup>™</sup> Chemiluminescence Reagent Plus“ nach Angaben des Herstellers. Das entstandene Signal wurde auf einem Röntgenfilm festgehalten.

Inkubationspuffer für die Blockierung und die einzelnen primären und sekundären Antikörper sind in Tab. 3 zusammengefasst dargestellt.

Tab. 3: Inkubationspuffer für die Blockierung und der Primär- und Sekundärantikörper bei der Western-Blot-Analyse

<b>Antikörper</b>	<b>Blockierungspuffer</b>	<b>Inkubationspuffer für den primären Antikörper</b>	<b>Inkubationspuffer für den sekundären Antikörper</b>
<b>B-Tubulin</b>	TBS, 1x BSA, 3% Tween <sup>®</sup> -20, 0,05%	TBS, 1x Milchpulver, 5% Tween <sup>®</sup> -20, 0,05%	TBS, 1x Milchpulver, 5% Tween <sup>®</sup> -20, 0,05%
<b>PKC <math>\delta</math></b>	TBS, 1x BSA, 3% Tween <sup>®</sup> -20, 0,05%	TBS, 1x BSA, 1% Tween <sup>®</sup> -20, 0,05%	TBS, 1x BSA, 1% Tween <sup>®</sup> -20, 0,05%

#### 4.3.7. BDNF-Proteinquantifizierung mittels ELISA

Die Quantifizierung des BDNF-Proteins in Zellüberständen von PMA-behandelten HUVEC fand mit dem „BDNF E<sub>max</sub><sup>®</sup> ImmunoAssay System“ der Fa. Promega nach Angaben des Herstellers statt. Hierbei ist die Konzentration von BDNF direkt proportional zur Absorption bei 450 nm. Nach Stimulation der Zellen (siehe Kapitel 4.1.3.) wurden die Zellüberstände einer 6-Lochplatte abgenommen, aliquotiert und bis



zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. In den ELISA wurden 100  $\mu\text{l}$  des unverdünnten Zellüberstandes eingesetzt.

#### 4.4. RFL-6-Reporterzell-Assay

Der RFL-6 Reporterzell-Assay dient der Quantifizierung von bioaktivem NO, welches aus NO produzierenden Zellüberständen stammt (Forstermann *et al.*, 1990; Ishii *et al.*, 1991). Hierbei bedient man sich fetaler Rattenlungenfibroblasten (RFL-6) als Reporterzellen. Diese exprimieren endogen die lösliche Guanylatcyclase, jedoch keine NO-Synthase. Die lösliche Guanylatcyclase kann durch NO stimuliert werden, welches aus endothelialen Zellüberständen oder von NO-Donatoren wie SIN-1 stammt. Nach der Stimulation durch NO setzt die lösliche Guanylatcyclase GTP zu cGMP um. Hierbei ist die Menge an gebildetem cGMP direkt proportional zu vorhandenen Menge an NO. Die cGMP-Konzentration kann mittels eines Radioimmunassays (RIA) bestimmt werden. Hierbei werden die Zellüberstände von RFL-6-Zellen, die das gebildete cGMP enthalten, zusammen mit radioaktiv markiertem cGMP ( $^{125}\text{I}$ -cGMP) und einem Antikörper gegen cGMP inkubiert. Das radioaktiv markierte und das endogene cGMP konkurrieren um die Bindung mit dem Antikörper. Die cGMP-Antikörper-Komplexe werden anschließend gefällt und die Radioaktivität der Komplexe in einem  $\gamma$ -Szintillationszähler gemessen. Hierbei ist die gemessene Radioaktivität umgekehrt proportional zur vorhandenen Menge an endogenem cGMP und somit ein direktes Maß für die Bestimmung der NO-Konzentration in Endothelzellen.

##### 4.4.1. Transfer

bEnd.3 und RFL-6-Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. 24h vor Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium gegen ein serumreduziertes Medium (1% FCS) gewechselt, das zusätzlich Sepiapterin (10  $\mu\text{M}$ ) enthielt. Sepiapterin ist eine Vorstufe von  $\text{BH}_4$ , welcher ein essentieller Kofaktor der eNOS ist. Die Stimulation der bEnd.3-Zellen fand in 1x Locke's Lösung statt. Vor dem

Transfer und der Stimulation der Zellen fand eine 30-minütige Vorinkubation der Zellen bei 37°C in Locke's Lösung statt, die zusätzlich Arginin (1mM) enthielt, um eine vollständige Versorgung der eNOS zu gewährleisten. Neben Arginin wurde auch die Superoxiddismutase (SOD, 200 U/ml) zugesetzt, die Superoxid abfängt, welches gebildetes NO sofort wieder inaktivieren würde. RFL-6-Zellen wurden ebenso in 1x Locke's Lösung für 30 min bei 37°C vorinkubiert, die den Phosphodiesterasehemmer IBMX (600 µM) enthält, der einen Abbau von gebildetem cGMP durch Phosphodiesterasen verhindert. Die Stimulation der NO-Produktion von bEnd.3-Zellen erfolgte für 3 min bei 37°C in Locke's Lösung (inkl. Arginin und SOD) mit Nebivolol bzw. DMSO als Kontrolle. Nach exakt 3 min wurde der Überstand von den NO-produzierenden bEnd.3-Zellen auf RFL-6-Zellen transferiert, deren Vorinkubationslösung zuvor abgesaugt wurde. Die cGMP-Produktion der RFL-6-Zellen wurde für 2 min mit dem Zellüberstand der bEnd.3-Zellen stimuliert, der Überstand anschließend abgesaugt und die Zellen mit 1 ml NaAcetat (50 mM, pH 4,0) lysiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. RFL-6 Zelllysate, die entweder für 2 min unstimuliert blieben oder mit dem NO-Donator SIN-1 (100 µM) stimuliert wurden, dienten der Berechnung der basalen cGMP-Produktion von RFL-6-Zellen bzw. der Berechnung der maximalen Stimulierbarkeit der löslichen Guanylatcyclase. Hier fand kein Transfer von Zellüberständen statt; die Stimulation der RFL-6-Zellen fand direkt in 1x Locke's Lösung inklusive IBMX (600 µM) statt.

#### **4.4.2. Radioimmunassay (RIA)**

Die bei -80°C gelagerten RFL-6 Zelllysate wurden nach dem Auftauen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert, um mögliche Zellfragmente zu pelletieren. 10 µl des klaren Überstandes wurde dann in den RIA eingesetzt. Die Probe wurde in NaAcetat-Puffer verdünnt und mit <sup>125</sup>I-cGMP und dem anti-cGMP-Antikörper in einem Szintillations-Röhrchen vermischt. Eine cGMP-Verdünnungsreihe diente der Erstellung einer Eichgeraden, mit deren Hilfe dann die Konzentration von endogenem cGMP berechnet werden konnte. Für eine

bessere Übersicht sind die einzelnen Komponenten des RIA in Tab. 4 zusammengefasst dargestellt.

Tab. 4: Zusammensetzung des Radioimmunassays beim RFL-6-Reporterzell-Assay

	<b>Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 4,0)</b>	<b>Standard bzw. RFL-6 Zelllysate</b>	<b><sup>125</sup>I-cGMP, 10.000 cpm</b>	<b>Anti-cGMP Antikörper, 10 µM</b>
<b>Total</b>	-	-	100 µl	-
<b>Leerwert</b>	200 µl + 0,01% BSA	-	100 µl	-
<b>Bindungswert</b>	200 µl	-	100 µl	100 µl
<b>Standard</b>	150 µl	50 µl	100 µl	100 µl
<b>Probe</b>	190 µl	10 µl	100 µl	100 µl

Die Ausbildung der cGMP-Antikörper-Komplexe fand über Nacht bei 4°C statt. Am nächsten Tag wurden die Präzipitate durch Zugabe von 50 µl  $\gamma$ -Globulin-Lösung (1%) und 2,5 ml eiskaltem Isopropanol pro Probe (mit Ausnahme des Totalwertes) bei 4°C und 4000 rpm für 30 min gefällt. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets getrocknet und die Radioaktivität der trockenen Pellet im  $\gamma$ -Szintillationszähler gemessen.

#### 4.5. *In vivo* Versuche an C57BL/J6 Mäusen

Die Untersuchung der BDNF-mRNA-Expression *in vivo* fand in männlichen C57BL/6J Mäusen unter der Leitung von Dr. Huige Li statt. Die Genehmigung erfolgte durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (AZ: 177-07/031-25). C57BL/6J Mäuse wurden für 14 Tage mit Nebivolol-haltigem Futter (30 mg/kg/Tag) gefüttert. Nach der Behandlung wurden die Mäuse getötet. Herz und Gehirn wurden entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Isolierung von Gesamt-RNA (siehe 4.2.2.) wurden die entnommenen Organe bei -80°C gelagert.

## 4.6. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels faktorieller ANOVA („analysis of variance“), gefolgt von Fisher´s PLSD-Test („protected least significant difference-test“) und wurde mit dem Computer-Programm StatView (ABACUS) durchgeführt.

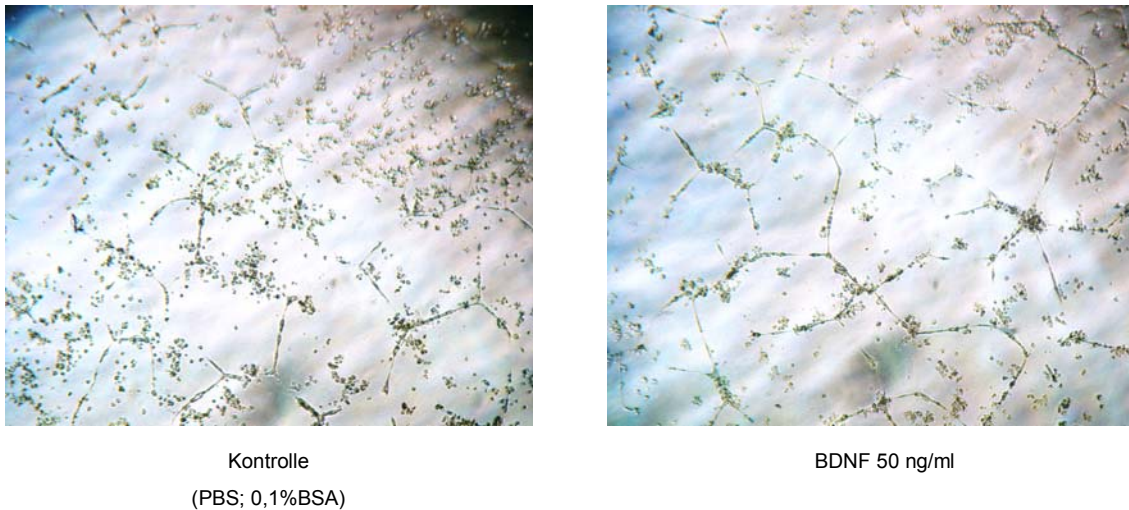
$P < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Der Einfluss von BDNF auf die Angiogenese in HUVEC

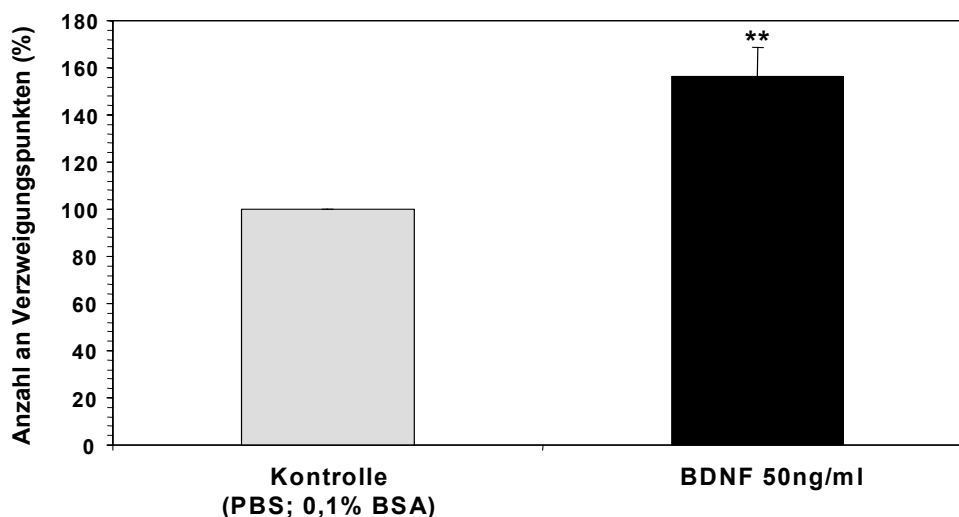
#### 5.1.1. BDNF stimuliert die Angiogenese in HUVEC

Um den Einfluss von BDNF auf die Tubulusbildung in HUVEC zu untersuchen, wurden konfluente HUVEC von ihrer Kulturschale abgelöst und in einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung einer 96-Lochplatte ausgesät, die zuvor mit „Matrigel™“ beschichtet wurde. Die Konzentration von BDNF im Medium betrug 50 ng/ml. Medium, welches mit dem Lösungsmittel von BDNF (PBS; 0,1% BSA) versetzt wurde, diente als Kontrolle. Die Tubulusausbildung der Zellen erfolgte für 18h bei 37°C. Nach 18h wurden die einzelnen Vertiefungen der 96-Lochplatte photographiert und ausgewertet (siehe Kapitel 4.1.4.). Abb. 5a zeigt exemplarisch die Tubulusbildung von BDNF-behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Eine vermehrte Ausbildung von Verzweigungspunkten und Vernetzungen der Zellen untereinander kann in BDNF-behandelten Zellen beobachtet werden. Die quantitative Auswertung der Anzahl an Verzweigungspunkten ist in Abb. 5b dargestellt. Im Vergleich zu Kontrollzellen zeigen BDNF-behandelte Zellen einen Anstieg im Vernetzungsgrad auf  $156 \pm 12\%$ .



**Abb. 5a: BDNF stimuliert die Angiogenese in HUVEC.**

Die Untersuchung der Tubulusausbildung von HUVEC erfolgte mit Hilfe des „Matrigel™ Angiogenese Assays“ für 18h in An- oder Abwesenheit von BDNF (50ng/ml) bei 37°C. Abb. 5a zeigt repräsentativ zwei Fotografien Kontroll- bzw. BDNF-behandelter Zellen.

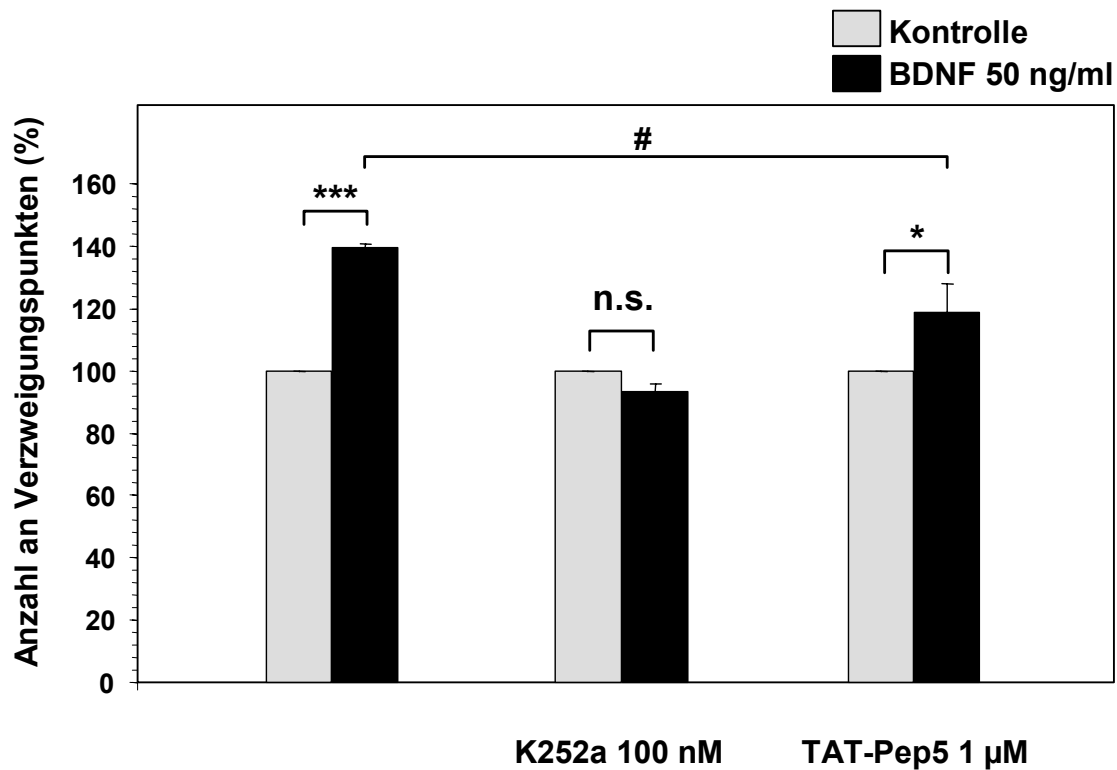


**Abb. 5b: BDNF stimuliert die Angiogenese in HUVEC – Quantitative Auswertung.**

Quantitative Auswertung der Tubulusbildung von HUVEC im „Matrigel™ Angiogenese Assay“.  $1 \times 10^4$  Zellen wurden pro Vertiefung einer 96-Lochplatte ausgesät, die zuvor mit „Matrigel™“ beschichtet wurde. Die Tubulusausbildung fand für 18h bei 37°C in An- oder Abwesenheit von BDNF (50 ng/ml) statt. Die Anzahl an Verzweigungspunkten von Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Die quantitative Auswertung zeigt den MW  $\pm$  SEM von n=12 (\*\* P<0,01).

### **5.1.2. Der stimulierende Einfluss von BDNF auf die Angiogenese in HUVEC wird durch die Inhibition des Rezeptors TrkB aufgehoben**

Nachdem eine stimulierende Wirkung von BDNF auf die Tubulusbildung von HUVEC festgestellt werden konnte (siehe Kapitel 5.1.1.), sollte im nächsten Schritt der Rezeptor ermittelt werden, der den Einfluss von BDNF auf die Angiogenese in HUVEC vermittelt. Für die Blockierung der Rezeptoren wurde zum einen K-252a (100 nM) eingesetzt, ein Inhibitor der Tyrosin-Kinaseaktivität des TrkB-Rezeptors, sowie TAT-Pep5 (1  $\mu$ M), ein Inhibitor des p75<sup>NTR</sup>-vermittelten Signalweges. Vor der Zugabe von BDNF wurden die Zellen in Zellsuspension mit den jeweiligen Inhibitoren für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Durchführung des „Matrigel<sup>TM</sup> Angiogenese Assays“ erfolgte wie in Kapitel 4.1.1. beschrieben, in An- bzw. Abwesenheit der Inhibitoren. Abb. 6 zeigt die quantitative Auswertung der Anzahl an Verzweigungspunkten der unterschiedlichen Behandlungen in %. Im Vergleich zu Kontrollzellen ist durch eine Behandlung der Zellen mit BDNF (50 ng/ml) ein signifikanter Anstieg der Tubulusbildung zu beobachten (140 $\pm$ 1%). Die stimulierende Wirkung von BDNF auf die Angiogenese wird durch die Inhibition des TrkB-Rezeptors aufgehoben. Im Vergleich zur Anzahl an Verzweigungspunkten von Zellen, die nur mit dem Inhibitor des TrkB-Rezeptors behandelt wurden (100%), zeigt die zusätzliche Gabe von BDNF keinen weiteren signifikanten Anstieg mehr (93 $\pm$ 2%). Wurde der p75<sup>NTR</sup> vermittelte Signalweg durch eine Behandlung der Zellen mit TAT-Pep5 unterbunden (Anzahl an Verzweigungspunkten = 100%), so ist nur noch ein leichter Anstieg in der Anzahl an Verzweigungspunkten durch eine Behandlung mit BDNF zu erkennen (119 $\pm$ 10%). Die Stimulation der Tubulusbildung durch BDNF unter Inhibition des p75<sup>NTR</sup> vermittelten Signalweges ist allerdings im Vergleich zur stimulierenden Wirkung von BDNF ohne Inhibition des Neurotrophinrezeptors signifikant reduziert.



**Abb. 6: Der stimulierende Einfluss von BDNF auf die Angiogenese in HUVEC wird durch die Inhibition des Rezeptors TrkB aufgehoben.**

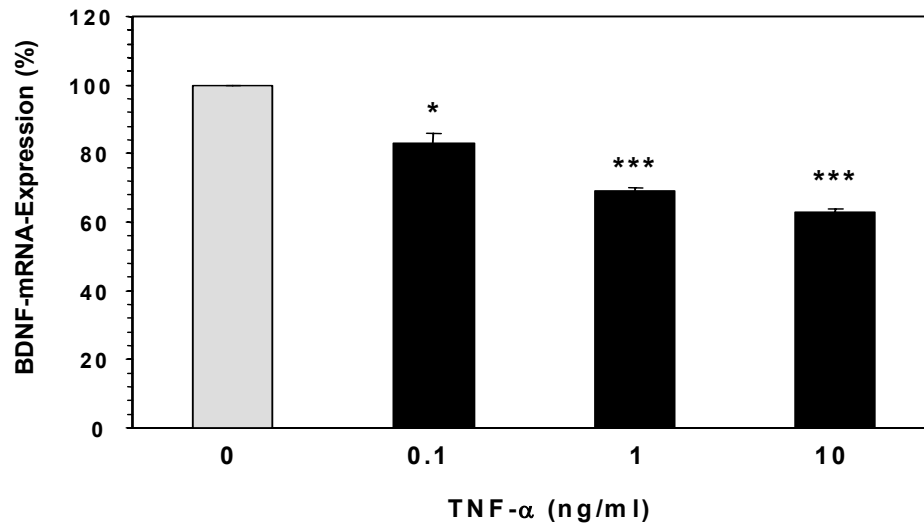
Quantitative Auswertung der Tubulusbildung von HUVEC im „Matrigel™ Angiogenese Assay“.  $1 \times 10^4$  Zellen wurden pro Vertiefung einer 96-Lochplatte ausgesät, die zuvor mit „Matrigel™“ beschichtet wurde. Die Tubulusausbildung fand für 18h bei 37°C in An- oder Abwesenheit von BDNF (50 ng/ml), K-252a (100 nM) oder TAT-Pep5 (1 µM) statt. Die Inhibitoren wurden vor der Zugabe von BDNF für 15 min bei 37°C in Zellsuspension vorinkubiert. Die Anzahl an Verzweigungspunkten von Kontrollzellen bzw. von Zellen, die nur mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt wurden, wurde auf 100% gesetzt. Die quantitative Auswertung zeigt den MW  $\pm$  SEM von n=6 (\*, # P<0,05; \*\*\* P<0,001; n.s. = nicht signifikant).



## **5.2. TNF- $\alpha$ reduziert die BDNF-Expression in peripheren Endothelzellen**

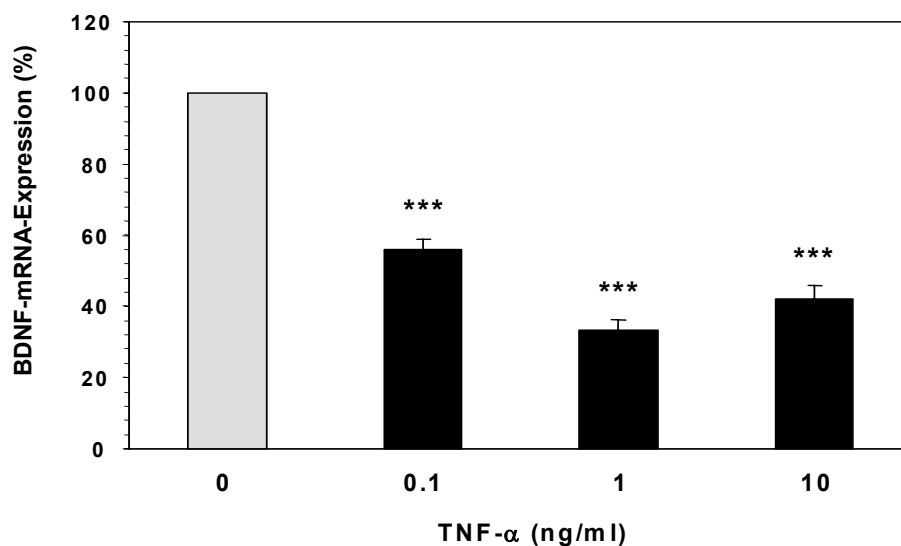
### **5.2.1. TNF- $\alpha$ reduziert konzentrations- und zeitabhängig die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen und HUVEC**

Um den Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression zu analysieren, wurden EA.hy 926-Zellen bzw. HUVEC für 6h mit TNF- $\alpha$  (0,1, 1 oder 10 ng/ml) behandelt. Um zusätzlich eine Zeitabhängigkeit der Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression zu ermitteln, wurden EA.hy 926-Zellen für 1, 3, 6, 12 oder 24h mit 1 ng/ml TNF- $\alpha$  inkubiert. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe Kapitel 4.2.1.) und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt (siehe Kapitel 4.2.4.). TNF- $\alpha$  reduzierte die BDNF-mRNA-Expression signifikant und konzentrationsabhängig auf maximal  $57\pm 3\%$  in EA.hy 926-Zellen (Abb. 7) und  $42\pm 3\%$  in HUVEC (Abb. 8) im Vergleich zu Kontrollzellen. Gleichzeitig erfolgte die reduzierende Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression zeitabhängig. Nach dreistündiger Inkubation konnte in EA.hy 926-Zellen eine Reduktion der BDNF-Expression durch TNF- $\alpha$  auf  $62\pm 4\%$  gezeigt werden, die auch nach 6-, 12- bzw. 24-stündiger TNF- $\alpha$ -Behandlung konstant zu beobachten war (Abb. 9, 6h  $54\pm 4\%$ , 12h  $52\pm 4\%$ , 24h  $62\pm 6\%$ ).



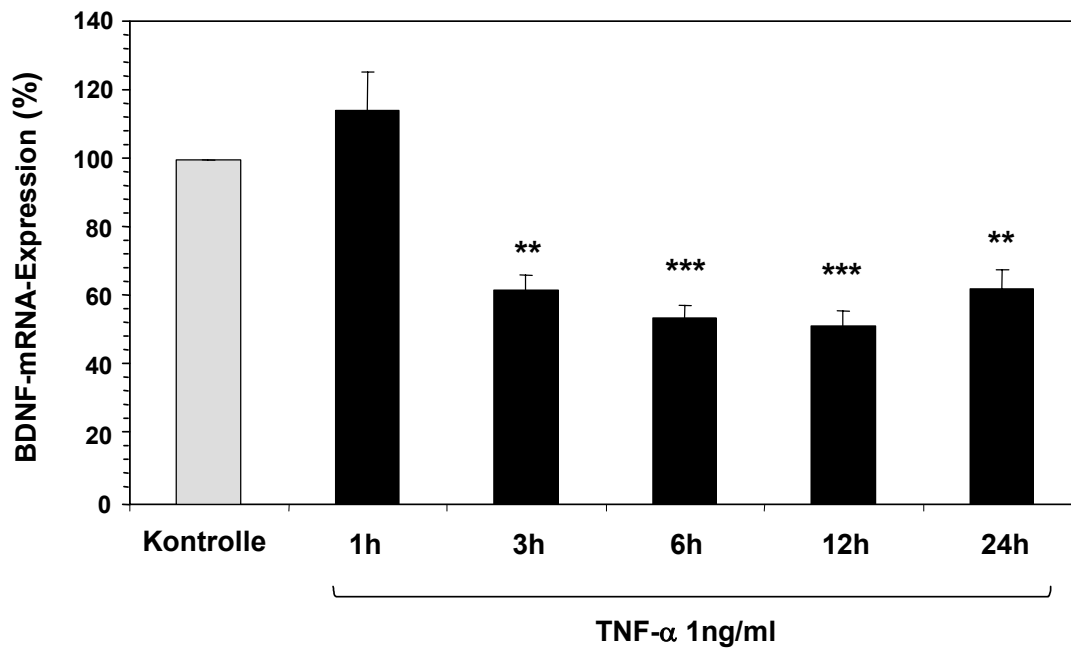
**Abb. 7: TNF- $\alpha$  reduziert konzentrationsabhängig die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen.**

EA.hy 926-Zellen wurden für 6h mit TNF- $\alpha$  (0,1, 1 oder 10 ng/ml) behandelt, Gesamt-RNA wurde isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW  $\pm$  SEM von n=6-9 (\* P<0,05; \*\*\* P<0,001).



**Abb. 8: TNF- $\alpha$  reduziert konzentrationsabhängig die BDNF-mRNA-Expression in HUVEC.**

HUVEC wurden für 6h mit TNF- $\alpha$  (0,1, 1 oder 10 ng/ml) behandelt, Gesamt-RNA wurde isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW  $\pm$  SEM von n=3 (\*\*\* P<0,001).

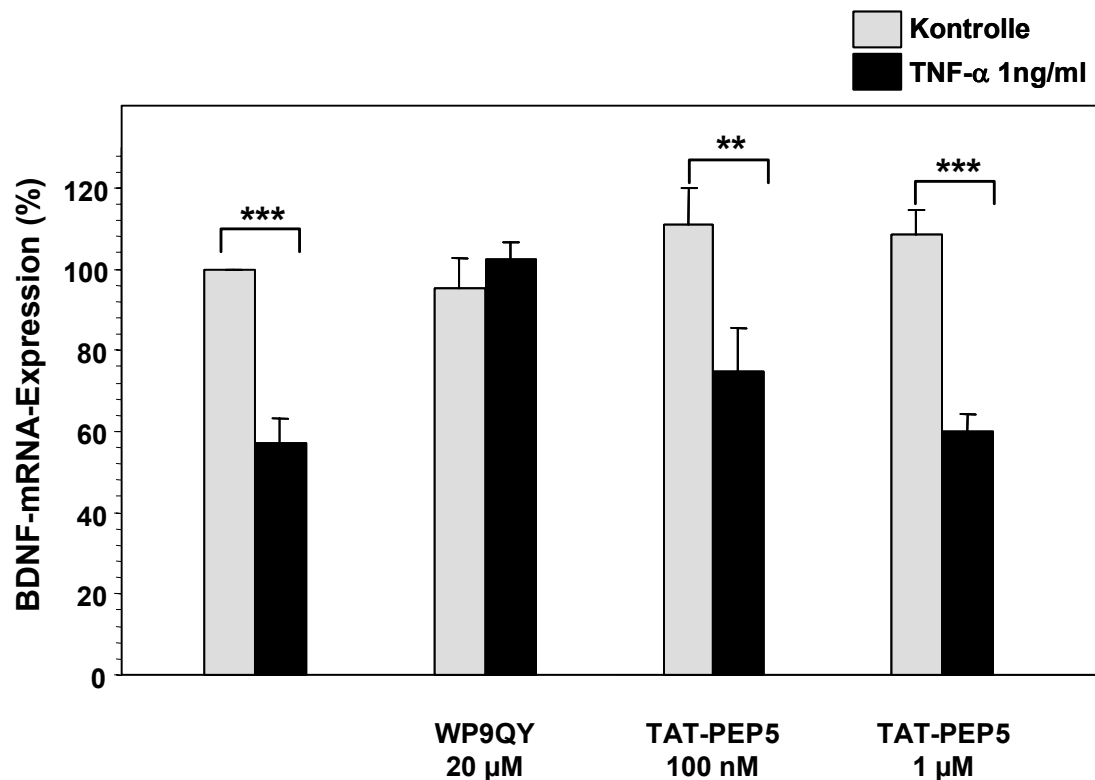


**Abb. 9: TNF- $\alpha$  reduziert zeitabhängig die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen.**

EA.hy 926-Zellen wurden für 1, 3, 6, 12 oder 24h mit TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) behandelt, Gesamt-RNA wurde isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW  $\pm$  SEM von n=3 (\*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001).

### **5.2.2. Die reduzierende Wirkung von TNF- $\alpha$ auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch den TNFR1-Antagonisten WP9QY aufgehoben**

Nachdem eine reduzierende Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 5.2.1.), sollte in EA.hy 926-Zellen im nächsten Schritt analysiert werden, ob der Einfluss von TNF- $\alpha$  über den TNFR1 (p55) oder TNF- $\alpha$  Rezeptor 2 (TNFR2/p<sup>75NTR</sup>) vermittelt wird. Hierfür wurde der TNFR1-Antagonist WP9QY sowie ein Inhibitor des TNFR2/p<sup>75NTR</sup>-vermittelten Signalweges (TAT-Pep5) eingesetzt. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Inhibitoren für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Danach folgte die Zugabe von TNF- $\alpha$  inklusive der Inhibitoren für weitere 6h. Nach der Stimulation wurde Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der qRT-PCR sind in Abb. 10 dargestellt. TNF- $\alpha$  reduziert deutlich die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen auf 57±6% im Vergleich zu Kontrollzellen. Auch in TAT-Pep5-behandelten Zellen konnte eine signifikante Reduktion der BDNF-mRNA-Expression durch TNF- $\alpha$  auf 75±11% (100 nM) bzw. 60±4% (1  $\mu$ M) beobachtet werden. In WP9QY-behandelte Zellen hingegen konnte keine Veränderung der BDNF-mRNA-Expression durch TNF- $\alpha$  festgestellt werden (102±4%). Die alleinige Zugabe der Inhibitoren veränderte die BDNF-mRNA-Expression nicht (WP9QY 95±8%, TAT-Pep5 100 nM 111±9%, TAT-Pep5 1  $\mu$ M 108±6%).



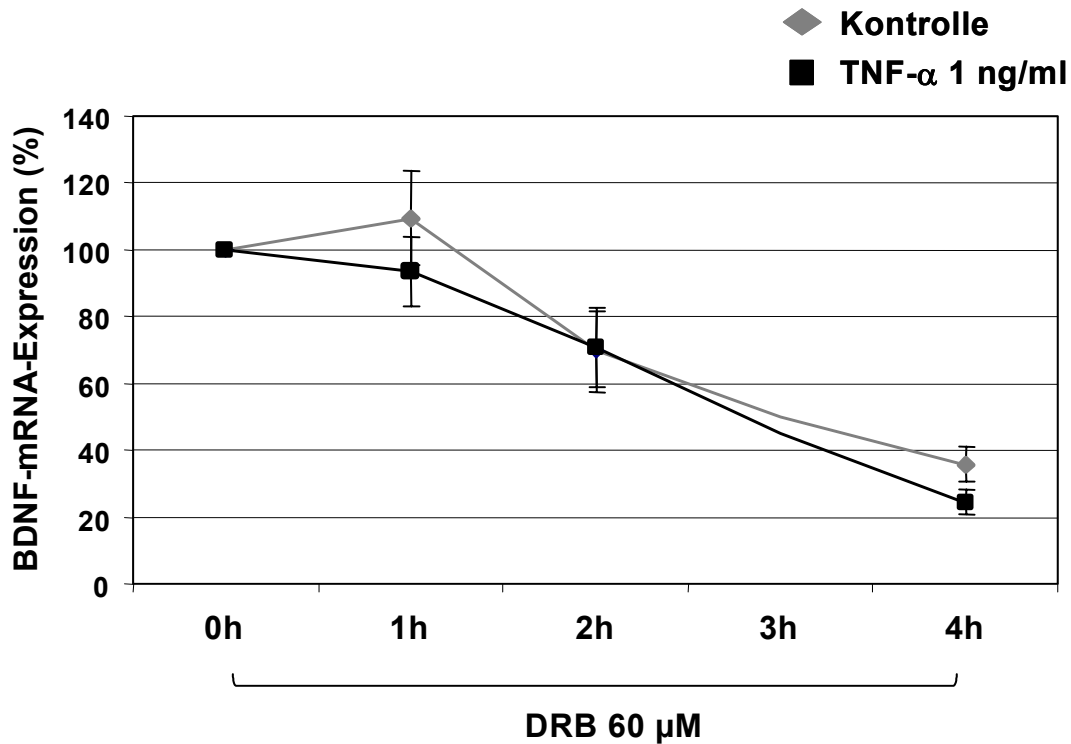
**Abb. 10: Die reduzierende Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch den TNFR1-Antagonisten WP9QY aufgehoben.**

EA.hy 926-Zellen wurden für 30 min mit den Inhibitoren WP9QY (20  $\mu$ M) bzw. TAT-Pep5 (100 nM oder 1  $\mu$ M) behandelt. Danach folgte die Zugabe von TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) inklusive der Inhibitoren für weitere 6h. Gesamt-RNA wurde isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW  $\pm$  SEM von n=3-9 (\*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001).

### 5.2.3. TNF- $\alpha$ hat keine Wirkung auf die BDNF-mRNA-Stabilität

Nachdem ein deutlich reduzierender Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 5.2.1.), sollte nun im nächsten Schritt der Mechanismus der Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-Expression näher untersucht werden. Hierfür wurde zunächst der Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Stabilität analysiert.

EA.hy 926-Zellen wurden für 6h mit TNF- $\alpha$  (1ng/ml) behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Nach 6h wurde die Transkription durch Zugabe des Transkriptions-Inhibitors DRB unterbunden. Gesamt-RNA wurde nach 0, 1, 2 oder 4h DRB-Behandlung sowohl von TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen als auch Kontrollzellen isoliert. Der Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Stabilität ist in Abb. 11 dargestellt. Die BDNF-mRNA-Expression von Kontrollzellen als auch von TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen, die nicht mit DRB behandelt wurden (0h), wurde auf 100% gesetzt. In Kontrollzellen ist durch die Inhibition der Transkription eine Abnahme der BDNF-mRNA auf  $36\pm 5\%$  nach 4h zu beobachten. Die Halbwertszeit der BDNF-mRNA beträgt ca. 3h. In TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen weicht die BDNF-mRNA-Expression von den Werten der Kontrollzellen nicht signifikant ab. Auch hier beträgt die Halbwertszeit der BDNF-mRNA ca. 3h.



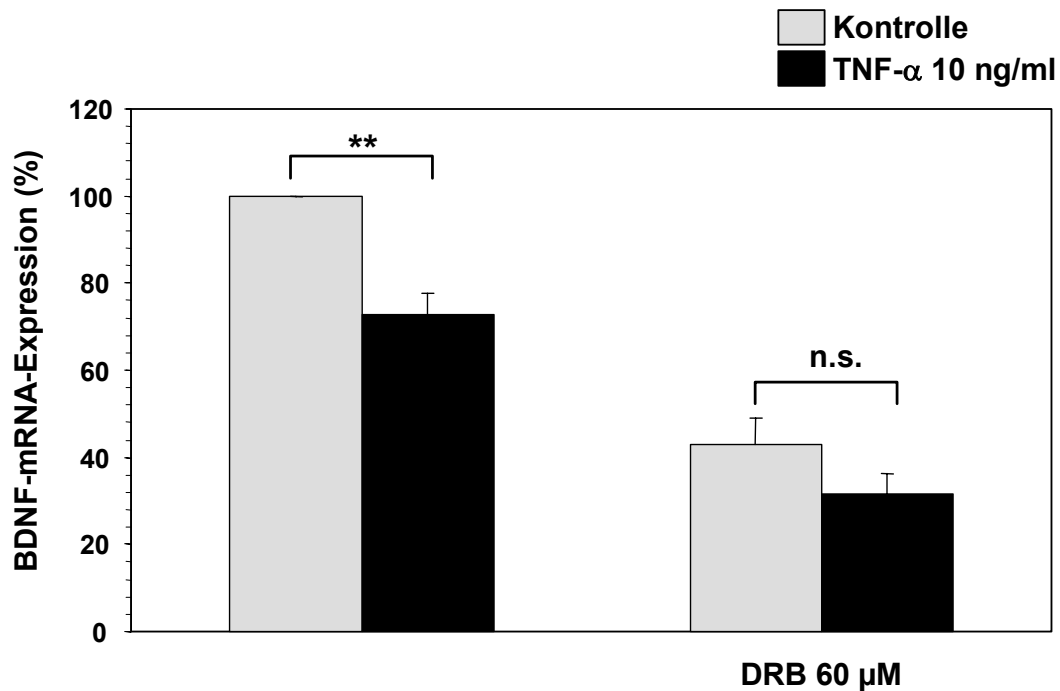
**Abb. 11: TNF- $\alpha$  hat keine Wirkung auf die BDNF-mRNA-Stabilität.**

EA.hy 926-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) für 6h behandelt. Nach der 6-stündigen Behandlung wurde die Transkription mit dem Transkriptions-Inhibitor DRB (60  $\mu$ M) unterbunden. Gesamt-RNA wurde nach 0, 1, 2 oder 4h DRB-Behandlung von Kontrollzellen und TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die relative BDNF-mRNA-Expression von Kontrollzellen bzw. TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen, die nicht mit DRB behandelt wurden (0h), wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt ist der MW  $\pm$  SEM von n=3.

#### **5.2.4. Durch die Inhibition der Transkription durch DRB wird der reduzierende Einfluss von TNF- $\alpha$ auf die BDNF-mRNA-Expression aufgehoben**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TNF- $\alpha$  keine Wirkung auf die mRNA-Stabilität von BDNF hat (siehe Kapitel 5.2.3.), sollte nun im nächsten Schritt untersucht werden, ob TNF- $\alpha$  BDNF auf dem Niveau der Transkription reguliert. Hierfür wurde die Transkription von EA.hy 926-Zellen durch Zugabe des Transkriptions-Inhibitors DRB zunächst für 30 min vorinhibiert. Danach folgte eine weitere 6-stündige Inkubation der Zellen mit DRB in An- oder Abwesenheit von TNF- $\alpha$ . Kontroll- bzw. TNF- $\alpha$ -behandelte Zellen, deren Transkription nicht mit DRB unterbunden wurde, dienten als Vergleich. Die BDNF-mRNA-Expression von Zellen, die nicht mit TNF- $\alpha$  und nicht mit DRB behandelt wurden, wurde auf 100% gesetzt und die relative BDNF-Expression der anderen Behandlungen mit ihr verglichen (siehe Abb. 12). Erneut ist eine signifikante Reduktion der BDNF-mRNA-Expression durch TNF- $\alpha$  auf  $73\pm 5\%$  in DRB-unbehandelten Zellen zu erkennen. Vergleicht man nun die BDNF-Expression DRB-behandelter Zellen, so sind keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen Kontrollzellen ( $43\pm 6\%$ ) und TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen ( $32\pm 5\%$ ) zu erkennen. Durch die Inhibition der Transkription konnte der reduzierende Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-Expression aufgehoben werden.



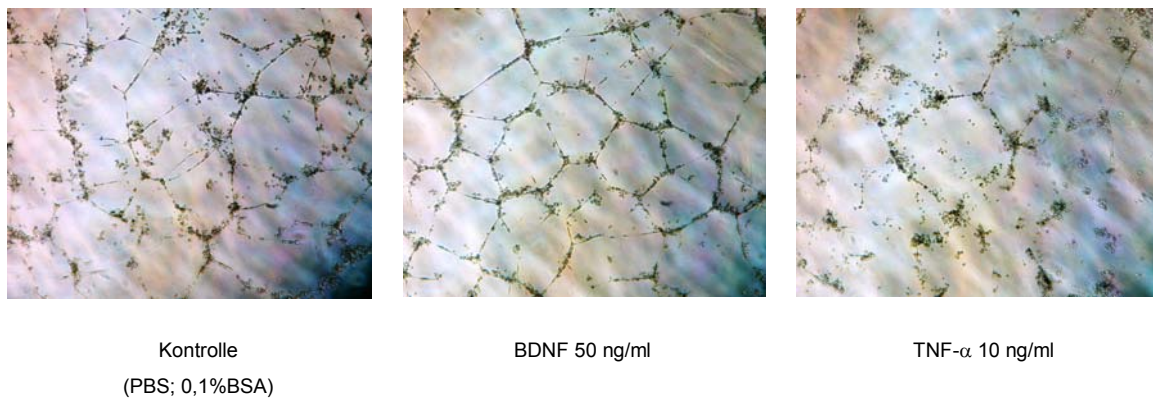


**Abb. 12: Durch die Inhibition der Transkription durch DRB wird der reduzierende Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression aufgehoben.**

Die Transkription von EA.hy 926-Zellen wurde durch Zugabe des Transkriptions-Inhibitors DRB (60  $\mu$ M) zunächst für 30 min vorinhibiert. Es folgte eine weitere 6-stündige DRB-Behandlung der Zellen in An- oder Abwesenheit von TNF- $\alpha$  (1 ng/ml). Kontroll- bzw. TNF- $\alpha$ -behandelte Zellen, die nicht mit DRB inkubiert wurde, dienten als Vergleich. Gesamt-RNA wurde isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die relative BDNF-mRNA-Expression von Zellen, die nicht mit TNF- $\alpha$  und nicht mit DRB behandelt wurden, wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt ist der MW  $\pm$  SEM von n=3 (\*\* P<0,01; n.s. = nicht signifikant).

### 5.2.5. TNF- $\alpha$ reduziert konzentrationsabhängig die Angiogenese in HUVEC

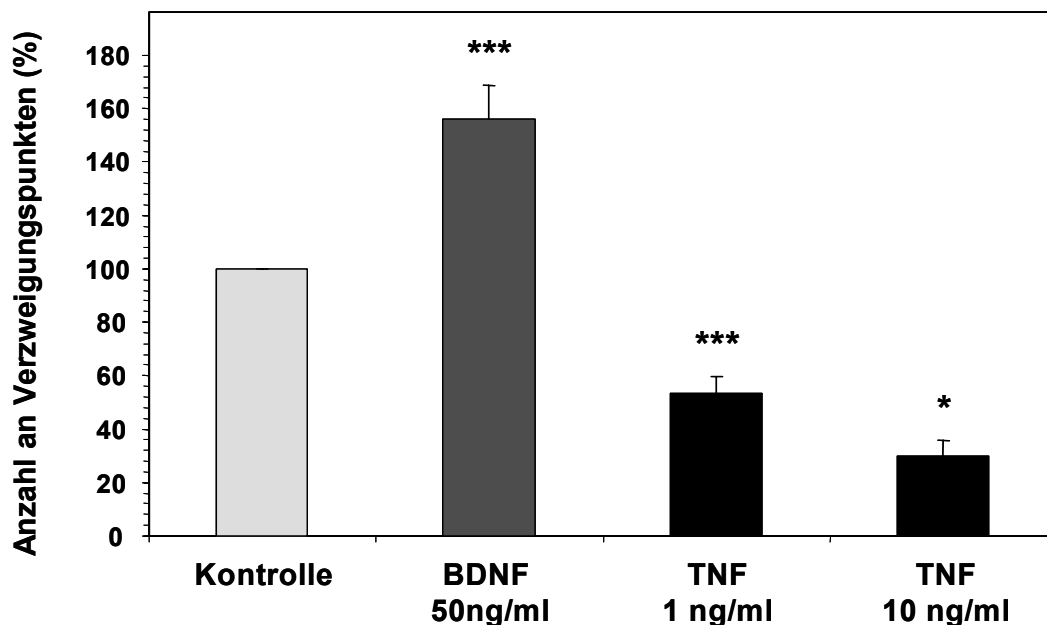
Abb. 13 zeigt den Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die Tubulusbildung von HUVEC. Hierfür wurden  $1 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung einer „Matrigel<sup>TM</sup>“ beschichteten 96-Lochplatte ausgesät und für 18h bei 37°C mit BDNF (50 ng/ml) oder TNF- $\alpha$  (1 oder 10 ng/ml) behandelt. Abb. 13a zeigt exemplarisch die Tubulusbildung von BDNF- bzw. TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen im „Matrigel<sup>TM</sup> Angiogenese Assay“. In BDNF-behandelten Zellen ist ein signifikanter Anstieg der Tubulusbildung auf  $156 \pm 12\%$  im Vergleich zu Kontrollzellen zu erkennen (Abb. 13b). In TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen hingegen ist eine konzentrationsabhängige und signifikante Reduktion der Angiogenese auf  $53 \pm 7\%$  bei 1 ng/ml TNF- $\alpha$  bzw.  $30 \pm 6\%$  bei 10 ng/ml TNF- $\alpha$  zu beobachten.



**Abb. 13a: TNF- $\alpha$  reduziert die Angiogenese in HUVEC.**

Die Untersuchung der Tubulusausbildung von HUVEC erfolgte mit Hilfe des „Matrigel™ Angiogenese Assays“ für 18h in An- oder Abwesenheit von BDNF (50ng/ml) oder TNF- $\alpha$  (1 oder 10 ng/ml) bei 37°C.

Abb. 13a zeigt repräsentativ Fotografien Kontroll-, BDNF- oder TNF- $\alpha$ -behandelter Zellen.



**Abb. 13b: TNF- $\alpha$  reduziert konzentrationsabhängig die Angiogenese in HUVEC.**

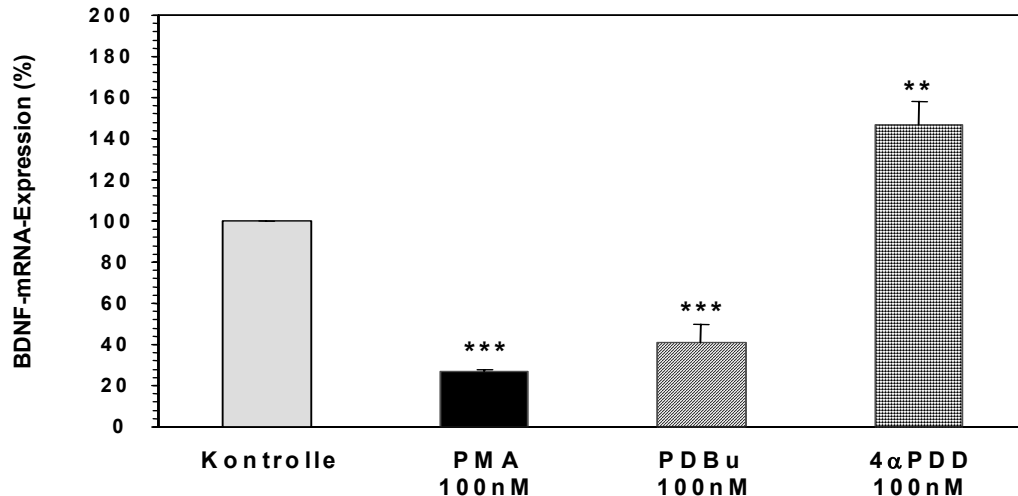
Quantitative Auswertung der Tubulusbildung von HUVEC im „Matrigel™ Angiogenese Assay“.  $1 \times 10^4$  Zellen wurden pro Vertiefung einer 96-Lochplatte ausgesät, die zuvor mit „Matrigel™“ beschichtet wurde. Die Tubulusausbildung fand für 18h bei 37°C in An- oder Abwesenheit von BDNF (50 ng/ml) oder TNF- $\alpha$  (1 oder 10 ng/ml) statt. Die Anzahl an Verzweigungspunkten von Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Die quantitative Auswertung zeigt den MW  $\pm$  SEM von n=12-15 (\* P<0,05; \*\*\* P<0,001).

### 5.3. PKC-Aktivierung reduziert die BDNF-Expression in peripheren Endothelzellen

#### 5.3.1. PKC-Aktivatoren reduzieren die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen und HUVEC konzentrations- und zeitabhängig

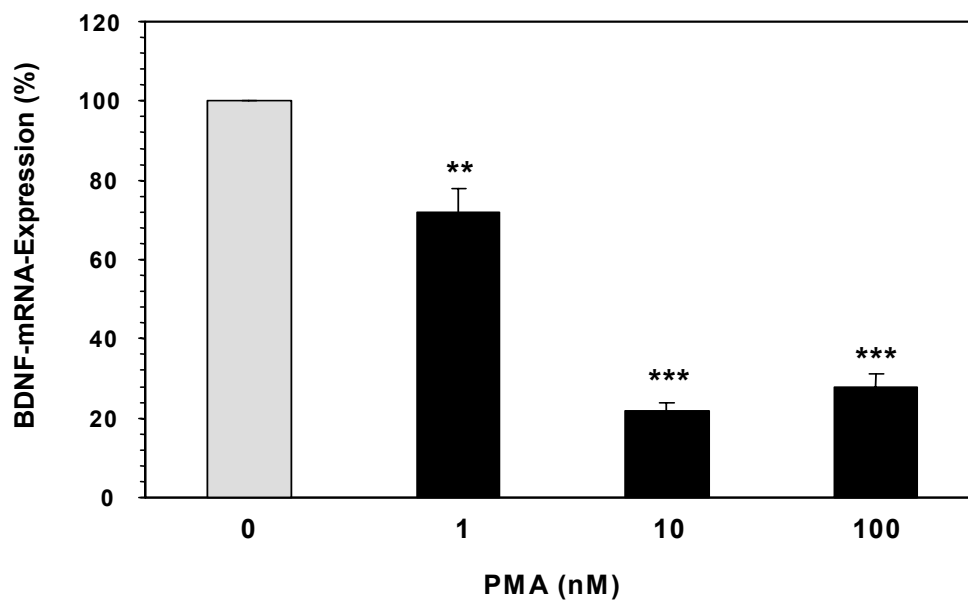
Um den Einfluss einer PKC-Aktivierung auf die BDNF-mRNA-Expression zu untersuchen, wurden EA.hy 926-Zellen für 6h mit den PKC-Aktivatoren PMA bzw. PDBu behandelt. Die Inkubation der Zellen mit dem inaktiven Phorbolster  $4\alpha$ PDD diente als Negativkontrolle. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert und die relative BDNF-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. In Abb. 14 ist eine signifikante Reduktion der BDNF-mRNA-Expression durch PMA auf  $27\pm 1\%$  im Vergleich zu Kontrollzellen zu erkennen. Auch PDBu reduzierte die BDNF-Expression auf  $41\pm 9\%$ . Bei der Behandlung der Zellen mit dem inaktiven Phorbolster  $4\alpha$ PDD hingegen wurde die BDNF-mRNA-Expression nicht reduziert ( $147\pm 11\%$ ). In Abb. 15 ist die Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an PMA dargestellt. Nach 6-stündiger Inkubation mit PMA wurde die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen konzentrationsabhängig auf  $72\pm 6\%$  (PMA 1 nM),  $22\pm 2\%$  (PMA 10 nM) und  $28\pm 3\%$  (PMA 100 nM) signifikant reduziert.

Die Regulation der BDNF-Expression durch PKC-Aktivierung wurde nicht nur in EA.hy 926-Zellen untersucht, sondern auch in HUVEC. Hierfür wurden konfluente HUVEC für 6, 24 oder 48h mit PMA behandelt und anschließend die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 zusammenfassend dargestellt. Im Vergleich zu Kontrollzellen fand eine Herunterregulation der BDNF-mRNA-Expression durch PMA statt, die bereits nach 6-stündiger PMA-Behandlung maximal war ( $3\pm 0\%$ ). Nach 24- bzw. 48-stündiger Behandlung der Zellen mit PMA wurde die BDNF-Expression auf  $10\pm 7\%$  (24h) bzw.  $19\pm 7\%$  (48h) reduziert.



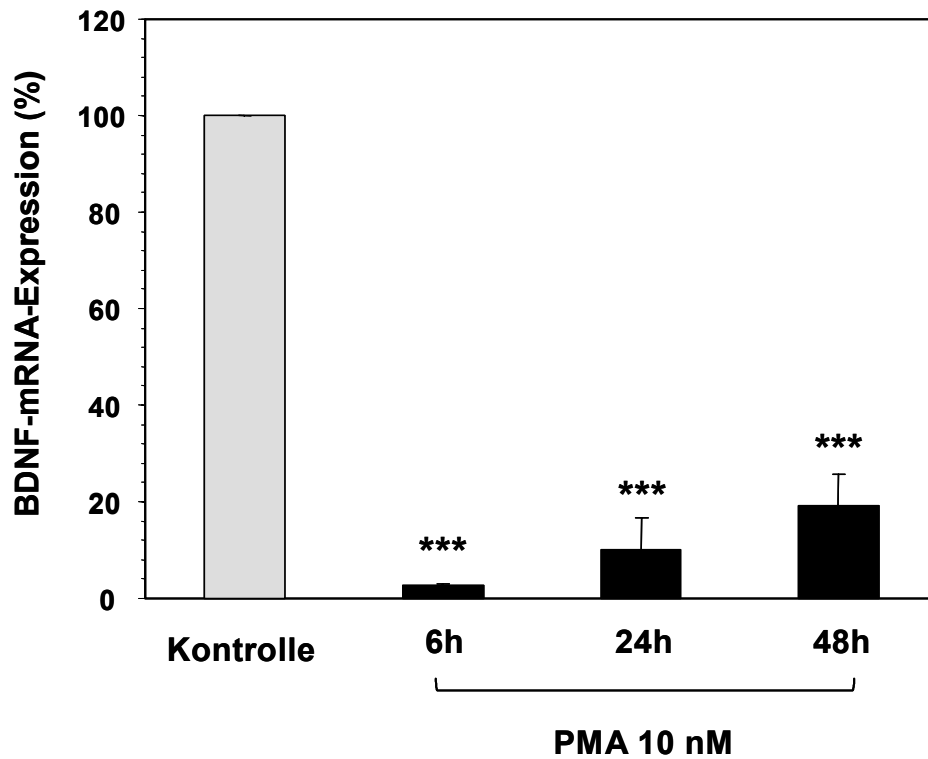
**Abb. 14: PKC-Aktivatoren reduzieren die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen.**

EA.hy 926-Zellen wurden für 6h mit den PKC-Aktivatoren PMA (100 nM) oder PDBu (100 nM) bzw. dem inaktiven Phorbolster 4αPDD (100 nM) behandelt. Gesamt-RNA wurde isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW ± SEM von n=3 (\*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001).



**Abb. 15: PMA reduziert die BDNF-mRNA-Expression konzentrationsabhängig in EA.hy 926-Zellen.**

EA.hy 926-Zellen wurden für 6h mit verschiedenen Konzentrationen an PMA (1, 10 oder 100 nM) behandelt. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW ± der SEM von n=3 (\*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001).

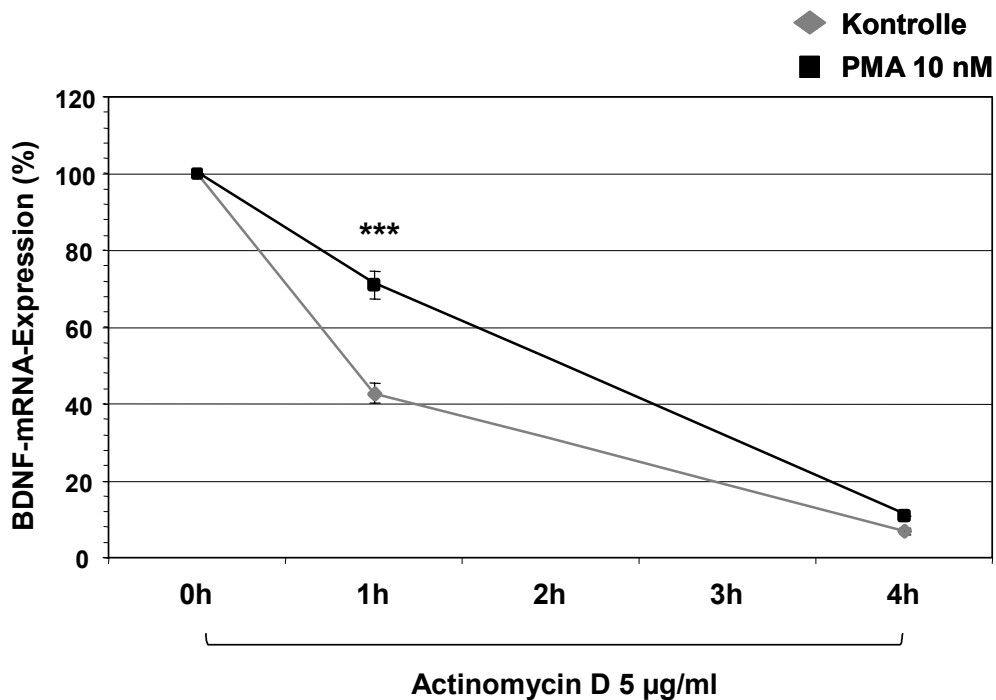


**Abb. 16: PMA reduziert zeitabhängig die BDNF-mRNA-Expression in HUVEC.**

HUVEC wurden für 6, 24 oder 48h mit PMA (10 nM) bzw. DMSO (0,1%) behandelt. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW  $\pm$  SEM von n=3-6 (\*\*\*)  $P < 0,001$ ).

### 5.3.2. PMA vermindert die mRNA-Stabilität von BDNF in EA.hy 926-Zellen nicht

Nachdem beobachtet werden konnte, dass die BDNF-mRNA-Expression durch eine Aktivierung der PKC reduziert werden kann (siehe Kapitel 5.3.1.), sollte nun im nächsten Schritt untersucht werden, ob dies möglicherweise über eine veränderte mRNA-Stabilität reguliert wird. Hierfür wurden EA.hy 926-Zellen für 6h mit PMA (10 nM) bzw. DMSO (0,1%, Kontrolle) behandelt. Nach der 6-stündigen Inkubation wurde die Transkription in Kontroll- bzw. PMA-behandelten Zellen durch die Zugabe des Transkriptions-Inhibitors Actinomycin D (5 µg/ml) unterbunden. Gesamt-RNA wurde nach 1 oder 4h Actinomycin D-Behandlung isoliert. Die relative BDNF-Expression wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Die Expression von Kontrollzellen und PMA-behandelten Zellen, denen nach der 6-stündigen Inkubation kein Actinomycin D zugesetzt wurde (0h), wurde auf je 100% gesetzt und diente als Vergleich. Der Einfluss von PMA auf die BDNF-mRNA-Stabilität ist in Abb. 17 dargestellt. Durch die Zugabe von Actinomycin D wurde die BDNF-Expression in Kontrollzellen auf  $43\pm 3\%$  nach 1h bzw.  $7\pm 1\%$  nach 4h reduziert. Die Halbwertszeit für die BDNF-mRNA liegt demnach hier bei ca. 1h. Die BDNF-Expression in PMA-behandelten Zellen wird durch Actinomycin D-Zugabe ebenfalls auf  $71\pm 4\%$  (1h) und  $11\pm 0\%$  (4h) herunter reguliert. Eine signifikante Abweichung ist somit zwischen PMA- und Kontroll-behandelten Zellen nach 1-stündiger Inhibition der Transkription durch Actinomycin D zu beobachten. Insgesamt kann allerdings beobachtet werden, dass die mRNA-Stabilität von BDNF durch eine Behandlung mit PMA im Vergleich zu Kontrollzellen nicht vermindert wird.



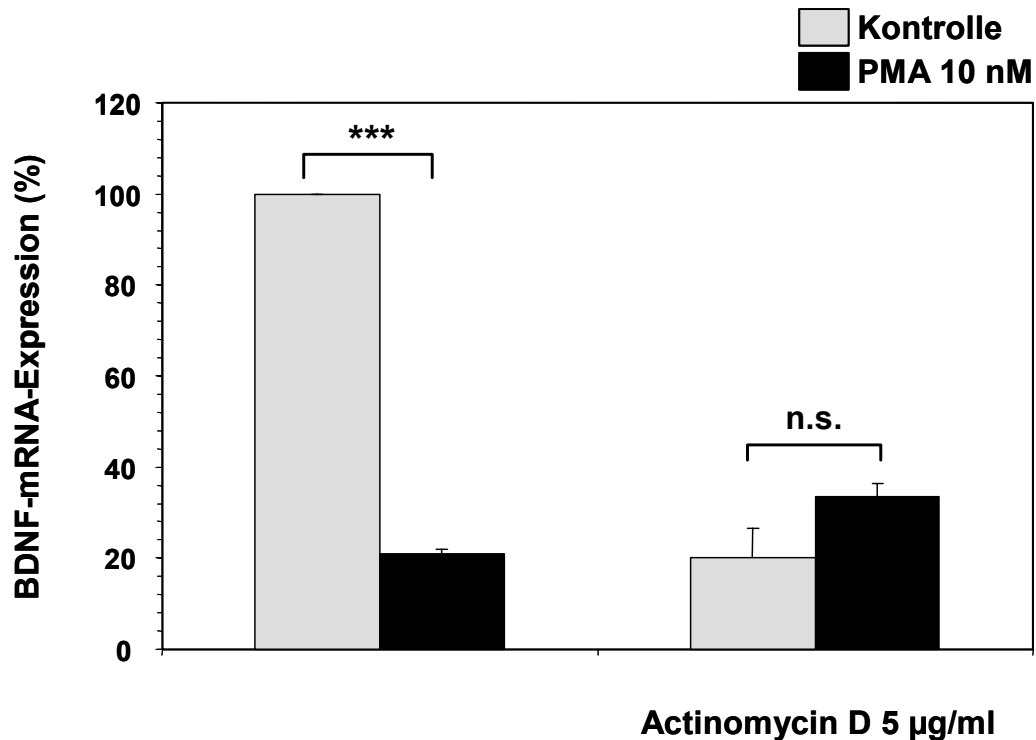
**Abb. 17: PMA vermindert die mRNA-Stabilität von BDNF in EA.hy 926-Zellen nicht.**

EA.hy 926-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von PMA (10 nM) für 6h behandelt. Nach der 6-stündigen Behandlung wurde die Transkription mit dem Transkriptions-Inhibitor Actinomycin D (5 µg/ml) unterbunden. Gesamt-RNA wurde nach 1 oder 4h Actinomycin D-Behandlung von Kontrollzellen und PMA-behandelten Zellen isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die relative BDNF-mRNA-Expression von Kontrollzellen bzw. PMA-behandelten Zellen, die nicht mit Actinomycin D behandelt wurden (0h), wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt ist der MW ± der SEM von n=3 (\*\*\*) P<0,001).



### **5.3.3. Der reduzierende Einfluss einer PKC-Aktivierung auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch die Inhibition der Transkription aufgehoben**

Da die mRNA-Stabilität von BDNF durch PMA nicht vermindert wird (siehe Kapitel 5.3.2.), sollte nun eine mögliche transkriptionelle Regulation der BDNF-Expression durch PKC-Aktivierung untersucht werden. Hierfür wurden EA.hy 926-Zellen für 6h mit PMA (10 nM) bzw. DMSO (0,1%, Kontrolle) behandelt. In einigen Zellen erfolgte gleichzeitig eine Inhibition der Transkription durch Zugabe von Actinomycin D (5 µg/ml). Hierbei wurden die Zellen bereits vor der Behandlung mit PMA bzw. DMSO mit dem Inhibitor für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Nach der Isolierung von Gesamt-RNA wurde die relative BDNF-Expression durch qRT-PCR ermittelt, die in Abb. 18 zusammengefasst dargestellt ist. In Actinomycin D-unbehandelten Zellen kann wiederum eine signifikante Herunterregulation der BDNF-Expression durch PMA auf  $21\pm 1\%$  beobachtet werden. Wird allerdings die Transkription durch Zugabe des Transkriptions-Inhibitors gestoppt, so wird der reduzierende Einfluss von PMA aufgehoben. So sind bei der Actinomycin D-Behandlung keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen Kontrollzellen und PMA-behandelten Zellen zu erkennen (Kontrolle  $20\pm 6\%$ , PMA  $33\pm 3\%$ ). Die Reduzierung der BDNF-mRNA-Expression durch PKC-Aktivierung konnte durch die Inhibition der Transkription vollständig aufgehoben werden.

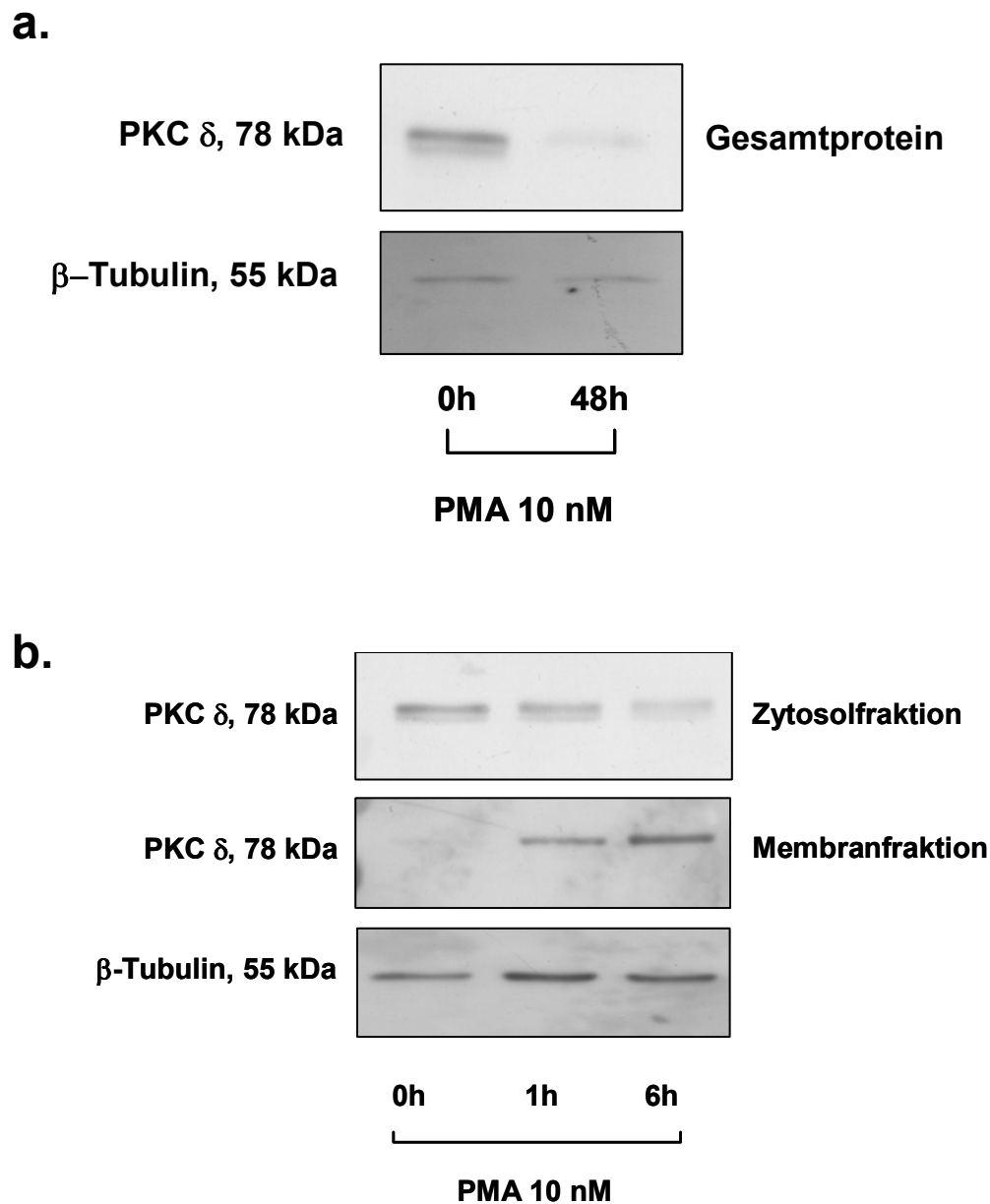


**Abb. 18: Der reduzierende Einfluss von PMA auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch die Inhibition der Transkription mit Actinomycin D aufgehoben.**

Die Transkription von EA.hy 926-Zellen wurde durch Zugabe von Actinomycin D (5 µg/ml) zunächst für 30 min vorinhibiert. Es folgte eine weitere 6-stündige Actinomycin D-Behandlung der Zellen in An- oder Abwesenheit von PMA (10 nM). Kontroll- bzw. PMA-behandelte Zellen, die nicht mit Actinomycin D inkubiert wurden, dienten als Vergleich. Gesamt-RNA wurde isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die relative BDNF-mRNA-Expression von Zellen, die nicht mit PMA und nicht mit Actinomycin D behandelt wurden, wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt ist der MW ± SEM von n=6 (\*\*\*)  $P < 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant).

#### 5.3.4. Der Einfluss von PMA auf die PKC-Isoform $\delta$ in EA.hy 926-Zellen

Die Abb. 14-16 zeigen deutlich, dass PMA die BDNF-mRNA-Expression herunter reguliert. Im Weiteren sollte aus diesem Grund untersucht werden, welche PKC-Isoform die Wirkung von PMA auf die BDNF-Expression vermittelt. Von der PKC existieren insgesamt 10 verschiedene Isoformen, die in 3 Klassen unterteilt werden (Mellor and Parker, 1998; Nishizuka, 1995; Toker, 1998). Zur Gruppe der konventionellen PKC-Isoformen (cPKCs) gehören die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$ .  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\eta$  und  $\theta$  werden in die Gruppe der neuen PKC-Isoformen (nPKCs) eingeteilt,  $\zeta$  und  $\lambda$  in die der atypischen (aPKCs). Die Isoformen  $\mu$  und  $\nu$  sollen eine neue vierte Klasse von PKC-Isoformen darstellen. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass PMA die PKC-Isoformen  $\alpha$  und  $\varepsilon$  in EA.hy 926-Zellen aktiviert (Li *et al.*, 1998). Auch konnte eine Aktivierung der Isoform  $\delta$  durch PMA in HUVEC beobachtet werden (Xu *et al.*, unpublizierte Daten). Abb. 19a und 19b zeigen den Einfluss von PMA auf die PKC-Isoform  $\delta$  in EA.hy 926-Zellen. EA.hy 926-Zellen wurden für 0, 1, 6 oder 48h mit PMA (10 nM) behandelt. Nach der Stimulation wurde Gesamtprotein (siehe Kapitel 4.3.1.) bzw. Proteine der Zytosol- und Membranfraktion (siehe Kapitel 4.3.2.) isoliert. Die Protein-Expression der PKC-Isoform  $\delta$  wurde anschließend mittels der Western-Blot-Analyse untersucht (siehe Kapitel 4.3.6.). Die zeitgleiche Analyse des konstitutiv exprimierten Proteins  $\beta$ -Tubulin diente der Normierung. In Abb. 19b wird deutlich, dass eine Behandlung der Zellen mit PMA zu einer Translokation der PKC-Isoform  $\delta$  aus dem Zytosol in die Membran der Zelle führt. Die Expression von  $\beta$ -Tubulin wird durch PMA zu keinem Zeitpunkt verändert. Nach 48-stündiger PMA-Behandlung von EA.hy 926-Zellen ist eine deutliche Abnahme der PKC  $\delta$ -Expression im Gesamtproteinextrakt im Vergleich zu Kontroll-behandelten Zellen zu erkennen (Abb. 19a). Auch hier wird die Expression von  $\beta$ -Tubulin nicht verändert.



**Abb. 19: Der Einfluss von PMA auf die PKC-Isoform  $\delta$  in EA.hy 926-Zellen.**

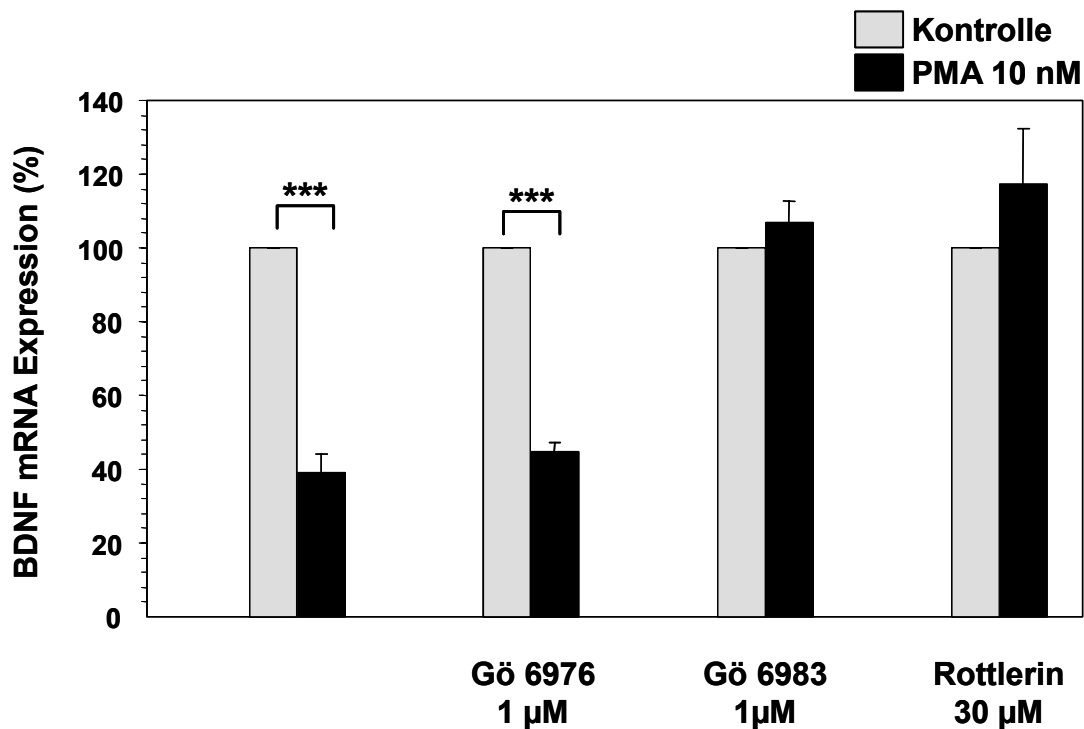
EA.hy 926-Zellen wurden für 0, 1, 6 oder 48h mit PMA (10 nM) behandelt. Nach der Stimulation wurden Gesamtprotein (Abb. 19a) bzw. Proteine der Zytosol- und Membranfraktion (Abb. 19b) isoliert. Die Protein-Expression der PKC-Isoform  $\delta$  bzw. von  $\beta$ -Tubulin wurde in 15  $\mu$ g aufgetragenem Protein mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen die PKC-Isoform  $\delta$  oder  $\beta$ -Tubulin in der Western-Blot-Analyse untersucht. Dargestellte Western-Blots zeigen repräsentativ die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente mit ähnlichen Ergebnissen.

### 5.3.5. Die PKC-Inhibitoren Rottlerin und Gö 6983 heben den reduzierenden Einfluss von PMA auf die BDNF-mRNA-Expression auf

Nachdem nun bekannt war, dass PMA die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$ , und  $\varepsilon$  in EA.hy 926-Zellen aktiviert (siehe Kapitel 5.3.4. und 6.3.2.), sollte durch den Einsatz verschiedener PKC-Inhibitoren die Isoform identifiziert werden, die den Einfluss von PMA auf die BDNF-Expression vermittelt. Hierfür wurden EA.hy 926-Zellen in An- oder Abwesenheit von PMA (10 nM) für 6h inkubiert. Die Inhibition der verschiedenen PKC-Isoformen erfolgte durch Zugabe der Inhibitoren Gö 6976 (1  $\mu$ M), Gö 6983 (1  $\mu$ M) bzw. Rottlerin (30  $\mu$ M), die bereits 30 min vor der Zugabe von PMA bzw. DMSO (0,1%, Kontrolle) auf die Zellen gegeben wurden. Tab. 5 zeigt zusammenfassend das Wirkspektrum der unterschiedlichen Inhibitoren für die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$ , angegeben als  $IC_{50}$ -Wert in  $\mu$ M. Nach der Stimulation wurde Gesamt-RNA der Zellen isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die BDNF-mRNA-Expression von PMA-unbehandelten Zellen als auch von Zellen, die nur mit den Inhibitoren behandelt wurden, wurde auf je 100% gesetzt. Zu erkennen ist wiederum, dass PMA die BDNF-Expression signifikant auf  $39\pm 5\%$  reduziert (Abb. 20). Auch unter dem Einfluss von Gö 6976, einem Inhibitor der PKC-Isoform  $\alpha$ , bleibt die signifikante Reduktion durch PMA-Behandlung bestehen ( $45\pm 3\%$ ). Gö 6983 sowie Rottlerin, Inhibitoren der PKC-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$ , heben die Wirkung von PMA allerdings vollständig auf. Eine Behandlung der Zellen mit PMA beeinflusst hier die BDNF-Expression nicht mehr ( $107\pm 6\%$  Gö 6983 + PMA,  $117\pm 15\%$  Rottlerin + PMA).

**Tab. 5: Eingesetzte PKC-Inhibitoren mit ihrem Wirkspektrum für die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$**

PKC-Isoform	Gö 6976	Gö 6983	Rottlerin	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
PKC $\alpha$	0,002	0,007	30-42	
PKC $\delta$	-	0,01	3-6	
PKC $\varepsilon$	-	-	80-100	

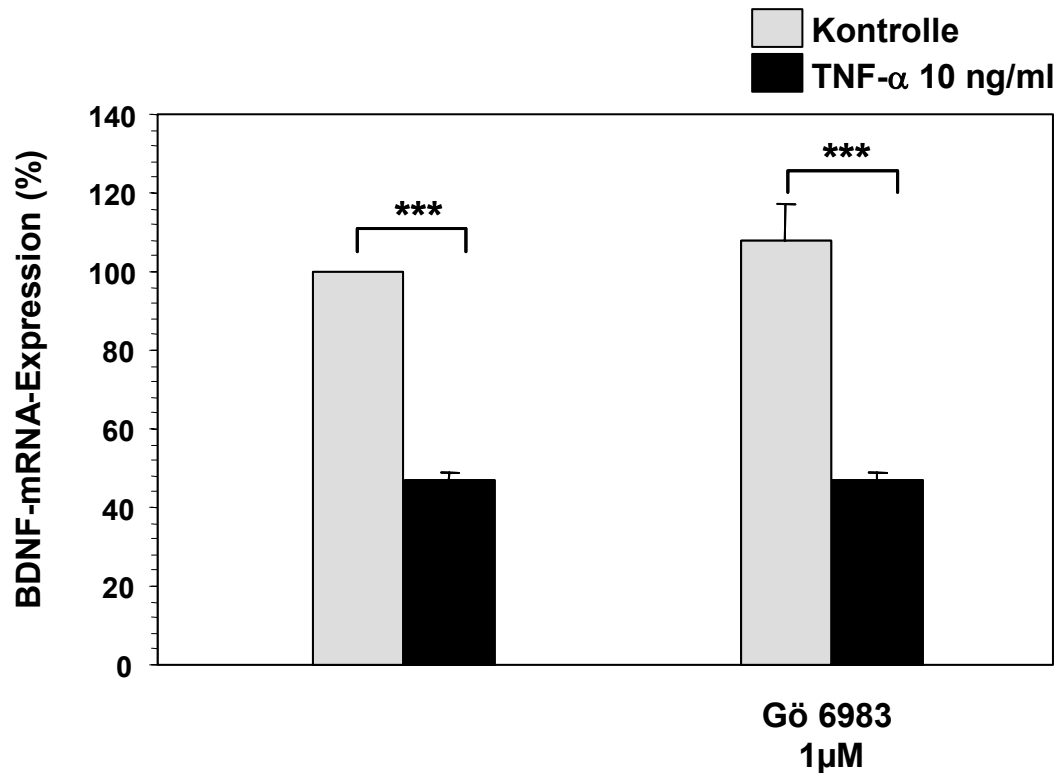


**Abb. 20: Die PKC-Inhibitoren Rottlerin und Gö 6983 heben den reduzierenden Einfluss von PMA auf die BDNF-mRNA-Expression auf.**

EA.hy 926-Zellen wurden für 30 min mit den Inhibitoren Gö 6976 (1 µM), Gö 6983 (1 µM) bzw. Rottlerin (30 µM) vorbehandelt. Danach folgte die Zugabe von PMA (10 nM) inklusive der Inhibitoren für weitere 6h. Gesamt-RNA wurde isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression PMA-unbehandelter Zellen als auch von Zellen, die nur mit den Inhibitoren behandelt wurden, wurde auf je 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW  $\pm$  SEM von n=6-9 (\*\*\*) P<0,001).

### **5.3.6. Der reduzierende Einfluss von TNF- $\alpha$ auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch den PKC-Inhibitor Gö 6983 nicht aufgehoben**

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  die BDNF-mRNA-Expression reduziert (siehe Kapitel 5.2.1.). Weiterhin ist von TNF- $\alpha$  beschrieben worden, dass es die PKC in Endothelzellen aktivieren kann (Frey *et al.*, 2002). Da die BDNF-mRNA-Expression durch eine Aktivierung der PKC  $\delta$  reguliert wird (siehe Kapitel 5.3.1.), sollte mit Hilfe des PKC-Inhibitors Gö 6983 getestet werden, ob bei der Reduzierung der BDNF-mRNA-Expression durch TNF- $\alpha$  eine Aktivierung der PKC beteiligt ist. EA.hy 926-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) für 6h bei 37°C kultiviert. Gö 6983 wurde 30 min vor der Zugabe von TNF- $\alpha$  auf die Zellen gegeben. Nach der Stimulation wurde Gesamt-RNA isoliert und die BDNF-Expression mittels qRT-PCR analysiert. In Abb. 21 ist die relative BDNF-Expression nach TNF- $\alpha$ -Behandlung bzw. unter Einfluss von Gö 6983 dargestellt. TNF- $\alpha$  reduzierte auch hier signifikant die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen auf  $47\pm 4\%$  im Vergleich zu Kontrollzellen. Eine Behandlung der Zellen mit Gö 6983 alleine veränderte die BDNF-Expression nicht ( $110\pm 8\%$ ). Die reduzierende Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-Expression konnte durch eine Inhibition der PKC allerdings nicht aufgehoben werden. Auch hier regulierte TNF- $\alpha$  die BDNF-Expression signifikant auf  $47\pm 1\%$  im Vergleich zu Kontrollzellen herunter.



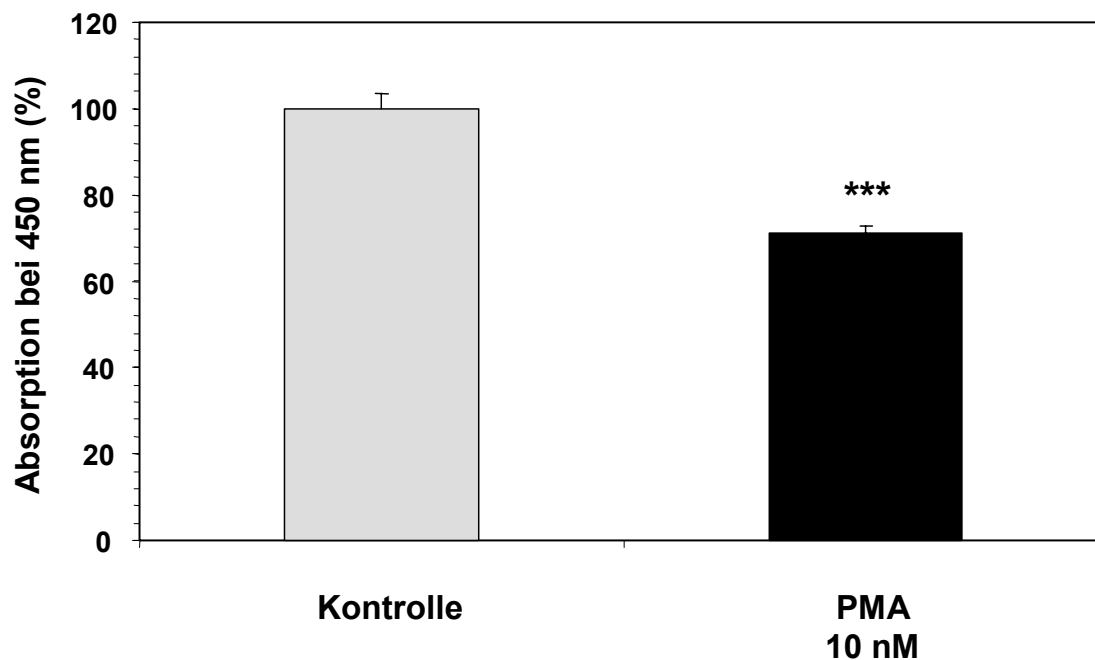
**Abb. 21: Der reduzierende Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch den PKC-Inhibitor Gö 6983 nicht aufgehoben.**

EA.hy 926-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bzw. Gö 6983 (1  $\mu$ M) für 6h behandelt. Die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor erfolgte bereits 30 min vor der TNF- $\alpha$ -Behandlung. Nach der Stimulation wurde Gesamt-RNA isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW $\pm$  SEM von n=6 (\*\*\*) P<0,001).



### 5.3.7. PMA reduziert die BDNF-Protein-Expression in HUVEC

Um den Einfluss von PMA auf die BDNF-Protein-Expression zu untersuchen, wurden konfluente HUVEC in serumreduziertem Medium für 48 h mit PMA (10 nM) bzw. DMSO (0,1%, Kontrolle) behandelt. Im Zellüberstand wurde nach der Stimulation das BDNF-Protein mit Hilfe des „BDNF E<sub>max</sub><sup>®</sup> ImmunoAssay System“ quantifiziert (siehe Kapitel 4.3.7.). Hierfür wurde die Absorption bei 450 nm gemessen, die in Kontroll-behandelten Zellen auf 100% gesetzt wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt. Eine Behandlung der Zellen mit PMA führt zu einer signifikanten Reduktion der Absorption bei 450 nm auf 71±2% im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen.



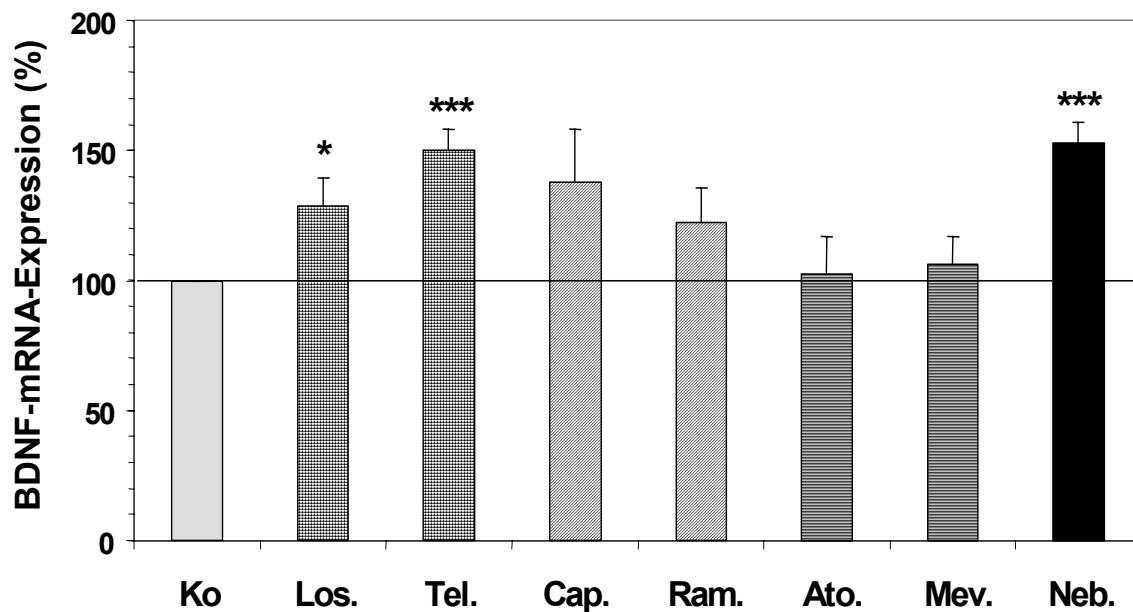
**Abb. 22: PMA reduziert die BDNF-Protein-Expression HUVEC.**

HUVEC wurden für 48h in serumreduziertem Medium mit PMA (10 nM) bzw. DMSO (0,1%) behandelt. Im Zellüberstand wurde anschließend das BDNF-Protein mit Hilfe des „BDNF E<sub>max</sub><sup>®</sup> ImmunoAssay System“ quantifiziert. Hierfür wurde die Absorption bei 450 nm gemessen und in Kontroll-behandelten Zellen auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW der Absorption bei 450 nm ± SEM von n=4 (\*\*\*) P<0,001).

## **5.4. Nebivolol stimuliert die BDNF-Expression in zerebralen Endothelzellen**

### **5.4.1. Die Wirkung vasoaktiver Pharmaka auf die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen**

Um den Einfluss verschiedener vasoaktiver Pharmaka auf die BDNF-mRNA-Expression zu untersuchen, wurden bEnd.3-Zellen für 18h mit unterschiedlichen Substanzen in serumreduziertem Medium (1% FCS) inkubiert. Hierzu gehören die AT1-Rezeptorantagonisten Losartan und Telmisartan (je 10  $\mu\text{M}$ ), die ACE-Inhibitoren Captopril und Ramipril (je 10  $\mu\text{M}$ ), die Statine Atorvastatin (30  $\mu\text{M}$ ) und Mevastatin (10  $\mu\text{M}$ ) sowie der  $\beta_1$ -Adrenozeptorantagonist Nebivolol (7,5  $\mu\text{M}$ ). Gewählte Konzentrationen der einzelnen Substanzen orientierten sich hierbei an vorhandenen Literaturdaten. Nach 18-stündiger Behandlung der Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und die relative BDNF-mRNA-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Im Vergleich zu Kontrollzellen wurde die BDNF-Expression durch eine Behandlung der Zellen mit den Statinen (Atorvastatin  $102\pm 15\%$ , Mevastatin  $106\pm 11\%$ ) oder mit den ACE-Inhibitoren (Captopril  $138\pm 20\%$ , Ramipril  $122\pm 13\%$ ) nicht signifikant verändert (Abb. 23). Signifikante Veränderungen waren jedoch sowohl bei beiden AT1-Rezeptorantagonisten Losartan und Telmisartan als auch bei dem  $\beta_1$ -Blocker Nebivolol zu beobachten. Hier wurde die BDNF-mRNA-Expression auf  $129\pm 11\%$  (Losartan),  $150\pm 28\%$  (Telmisartan) bzw.  $153\pm 8\%$  (Nebivolol) gesteigert.

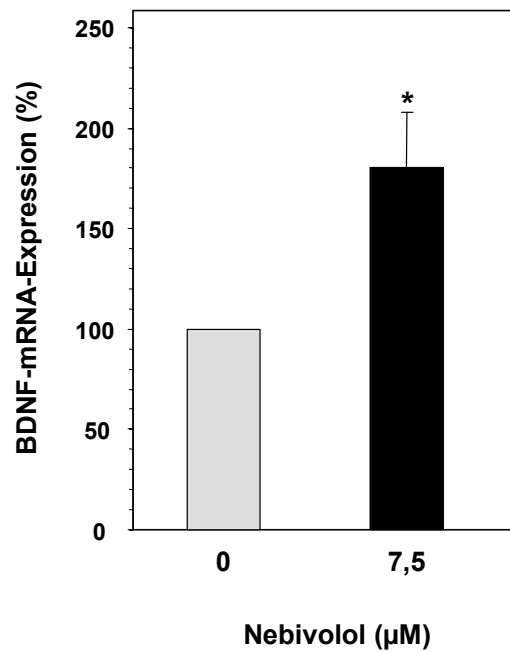
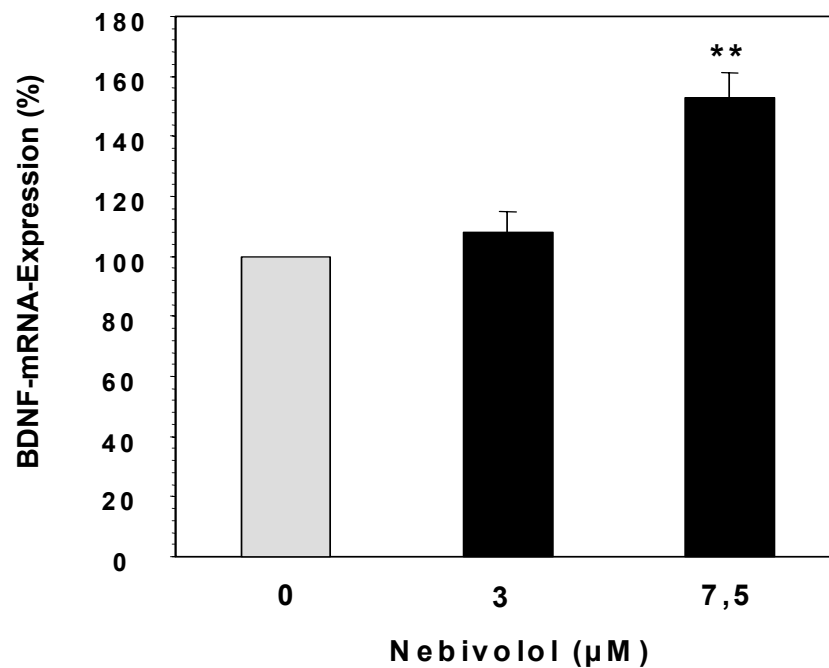


**Abb. 23: Der Wirkung vasoaktiver Pharmaka auf die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen.**

bEnd.3-Zellen wurden für 18h mit folgenden Substanzen behandelt: Kontrolle (Ko, 0,1% DMSO), Losartan (Los., 10  $\mu$ M), Telmisartan (Tel., 10  $\mu$ M), Captopril (Cap., 10  $\mu$ M), Ramipril (Ram., 10  $\mu$ M), Atorvastatin (Ato., 30  $\mu$ M), Mevastatin (Mev., 10  $\mu$ M) oder Nebivolol (Neb., 7,5  $\mu$ M). Gesamt-RNA wurde anschließend isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW  $\pm$  SEM von n=2-12 (\* P<0,05; \*\*\* P<0,001).

#### **5.4.2. Nebivolol erhöht die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen**

In einem weiteren Schritt sollte nun zunächst die Regulation der BDNF-mRNA-Expression durch Nebivolol näher untersucht werden. Die nähere Analyse der Wirkungen von Losartan und Telmisartan auf die BDNF-mRNA wurde für zukünftige Experimente in Betracht gezogen. bEnd.3-Zellen wurden für 6 oder 18h mit verschiedenen Konzentrationen an Nebivolol behandelt (3 oder 7,5  $\mu\text{M}$ ). Nach der Stimulation wurde RNA isoliert und die BDNF-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der 6-stündigen Behandlung sind in Abb. 24a dargestellt, die der 18h-stündigen in Abb. 24b. Sowohl nach 6- als auch 18-stündiger Behandlung der Zellen mit Nebivolol (7,5  $\mu\text{M}$ ) ist im Vergleich zu Kontrollzellen ein signifikanter Anstieg der BDNF-mRNA-Expression zu beobachten (6h  $180\pm 28\%$ , 18h  $153\pm 8\%$ ).

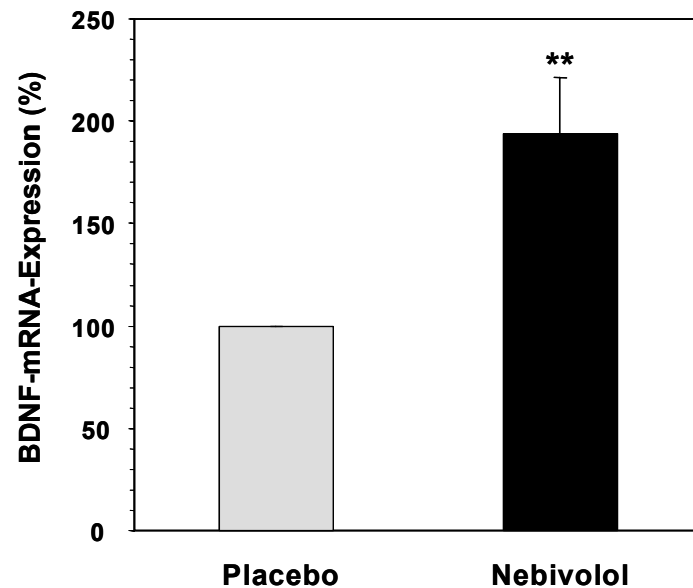
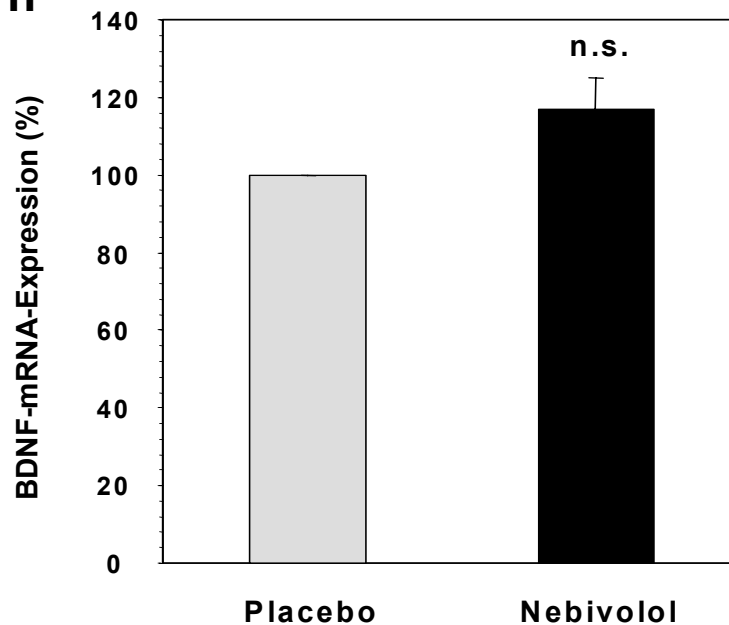
**a. 6h****b. 18h**

**Abb. 24: Nebivolol erhöht die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen.**

bEnd.3-Zellen wurden mit Nebivolol (3 oder 7,5 µM) für 6h (Abb. 24a) oder 18h (Abb. 24b) behandelt. Nach der Stimulation wurde Gesamt-RNA isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW ± SEM von n=3-9 (\* P<0,05; \*\* P<0,01).

### 5.4.3. Nebivolol-behandelte Mäuse zeigen eine erhöhte BDNF-mRNA-Expression im Herz

Nachdem eine stimulierende Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression in zerebralen Endothelzellen gefunden werden konnte (siehe Kapitel 5.4.2.), sollte nun im nächsten Schritt untersucht werden, ob eine Nebivolol-Behandlung auch *in vivo* zu einer erhöhten BDNF-Expression führt. Hierfür wurden männliche C57BL/6J Mäuse für 14 Tage mit 30 mg/kg/Tag Nebivolol behandelt. Nach der Behandlung wurden die Mäuse getötet; Herz und Gehirn wurden entnommen. Gesamt-RNA wurde aus den jeweiligen Geweben isoliert und die BDNF-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die BDNF-mRNA-Expression von Placebo-behandelten Tieren wurde auf 100% gesetzt. Abb. 25 zeigt den Einfluss von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression im Herz (Abb. 25a) und im Gehirn (Abb. 25b) der Maus. Im Herz ist ein signifikanter Anstieg der BDNF-mRNA-Expression durch Nebivolol auf  $194 \pm 28\%$  zu erkennen. Im Gehirn wird die BDNF-Expression durch Nebivolol nicht signifikant verändert. Hier ist nur ein leichter Anstieg auf  $117 \pm 8\%$  zu beobachten.

**a. Herz****b. Gehirn**

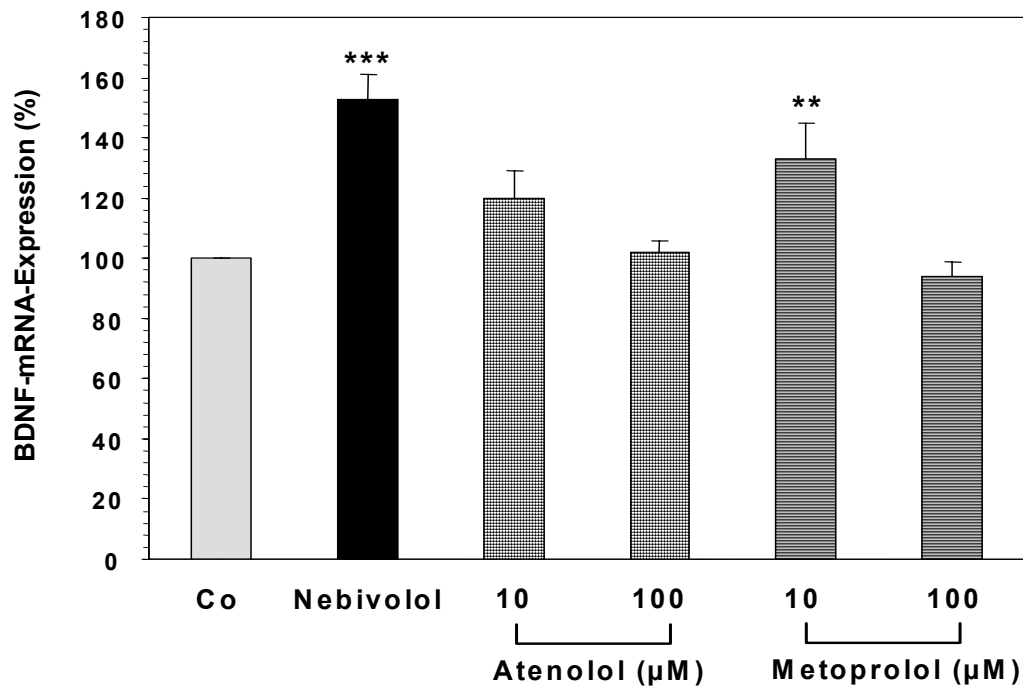
**Abb. 25: Nebivolol-behandelte Mäuse zeigen eine erhöhte BDNF-mRNA-Expression im Herz.**

C57BL/6J Mäuse wurden für 14 Tage mit 30 mg/kg/Tag Nebivolol behandelt. Nach der Behandlung wurden die Tiere getötet, Herz und Gehirn wurden entnommen und Gesamt-RNA aus den Geweben isoliert. Die relative BDNF-Expression wurde anschließend mittels qRT-PCR für Herz- (Abb. 25a) bzw. Gehirngewebe (Abb. 25b) ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression Placebo-behandelter Tieren wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n=8-16$  (\*\*  $P<0,01$ ; n.s. = nicht signifikant).

#### **5.4.4. Die $\beta_1$ -Adrenozeptorantagonisten Atenolol und Metoprolol verändern die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen nicht**

Durch eine Behandlung von bEnd.3-Zellen mit den  $\beta_1$ -Adrenozeptorantagonisten Atenolol oder Metoprolol sollte analysiert werden, ob möglicherweise auch weitere  $\beta_1$ -Rezeptorantagonisten neben Nebivolol einen Einfluss auf die BDNF-mRNA-Expression haben. Hierfür wurden konfluente bEnd.3-Zellen mit Atenolol (10 oder 100  $\mu\text{M}$ ), Metoprolol (10 oder 100  $\mu\text{M}$ ), Nebivolol (7,5  $\mu\text{M}$ ) oder DMSO (0,1%) für 18h inkubiert. Nach der Inkubation wurde Gesamt-RNA isoliert und die BDNF-Expression durch qRT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der qRT-PCR sind in Abb. 26 dargestellt. Wiederum ist ein signifikanter Anstieg der BDNF-mRNA-Expression durch Nebivolol auf  $153\pm 8\%$  zu erkennen. Eine Behandlung der Zellen mit Atenolol oder Metoprolol (100  $\mu\text{M}$ ) verändert die BDNF-mRNA-Expression nicht signifikant (Atenolol 10  $\mu\text{M}$   $120\pm 9\%$ , Atenolol 100  $\mu\text{M}$   $102\pm 4\%$ , Metoprolol 100  $\mu\text{M}$   $94\pm 5\%$ ). Allerdings führt eine Behandlung der Zellen mit einer niedrigeren Konzentration an Metoprolol (10  $\mu\text{M}$ ) zu einem signifikanten Anstieg der BDNF-mRNA-Expression ( $133\pm 12\%$ ).



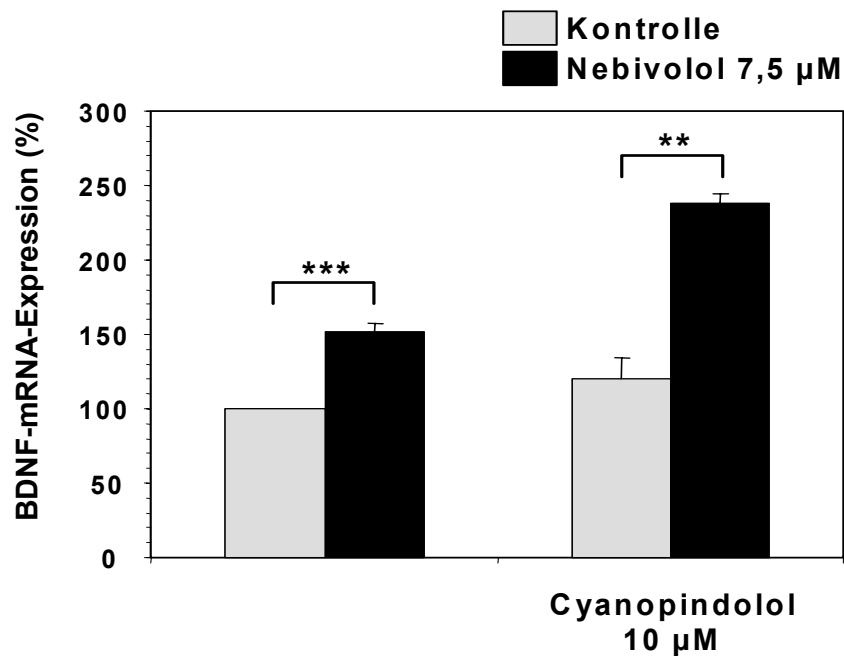


**Abb. 26: Die  $\beta_1$ -Adrenozeptorantagonisten Atenolol und Metoprolol verändern die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen nicht.**

bEnd.3-Zellen wurden mit Atenolol (10 oder 100  $\mu\text{M}$ ), Metoprolol (10 oder 100  $\mu\text{M}$ ), Nebivolol (7,5  $\mu\text{M}$ ) oder DMSO (0,1%, Co) für 18h in serumreduziertem Medium behandelt. Nach der Stimulation wurde Gesamt-RNA isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW  $\pm$  SEM von n=3-12 (\*\* P<0,001).

#### **5.4.5. Der $\beta_3$ -Adrenozeptorantagonist Cyanopindolol hebt die stimulierende Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression nicht auf**

Da bereits eine  $\beta_3$ -Adrenozeptoraktivierung durch Nebivolol beschrieben worden ist (siehe Kapitel 6.4.2.), sollte im nächsten Schritt eine Beteiligung des  $\beta_3$ -Adrenozeptors an der Nebivolol-induzierten Hochregulation der BDNF-Expression untersucht werden. Hierfür wurden bEnd.3-Zellen in An- oder Abwesenheit von Nebivolol (7,5  $\mu$ M) für 18h behandelt. Die Antagonisierung des  $\beta_3$ -Adrenozeptors fand durch den  $\beta_3$ -Adrenozeptorantagonisten Cyanopindolol statt. Eine Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor fand bereits 30 min vor der Zugabe von Nebivolol statt. Nach der Inkubation wurde Gesamt-RNA isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. In Abb. 27 ist der Einfluss von Cyanopindolol auf die Nebivolol-induzierte Hochregulation der BDNF-Expression dargestellt. Nebivolol erhöht hier die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen auf  $152\pm 5\%$ . Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit dem  $\beta_3$ -Adrenozeptorantagonisten Cyanopindolol hatte keinen Einfluss auf die Nebivolol-induzierte Hochregulation der BDNF-Expression in bEnd.3-Zellen ( $238\pm 6\%$ ). Eine Behandlung der Zellen mit Cyanopindolol allein veränderte die BDNF-mRNA-Expression nicht signifikant ( $120\pm 14\%$ ).



**Abb. 27: Der  $\beta_3$ -Adrenozeptorantagonist Cyanopindolol hebt die stimulierende Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression nicht auf.**

bEnd.3-Zellen wurden für 30 min mit dem  $\beta_3$ -Adrenozeptorantagonist Cyanopindolol (10  $\mu$ M) vorbehandelt. Danach folgte die Zugabe von Nebivolol (7,5  $\mu$ M) bzw. DMSO (0,1%, Kontrolle) in Anwesenheit von Cyanopindolol für weitere 18h. Gesamt-RNA wurde isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression von unbehandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW  $\pm$  SEM von n=3-9 (\*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001).

#### **5.4.6. Die Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen ist NO-unabhängig**

Da in einigen Studien bereits gezeigt werden konnte, dass Nebivolol in Endothelzellen eine stimulierende Wirkung auf die NO-Freisetzung hat (siehe Kapitel 6.4.2.), sollte aus diesem Grund überprüft werden, ob die Regulation der BDNF-Expression durch Nebivolol ebenfalls NO-abhängig verläuft. Für die Analyse einer möglichen NO-abhängigen Regulation der BDNF-Expression durch Nebivolol wurden verschiedene experimentelle Ansätze gewählt.

##### **5.4.6.1. Die stimulierende Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen wird durch den NOS-Inhibitor L-NAME nicht aufgehoben**

Abb. 28 zeigt die BDNF-mRNA-Expression von bEnd.3-Zellen, die mit dem NOS-Inhibitor L-NAME behandelt wurden. Konfluente bEnd.3-Zellen wurden für 18h mit Nebivolol (7,5  $\mu$ M) bzw. DMSO (0,1%) behandelt. In einigen Zellen wurde die Aktivität der eNOS durch Zugabe des NOS-Inhibitors L-NAME unterbunden. Die Inkubation der Zellen mit L-NAME fand bereits 30 min vor der Zugabe von Nebivolol bzw. DMSO statt. RNA wurde isoliert und die BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Es zeigte sich, dass die Inhibition der eNOS-Aktivität keinen Einfluss auf die Nebivolol-induzierte BDNF-Hochregulation hatte. Sowohl in L-NAME-behandelten Zellen als auch in Zellen, die nicht mit dem NOS-Inhibitor inkubiert wurden, erhöht Nebivolol signifikant die BDNF-Expression auf  $156\pm 5\%$  bzw.  $161\pm 9\%$ . Die alleinige Inkubation der Zellen mit L-NAME veränderte die BDNF-Expression nicht ( $88\pm 11\%$ ).

##### **5.4.6.2. Die BDNF-mRNA-Expression von bEnd.3-Zellen wird durch exogenes NO nicht verändert**

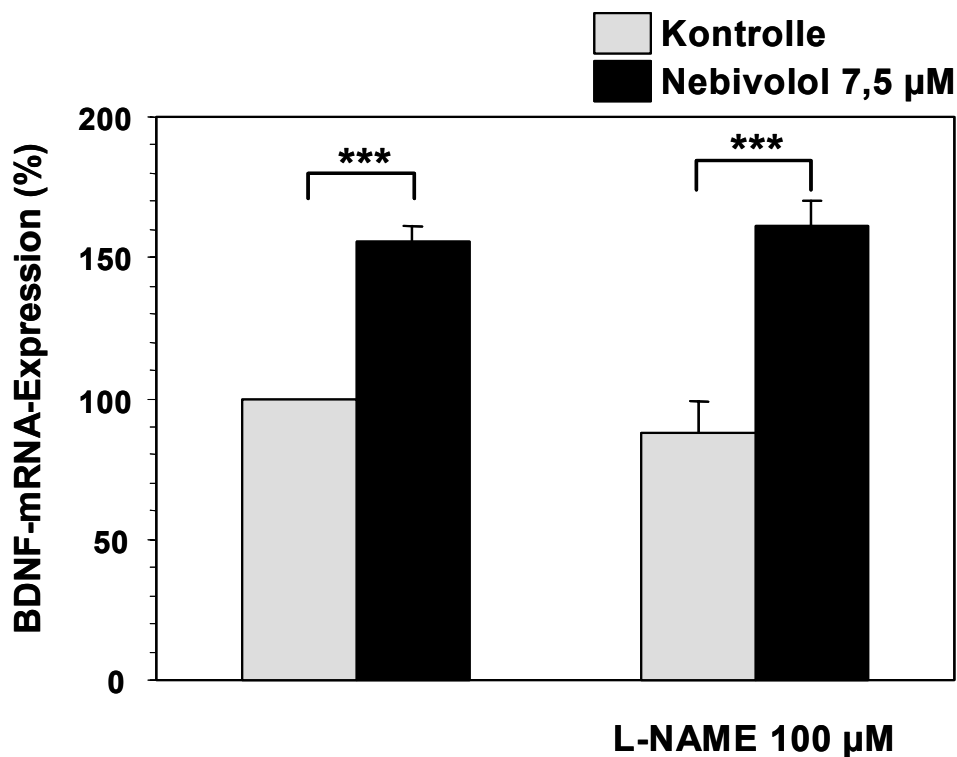
Abb. 29 zeigt den Einfluss von exogenem NO auf die BDNF-mRNA-Expression. bEnd.3-Zellen wurden für 18h mit unterschiedlichen Konzentrationen des NO-Donators Spermin-NONOate (1 oder 10  $\mu$ M) behandelt, Gesamt-RNA wurde anschließend isoliert und die BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Im Vergleich zu Kontrollzellen verändert sich die BDNF-mRNA-Expression durch die

Behandlung mit exogenem NO nicht signifikant (Spermin-NONOate 1  $\mu\text{M}$   $89\pm 9\%$ , Spermin-NONOate 10  $\mu\text{M}$   $88\pm 13\%$ ).

#### **5.4.6.3. Nebivolol hat keinen Einfluss auf die eNOS-mRNA-Expression und eNOS-Aktivität in bEnd.3-Zellen**

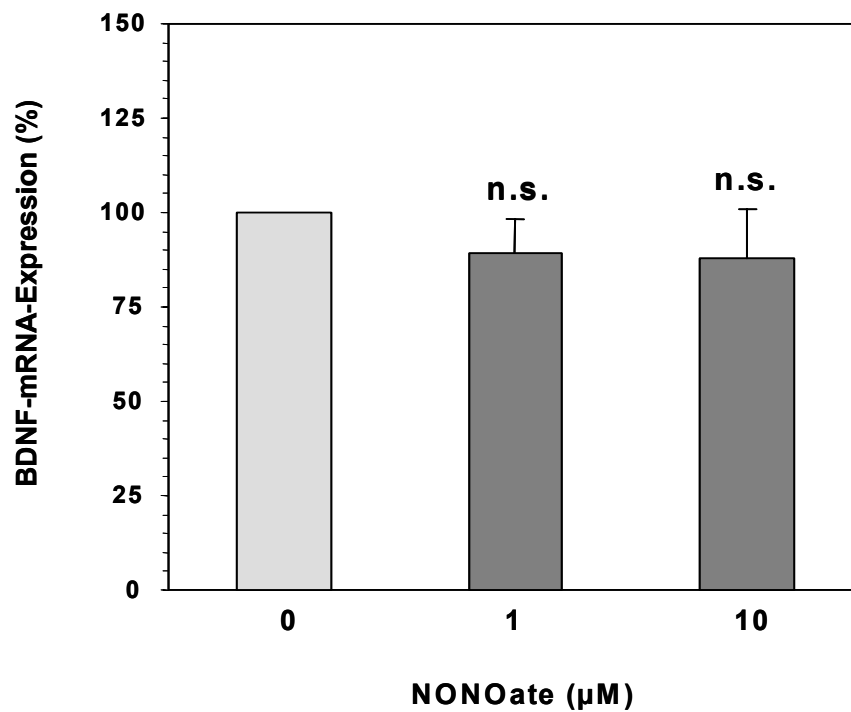
In Abb. 30 ist die eNOS-mRNA-Expression von bEnd.3-Zellen dargestellt, die für 18h mit Nebivolol (3 oder 7,5  $\mu\text{M}$ ) oder DMSO (0,1%) behandelt wurden. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen, dass durch eine Behandlung der Zellen mit einer niedrigen Konzentration an Nebivolol (3  $\mu\text{M}$ ) die eNOS-mRNA-Expression erhöht wird ( $136\pm 7\%$ ). Bei einer höheren Konzentration an Nebivolol (7,5  $\mu\text{M}$ ) allerdings wird die eNOS-mRNA-Expression nicht signifikant verändert ( $117\pm 7\%$ ).

Auch die eNOS-Aktivität wird durch eine Behandlung der Zellen mit Nebivolol nicht beeinflusst. Abb. 31 zeigt die Ergebnisse des RFL-6-Reporterzell-Assays. Konfluente bEnd.3-Zellen wurden für 3 min mit Nebivolol (7,5  $\mu\text{M}$ ) bzw. DMSO (0,1%) stimuliert, und der Zellüberstand wurde anschließend auf RFL-6-Zellen transferiert. Von RFL-6-Zellen gebildetes cGMP wurde dann im Radioimmunassay quantifiziert (siehe Kapitel 4.4.). Die ermittelte cGMP-Konzentration von RFL-6-Zellen, die mit dem Zellüberstand von DMSO-stimulierten Zellen behandelt wurden, lag bei  $159\pm 23$  pmol/ml. Eine Behandlung von bEnd.3-Zellen mit Nebivolol reduzierte die cGMP-Konzentration in RFL-6-Zellen nach dem Transfer auf  $142\pm 15$  pmol/ml. Diese Reduktion der cGMP-Konzentration ist allerdings im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen nicht signifikant.



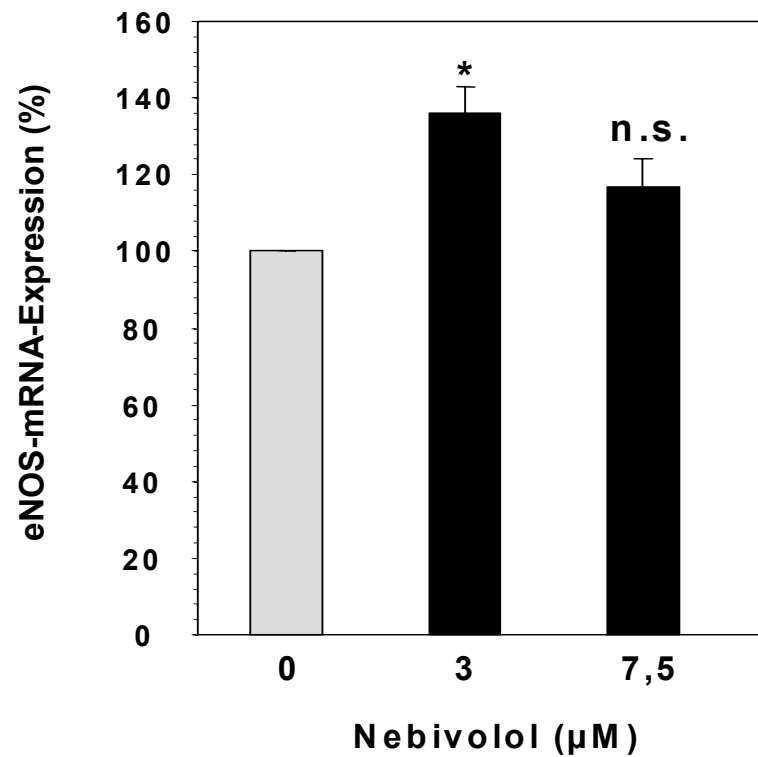
**Abb. 28: Die stimulierende Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen wird durch den NOS-Inhibitor L-NAME nicht aufgehoben.**

bEnd.3-Zellen wurden für 18h mit Nebivolol (7,5 µM) bzw. DMSO (0,1%) behandelt. In einigen Zellen wurde die Aktivität der eNOS durch die Zugabe des NOS-Inhibitors L-NAME (100 µM) unterbunden. Der Inhibitor wurde hierbei bereits 30 min vor der Zugabe von Nebivolol oder DMSO auf die Zellen gegeben. Gesamt-RNA wurde anschließend isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression von Zellen, die weder mit Nebivolol noch mit L-NAME behandelt wurden, wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW ± SEM von n=5-6 (\*\*\*) P<0,001).



**Abb. 29:** Die BDNF-mRNA-Expression von bEnd.3-Zellen wird durch exogenes NO nicht verändert.

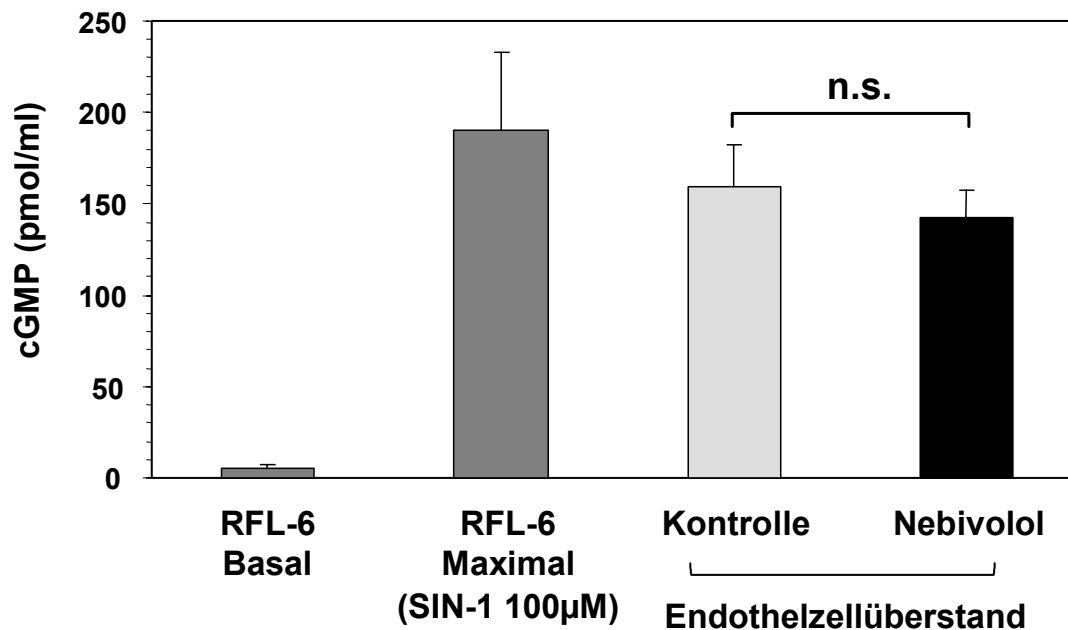
bEnd.3-Zellen wurden für 18h mit unterschiedlichen Konzentrationen des NO-Donators Spermin-NONOate (1 oder 10 µM) behandelt. Gesamt-RNA wurde nach der Stimulation isoliert und die relative BDNF-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative BDNF-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW ± SEM von n=9 (n.s. = nicht signifikant).



**Abb. 30: Nebivolol verändert die eNOS-mRNA-Expression in bEnd.3-Zellen nicht.**

bEnd.3-Zellen wurden mit Nebivolol (3 oder 7,5 µM) bzw. DMSO (0,1%, Kontrolle) für 18h behandelt. Gesamt-RNA wurde nach der Stimulation isoliert und die relative eNOS-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Die relative eNOS-mRNA-Expression der Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellte Säulen zeigen den MW ± SEM von n=3 (\* P<0,05; n.s. = nicht signifikant).





**Abb. 31: Nebivolol hat keinen Einfluss auf die eNOS-Aktivität in bEnd.3-Zellen.**

Konfluente bEnd.3-Zellen wurden für 3 min mit Nebivolol (7,5 µM) bzw. DMSO (0,1%, Kontrolle) stimuliert, und der Zellüberstand wurde anschließend auf RFL-6-Zellen transferiert. Von RFL-6-Zellen gebildetes cGMP wurde dann mit Hilfe des Radioimmunassays quantifiziert. Die basale cGMP-Produktion von RFL-6-Zellen als auch nach Stimulation mit dem NO-Donator SIN-1 (100 µM, Positivkontrolle) ist ebenfalls mit aufgetragen. Dargestellt ist der MW der cGMP-Konzentration in pmol/ml ± SEM von n=3-4 (n.s. = nicht signifikant).

## 6. Diskussion

### 6.1. Die stimulierende Wirkung von BDNF auf die Angiogenese in HUVEC wird durch die Rezeptoren TrkB und p75<sup>NTR</sup> vermittelt

In der vorliegenden Arbeit konnte deutlich gezeigt werden, dass BDNF einen stimulierenden und fördernden Einfluss auf die Angiogenese in HUVEC hat. Vergleicht man in Abb. 5a (siehe Kapitel 5.1.1.) die Tubulusbildung von Kontroll- und BDNF-behandelten Zellen, so sieht man in Folge einer BDNF-Behandlung eine vermehrte Ausbildung von Vernetzungen und Verzweigungen der Zellen untereinander. Im Vergleich hierzu zeigen BDNF-unbehandelte Zellen nur einen geringen Grad an Vernetzungen, die meisten Zellen liegen isoliert voneinander vor. BDNF stimuliert somit die Tubulusbildung von Endothelzellen deutlich. Die vorliegenden Daten werden durch Beobachtungen von *Hu et al.* und *Sun et al.* bestätigt (*Hu et al.*, 2005; *Sun et al.*, 2006). Auch hier stimuliert BDNF die Angiogenese von HUVEC *in vitro* als auch die Angiogenese *in vivo* (chorioallantoische Membran aus Hühnerembryonen).

*Kermani et al.* konnten bereits zeigen, dass die Fähigkeit von BDNF, die Angiogenese zu stimulieren, von der gleichzeitigen Expression des Rezeptors TrkB abhängt (*Kermani et al.*, 2005). So hatte BDNF keinen stimulierenden Einfluss auf die Tubulusbildung von Endothelzellen, die den Rezeptor TrkB nicht exprimierten („Corneal Pocket Assay“). Gleichzeitig zeigten in einem Ischämiemodell TrkB<sup>+/-</sup>-Mäuse eine geringere Vaskularisierung nach BDNF-Behandlung im Vergleich zu TrkB<sup>+/+</sup>-Wildtypmäusen mit gleicher Behandlung. Der stimulierende Einfluss von BDNF auf die Angiogenese scheint somit von der Expression des TrkB-Rezeptors abhängig zu sein. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals auch im „Matrigel<sup>TM</sup> Angiogenese Assay“ gezeigt werden, dass durch die Inhibition des TrkB-Rezeptors der fördernde Einfluss von BDNF auf die Angiogenese aufgehoben wird (Abb. 6, Kapitel 5.1.2.). Somit kann daraus geschlossen werden, dass der stimulierende Einfluss von BDNF auf die Tubulusbildung in HUVEC über den TrkB-Rezeptor vermittelt wird.

Auch eine Beteiligung des p75<sup>NTR</sup>-Rezeptors an der BDNF-vermittelten Stimulation der Angiogenese war bisher in HUVEC noch nicht beschrieben worden. In einem Ischämiemodell der Maus konnte in p75<sup>NTR/-</sup>-Mäusen gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine schlechtere Durchblutung, eine erhöhte Endothelzellapoptose, eine erniedrigte Kapillardichte und erniedrigte VEGF- sowie bFGF- („basic fibroblast growth factor“) mRNA-Spiegel im betroffenen Gewebe als auch in zirkulierenden Endothel-Vorläuferzellen aufwiesen (Goukassian *et al.*, 2007). Eine Abhängigkeit zwischen Angiogenese und der Expression bzw. Aktivierung des p75<sup>NTR</sup>-Rezeptors scheint also zu bestehen. Eine Beteiligung des p75<sup>NTR</sup>-Rezeptors an der BDNF-vermittelten Angiogenese ist allerdings bisher noch nicht beschrieben worden. Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten zeigen nun, dass BDNF bei gleichzeitiger Inhibition des p75<sup>NTR</sup>-vermittelten Signalweges eine stimulierende Wirkung auf die Angiogenese besitzt (Abb. 6, Kapitel 5.1.2.). Diese Wirkung ist allerdings im Vergleich zu einer Stimulation der Tubulusbildung durch BDNF ohne Inhibition von p75<sup>NTR</sup> signifikant reduziert. Somit scheint dieser Rezeptor zwar an der BDNF-vermittelten Stimulation der Angiogenese beteiligt zu sein, allerdings in einem geringeren Maß als der TrkB-Rezeptor. Wird der TrkB-Rezeptor in seiner Aktivität blockiert, so ist die stimulierende Wirkung von BDNF auf die Angiogenese völlig aufgehoben. Von p75<sup>NTR</sup> ist bekannt, dass er die Affinität von Neurotrophinen zu ihren jeweiligen Rezeptoren erhöhen kann, wenn er mit den spezifischen Neurotrophinrezeptoren koexprimiert wird (siehe hierzu auch Kapitel 1.1.4.) (Bibel *et al.*, 1999; Hempstead, 2002). Es ist also denkbar, dass die Stimulation der Angiogenese durch BDNF hauptsächlich über eine Aktivierung des TrkB-Rezeptors verläuft. Diese Stimulation wird allerdings bei gleichzeitiger Aktivierung des p75<sup>NTR</sup> deutlich verbessert.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die stimulierende Wirkung von BDNF auf die Tubulusbildung in HUVEC über den TrkB-Rezeptor vermittelt wird. Eine gleichzeitige Aktivierung des p75<sup>NTR</sup> erhöht zusätzlich die Wirkung von BDNF auf die Angiogenese in HUVEC.

## 6.2. TNF- $\alpha$ reduziert die BDNF-Expression in peripheren Endothelzellen

Die hier vorgelegten Daten zeigen deutlich, dass TNF- $\alpha$  zu einer signifikanten Reduktion der BDNF-mRNA-Expression in peripheren Endothelzellen (EA.hy 926-Zellen und HUVEC) führt. Diese Reduktion der BDNF-mRNA-Expression erfolgte in beiden Zelltypen konzentrationsabhängig (Abb. 7 und Abb. 8, Kapitel 5.2.1.). Untersuchungen der Substantia nigra von M. Parkinson-Patienten zeigten bereits sowohl erhöhte TNF- $\alpha$ -Spiegel als auch erniedrigte BDNF-Spiegel (Nagatsu *et al.*, 2000; Nagatsu and Sawada, 2005; Sawada *et al.*, 2006). Ob eine erniedrigte BDNF-Konzentration Folge einer erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentration ist, wurde allerdings noch nicht näher untersucht. Weiterhin wurde in den genannten Arbeiten Gesamtgewebe analysiert. Zelltypspezifische Korrelationen zwischen einer erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentration und einer erniedrigten BDNF-Expression wurden nicht weiter untersucht. Bayas *et al.* konnten nun einen Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-Expression in Endothelzellen zeigen (Bayas *et al.*, 2002). TNF- $\alpha$  erhöhte die BDNF-Expression in zerebralen Endothelzellen; in peripheren Endothelzellen (HUVEC) hingegen konnte eine Reduktion der BDNF-Expression durch TNF- $\alpha$  beobachtet werden. Somit bestätigen die vorliegenden Daten bisherige Beobachtungen. Erstmals konnte ein Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression auch in EA.hy 926-Zellen gezeigt werden. Auch hier wurde die BDNF-Expression durch TNF- $\alpha$  herunterreguliert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-Expression bereits sehr früh zu erkennen ist und dann über einen Zeitraum von bis zu 24 Stunden konstant bleibt.

TNF- $\alpha$ , ein Zytokin, welches bei vielen pathologischen Prozessen in Folge der Entzündungsreaktion vermehrt produziert wird, hat also einen deutlich regulierenden Einfluss auf die BDNF-Expression in peripheren Endothelzellen. Ob sich die Reduktion der BDNF-Expression durch TNF- $\alpha$  auch auf die Angiogenese der Endothelzellen auswirkt, wird in Kapitel 6.2.3. diskutiert.

### **6.2.1. Die reduzierende Wirkung von TNF- $\alpha$ auf die BDNF-mRNA-Expression wird durch TNFR1 vermittelt**

Die Bindung von TNF- $\alpha$  erfolgt über zwei verschiedene membranständige Rezeptoren. Hierzu gehören TNFR1 (p55) sowie TNFR2 (p75<sup>NTR</sup>) (Chen and Goeddel, 2002). Eine Aktivierung des Rezeptors durch die Bindung von TNF- $\alpha$  führt zu dessen Trimerisierung. Intrazellulär wird eine Kaskade unterschiedlicher Protein-Protein-Wechselwirkungen angeschaltet, die in Folge bestimmte Signalwege aktivieren bzw. regulieren, die sowohl anti-apoptotisch als auch pro-apoptotisch sein können (siehe auch Kapitel 1.1.4.). In HUVEC wurde eine Expression beider TNF-Rezeptoren (TNFR1/p55 und TNFR2/p75<sup>NTR</sup>) gefunden (Nubel *et al.*, 2005). Bisher wird allerdings angenommen, dass die meisten biologischen Funktionen von TNF- $\alpha$  über TNFR1 vermittelt werden (Chen and Goeddel, 2002). In M. Parkinson-Patienten zum Beispiel, bei denen ein erhöhter TNF- $\alpha$ -Spiegel mit einem erniedrigten BDNF-Spiegel korreliert, wurde eine erhöhte Expression des TNFR1 gefunden (siehe hierzu auch Kapitel 1.3.4) (Nagatsu *et al.*, 2000). Ein möglicher Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-Expression könnte also auch hier über TNFR1 vermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine TNFR1-vermittelte Reduktion der BDNF-mRNA-Expression durch TNF- $\alpha$  beobachtet (Abb. 10, Kapitel 5.2.2.). Durch die Inkubation der Zellen mit den TNFR1-Antagonisten WP9QY konnte die Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression vollständig aufgehoben werden. Wurde hingegen der TNFR2/p75<sup>NTR</sup>-vermittelte Signalweg inhibiert, so hatte dies keinen Einfluss auf die Herunterregulation der BDNF-Expression durch TNF- $\alpha$ . Aus diesen Daten kann deshalb geschlossen werden, dass die Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression in peripheren Endothelzellen durch eine Aktivierung des TNFR1 vermittelt wird.

### **6.2.2. TNF- $\alpha$ reguliert die BDNF-mRNA-Expression auf dem Niveau der Transkription**

Die BDNF-mRNA-Expression kann durch zwei verschiedene molekulare Mechanismen reduziert werden. Durch eine Behandlung der Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  kann zum einen die Transkription von BDNF reduziert werden, was eine

verminderte BDNF-mRNA-Expression nach TNF- $\alpha$ -Behandlung erklären würde. Zum anderen könnte TNF- $\alpha$  aber auch posttranskriptionell einen Einfluss auf die Stabilität der BDNF-mRNA haben. Hätte TNF- $\alpha$  eine destabilisierende Wirkung auf die BDNF-mRNA, so könnte auch hierdurch die Reduktion der BDNF-Expression durch TNF- $\alpha$  erklärt werden. Die Ergebnisse in Abb. 11 (Kapitel 5.2.3.) zeigen allerdings, dass TNF- $\alpha$  keinen destabilisierenden Einfluss auf die BDNF-mRNA hat. Nach der Inhibition der Transkription durch die Zugabe des Transkriptions-Inhibitors DRB nimmt die RNA-Expression in Kontrollzellen über einen Zeitraum von 0 bis 4h kontinuierlich ab. Nach 4-stündiger Inhibition der Transkription sind nur noch  $36\pm 5\%$  der ursprünglich vorhandenen BDNF-mRNA zu detektieren. Die hier erhaltenen Daten zur BDNF-mRNA-Stabilität mit einer Halbwertszeit von ca. 3h stimmen somit mit bekannten Daten aus der Literatur überein, die eine Halbwertszeit der BDNF-mRNA von  $132\pm 30$  min für das 1,6 kb lange Transkript angeben (Castren *et al.*, 1998).

Wird die Transkription vollständig inhibiert, so sind Veränderungen zwischen Kontroll- und TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen nur durch einen Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die Stabilität der BDNF-mRNA zu erklären. Die Behandlung der Zellen mit TNF- $\alpha$  aber führt zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Abweichung der BDNF-mRNA-Stabilität im Vergleich zu Kontroll-behandelten Zellen. Auch unter TNF- $\alpha$ -Behandlung wird die BDNF-mRNA auf  $24\pm 4\%$  nach 4-stündiger Inhibition der Transkription reduziert. TNF- $\alpha$  destabilisiert die BDNF-mRNA also nicht. Der reduzierende Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression kann also durch diesen posttranskriptionellen Mechanismus nicht erklärt werden.

Wird allerdings vor einer Behandlung der Zellen mit TNF- $\alpha$  die Transkription inhibiert, so wird der reduzierende Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression aufgehoben (Abb. 12, Kapitel 5.2.4.). Hieraus kann geschlossen werden, dass TNF- $\alpha$  die BDNF-mRNA-Expression über eine Reduktion der Transkription reguliert, da unter Inhibition der Transkription der reduzierende Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-Expression nicht mehr zu beobachten ist. Bisher ist für das BDNF-Gen ein regulatorisches Element bekannt, durch dessen Aktivierung die basale BDNF-Expression in Neuronen reduziert wird (Timmusk *et al.*, 1999). Ob dieses „neuron-restrictive silencer element“ (NRSE) auch in Endothelzellen exprimiert wird und bei

der TNF- $\alpha$ -induzierten Reduktion der BDNF-Expression beteiligt ist, bedarf weiterer Analysen.

### 6.2.3. TNF- $\alpha$ reduziert die Angiogenese in HUVEC

Die hier vorgelegten Daten (Abb. 13, Kapitel 5.2.5.) zeigen eine konzentrationsabhängige und signifikante Reduktion der Tubulusbildung von HUVEC durch TNF- $\alpha$  im „Matrigel<sup>TM</sup> Angiogenese Assay“.

Eine Regulation der Angiogenese durch TNF- $\alpha$  ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden. Allerdings finden sich hier gegensätzliche Daten in Bezug auf die angiogenetischen bzw. anti-angiogenetischen Eigenschaften von TNF- $\alpha$ .

So konnte eine stimulierende Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die Angiogenese *in vivo* in der Maus („Corneal Pocket Assay“) und *in vitro* in bovinen Endothelzellen gefunden werden (Leibovich *et al.*, 1987). Weiterhin wird angenommen, dass die Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die Angiogenese abhängig ist von weiteren sekundären Mediatoren der Angiogenese, die durch TNF- $\alpha$  in ihrer Expression reguliert werden (Chen *et al.*, 2004). So konnte in humanen mikrovaskulären Zellen gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  in Abhängigkeit von der Anwesenheit von VEGF, bFGF und Interleukin-8 (IL-8) die Angiogenese stimuliert (Yoshida *et al.*, 1997). Die durch TNF- $\alpha$  induzierte Stimulation der Tubulusbildung konnte durch Antikörper gegen VEGF, bFGF bzw. IL-8 deutlich vermindert werden. Auch die Induktion der Neoangiogenese durch TNF- $\alpha$  *in vivo* („Corneal Pocket Assay“) war abhängig von der Aktivität von VEGF und IL-8 (Yoshida *et al.*, 1997).

Auch die Studien von *Montrucchio et al.* (Montrucchio *et al.*, 1994) beschreiben eine Stimulation der Angiogenese durch TNF- $\alpha$  in einem *in vivo* „Matrigel-Angiogenese-Assay“ in der Maus. Die TNF- $\alpha$ -induzierte Angiogenese konnte allerdings durch einen PAF- („platelet-activating factor“) Rezeptor-Antagonisten aufgehoben werden. Gleichzeitig induzierte TNF- $\alpha$  die PAF-Synthese im Matrigel. Die Autoren nehmen deshalb an, dass die Stimulation der Angiogenese durch TNF- $\alpha$  durch einen sekundären Mediator, wie hier z.B. PAF, vermittelt wird.

*Patterson et al.* hingegen beobachteten, dass TNF- $\alpha$  in arteriellen und venösen Endothelzellen die Expression der VEGF-Rezeptoren KDR/flk-1 undflt-1 reduziert.

Die Autoren nehmen aus diesem Grund an, dass die VEGF-vermittelte Stimulation der Angiogenese über diese Wirkung von TNF- $\alpha$  inhibiert werden könnte (Patterson *et al.*, 1996).

Daten aus der Literatur zeigen also, dass TNF- $\alpha$  die Angiogenese regulieren kann. Doch die Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die Angiogenese scheint nicht direkt zu sein. Vielmehr sind weitere Mediatoren der Angiogenese von Bedeutung, die wiederum durch TNF- $\alpha$  in ihrer Expression reguliert werden. Hierbei reguliert TNF- $\alpha$  in unterschiedlichen Systemen unterschiedliche Mediatoren, wie z.B. PAF, bFGF oder VEGF, die dann wiederum die Angiogenese beeinflussen. Die hier vorgelegten Daten zeigen nun, dass TNF- $\alpha$  in unserem System (HUVEC) den sekundären Mediator BDNF in seiner Expression vermindert. Im Vergleich zu einer reduzierten Tubulusbildung, wie sie bei einer Behandlung der Zellen mit TNF- $\alpha$  zu beobachten war, ist durch eine Behandlung der Zellen mit BDNF eine verstärkte Anzahl an Vernetzungen und Verzweigungen der Zellen untereinander zu erkennen. BDNF stimuliert also die Angiogenese von HUVEC (siehe hierzu auch Kapitel 6.1.). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  in HUVEC bzw. EA.hy 926-Zellen die BDNF-mRNA-Expression reduziert (Abb. 7, 8 und 9, Kapitel 5.2.1.). Auf Grund der vorliegenden Beobachtungen kann daher angenommen werden, dass TNF- $\alpha$  über eine Reduktion der BDNF-Expression die Angiogenese bzw. Tubulusbildung in Endothelzellen inhibiert. Unter den Bedingungen einer erhöhten TNF- $\alpha$ - und einer erniedrigten BDNF-Konzentration, die auch bei einigen pathologischen Prozessen vorzufinden sind, wäre eine antiinflammatorische Therapie denkbar, die die Konzentration an TNF- $\alpha$  vermindert und somit zu einer Erhöhung des BDNF-Spiegels führt, was wiederum die Angiogenese stimulieren könnte.

### **6.3. PKC-Aktivierung reduziert die BDNF-Expression in peripheren Endothelzellen**

In der Literatur liegen bereits einige Daten vor, die eine Veränderung der BDNF-Expression bei gleichzeitiger Aktivierung der PKC beschreiben (siehe hierzu auch Kapitel 1.3.4. und 1.3.5.). So zeigen Daten von *Weinreb et al.*, dass das



Antiparkinsonmedikament Rasagilin in PC12-Zellen der Ratte und humanen SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zu einer erhöhten BDNF-Expression führt. In den gleichen Zellen war durch die Behandlung ebenfalls eine vermehrte Phosphorylierung der PKC sowie eine erhöhte Expressionen der PKC-Isoformen  $\alpha$  und  $\varepsilon$  zu beobachten (Weinreb *et al.*, 2006). Weiterhin ist von dem NMDA-Rezeptor-Antagonisten Ifendopril bekannt, der bereits auch zytoprotektive Wirkungen in Ischämie- und Parkinson-Tiermodellen zeigte, dass er in Astrozyten die BDNF- und NGF-Expression erhöht (Toyomoto *et al.*, 2005). Zumindest für NGF konnte gezeigt werden, dass seine erhöhte Expression PKC-abhängig verläuft. Unter ischämischen Bedingungen ist ebenfalls eine Regulation der PKC bekannt. Hierbei findet eine differentielle Regulation der verschiedenen PKC-Isoformen abhängig von den Stadien der Ischämie statt (siehe hierzu auch Kapitel 1.3.5.). Gleichzeitig wird auch BDNF bei einer Ischämie in seiner Expression reguliert. Ein Zusammenhang zwischen einer Aktivierung der PKC und einer Regulation der BDNF-Expression liegt deshalb nahe. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch eine Aktivierung der PKC die BDNF-mRNA-Expression in peripheren Endothelzellen reduziert wird. So ist bei der Behandlung von EA.hy 926-Zellen mit den aktiven Phorbolestern PMA und PDBu, zwei Aktivatoren der PKC, eine Reduktion der BDNF-Expression zu erkennen (Abb. 14, Kapitel 5.3.1.). Ein inaktiver Phorbolster hingegen, der die PKC nicht stimuliert, reduzierte die BDNF-Expression nicht. Der Anstieg der BDNF-mRNA-Expression, der durch eine Behandlung der Zellen mit dem inaktiven Phorbolster zu beobachten war, lässt sich nur durch eine unspezifische Wirkung der Substanz erklären. Aus den Daten kann deshalb geschlossen werden, dass die Reduktion der BDNF-Expression eine Folge der Aktivierung der PKC ist. Weiterhin ist eine konzentrationsabhängige Herunterregulation der BDNF-mRNA-Expression durch PMA in EA.hy 926-Zellen zu beobachten (Abb. 15, Kapitel 5.3.1.). Eine Reduktion der BDNF-Expression durch Aktivierung der PKC konnte auch in HUVEC erfolgreich reproduziert werden (Abb. 16, Kapitel 5.3.1.). Eine Herunterregulation der BDNF-Expression durch die Behandlung der Zellen mit PMA war nach 6-stündiger Inkubation maximal. Nach 12- und 24-stündiger PMA-Behandlung ist allerdings wieder ein leichter Anstieg in der BDNF-Expression im Vergleich zu der maximalen Reduktion nach 6h zu erkennen. Erklärungen für diese zeitabhängigen

Veränderungen sind in dem Mechanismus der PKC-Aktivierung zu finden (Newton, 2001). Die inaktive PKC liegt im Zytoplasma der Zellen vor. Eine Stimulation der PKC durch z.B. PMA führt dann zu ihrer Translokation zur Zellmembran. Wird die Stimulation der PKC mit PMA weiter fortgeführt, so folgt die Degradierung der PKC. Diese Degradierung, also Inaktivierung der PKC, nach Langzeitbehandlung der Zellen mit PMA kann somit den erneuten leichten Anstieg der BDNF-Expression bei 12- bzw. 24-stündiger PMA-Behandlung erklären. Weiterhin wurde auch die BDNF-Protein-Expression durch PMA in HUVEC reduziert (Abb. 22, Kapitel 5.3.7.).

Zusammenfassend konnte also erfolgreich gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der Aktivierung der PKC und der Regulation der BDNF-Expression besteht. Zu diskutieren bleibt allerdings, dass es sich hier im Gegensatz zu den genannten Daten aus der Literatur um eine Reduktion und nicht Stimulation der BDNF-Expression handelt. Eine Erklärung hierfür könnte eine zelltypspezifische und differentielle Regulation von BDNF durch die PKC sein, wie es z.B. auch im Fall von TNF- $\alpha$  zu beobachten ist (siehe Kapitel 6.2.). Auch hier wird BDNF durch TNF- $\alpha$  in peripheren und zerebralen Endothelzellen gegensätzlich reguliert. Weiterhin werden in verschiedenen Zelltypen und unter verschiedenen zellulären Bedingungen unterschiedliche PKC-Isoformen aktiviert, die zum Teil gegensätzliche Funktionen haben können (Bright and Mochly-Rosen, 2005; Murriel and Mochly-Rosen, 2003). Abweichende Regulationen von BDNF in verschiedenen Zelltypen durch die PKC könnten somit erklärt werden.

### **6.3.1. PKC-Aktivierung reguliert die BDNF-mRNA-Expression auf dem Niveau der Transkription**

Wie bereits in Kapitel 6.2.2. erwähnt, kann eine reduzierte mRNA-Expression das Ergebnis einer verminderten Transkription sein, ein destabilisierender Einfluss einer bestimmten Substanz auf die RNA-Stabilität einer bestimmten mRNA ist allerdings ebenso möglich. In Abb. 17 (Kapitel 5.3.2.) wurden EA.hy 926-Zellen mit PMA bzw. DMSO vorbehandelt und die Transkription der Zellen wurde dann durch Zugabe von Actinomycin D blockiert. Die zeitliche BDNF-mRNA-Expression ab der Zugabe von

Actinomycin D hängt dann nur noch von der mRNA-Stabilität ab. Wie in Abb. 17 zu erkennen ist, vermindert PMA die BDNF-mRNA-Stabilität allerdings nicht.

Wird nun die Transkription in EA.hy 926-Zellen durch Actinomycin D vor der Zugabe von PMA inhibiert, so wird der reduzierende Einfluss von PMA auf die BDNF-mRNA-Expression vollständig aufgehoben (Abb. 18, Kapitel 5.3.3.). Da also PMA unter Inhibition der Transkription die BDNF-Expression nicht mehr herunterreguliert, kann aus den vorliegenden Daten geschlossen werden, dass PMA die BDNF-mRNA-Expression auf dem Niveau der Transkription reguliert. PMA vermindert die BDNF-Transkription und führt so zu einer reduzierten BDNF-mRNA-Expression.

Eine mögliche Beteiligung bzw. Expression des „neuron-restrictive silencer element“ (NRSE) bei der PKC-vermittelten Reduktion der BDNF-Expression bedarf auch hier weiterer Untersuchungen (siehe hierzu auch Kapitel 6.2.2.).

### **6.3.2. Die Reduktion der BDNF-mRNA-Expression durch PMA wird über eine Aktivierung der PKC-Isoformen $\delta$ vermittelt**

Um eine PKC-Isoform identifizieren zu können, die die Wirkung von PMA auf die BDNF-Expression vermittelt, mussten zunächst die PKC-Isoformen detektiert werden, die in EA.hy 926-Zellen durch PMA aktiviert werden. Wie bereits in Kapitel 5.3.4. erwähnt, existieren von der PKC 10 verschiedene Isoformen, die in drei Klassen unterteilt werden (Mellor and Parker, 1998; Nishizuka, 1995; Toker, 1998). Zur Gruppe der konventionellen PKC-Isoformen gehören die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$ .  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  und  $\theta$  werden in der Gruppe der neuen PKC-Isoformen zusammengefasst,  $\zeta$  und  $\lambda$  in die der atypischen. Die Isoformen  $\mu$  und  $\nu$  sollen eine neue vierte Klasse von PKC-Isoformen darstellen. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass PMA in EA.hy 926-Zellen zu einer Aktivierung der PKC-Isoformen  $\alpha$  und  $\epsilon$  führt (Li *et al.*, 1998). In Abb. 19a und 19b (Kapitel 5.3.4.) konnte nun gezeigt werden, dass PMA auch die PKC-Isoform  $\delta$  in EA.hy 926-Zellen aktiviert. In Abb. 19b dargestellter Western-Blot zeigt deutlich, dass der Gehalt der PKC-Isoform  $\delta$  in der Zytosolfraction von EA.hy 926-Zellen durch PMA-Behandlung reduziert wird. Gleichzeitig nimmt der PKC- $\delta$ -Protein-Gehalt in der Membranfraction von PMA-behandelten Zellen über den gleichen Zeitraum hin zu. Anhand dieser Daten ist also eine deutliche Translokation

der PKC-Isoform  $\delta$  durch Stimulation mit PMA zu erkennen. Gleichzeitig wird die PKC- $\delta$ -Protein-Expression im Gesamtproteinextrakt nach Langzeitinkubation mit PMA im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen vermindert (Abb. 19a).

Nachdem nun drei Isoformen ( $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$ ) identifiziert werden konnten, die in EA.hy 926-Zellen durch PMA aktiviert werden, sollte durch den Einsatz verschiedener PKC-Inhibitoren die PKC-Isoform detektiert werden, die den Einfluss von PMA auf die BDNF-Expression vermittelt.

Betrachtet man nun die Daten der Inhibition der verschiedenen PKC-Isoformen durch Gö 6976, Gö 6983 und Rottlerin (Abb. 20, Kapitel 5.3.5.), so kann zunächst die PKC-Isoform  $\varepsilon$  für eine PMA-vermittelte Reduktion der BDNF-Expression ausgeschlossen werden. Die PKC-Isoform  $\varepsilon$  wird durch die verwendeten PKC-Inhibitoren entweder gar nicht in ihrer Aktivität inhibiert, oder es findet eine Inhibition nur unter sehr hohen Konzentrationen des Inhibitors statt. Diese hohen Konzentrationen wurden allerdings in den durchgeführten Experimenten nicht verwendet. Betrachtet man nun die  $IC_{50}$ -Werte der verwendeten Inhibitoren für die PKC-Isoformen  $\alpha$  und  $\delta$  (Tab. 5, Kapitel 5.3.5.), so erkennt man, dass der Inhibitor Gö 6976 die PKC-Isoform  $\alpha$  hemmt. Da unter Anwesenheit von Gö 6976 die BDNF-mRNA-Expression durch PMA jedoch herunterreguliert wird, kann also auch die PKC  $\alpha$  für die PMA-vermittelte Wirkung auf die BDNF-Expression nicht verantwortlich sein. Der Einfluss von PMA auf die BDNF-mRNA-Expression wird nur durch eine Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Gö 6983 sowie Rottlerin aufgehoben. Beide Inhibitoren hemmen neben der PKC-Isoform  $\alpha$  auch die PKC-Isoform  $\delta$ , die allerdings durch Gö 6976 nicht inhibiert wurde. Diese Daten weisen also darauf hin, dass die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen durch eine Aktivierung der PKC-Isoform  $\delta$  reduziert werden könnte.

### **6.3.3. TNF- $\alpha$ reduziert die BDNF-mRNA-Expression PKC-unabhängig**

Eine Aktivierung der PKC  $\delta$  durch Phorbolster führt zu einer Reduktion der BDNF-mRNA-Expression in peripheren Endothelzellen. Diese Beobachtungen sind Teil der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 6.3.). Weiterhin lassen sich in der Literatur mehrere Anhaltspunkte für eine Regulation der BDNF-Expression durch Aktivierung der PKC finden (siehe hierzu Kapitel 6.3.). Außerdem ist auch von TNF- $\alpha$  beschrieben worden,

dass es die PKC in Endothelzellen aktivieren kann (Frey *et al.*, 2002). Ein gleichzeitiges Auftreten eines erhöhten TNF- $\alpha$ -Spiegels sowie eine Aktivierung der PKC ist auch bei einigen pathologischen Prozessen, wie z.B. unter ischämischen Bedingungen, zu beobachten (siehe hierzu auch Kapitel 1.3.5.). Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob die Reduktion der BDNF-Expression durch TNF- $\alpha$  möglicherweise PKC-vermittelt reguliert wird. Für die Inhibition der PKC wurde der PKC-Inhibitor Gö 6983 gewählt. Gö 6983 hat ein weites Wirkspektrum und hemmt die Aktivität von cPKCs (z.B.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), nPKCs (z.B.  $\delta$ ) und aPKCs (z.B.  $\zeta$ ) (Gschwendt *et al.*, 1996). Durch den Einsatz dieses Inhibitors konnte bereits eine PKC-vermittelte BDNF-mRNA-Reduktion vollständig aufgehoben werden (siehe Kapitel 5.3.5.). Gö 6983 hebt die Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression allerdings nicht auf (Abb. 21, Kapitel 5.3.6.). Dies ist ein Hinweis dafür, dass die reduzierende Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die BDNF-mRNA-Expression in EA.hy 926-Zellen sehr wahrscheinlich PKC-unabhängig erfolgt.

#### **6.4. Nebivolol stimuliert die BDNF-Expression in zerebralen Endothelzellen und Mäuseherzen**

Sowohl Statine als auch mehreren blutdrucksenkenden Pharmaka wie AT1-Rezeptorantagonisten, ACE-Inhibitoren und  $\beta$ -Blockern, werden pleiotrope Funktionen zugeschrieben, die über einen noch nicht bekannten Mechanismus das Schlaganfallrisiko reduzieren (siehe Kapitel 1.4.3.). Auf Grund der Beobachtung, dass auch bei nicht hypertensiven Patienten nach einer Behandlung mit den genannten Substanzen das Schlaganfallrisiko reduziert wurde, werden weitere bisher noch nicht bekannte zellschützenden Mechanismen und protektive Proteine in Betracht gezogen, die durch diese Pharmaka reguliert werden. Da auch BDNF unter vielen pathologischen Bedingungen reguliert wird, wie z.B. bei der Ischämie (siehe Kapitel 1.3.5.), kommt es als mögliche Zielstruktur vasoaktiver Pharmaka in Frage.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem die Identifikation BDNF-regulierender vasoaktiver Pharmaka in zerebralen Endothelzellen. Erstmals konnte gezeigt werden, dass die BDNF-mRNA-Expression in zerebralen Endothelzellen

sowohl durch den selektiven  $\beta_1$ -Blocker Nebivolol als auch die AT1-Rezeptorantagonisten Losartan und Telmisartan erhöht wird (Abb. 23, Kapitel 5.4.1.). Weitere Untersuchungen beschränkten sich zunächst auf die nähere Analyse der Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-Expression. Die Wirkungen von Losartan und Telmisartan sind Gegenstand zukünftiger Experimente.

Der selektive  $\beta_1$ -Adrenozeptorantagonist Nebivolol ist ein razemisches Gemisch aus zwei Enantiomeren, wobei die  $\beta_1$ -antagonisierende Wirkung hauptsächlich dem *d*-Enantiomer zugeschrieben wird, eine weitere vasodilatorische Wirkung dem *l*-Enantiomer (Dessy *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nebivolol sowohl nach 6- als auch 18-stündiger Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der BDNF-Expression in zerebralen Endothelzellen führt (Abb. 24, Kapitel 5.4.2.). Weiterhin ließen sich die *in vitro* Experimente durch Daten aus *in vivo* Studien belegen. Auch Nebivolol-behandelte Mäuse zeigen einen Anstieg der BDNF-mRNA-Expression im Herz auf ca. 194% im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren (Abb. 25a, Kapitel 5.4.3.). Nebivolol führte allerdings zu keiner signifikanten Veränderung der BDNF-Expression im Gehirn der Mäuse (Abb. 25b, Kapitel 5.4.3.). Eine mögliche Erklärung hierfür ist das neuronale Expressionsmuster von BDNF. BDNF wird am stärksten im Hippocampus sowie Hypothalamus exprimiert (Yan *et al.*, 1997, siehe auch Kapitel 1.2.1.). Eine mögliche expressionelle Veränderung von BDNF durch Nebivolol in Endothelzellen könnte in einem Gesamt-RNA-Extrakt durch die starke BDNF-Expression in neuronalen Zellen überdeckt werden. Die Isolierung von zerebralen Endothelzellen aus Gehirngewebe Nebivolol-behandelter Mäuse sowie eine separate RNA-Analyse der isolierten Zellen wären hier notwendig.

Dennoch konnte erstmalig eine Regulation der BDNF-Expression durch Nebivolol gefunden werden. Ob Nebivolol aufgrund der erhöhten BDNF-Expression auch zytoprotektive Wirkungen besitzt, bedarf weiterer Analysen. Mögliche zellschützende Wirkungen von Nebivolol und BDNF sind für zukünftige therapeutische Weiterentwicklungen von Interesse.

#### **6.4.1. Die Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression ist substanzspezifisch**

Um zwischen einer substanzspezifischen Wirkung von Nebivolol und einer klassenspezifischen Wirkung der Gruppe der  $\beta_1$ -Blocker unterscheiden zu können, wurde die Wirkung von weiteren selektiven  $\beta_1$ -Adrenozeptorantagonisten auf die BDNF-mRNA-Expression untersucht. Im Vergleich zu Nebivolol veränderte der  $\beta_1$ -Adrenozeptorantagonist Atenolol die BDNF-Expression in bEnd.3-Zellen nicht signifikant (Abb. 26, Kapitel 5.4.4.). Metoprolol-behandelte Zellen hingegen zeigten teilweise eine signifikante Erhöhung der BDNF-mRNA-Expression (10  $\mu$ M). Da allerdings bei höheren Konzentrationen an Metoprolol die BDNF-mRNA-Expression nicht signifikant verändert wird, kann angenommen werden, dass auch Metoprolol keinen Einfluss auf die BDNF-Expression hat. Aus den vorliegenden Daten kann deshalb geschlossen werden, dass es sich bei der Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression um eine substanzspezifische Wirkung handelt.

#### **6.4.2. Die stimulierende Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression verläuft NO-unabhängig und wird nicht über den $\beta_3$ -Adrenozeptor vermittelt**

In Rattenaorten sowie in koronaren mikrovaskulären Gefäßen von Mensch und Nagern ist eine Stimulation der Vasodilatation, NO-Produktion und Angiogenese durch Nebivolol beschrieben worden. Diese Funktionen von Nebivolol sind abhängig von der Expression und Aktivität der endothelialen NO-Synthase und sollen durch eine Bindung von Nebivolol an den  $\beta_3$ -Adrenozeptor vermittelt werden (de Groot *et al.*, 2003; Dessy *et al.*, 2005). Außerdem konnte eine Stimulation der NO-Produktion durch Nebivolol auch in BAEC („bovine aortic endothelial cells“) beobachtet werden. Des Weiteren ist in eNOS<sup>-/-</sup>-knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach induzierter Ischämie eine verringerte BDNF-Expression in ischämischem Gehirngewebe gefunden worden (Chen *et al.*, 2005a). Ein Zusammenhang zwischen der Expression und Aktivität der eNOS sowie der BDNF-Expression ist also denkbar. Aufgrund der Literaturdaten wurde zunächst eine mögliche Beteiligung des  $\beta_3$ -Adrenozeptors an der Nebivolol-vermittelten Regulation der BDNF-Expression untersucht. Abb. 27 (Kapitel 5.4.5.) zeigt deutlich, dass durch die Antagonisierung

des  $\beta_3$ -Adrenozeptors mittels des  $\beta_3$ -Adrenozeptorantagonisten Cyanopindolol die Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression nicht aufgehoben wird. Die Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression wird also nicht über den  $\beta_3$ -Adrenorezeptor vermittelt.

Im Weiteren wurde außerdem eine mögliche Abhängigkeit der Nebivolol-induzierten Hochregulation der BDNF-Expression von der eNOS untersucht. Die hier vorgelegten Daten zeigen allerdings, dass Nebivolol weder einen Einfluss auf die eNOS-Aktivität (Abb. 31, Kapitel 5.4.6.3.) noch auf die eNOS-Expression (Abb. 30, Kapitel 5.4.6.3.) in zerebralen Endothelzellen besitzt. Die Erhöhung der eNOS-mRNA-Expression, die nach 18-stündiger Nebivolol-Behandlung bei einer Konzentration von 3  $\mu$ M zu beobachten war, kann nicht Ursache einer erhöhten BDNF-mRNA-Expression durch Nebivolol sein, da unter den gegebenen Bedingungen keine Erhöhung der BDNF-mRNA-Expression trotz erhöhter eNOS-mRNA-Expression zu beobachten ist (siehe Abb. 24, Kapitel 5.4.2.). Auch die BDNF-mRNA-Expression blieb durch exogene Gabe des NO-Donators Spermin-NONOate unverändert (Abb. 29, Kapitel 5.4.6.2.). Weiterhin ließ sich die Nebivolol-induzierte Hochregulation der BDNF-Expression durch eine Inhibition der eNOS nicht unterbinden (Abb. 28, Kapitel 5.4.6.1.). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die stimulierende Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression in zerebralen Endothelzellen NO-unabhängig verläuft.

Durch die hier vorgelegten Daten konnte eine bisher noch nicht bekannte pharmakologische Regulation der BDNF-Expression durch Nebivolol in zerebralen Endothelzellen gezeigt werden. Bereits bekannte Wirkmechanismen von Nebivolol, wie z.B. die Erhöhung der NO-Produktion oder der  $\beta_3$ -Agonismus, konnten ausgeschlossen werden. Untersuchungen zum Wirkmechanismus sind Gegenstand zukünftiger Analysen. Bei einer Stimulation der Transkription von BDNF durch Nebivolol ist eine Beteiligung der so genannten „calcium-responsive elements“ (CaRE1, CaRE2 und CaRE3/CRE) denkbar (Finkbeiner, 2000). Diese in Exon III gelegenen regulierenden Elemente werden durch einen erhöhten Calcium-Spiegel aktiviert (Shieh *et al.*, 1998; Tao *et al.*, 1998). Ebenfalls ist eine Beteiligung eines „calcium-response element binding protein“ (CREB) sowie eines Transkriptionsfaktors CaRF (Tao *et al.*, 2002) bekannt, die für deren Aktivierung nötig sind. Tatsächlich ist



von Exon III-enthaltenen Transkripten beschrieben worden, dass ihre Expression *in vivo* am häufigsten induziert wird (Kokaia *et al.*, 1994; Lauterborn *et al.*, 1996). In BAEC ist beobachtet worden, dass eine Behandlung der Zellen mit Nebivolol zu einem Anstieg der Calcium-Konzentration führt (Dessy *et al.*, 2005). Ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Calcium-Spiegel und einer expressionellen Steigerung von BDNF durch Nebivolol ist also denkbar, bedarf allerdings weiterer Analysen.

Weiterhin bleibt zu überprüfen, ob Nebivolol durch seine Fähigkeit, die BDNF-mRNA-Expression zu erhöhen, auch zellschützende Eigenschaften besitzt, und so (zusätzlich zur Hypertonie) auch für weitere therapeutische Zwecke, wie z.B. bei einem Schlaganfall, eingesetzt werden könnte.

## 7. Zusammenfassung

Das Neurotrophin BDNF ist ein protektiver Faktor, der das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben neuronaler Zellen fördert. Neben der neuronalen Expression wird BDNF aber auch peripher exprimiert, unter anderem auch von Endothelzellen. Dort konnte vor allem ein stimulierender Einfluss von BDNF auf die Angiogenese von Endothelzellen beobachtet werden.

Eine Regulation der BDNF-Expression unter pathologischen Bedingungen wie Epilepsie, M. Alzheimer, M. Parkinson, Depression und Ischämie ist bereits mehrfach beschrieben worden. Weiterhin konnte eine gesteigerte BDNF-Expression in Patienten beobachtet werden, die mit Antiepileptika bzw. Antidepressiva behandelt wurden. BDNF zeigte außerdem in Tiermodellen der Ischämie und Epilepsie eine schützende Funktion vor den degenerativen Prozessen der Krankheit bzw. vor dem Auslösen eines Anfalls. Dadurch wird die Regulation der BDNF-Expression als therapeutische Strategie zu einem interessanten und notwendigen Forschungsgebiet. Aus der Literatur gehen Beobachtungen hervor, die Veränderungen der BDNF-Expression zeitgleich mit einem erhöhten TNF- $\alpha$ -Spiegel bzw. einer Aktivierung der PKC unter pathologischen Bedingungen beschreiben. Ob ein erhöhter TNF- $\alpha$ -Spiegel bzw. die Aktivierung der PKC Ursache der veränderten BDNF-Expression sind, war bisher noch nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass sowohl TNF- $\alpha$  als auch eine Aktivierung der PKC in peripheren Endothelzellen die BDNF-Expression konzentrations- und zeitabhängig reduzieren. Im Fall von TNF- $\alpha$  wird diese Reduktion über den TNFR1 vermittelt. TNF- $\alpha$  hatte keinen Einfluss auf die BDNF-mRNA-Stabilität, die BDNF-Expression wird durch TNF- $\alpha$  über eine Reduktion der Transkription reguliert. Weiterhin wurde die Wirkung von BDNF auf die Angiogenese von HUVEC untersucht. Hierbei konnte die Tubulusbildung von HUVEC durch BDNF signifikant stimuliert werden. Die stimulierende Wirkung von BDNF auf die Tubulusbildung von HUVEC wurde über die Rezeptoren TrkB und p75<sup>NTR</sup> vermittelt. TNF- $\alpha$  hingegen reduzierte die Angiogenese in HUVEC. Da ebenfalls eine Reduktion der BDNF-Expression durch TNF- $\alpha$  in diesen Zellen beobachtet werden konnte, kann

aufgrund der vorliegenden Daten angenommen werden, dass TNF- $\alpha$  die Angiogenese von HUVEC über eine verminderte BDNF-Expression inhibiert.

Bei der Regulation der BDNF-Expression durch PKC-Aktivierung konnte die PKC-Isoform  $\delta$  als mögliche BDNF-regulierende Isoform identifiziert werden. Weiterhin hatte PMA keinen destabilisierenden Einfluss auf die BDNF-mRNA. Auch hier wird BDNF durch PMA auf dem Niveau der Transkription reguliert.

Weitere Erkenntnisse über eine Regulation der BDNF-Expression durch TNF- $\alpha$  und PKC-Aktivierung helfen möglicherweise bei der Entwicklung therapeutischer Strategien, die sich mit veränderten BDNF-Expressionen bei verschiedenen Krankheitsbildern befassen.

Auch ist bisher eine pharmakologische Regulation der BDNF-Expression noch nicht näher untersucht worden. Mehrere Pharmaka, die in der antihypertensiven und cholesterinsenkenden Therapie zum Einsatz kommen, zeigen beispielsweise eine schützende Funktion vor Schlaganfällen, die allerdings unabhängig von ihrer blutdruck- bzw. cholesterinsenkenden Wirkung ist. Somit kommen andere Zielstrukturen, wie auch BDNF in Frage, die durch diese Substanzen reguliert werden könnten.

Erstmalig konnte ein Einfluss des  $\beta_1$ -Adrenozeptorantagonisten Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression beobachtet werden. Nebivolol erhöhte die BDNF-Expression in zerebralen Endothelzellen und Mäuseherzen. Hierbei handelt es sich um eine substanzspezifische Wirkung von Nebivolol, die von anderen  $\beta$ -Blockern nicht geteilt wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von Nebivolol auf die BDNF-mRNA-Expression NO-unabhängig verläuft und nicht über den  $\beta_3$ -Adrenozeptor vermittelt wird. Die pharmakologische Regulation von BDNF durch Nebivolol läuft über einen noch unbekanntem Mechanismus und bedarf weiterer Analysen, vor allem auch in Hinblick auf mögliche therapeutische Einsätze. Potentielle protektive Funktionen von Nebivolol, welches über eine erhöhte BDNF-Expression die Zelle z.B. vor den Folgen einer Ischämie schützen könnte, sind von therapeutischem Interesse.

## 8. Veröffentlichungen

### Präsentationen auf Kongressen

Petra Czerwinski, Hui Xu, Ulrich Förstermann und Huige Li. Nebivolol increases the expression of BDNF in cerebral endothelial cells in an NO-independent manner.

2. Deutscher Atherosklerosekongress, 22.-23. September 2006, Münster

Petra Czerwinski, Hui Xu, Ulrich Förstermann und Huige Li. Nebivolol increases the expression of BDNF in cerebral endothelial cells in an NO-independent manner.

2<sup>nd</sup> Joint French-German Meeting on NO Research, 05.-07. Oktober 2006, Hamburg

Petra Czerwinski, Hui Xu, Ulrich Förstermann und Huige Li. Regulation der BDNF-Expression in peripheren Endothelzellen durch PKC-Aktivierung und TNF- $\alpha$ .

48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 13.-15. März 2007, Mainz

### Publikationen

Petra Czerwinski, Hui Xu, Ulrich Förstermann and Huige Li. Regulation of BDNF expression in endothelial cells by PKC and TNF- $\alpha$ .

Submitted to **Am J Physiol.**, 2007

Hui Xu\*, Petra Czerwinski\*, Marcus Hortmann, Hae-Young Sohn, Ulrich Förstermann and Huige Li. PKC alpha promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of VEGF.

Submitted to **Cardiovasc Res.**, 2007 (\* both authors contributed equally)

Petra Czerwinski, Hui Xu, Ulrich Förstermann und Huige Li. Nebivolol increases the expression of BDNF in cerebral endothelial cells in an NO-independent manner.

Manuscript in preparation, 2007.

## 9. Literaturverzeichnis

- Allen, S. J., Wilcock, G. K., Dawbarn, D. (1999) Profound and selective loss of catalytic TrkB immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **264**: 648-651.
- Alonso, M., Vianna, M. R., Depino, A. M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I., Medina, J. H. (2002) BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus* **12**: 551-560.
- Barde, Y. A., Edgar, D., Thoenen, H. (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* **1**: 549-553.
- Barrett, G. L. (2000) The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* **61**: 205-229.
- Bayas, A., Hummel, V., Kallmann, B. A., Karch, C., Toyka, K. V., Rieckmann, P. (2002) Human cerebral endothelial cells are a potential source for bioactive BDNF. *Cytokine* **19**: 55-58.
- Benraiss, A., Chmielnicki, E., Lerner, K., Roh, D., Goldman, S. A. (2001) Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci* **21**: 6718-6731.
- Berkemeier, L. R., Winslow, J. W., Kaplan, D. R., Nikolics, K., Goeddel, D. V., Rosenthal, A. (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* **7**: 857-866.
- Biagini, G., Avoli, M., Marcinkiewicz, J., Marcinkiewicz, M. (2001) Brain-derived neurotrophic factor superinduction parallels anti-epileptic--neuroprotective treatment in the pilocarpine epilepsy model. *J Neurochem* **76**: 1814-1822.
- Bibel, M., Hoppe, E., Barde, Y. A. (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *Embo J* **18**: 616-622.
- Biffo, S., Offenhauser, N., Carter, B. D., Barde, Y. A. (1995) Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* **121**: 2461-2470.

- Bishop, J. F., Mueller, G. P., Mouradian, M. M. (1994) Alternate 5' exons in the rat brain-derived neurotrophic factor gene: differential patterns of expression across brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* **26**: 225-232.
- Boissiere, F., Faucheux, B., Agid, Y., Hirsch, E. C. (1997) Expression of catalytic trkB gene in the striatum and the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease: an in situ hybridization study. *Neurosci Lett* **221**: 141-144.
- Bothwell, M. (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* **18**: 223-253.
- Bright, R., Mochly-Rosen, D. (2005) The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury. *Stroke* **36**: 2781-2790.
- Burnette, W. N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**: 195-203.
- Castren, E., Berninger, B., Leingartner, A., Lindholm, D. (1998) Regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA levels in hippocampus by neuronal activity. *Prog Brain Res* **117**: 57-64.
- Chao, M. V. (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* **4**: 299-309.
- Chen, B., Dowlatshahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F., Young, L. T. (2001) Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry* **50**: 260-265.
- Chen, G., Goeddel, D. V. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**: 1634-1635.
- Chen, J., Zacharek, A., Zhang, C., Jiang, H., Li, Y., Roberts, C., Lu, M., Kapke, A., Chopp, M. (2005a) Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci* **25**: 2366-2375.
- Chen, J., Zhang, C., Jiang, H., Li, Y., Zhang, L., Robin, A., Katakowski, M., Lu, M., Chopp, M. (2005b) Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**: 281-290.

- Chen, J. X., Chen, Y., DeBusk, L., Lin, W., Lin, P. C. (2004) Dual functional roles of Tie-2/angiopoietin in TNF-alpha-mediated angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**: H187-195.
- Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**: 532-534, 536-537.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.
- Cohen, S. (1954) A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcoma 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**: 1014-1018.
- Connor, B., Dragunow, M. (1998) The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Brain Res Rev* **27**: 1-39.
- Danton, G. H., Dietrich, W. D. (2004) The search for neuroprotective strategies in stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* **25**: 181-194.
- de Groot, A. A., Mathy, M. J., van Zwieten, P. A., Peters, S. L. (2003) Involvement of the beta3 adrenoceptor in nebivolol-induced vasorelaxation in the rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* **42**: 232-236.
- Dechant, G., Barde, Y. A. (2002) The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* **5**: 1131-1136.
- Dessy, C., Saliez, J., Ghisdal, P., Daneau, G., Lobysheva, I., Frerart, F., Belge, C., Jnaoui, K., Noirhomme, P., Feron, O., Balligand, J. L. (2005) Endothelial beta3-adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation beta-blocker nebivolol. *Circulation* **112**: 1198-1205.
- Donovan, M. J., Lin, M. I., Wiegand, P., Ringstedt, T., Kraemer, R., Hahn, R., Wang, S., Ibanez, C. F., Rafii, S., Hempstead, B. L. (2000) Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* **127**: 4531-4540.

- Donovan, M. J., Miranda, R. C., Kraemer, R., McCaffrey, T. A., Tessarollo, L., Mahadeo, D., Sharif, S., Kaplan, D. R., Tsoulfas, P., Parada, L., et al. (1995) Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol* **147**: 309-324.
- Duda, D. G., Jain, R. K. (2005) Pleiotropy of tissue-specific growth factors: from neurons to vessels via the bone marrow. *J Clin Invest* **115**: 596-598.
- El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Dolle, L., Descamps, S., Hondermarck, H. (2003) Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein is involved in the neurotrophin receptor-mediated antiapoptotic activity of nerve growth factor in breast cancer cells. *J Biol Chem* **278**: 16952-16956.
- Endres, M. (2005) Statins and stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**: 1093-1110.
- Erb, R. E. (1950) Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen capacity. *J. Dairy Sci.* **33**: 853-864.
- Ernfors, P., Ibanez, C. F., Ebendal, T., Olson, L., Persson, H. (1990) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5454-5458.
- Fagan, S. C., Hess, D. C., Hohnadel, E. J., Pollock, D. M., Ergul, A. (2004) Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke* **35**: 2220-2225.
- Finkbeiner, S. (2000) Calcium regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Cell Mol Life Sci* **57**: 394-401.
- Forstermann, U., Gorsky, L. D., Pollock, J. S., Ishii, K., Schmidt, H. H., Heller, M., Murad, F. (1990) Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Mol Pharmacol* **38**: 7-13.
- Frey, R. S., Rahman, A., Kefer, J. C., Minshall, R. D., Malik, A. B. (2002) PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res* **90**: 1012-1019.
- Fryer, R. H., Kaplan, D. R., Kromer, L. F. (1997) Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* **148**: 616-627.



- Garcia-Donaire, J. A., Nunez, A. G., Segura, J., Ruilope, L. M. (2004) Cerebrovascular protection and antihypertensive therapy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **13**: 507-512.
- Gentry, J. J., Rutkoski, N. J., Burke, T. L., Carter, B. D. (2004) A functional interaction between the p75 neurotrophin receptor interacting factors, TRAF6 and NRIF. *J Biol Chem* **279**: 16646-16656.
- Gotz, R., Koster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharf, M., Thoenen, H. (1994) Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* **372**: 266-269.
- Goukassian, D. A., Qin, G., Dolan, C., Murayama, T., Silver, M., Curry, C., Eaton, E., Luedemann, C., Ma, H., Asahara, T., Zak, V., Mehta, S., Burg, A., Thorne, T., Kishore, R., Losordo, D. W. (2007) Tumor necrosis factor-alpha receptor p75 is required in ischemia-induced neovascularization. *Circulation* **115**: 752-762.
- Goutan, E., Marti, E., Ferrer, I. (1998) BDNF, and full length and truncated TrkB expression in the hippocampus of the rat following kainic acid excitotoxic damage. Evidence of complex time-dependent and cell-specific responses. *Brain Res Mol Brain Res* **59**: 154-164.
- Gschwendt, M., Dieterich, S., Rennecke, J., Kittstein, W., Mueller, H. J., Johannes, F. J. (1996) Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett* **392**: 77-80.
- Halban, P. A., Irminger, J. C. (1994) Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem J* **299 ( Pt 1)**: 1-18.
- Hallbook, F., Ibanez, C. F., Persson, H. (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary. *Neuron* **6**: 845-858.
- Hamburger, V., Oppenheim, R.W. (1982) Naturally-occurring neuronal death in vertebrates. *Neurosci Comment* **1**: 38-55.
- Hariri, A. R., Goldberg, T. E., Mattay, V. S., Kolachana, B. S., Callicott, J. H., Egan, M. F., Weinberger, D. R. (2003) Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci* **23**: 6690-6694.

- Hempstead, B. L. (2002) The many faces of p75<sup>NTR</sup>. *Curr Opin Neurobiol* **12**: 260-267.
- Henderson, C. E. (1996) Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Curr Opin Neurobiol* **6**: 64-70.
- Hiltunen, J. O., Laurikainen, A., Vakeva, A., Meri, S., Saarma, M. (2001) Nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor mRNAs are regulated in distinct cell populations of rat heart after ischaemia and reperfusion. *J Pathol* **194**: 247-253.
- Hock, C., Heese, K., Hulette, C., Rosenberg, C., Otten, U. (2000) Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol* **57**: 846-851.
- Hoehner, J. C., Wester, T., Pahlman, S., Olsen, L. (1996) Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. *Gastroenterology* **110**: 756-767.
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., Barde, Y. A. (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* **344**: 339-341.
- Hokfelt, T., Broberger, C., Xu, Z. Q., Sergeev, V., Ubink, R., Diez, M. (2000) Neuropeptides--an overview. *Neuropharmacology* **39**: 1337-1356.
- Hu, Y., Sun, C. Y., Wang, Y. D., Wei, W. N., Wu, T., He, W. J., Zhao, S. (2005) [Study on the high expression of brain-derived neurotrophic factor in multiple myeloma patients and its possible mechanism]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **13**: 104-109.
- Isackson, P. J., Huntsman, M. M., Murray, K. D., Gall, C. M. (1991) BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron* **6**: 937-948.
- Ishii, K., Sheng, H., Warner, T. D., Forstermann, U., Murad, F. (1991) A simple and sensitive bioassay method for detection of EDRF with RFL-6 rat lung fibroblasts. *Am J Physiol* **261**: H598-603.
- Kaplan, D. R., Miller, F. D. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **10**: 381-391.

- Karege, F., Perret, G., Bondolfi, G., Schwald, M., Bertschy, G., Aubry, J. M. (2002) Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* **109**: 143-148.
- Katoh-Semba, R., Takeuchi, I. K., Semba, R., Kato, K. (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J Neurochem* **69**: 34-42.
- Kawamoto, Y., Nakamura, S., Nakano, S., Oka, N., Akiguchi, I., Kimura, J. (1996) Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience* **74**: 1209-1226.
- Kermani, P., Rafii, D., Jin, D. K., Whitlock, P., Schaffer, W., Chiang, A., Vincent, L., Friedrich, M., Shido, K., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Rafii, S., Hempstead, B. L. (2005) Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest* **115**: 653-663.
- Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, V. V., Misgeld, T., Klinkert, W. E., Kolbeck, R., Hoppe, E., Oropeza-Wekerle, R. L., Bartke, I., Stadelmann, C., Lassmann, H., Wekerle, H., Hohlfeld, R. (1999) Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* **189**: 865-870.
- Kessler, R. C. (1997) The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* **48**: 191-214.
- Khursigara, G., Orlinick, J. R., Chao, M. V. (1999) Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* **274**: 2597-2600.
- Kim, H., Li, Q., Hempstead, B. L., Madri, J. A. (2004) Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J Biol Chem* **279**: 33538-33546.
- Klein, R., Conway, D., Parada, L. F., Barbacid, M. (1990) The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* **61**: 647-656.

- Klein, R., Parada, L. F., Coulier, F., Barbacid, M. (1989) *trkB*, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *Embo J* **8**: 3701-3709.
- Kokaia, Z., Metsis, M., Kokaia, M., Bengzon, J., Elmer, E., Smith, M. L., Timmusk, T., Siesjo, B. K., Persson, H., Lindvall, O. (1994) Brain insults in rats induce increased expression of the BDNF gene through differential use of multiple promoters. *Eur J Neurosci* **6**: 587-596.
- Kraemer, R., Baker, P. J., Kent, K. C., Ye, Y., Han, J. J., Tejada, R., Silane, M., Upmacis, R., Deeb, R., Chen, Y., Levine, D. M., Hempstead, B. (2005) Decreased neurotrophin TrkB receptor expression reduces lesion size in the apolipoprotein E-null mutant mouse. *Circulation* **112**: 3644-3653.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lai, K. O., Fu, W. Y., Ip, F. C., Ip, N. Y. (1998) Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci* **11**: 64-76.
- Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C., Jahn, R. (2001) SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J* **20**: 2202-2213.
- Larmet, Y., Reibel, S., Carnahan, J., Nawa, H., Marescaux, C., Depaulis, A. (1995) Protective effects of brain-derived neurotrophic factor on the development of hippocampal kindling in the rat. *Neuroreport* **6**: 1937-1941.
- Laufs, U., Endres, M., Stagliano, N., Amin-Hanjani, S., Chui, D. S., Yang, S. X., Simoncini, T., Yamada, M., Rabkin, E., Allen, P. G., Huang, P. L., Bohm, M., Schoen, F. J., Moskowitz, M. A., Liao, J. K. (2000) Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton. *J Clin Invest* **106**: 15-24.
- Lauterborn, J. C., Rivera, S., Stinis, C. T., Hayes, V. Y., Isackson, P. J., Gall, C. M. (1996) Differential effects of protein synthesis inhibition on the activity-dependent expression of BDNF transcripts: evidence for immediate-early gene responses from specific promoters. *J Neurosci* **16**: 7428-7436.
- Lee, F. S., Kim, A. H., Khursigara, G., Chao, M. V. (2001) The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 281-286.

- Leibovich, S. J., Polverini, P. J., Shepard, H. M., Wiseman, D. M., Shively, V., Nuseir, N. (1987) Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* **329**: 630-632.
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., Barde, Y. A. (1989) Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* **341**: 149-152.
- Lessmann, V., Gottmann, K., Malsangio, M. (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* **69**: 341-374.
- Levi-Montalcini, R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**: 1154-1162.
- Lewin, G. R., Barde, Y. A. (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* **19**: 289-317.
- Li, H., Oehrlein, S. A., Wallerath, T., Ihrig-Biedert, I., Wohlfart, P., Ulshofer, T., Jessen, T., Herget, T., Forstermann, U., Kleinert, H. (1998) Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* **53**: 630-637.
- Lindsay, R. M., Wiegand, S. J., Altar, C. A., DiStefano, P. S. (1994) Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci* **17**: 182-190.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N. Y., Furth, M. E., Lindsay, R. M., Yancopoulos, G. D. (1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* **247**: 1446-1451.
- Maisonpierre, P. C., Le Beau, M. M., Espinosa, R., 3rd, Ip, N. Y., Belluscio, L., de la Monte, S. M., Squinto, S., Furth, M. E., Yancopoulos, G. D. (1991) Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* **10**: 558-568.
- McAllister, A. K., Katz, L. C., Lo, D. C. (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* **22**: 295-318.
- Mellor, H., Parker, P. J. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* **332 ( Pt 2)**: 281-292.

- Merighi, A. (2002) Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol* **66**: 161-190.
- Middlemas, D. S., Lindberg, R. A., Hunter, T. (1991) trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* **11**: 143-153.
- Mizuno, M., Yamada, K., He, J., Nakajima, A., Nabeshima, T. (2003) Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn Mem* **10**: 108-115.
- Montrucchio, G., Lupia, E., Battaglia, E., Passerini, G., Bussolino, F., Emanuelli, G., Camussi, G. (1994) Tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis. *J Exp Med* **180**: 377-382.
- Murer, M. G., Yan, Q., Raisman-Vozari, R. (2001) Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **63**: 71-124.
- Murriel, C. L., Mochly-Rosen, D. (2003) Opposing roles of delta and epsilonPKC in cardiac ischemia and reperfusion: targeting the apoptotic machinery. *Arch Biochem Biophys* **420**: 246-254.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., Togari, A. (2000) Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*: 277-290.
- Nagatsu, T., Sawada, M. (2005) Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr Pharm Des* **11**: 999-1016.
- Nakahashi, T., Fujimura, H., Altar, C. A., Li, J., Kambayashi, J., Tandon, N. N., Sun, B. (2000) Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* **470**: 113-117.
- Nawa, H., Carnahan, J., Gall, C. (1995) BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci* **7**: 1527-1535.
- Newton, A. C. (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* **101**: 2353-2364.
- Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J* **9**: 484-496.

- Nubel, T., Schmitt, S., Kaina, B., Fritz, G. (2005) Lovastatin stimulates p75 TNF receptor (TNFR2) expression in primary human endothelial cells. *Int J Mol Med* **16**: 1139-1145.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**: 5421-5426.
- Oppenheim, R. W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **14**: 453-501.
- Palma, E., Torchia, G., Limatola, C., Trettel, F., Arcella, A., Cantore, G., Di Gennaro, G., Manfredi, M., Esposito, V., Quarato, P. P., Miledi, R., Eusebi, F. (2005) BDNF modulates GABAA receptors microtransplanted from the human epileptic brain to *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1667-1672.
- Parain, K., Murer, M. G., Yan, Q., Faucheux, B., Agid, Y., Hirsch, E., Raisman-Vozari, R. (1999) Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport* **10**: 557-561.
- Patapoutian, A., Reichardt, L. F. (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 272-280.
- Patterson, C., Perrella, M. A., Endege, W. O., Yoshizumi, M., Lee, M. E., Haber, E. (1996) Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **98**: 490-496.
- Purves, D. (1988) *Body and Brain, A Trophic Theory of Neural Connections*. Cambridge Mass., Harvard.
- Rickhag, M., Teilum, M., Wieloch, T. (2007) Rapid and long-term induction of effector immediate early genes (BDNF, Neurtin and Arc) in peri-infarct cortex and dentate gyrus after ischemic injury in rat brain. *Brain Res*.
- Roberts, D. S., Hu, Y., Lund, I. V., Brooks-Kayal, A. R., Russek, S. J. (2006) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced synthesis of early growth response factor 3 (Egr3) controls the levels of type A GABA receptor alpha 4 subunits in hippocampal neurons. *J Biol Chem* **281**: 29431-29435.

- Rose, C. R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K. W., Konnerth, A. (2003) Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* **426**: 74-78.
- Ruiz-Leon, Y., Pascual, A. (2001) Brain-derived neurotrophic factor stimulates beta-amyloid gene promoter activity by a Ras-dependent/AP-1-independent mechanism in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* **79**: 278-285.
- Saarelainen, T., Hendolin, P., Lucas, G., Koponen, E., Sairanen, M., MacDonald, E., Agerman, K., Haapasalo, A., Nawa, H., Aloyz, R., Ernfors, P., Castren, E. (2003) Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci* **23**: 349-357.
- Saarelainen, T., Lukkarinen, J. A., Koponen, S., Grohn, O. H., Jolkkonen, J., Koponen, E., Haapasalo, A., Alhonen, L., Wong, G., Koistinaho, J., Kauppinen, R. A., Castren, E. (2000a) Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons show increased susceptibility to cortical injury after focal cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci* **16**: 87-96.
- Saarelainen, T., Pussinen, R., Koponen, E., Alhonen, L., Wong, G., Sirvio, J., Castren, E. (2000b) Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons have impaired long-term spatial memory but normal hippocampal LTP. *Synapse* **38**: 102-104.
- Saraceno, B. (2002) The WHO World Health Report 2001 on mental health. *Epidemiol Psichiatr Soc* **11**: 83-87.
- Sawada, M., Imamura, K., Nagatsu, T. (2006) Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*: 373-381.
- Schaaf, M. J., Duurland, R., de Kloet, E. R., Vreugdenhil, E. (2000) Circadian variation in BDNF mRNA expression in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* **75**: 342-344.
- Schinder, A. F., Poo, M. (2000) The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **23**: 639-645.
- Seidah, N. G., Mowla, S. J., Hamelin, J., Mamarbachi, A. M., Benjannet, S., Toure, B. B., Basak, A., Munzer, J. S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J. C., Lazure, C., Murphy, R. A., Chretien, M., Marcinkiewicz, M. (1999) Mammalian



- subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1321-1326.
- Shelton, R. C. (2007) The molecular neurobiology of depression. *Psychiatr Clin North Am* **30**: 1-11.
- Shieh, P. B., Hu, S. C., Bobb, K., Timmusk, T., Ghosh, A. (1998) Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* **20**: 727-740.
- Shirakura, M., Inoue, M., Fujikawa, S., Washizawa, K., Komaba, S., Maeda, M., Watabe, K., Yoshikawa, Y., Hasegawa, M. (2004) Postischemic administration of Sendai virus vector carrying neurotrophic factor genes prevents delayed neuronal death in gerbils. *Gene Ther* **11**: 784-790.
- Siegel, G. J., Chauhan, N. B. (2000) Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Brain Res Rev* **33**: 199-227.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- Sohrabji, F., Miranda, R. C., Toran-Allerand, C. D. (1995) Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11110-11114.
- Sun, C. Y., Hu, Y., Wang, H. F., He, W. J., Wang, Y. D., Wu, T. (2006) Brain-derived neurotrophic factor inducing angiogenesis through modulation of matrix-degrading proteases. *Chin Med J (Engl)* **119**: 589-595.
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D. B., Shaywitz, A. J., Greenberg, M. E. (1998) Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* **20**: 709-726.
- Tao, X., West, A. E., Chen, W. G., Corfas, G., Greenberg, M. E. (2002) A calcium-responsive transcription factor, CaRF, that regulates neuronal activity-dependent expression of BDNF. *Neuron* **33**: 383-395.
- Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., Arancibia, S. (2004) Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol* **25**: 77-107.

- Thoenen, H. (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* **270**: 593-598.
- Thoenen, H. (2000) Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Prog Brain Res* **128**: 183-191.
- Timmusk, T., Palm, K., Lendahl, U., Metsis, M. (1999) Brain-derived neurotrophic factor expression in vivo is under the control of neuron-restrictive silencer element. *J Biol Chem* **274**: 1078-1084.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., Persson, H. (1993) Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* **10**: 475-489.
- Toker, A. (1998) Signaling through protein kinase C. *Front Biosci* **3**: D1134-1147.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354.
- Toyomoto, M., Inoue, S., Ohta, K., Kuno, S., Ohta, M., Hayashi, K., Ikeda, K. (2005) Production of NGF, BDNF and GDNF in mouse astrocyte cultures is strongly enhanced by a cerebral vasodilator, ifenprodil. *Neurosci Lett* **379**: 185-189.
- Venero, J. L., Hefti, F. (1998) Regionally specific induction of BDNF and truncated trkB.T1 receptors in the hippocampal formation after intraseptal injection of kainic acid. *Brain Res* **790**: 270-277.
- Wang, H. (2006) Secretion of brain-derived neurotrophic factor from brain microvascular endothelial cells. *Eur J Neurosci* **23**: 1665-1670.
- Weinreb, O., Amit, T., Bar-Am, O., Sagi, Y., Mandel, S., Youdim, M. B. (2006) Involvement of multiple survival signal transduction pathways in the neuroprotective, neurorescue and APP processing activity of rasagiline and its propargyl moiety. *J Neural Transm Suppl*: 457-465.
- Wessel, D., Flugge, U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141-143.
- Wiechelmann, K. J., Braun, R. D., Fitzpatrick, J. D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* **175**: 231-237.

- Yacoubian, T. A., Lo, D. C. (2000) Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat Neurosci* **3**: 342-349.
- Yamada, K., Nabeshima, T. (2003) Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* **91**: 267-270.
- Yamamoto, M. (1996) 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.* **21**: 929-938.
- Yan, Q., Rosenfeld, R. D., Matheson, C. R., Hawkins, N., Lopez, O. T., Bennett, L., Welcher, A. A. (1997) Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* **78**: 431-448.
- Yasutake, C., Kuroda, K., Yanagawa, T., Okamura, T., Yoneda, H. (2006) Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **256**: 402-406.
- Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J. J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C. A., Reed, J. C., Bredesen, D. E. (1999) TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* **274**: 30202-30208.
- Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H., Ishibashi, T., Suzuki, H., Kuwano, M. (1997) Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* **17**: 4015-4023.
- Zhou, A., Webb, G., Zhu, X., Steiner, D. F. (1999) Proteolytic processing in the secretory pathway. *J Biol Chem* **274**: 20745-20748.