

**Der Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup>**  
**Eine biochemische Untersuchung**

Im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der  
Freien Universität Berlin eingereichte Dissertation

Vorgelegt von Tim Hucho

Berlin, April 2002



Die vorliegende Arbeit wurde unter direkter Betreuung von Prof. Dr. Yves A. Barde am Max Planck Institut für Neurobiologie in Martinsried angefertigt.

Disputation abgehalten am 30.5.2002

Gutachter:

1) Prof. Dr. Yves Barde

2) Prof. Dr. Ralf Erdmann



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Biologische Funktion der Neurotrophine</b> .....	<b>11</b>
<b>3.2</b>	<b>Struktur der Neurotrophine</b> .....	<b>13</b>
<b>3.3</b>	<b>Die Rezeptoren der Neurotrophine</b> .....	<b>14</b>
3.3.1	Die Trk Rezeptoren.....	15
3.3.2	Der Neurotrophinrezeptor p75 <sup>NTR</sup> .....	16
<b>4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Reinigung von intrazellulären Interaktoren</b> .....	<b>21</b>
4.1.1	Experimentelle Ansätze zur Identifikation von intrazellulären Interaktoren .....	21
<b>4.2</b>	<b>Suche nach p75<sup>NTR</sup>-ähnlichen Molekülen</b> .....	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>25</b>
5.1.1	Antikörper .....	25
5.1.2	Tiere .....	26
5.1.3	Zelllinien .....	26
5.1.4	Modifizierte Lambda Phosphatase .....	26
5.1.5	Neurotrophine .....	27
5.1.6	Plasmide .....	27
5.1.7	Medien.....	27
5.1.8	Adjuvantien .....	27
5.1.9	Chemikalien und Zubehör .....	28
5.1.10	Geräte.....	29
5.1.11	Puffer.....	30
<b>5.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>34</b>
5.2.1	Aufreinigung intrazellulärer Interaktoren von p75 <sup>NTR</sup> .....	34
5.2.1.1	P75 <sup>NTR</sup> Konzentrationsbestimmung in Gehirnhomogenat.....	34
5.2.1.2	Expression und Aufreinigung des p75 <sup>NTR</sup> -IZD Plasmids .....	34
5.2.1.3	Verwendung der BIAcore Maschine .....	35
5.2.1.4	Iodierung von Neurotrophinen.....	36
5.2.1.5	Dissoziation von Spinalganglien.....	37
5.2.1.6	Overlayblots.....	38

---

5.2.1.7	<i>In vitro</i> Translation der intrazellulären Domäne von p75 <sup>NTR</sup> .....	38
5.2.1.8	Kopplung von <sup>125</sup> I-Neurotrophin an p75 <sup>NTR</sup> für Overlayblots.....	39
5.2.1.9	Bindungsstudien an dissoziierten Spinalganglien Neuronen .....	39
5.2.1.10	Präparation von Caveolae mit Triton X-100.....	40
5.2.1.11	Präparation von Caveolae mit NaCO <sub>3</sub> .....	40
5.2.1.12	Präparation von „Postsynaptic Densities“ (PSDs) .....	41
5.2.2	Charakterisierung, Reinigung und Identifizierung von p75 <sup>NTR</sup> -ähnlichen Proteine .	42
5.2.2.1	Herstellung polyklonaler Seren gegen die intrazelluläre Domäne von p75 <sup>NTR</sup> .....	42
5.2.2.2	Organpräparation.....	42
5.2.2.3	Dephosphorylierung der Freundl Antigene.....	42
5.2.2.4	Bindungsassay an Spinalganglien .....	43
5.2.2.5	Reinigung des Freundl Antigens .....	43
5.2.2.6	Sequenzvergleich und Phosphorylierungsvorhersagen.....	44
5.2.2.7	Peptidkompetition im Westernblot.....	44
5.2.2.8	Präparation von Körnerzellen.....	45
5.2.2.9	Immunhistochemie.....	45
5.2.3	Vermischtes .....	46
5.2.3.1	NGF-ELISA.....	46
5.2.3.2	Herstellung einer stabilen Zelllinie.....	46
5.2.3.3	Biologischer Überlebensassay .....	47
5.2.3.4	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> -Bakterien.....	48
5.2.3.5	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) .....	48
5.2.3.6	<i>Semi-dry</i> Westernblot.....	49
5.2.3.7	Entfernung von Antikörpern von Blotmembranen (,Strippen des Blots') .....	49
5.2.3.8	Coomassie Färbung von Gelen.....	49
5.2.3.9	Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen .....	50
5.2.3.10	Kolloidal Coomassie Färbung von SDS-PAGE Gelen .....	50
5.2.3.11	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	50
<b>6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
<b>6.1</b>	<b>Biochemischen Aufreinigung intrazellulärer Interaktoren von p75<sup>NTR</sup> .....</b>	<b>51</b>
6.1.1	Affinitätsreinigung in Gegenwart des extrazellulären Liganden .....	51
6.1.2	Affinitätsreinigung über die intrazelluläre Domäne von p75 <sup>NTR</sup> .....	52
6.1.2.1	Protein Interaktionsmessungen mit der BIAcoremaschine .....	52
6.1.2.2	Interaktorendetektion mit Overlayblots .....	55
6.1.3	Anreicherung von Interaktoren in funktionell charakterisierten, subzellulären Fraktionen.....	57

---

6.1.3.1	Präparation von Caveolae.....	57
6.1.3.2	Präparation von Postsynaptischen Dichten (PSDs).....	58
<b>6.2</b>	<b>Charakterisierung, Reinigung und Identifizierung von p75<sup>NTR</sup>-ähnlichen Proteinen .....</b>	<b>60</b>
6.2.1	P75 <sup>NTR</sup> Antiserum zeigt Westernblotsignal auch in p75 <sup>NTR</sup> -/- Mäusen.....	60
6.2.2	Freundl Antigene sind nur im ZNS exprimiert.....	62
6.2.3	Freundl Antigene werden postnatal herunterreguliert.....	63
6.2.4	Freundl Antigen Westernblotsignal ist kalziumabhängig .....	63
6.2.5	Freundl Antigene wechseln die Zentrifugationsfraktion nach Inkubation .....	64
6.2.6	p75 <sup>NTR</sup> Seren detektieren Freundl Antigene in dephosphoryliertem Gehirn-homogenat.....	65
6.2.7	P75 <sup>NTR</sup> -ähnliche Immunfärbung in p75 <sup>NTR</sup> -/- Basal Ganglien .....	67
6.2.8	P75 <sup>NTR</sup> -ähnliche Bindung an dissoziierten Spinalganglien von p75 <sup>NTR</sup> -/- Tieren ....	67
6.2.9	Reinigung der Freundl Antigene .....	68
6.2.10	Identifikation der Freundl Antigene als N-Terminus von MAP1B .....	73
6.2.11	Die Freundl Antigene werden von einem MAP1B Antiserum detektiert .....	74
6.2.12	QRADxxESL-Peptide kompetieren nicht um Bindungsepitop.....	74
6.2.13	Calpain-Proteolyse führt zum N-Terminus von MAP1B.....	76
6.2.14	MAP1B Fragmente auch <i>in vivo</i> detektierbar .....	77
6.2.15	Neurotrophine zeigen keinen Einfluss auf die Spaltung von MAP1B.....	78
6.2.16	Neurotrophin abhängige Runterregulation von p75 <sup>NTR</sup> in Körner Zellen.....	79
<b>7</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>81</b>
<b>7.1</b>	<b>Biochemische Reinigung eines intrazellulären Interaktors von p75<sup>NTR</sup> .....</b>	<b>81</b>
7.1.1	Affinitätsreinigung in Gegenwart des extrazellulären Liganden .....	82
7.1.2	Affinitätsreinigung über die intrazelluläre Domäne .....	83
7.1.2.1	Proteininteraktionsmessungen mit der BIAcoremaschine.....	84
7.1.2.2	Interaktorendetektion mit Overlayblots .....	86
7.1.3	Anreicherung des Rezeptor-Interaktorkomplexes in einer funktionell charakterisierten, subzellulären Fraktion.....	87
7.1.4	Zusammenfassung und Schlußfolgerungen .....	88
<b>7.2</b>	<b>Charakterisierung, Reinigung und Identifizierung von p75<sup>NTR</sup>-ähnlichen Proteinen .....</b>	<b>91</b>
7.2.1	Antiserenhinweise auf p75 <sup>NTR</sup> -ähnliche Moleküle .....	91
7.2.2	Reinigung der p75 <sup>NTR</sup> -ähnlichen Proteine.....	92
7.2.3	Was ist MAP1B? .....	93
7.2.4	Sequenzhomologie zwischen p75 <sup>NTR</sup> und MAP1B .....	95

---

7.2.5	Die MAP1B Fragmente .....	97
7.2.6	Funktionelle Beziehungen zwischen p75 <sup>NTR</sup> und MAP1B .....	97
7.2.7	Calpain und der N-Terminus von MAP1B.....	99
7.2.8	Neurotrophinabhängige Proteolyse des N-Terminus von MAP1B .....	100
7.2.9	Experimenteller Ausblick.....	101
<b>8</b>	<b>Abkürzungen und Begriffe .....</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>105</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>107</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>109</b>



## 1 Zusammenfassung

Neurotrophine sind Wachstumsfaktoren. In Säugern modulieren sie nicht nur weitreichende Aspekte der Entwicklung sondern auch Funktionen des erwachsenen Nervensystems. Die Signaltransduktion erfolgt einerseits über den Rezeptor p75<sup>NTR</sup> andererseits über die Rezeptor-Tyrosinkinasen TrkA, TrkB und TrkC. Während die Signalkaskaden der Trk Rezeptoren weitgehend aufgeklärt wurden, entwickelte sich das Wissen über p75<sup>NTR</sup> ebenso wie das über die verwandten Mitglieder der „Tumor Necrosis Factor Rezeptor“ (TNFR)-Superfamilie nur langsam. 10 Jahre nach der Klonierung sollten mit dieser Arbeit daher die intrazellulären Interaktoren von p75<sup>NTR</sup> identifiziert werden. Ebenso wie zur Aufklärung der Signalwege anderer Mitglieder der TNFR-Superfamilie wurden biochemische Reinigungsansätze unternommen. Sowohl die Reinigung des p75<sup>NTR</sup>-Interaktorkomplexes in Gegenwart extrazellulärer Liganden, als auch die Affinitätsreinigung über die intrazelluläre Domäne sowie die Anreicherung des p75<sup>NTR</sup>-Interaktorkomplexes in charakterisierten subzellulären Fraktionen wurde vorgenommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem neue Antiseren gegen p75<sup>NTR</sup> hergestellt. Eines dieser Seren zeigte zusätzliche p75<sup>NTR</sup>-ähnliche Westernblotsignale. Überraschenderweise konnten diese Signale auch in Gehirnhomogenaten des 1992 hergestellten p75<sup>NTR</sup>-Teil-*Knockout* sowie in dem bis dahin nur in unserem Labor zugänglichen ersten vollständigen p75<sup>NTR</sup>-*Knockout* detektiert werden. Die Expression der p75<sup>NTR</sup>-ähnlichen Proteine war auf das Gehirn beschränkt, wurde postnatal stark herunterreguliert und zeigte in differenzieller Zentrifugation starke Kalziumabhängigkeit. Zusätzlich konnte in p75<sup>NTR</sup>-*Knockout*-Tieren eine p75<sup>NTR</sup>-ähnliche Bindungsstelle identifiziert werden. Die p75<sup>NTR</sup>-ähnlichen Proteine wurden gereinigt, als N-Terminus von des Mikrotubuli Assoziierten Proteins 1B (MAP1B) identifiziert und die Homologie zu p75<sup>NTR</sup> untersucht.

## 2 Abstract

Neurotrophins are growth factors. In mammals, they exert a broad range of modulatory effects on developing as well as on mature neurons. Neurotrophin-mediated signals are transduced by either the neurotrophin receptor  $p75^{\text{NTR}}$  or the receptor tyrosine kinases TrkA, TrkB and TrkC. Whereas signaling via the Trk-receptors is quite well understood, even 10 years after its identification there was little known about the function and signaling pathways of  $p75^{\text{NTR}}$ . The aim of this work was therefore to identify intracellular interactors of  $p75^{\text{NTR}}$ . A biochemical approach was chosen, as was previously applied to related proteins of the TNFR-family. Three different purification strategies were used: 1) purification of the  $p75^{\text{NTR}}$ -interactor complex in the presence of its extracellular ligands, 2) affinity purification via the intracellular domain of  $p75^{\text{NTR}}$  and 3) enrichment of the  $p75^{\text{NTR}}$ -interactor complex in characterized subcellular fractions.

In addition, new antisera against  $p75^{\text{NTR}}$  were generated and characterized. One antiserum recognized additional  $p75^{\text{NTR}}$ -like signals on Western blot. Surprisingly, these signals remained strongly detectable in brain homogenates of a partial as well as a complete  $p75^{\text{NTR}}/-$  knock out mouse. The  $p75^{\text{NTR}}$ -like antigens were expressed exclusively in the central nervous system, were strongly downregulated during postnatal development and showed calcium-dependent segregation during centrifugation. In addition, a  $p75^{\text{NTR}}$ -like binding site was detected in dissociated dorsal root ganglia of the complete  $p75^{\text{NTR}}$  knock out mouse. The  $p75^{\text{NTR}}$ -like antigens were purified, identified as the N-terminus of the microtubule associated protein MAP1B and the homology to  $p75^{\text{NTR}}$  was investigated.