

4 Zielsetzung der Arbeit

4.1 Reinigung von intrazellulären Interaktoren

p75^{NTR} wurde als erster Neurotrophinrezeptor identifiziert und 1986 kloniert (Radeke et al., 1987; Johnson et al., 1986). Während die intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität der später entdeckten Trk Rezeptoren einen leichten Zugang zur Erkundung ihrer Wirkungsweise bot, ist keine intrinsische enzymatische Aktivität von p75^{NTR} bekannt. Zudem konnte nicht wie bei den Trk Rezeptoren auf Erkenntnisse über Familienmitglieder zurückgegriffen werden, da p75^{NTR} als erstes Protein der TNFR-Superfamilie identifiziert wurde. So blieb seine Funktion auch 10 Jahre nach seiner Klonierung weitgehend spekulativ.

Auch die Funktion zunehmend identifizierter Familienmitglieder von p75^{NTR} blieb lange Zeit unerkannt. Inzwischen ist bekannt, dass ihre Aktivierung häufig zu Zelltod oder Entzündungsreaktionen führt (Locksley et al., 2001). Interessant war daher die Beobachtung, dass p75^{NTR} ebenfalls wie viele in Zelltod involvierte Familienmitglieder eine *Death*-Domäne besitzt. Tatsächlich konnte kurz vor Beginn dieser Arbeit in unserem Labor zum ersten Mal *in vivo* gezeigt werden, dass Neurotrophine über p75^{NTR} nicht wie zum Zeitpunkt seiner Identifizierung vermutet Nervenwachstum und Zellüberleben sondern Apoptose induzieren (Frade et al., 1996).

Aber auch eine neurotrophinunabhängige Wirkungsweise von p75^{NTR} zeichnete sich ab. So zeigt der in unserem Labor hergestellte vollständige *Knockout* p75^{NTR}_{-/-}^{ExonIV} einen deutlich stärkeren Phänotyp als der *Teil-Knockout* p75^{NTR}_{-/-}^{ExonIII}, in dem zwar keine Ligandenbindung mehr möglich ist, aber die intrazelluläre Domäne mit Teilen der extrazellulären Domäne nach wie vor exprimiert ist. Es steht somit zu vermuten, dass der verkürzte p75^{NTR} Rezeptor trotz fehlender Ligandenbindungsdomäne Signale in die Zellen transduziert.

Die Aufklärung der Signalwege und die Identifizierung von intrazellulären Interaktoren ist daher von großem Interesse und stellt ein Ziel dieser Arbeit dar.

4.1.1 Experimentelle Ansätze zur Identifikation von intrazellulären Interaktoren

Ebenso wie zur Identifikation von Interaktoren der Mitglieder der TNFR-Superfamilie Fas und TNFR2 wurde die biochemische Reinigung als Technik gewählt (Kischkel et al., 1995; Rothe et al., 1994; Muzio et al., 1996). Mehrere Ansätze sind denkbar und wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt:

1) Reinigung des p75^{NTR}-Interaktorkomplexes in Gegenwart extrazellulärer Liganden

Zwar binden alle Neurotrophine an p75^{NTR}, lösen jedoch nicht alle Apoptose aus (Frade et al., 1996; Casaccia-Bonnel et al., 1996; Petersen et al., 1998). Offensichtlich bewirkt die Bindung unterschiedlicher Liganden unterschiedliche intrazelluläre Signale. Die parallele Reinigung über NGF einerseits und BDNF andererseits soll daher die Identifikation spezifischer Interaktoren ermöglichen. Da ein ternärer Proteinkomplex gereinigt werden soll, hängt die Durchführbarkeit dieses Ansatzes zentral von der Konzentration von p75^{NTR} im Ausgangsmaterial ab.

2) Reinigung über die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR}

Der Vergleich des Teil-*Knockout* p75^{NTR}-*ExonIII* (Lee et al., 1992) und des vollständigen *Knockout* p75^{NTR}-*ExonIV* (von Schack et al., 2001) lässt vermuten, dass auch ohne Ligandenbindungsdomäne nur durch die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} Signalkaskaden induziert werden. Darüber hinaus weist die intrazelluläre Domäne eine große Zahl von möglichen Interaktionsregionen auf (siehe 3.3.2). Wie auch beim Fas- und TNF-Rezeptor könnte diese Region daher zur Reinigung von Interaktoren ausreichen. Es stand uns zudem die intrazelluläre Domäne in einem Expressionsplasmid zur Verfügung, mit dessen Hilfe die NMR-Struktur der *Death*-Domäne von p75^{NTR} bestimmt wurde (Liepinsh et al., 1997). Eine intakte Tertiärstruktur ist daher bestätigt.

3) Anreicherung in funktionell charakterisierten, subzellulären Fraktionen

Die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} deutet auf die Lokalisation von p75^{NTR} einerseits in Caveolae andererseits in der Postsynapse hin (siehe 3.3.2. 4), 8)). Für beide Regionen sind Präparationsprotokolle etabliert. Zusammen mit p75^{NTR} könnte so ein Interaktor mitangereichert werden und im Vergleich mit Reinigungen aus *Knockout*-Material identifiziert werden.

Da p75^{NTR} als Zelltodrezeptor fungieren kann, steht zu vermuten, dass Zelllinien, die dieses Molekül überexprimieren, nur auf Grund einer veränderten intrazellulären Signaltransduktion überleben. Die Wahl von Mäusegehirn als Ausgangsmaterial der Reinigung ist daher zentral für diese Arbeit. Im Gegensatz zu Zelllinien kann hier davon ausgegangen werden, dass p75^{NTR} in seinem physiologisch funktionalen Kontext exprimiert ist.

4.2 Suche nach p75^{NTR}-ähnlichen Molekülen

Da p75^{NTR} in der Superfamilie der TNF-Rezeptoren in Bezug auf Expression, Ligandenbindung, *Death*-Domänenstruktur und genomische Intronverteilung eine Sonderrolle einnimmt, kann über die Existenz p75^{NTR}-ähnlicher Proteine spekuliert werden. In Westernblots von Gewebeextrakten zeigen gegen p75^{NTR} gerichtete Antiseren teilweise sehr starke und vielzählige Kreuzreaktivitäten. Auch dies deutet auf die Existenz strukturell verwandter Proteine hin. Die Produktion neuer Seren und deren Charakterisierung sollte daher Erkenntnisse über die Relevanz der beobachteten Kreuzreaktivitäten herkömmlicher Antiseren liefern und gegebenenfalls die Reinigung p75^{NTR}-ähnlicher Proteine ermöglichen.

