

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Antikörper

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

##### **Freund I, Freund II, Gerbu I, Gerbu II**

Polyklonale Kaninchenseren; Hergestellt im Rahmen dieser Arbeit durch Injektion der vollständigen intrazellulären Domäne von p75<sup>NTR</sup> (Ratte) in Neuseeländische Weiße Kaninchen (siehe 5.2.2.1)

##### **Anti-p75<sup>NTR</sup> Chao**

Polyklonales Kaninchenserum; Hergestellt durch Injektion der intrazellulären Domäne von p75<sup>NTR</sup> (Mensch) in Kaninchen; vertrieben von Promega (Produktnummer G3231)

##### **Anti-MAP1B**

Monoklonaler Antikörper gegen MAP1B (Klon AA6) ; Bezogen von Sigma als Maus Aszitis; Produktnummer M4528

##### **N1-15 MAP1B**

Polyklonales Kaninchenserum; hergestellt durch Injektion der ersten 15 N-terminalen Aminosäuren von MAP1B; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Peter J. Brophy, University of Edinburgh, Summerhall, Edinburgh EH9 1QH, UK

##### **Anti-myc 9E10**

Monoklonaler Antikörper gegen die 10 Aminosäuren des myc-Epitops; hergestellt von C.Dotti, Heidelberg

##### **Anti-p75<sup>NTR</sup> Alf**

Peptidantikörper hergestellt gegen Aminosäure 248-274 der intrazellulären Domäne von p75<sup>NTR</sup> (Ratte) durch Alfredo Rodriguez-Tebar

##### **Anti-TrkA**

Polyklonales affinitätsgereinigtes Kaninchenserum; gegen die C-terminalen Aminosäuren 763-777 des humanen TrkA Proteins gerichtet; vertrieben von der Firma St. Cruz Biotechnology (Produktbezeichnung: sc-118)

##### **Anti-NGF (27/21)**

monoklonaler Maus anti-NGF Antikörper; bezogen von Roche; Produktnummer 1008218

### **Anti-Caveolin**

polyklonales Antiserum gegen die N-terminalen 97 Aminosäuren von humanem Caveolin1; bezogen durch BD Biosciences; Produktnummer 610060

### **Anti-PSD95**

polyklonales Antiserum gegen Aminosäure 353-504 von PSD95 (Ratte); bezogen durch BD Biosciences; Produktnummer 610496

## **5.1.2 Tiere**

**BL6-Mäuse:** C57BL/6NJCrl; Charles River Laboratories

**p75<sup>NTR</sup>-/-<sup>ExonIII</sup>:** Teil-*Knockout* des p75<sup>NTR</sup> Gens; die Translation in Exon 3 wurde unterbrochen. Es konnte kein vollständiges p75<sup>NTR</sup> Protein detektiert werden (Details siehe (Lee et al., 1992)). Kürzlich wurde allerdings sowohl in wildtyp als auch in p75<sup>NTR</sup>-/-<sup>ExonIII</sup> Mäusen eine Exon 3 Splicevariante identifiziert, der drei der vier extrazellulären Cysteinmotive fehlt. Es findet keine Ligandenbindung an den verkürzten Rezeptor statt (von Schack et al., 2001);

**p75<sup>NTR</sup>-/-<sup>ExonIV</sup>:** Vollständiger *Knockout* des p75<sup>NTR</sup> Gens; die Region in Exon 4, die für die Transmembranregion kodiert, wurde verändert. Es konnte weder vollständiges noch verkürztes p75<sup>NTR</sup> Protein detektiert werden (von Schack et al., 2001)

**Chinchilla Bastard Kaninchen** bezogen durch Charles River Deutschland

## **5.1.3 Zelllinien**

**PCNA** (Radeke et al., 1987): p75<sup>NTR</sup> (Ratte) überexprimierende Maus Fibroblasten Zelllinie. Maus LTK-Zellen wurden mit genomischer DNA aus PC12-Zellen transfiziert und mittels FACS-Analyse auf p75<sup>NTR</sup> Expression selektiert.

**293** (Graham et al., 1977): Zelllinie aus humanen, embryonalen Nierenzellen, die mit Adenovirus Typ5 (Ad5)-DNA transformiert wurden.

**PC12** (Greene and Tischler, 1976): Ratten Pheochromozytoma Zellen der Nebenniere.

## **5.1.4 Modifizierte Lambda Phosphatase**

Es wurde eine modifizierte Lambdaphagen Phosphatase verwendet. Sie ist von der Lambda Phagen Serin/Threonin Phosphatase abgeleitet (Swissproteintrag P03772).

Von Patrick Forrer wurden jedoch die für die Spezifität verantwortlichen Regionen entfernt, wodurch auch tyrosingekoppelte Phosphate hydrolysiert werden. Um die Phosphatase effizient *in vitro* zu produzieren, ist sie mit dem Phagenkopf Protein D fusioniert (Details siehe (Forrer and Jaussi, 1998)). Die gereinigte modifizierte Lambda Phosphatase wurde dankenswerterweise von Brian Hemmings zur Verfügung gestellt.

### 5.1.5 Neurotrophine

Rekombinantes humanes NGF wurde von Genentech, Inc., rekombinantes BDNF und NT-3 von Regeneron/Amgen Partners bezogen. NGF wurde in CHO-Zellen (Chinese Hamster ovary), BDNF und NT3 in *E. coli* produziert.

### 5.1.6 Plasmide

**pQE-31/p75<sup>NTR</sup>-IZD:** Die intrazelluläre Domäne von p75<sup>NTR</sup> der Ratte wurde von Liepinsh et al. in das Plasmid pQE-31 der Firma Quiagen kloniert. Die aus sechs Histidinen bestehende Markierung, die C-terminal an das p75<sup>NTR</sup> Fragment angefügt wurden entstammt dem pQE-31 Plasmid (Details, siehe (Liepinsh et al., 1997)). Das Konstrukt wurde dankenswerterweise von Leopold Illag zur Verfügung gestellt.

### 5.1.7 Medien

**F14:** bezogen von Gibco/Invitrogen Incorporation

**DMEM:** Dulbecco's modified eagle medium; vertrieben von Gibco/Invitrogen Incorporation; Produktnummer 11965

**Neurobasal:** serumfreies Medium zur Kultivierung von u.a. Körnerzellen; bezogen über Gibco/Invitrogen Corporation; Produktbezeichnung 17504-044

**Pferdeserum:** bezogen von Gibco/Invitrogene Incorporation

### 5.1.8 Adjuvantien

**Freundsches Adjuvant (komplett):** hitzebehandelte Mycobacterium tuberculosis Bakterien in Paraffinöl/Mannide Monooleat; wirkt als makrophagenrekrutierendes Agens in Immunisierungen; bezogen durch Sigma-Aldrich (Produktbezeichnung F5881)

**Freundsches Adjuvant (inkomplett):** Paraffinöl/Mannide Monooleat Gemisch für die der ersten Immunisierung folgenden Injektionen; bezogen durch Sigma-Aldrich (Produktbezeichnung F5506)

**GerbuAdjuvant100:** auf dem Glycopeptid GMDP des *Lactobacillus bulgaricus*-basierendes Adjuvant mit Ölemulsion; leicht mit wässrigen Lösungen vermischbar; bezogen durch Gerbu (Produktbezeichnung 3100.0003)

### 5.1.9 Chemikalien und Zubehör

1,4-Dithiothreit (DTT) (Roche)

<sup>125</sup>I (Amersham Biosciences)

<sup>35</sup>S-Cystein (Amersham Biosciences)

Acetyl-Calpastatin (Sigma)

Ammoniumpersulfat (APS) (BioRad)

Azetonitril (Chromatography Grade) (Merk)

Bio-Rad Protein Assay (BioRad)

Coomassie Brilliant Blue G colloidal (Sigma)

Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva)

Cytochrom C (Sigma)

Diethylaminoethyl (DEAE) Sepharose CL-6B (Amersham Biosciences)

Digitonin (Sigma)

Enhanced chemiluminescence (ECL) Plus (Amersham Biosciences)

Filter 0,2 µm und 0,4 µm (Millipore)

Fuji Medical X-Ray Film Super RX (Fuji)

G50 (Promega)

IPTG, Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (Roth)

Lactoperoxidase (Sigma)

Leupeptin (Sigma)

Magermilchpulver „frema Reform“ (Reformhaus)

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Sigma)

Natriumdodecylsulfat (SDS) (BioRad)

NHS/EDC (BIAcore)

Nickel Nitrilotriacetic acid (Ni-NTA)-Agarose (Qiagen)

Parafilm (American National Can)

Polyornithin (Sigma)

Polyvinylidene Fluorid (PVDF) Membran (Immobilon P 0,45 µm) (Millipore)

Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range (BioRad)  
Protein A-Sepharose 6 MB (Amersham Biosciences)  
Rinderserum Albumin (Sigma)  
SDS-PAGE Standard, Broad Range (BioRad)  
„TNT-T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System“ der Firma Promega;  
Retikulozytenlysat zur *in vitro* Translation; Produktnummer L5010  
Trichloressigsäure (Sigma)  
Triton X-100 (Sigma)  
Tween-20 (Roth)  
Ultra Pure Protogel 30% w/v Acrylamide/0,8% Bis-AA (National Diagnostics)  
Wheat Germ Agglutinin (WGA) (Roche)

#### 5.1.10 Geräte

Acrylamid Minigelsystem (Bio-Rad/Werkstatt des MPI für Neurobiologie)  
Agarose-Gelkammern (Werkstatt des MPI für Neurobiologie)  
BIAcore, CM5 Chip (BIAcore)  
C4 reversed Phase Column (Applied Biosystems Technology)  
Chromatographiesäule HR16 (Amersham Biosciences)  
FPLC 625LC System (Waters)  
GradiFrac System mit Optical Unit UV-1, Pumpe P-1 und Aufzeichnungsgerät REC102 (Amersham Biosciences)  
HPLC Millipore Waters Automated Gradient Controller mit Detector (490E) und Pumpen (510) (Millipore)  
MilliQ Wasseraufbereitungsanlage (Millipore)  
Neubauer Zellzählkammer (Roth)  
Peristaltische Pumpe Minipuls 2 (Gilson)  
pH Meter 632 (Metrohm) mit Einstabmeßkette (Ingold)  
Phosphoimager FujiX BAS 1000 (Fuji)  
Schüttler Unitwister (Uniequip)  
Sonifikatoren (Brenson Sonifier 450 und Brenson Cell Disruptor B15)  
SpeedVac Vakuumzentrifuge Univapo 100H (Uniequip)  
Spektrophotometer Ultrospec 3000 (Amersham Biosciences)  
Szintillationszähler LS 500 TA (Beckman)  
Western Semi-Trocken-Transfer-Kammer (Werkstatt des MPI für Neurobiologie)  
Zellinkubatoren IG150 (Jouan), Cytoperm (Heraeus)

Zentrifugen: TLA Ultrazentrifuge (Beckman), PicoFuge (Stratagene), Labofuge GL (Heraeus), Universal 30F (Hettich), 3K30 (Sigma), RC-5B (Sorvall), 5415C (Eppendorf)

### 5.1.11 Puffer

Hier nicht aufgeführte Puffer sind bei den jeweiligen Methoden beschrieben. Soweit nicht anders beschrieben wurden die Puffer mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

#### **BBS (2 x)**

50 mM BES (N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethan-sulfonsäure)  
280 mM NaCl  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 6.95 mit NaOH eingestellt

#### **BIAcore Laufpuffer**

10 mM HEPES  
50 mM NaCl  
0.05 mM EDTA  
0.005% P20  
bei pH 7.4 (entgast)

#### **Bakterienlysepuffer**

50 mM NaPO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
10 mM Imidazol  
1 mM DTT  
pH 8.0

#### **Bakterienwaschpuffer**

50 mM NaPO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
20 mM Imidazol  
1 mM DTT  
pH 8.0

#### **Bakterienelutionspuffer**

50 mM NaPO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
250 mM Imidazol  
1 mM DTT  
pH 8.0

#### **Coomassie Entfärber (schnell)**

40% Methanol  
10% Essigsäure

#### **Coomassie Entfärber (langsam)**

10% Methanol  
5% Essigsäure

**Coomassie-Färbelösung**

40% Methanol  
10% Essigsäure  
0,01% Coomassie Brilliant Blau R-250

**ELISA-Karbonatpuffer**

50 mM NaCO<sub>3</sub>  
pH 9.6

**ELISA-Waschpuffer**

50 mM Tris-HCl  
200 mM NaCl  
2 mM EDTA  
0.1% Triton X-100  
pH 7.3

**ELISA-Waschpuffer-2**

PBS  
0.1% Tween-20

**Geltrockenlösung**

20% Methanol  
3% Glycerol

**Hankspuffer**

125 mM NaCl  
5 mM KCl  
1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
1.2 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 µM ZnCl<sub>2</sub>  
10 mM Glukose  
25 mM HEPES  
0.25% (w/v) BSA  
pH 7.4

**HBB Puffer**

250 mM Hepes-KOH, pH 7.7  
250 mM NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub>

**Hyb Puffer**

20 mM Hepes KOH, pH 7.7  
75 mM KCl  
0.1 mM EDTA  
2.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1% Milchpulver  
1 mM DTT

**IPTG** 100 mM in H<sub>2</sub>O

**Krebs-Ringer/HEPES-Puffer (KRH)**

125 mM NaCl  
5 mM KCl  
1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
6 mM Glucose  
25 mM HEPES  
pH 7.3

**KRB Bindungspuffer**

KRH  
5 mg/ml BSA  
0.1 mg/ml Cytochrom C

**MBS**

25 mM MES  
150 mM NaCl  
1 mM PMSF  
pH 6.5

**MDTH** (Mikrotubuli Destabilisierender Trisgepufferter Homogenisationspuffer):

1 mM  $\text{MgCl}_2$   
10 mM  $\text{CaCl}_2$   
25 mM Tris  
pH 7.6

**MDTH/Dig** (Laufpuffer für die DEAE Chromatographie):

MDTH + 0.01% Digitonin

Das Digitonin wird in Lösung aufgekocht, dem MDTH Puffer zugegeben und mindestens über Nacht bei 4°C gelagert. Direkt vor Gebrauch filtrieren.

**PBS** (Phosphat gepufferte Saline;  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$  frei)

4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
137 mM NaCl  
1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
2.7 mM KCl  
pH 7.4

**PMSF-Stammlösung**

100 mM in Isopropanol

**Ponceau S**

2 g/l in 2% Trichloressigsäure

**SoIA**

0.32 M Saccharose  
1 mM  $\text{NaHCO}_3$   
1 mM  $\text{MgCl}_2$   
0.5 mM  $\text{CaCl}_2$   
1 mM PMSF

**SoIB**

0.32 M Saccharose  
1 mM  $\text{NaHCO}_3$

**Semi-dry Blot Transferpuffer**

0.04% SDS  
20% MeOH  
39 mM Glycin  
48 mM Tris

**SDS-PAGE Sammelgelpuffer**

0.1% SDS  
125 mM Tris-HCl  
pH 6.8

**SDS-PAGE Trenngelpuffer**

0.1% SDS  
375 mM Tris-HCl  
pH 8.8

**SDS-PAGE Laufpuffer (10x)**

250 mM Tris  
15% Glycin  
1 % SDS

**SDS-PAGE Probenpuffer (Lämmli-puffer) (4x)**

200 mM Tris/Cl pH 6.8  
8% SDS  
0.04% Bromphenolblau  
40% Glycerol  
jeweils frisch 400 mM DTT bzw. 80 µl/ml β-Mercaptoethanol zugesetzt

**TBS (Tris-Buffered-Saline)**

150 mM NaCl  
25 mM Tris  
pH 8.0

**TBST (Tris-Buffered-Saline-Tween 20)**

150 mM NaCl  
25 mM Tris, pH 8.0  
0.1% Tween 20

**Westernblot "Stripplösung"**

100 mM β-Mercaptoethanol  
2% SDS  
62.5 mM Tris-HCl  
pH 6.8

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Aufreinigung intrazellulärer Interaktoren von p75<sup>NTR</sup>

#### 5.2.1.1 P75<sup>NTR</sup> Konzentrationsbestimmung in Gehirnhomogenat

PCNA-Zellen exprimieren exogenes p75<sup>NTR</sup> (Radeke et al., 1987). Über Bindungsstudien wurde durch Dr. Georg Dechant im Labor eine Expressionsrate von ca. 400 000 p75<sup>NTR</sup> Rezeptoren pro Zelle bestimmt. Diese Zellen können somit als Standard zur Bestimmung der p75<sup>NTR</sup> Konzentration in Mäusegehirn verwendet werden.

Es wurden PCNA-Zellen in DMEM/10% Kälberserum bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> bis zu einer Dichte von 75% in 10 cm Kulturschalen kultiviert. Sie wurden 5 min trypsinisiert (0.1% Trypsin in PBS), die Zellen vorsichtig durch Schütteln von der Schale abgelöst, mit DMEM/10%Kälberserum gewaschen und 5 min bei 1000 g pelletiert. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, die Zellen gezählt und in Aliquots zu 1000 PCNA-Zellen pro µl weggefroren.

Zur Ermittlung des p75<sup>NTR</sup> Gehalts in Mäusegehirn wurden Gehirne von sieben Tage alten Wildtypmäusen im 15fachen ihres Feuchtgewichts MDTH im Glashomogenisator homogenisiert. Das Gehirnhomogenat wurde 1:4, das PCNA Homogenat 1:10 in zweifach konzentriertem Lämmli-puffer aufgenommen. Die Proben wurden 10 min bei 95°C gekocht und jeweils 20, 10, 5, 2.5 µl auf 10% Gele aufgetrennt, geblotet und mit dem anti-p75<sup>NTR</sup> Gerbull Serum (1:3000) über Nacht geprobt. Nach dem Entwickeln des Blots wurden die p75<sup>NTR</sup> Signale densitometrisch vermessen und der p75<sup>NTR</sup> Gehalt unter Annahme eines Molekulargewichts von 75 kD errechnet.

#### 5.2.1.2 Expression und Aufreinigung des p75<sup>NTR</sup>-IZD Plasmids

Die intrazelluläre Domäne (IZD) von Ratten p75<sup>NTR</sup> wurde als Fusionsprotein mit sechs N-terminalen Histidin und einer kurzen Sequenz der Multikloning-Site in E. coli Bakterien exprimiert. Bakterien samt dem entsprechenden pQE-31/p75<sup>NTR</sup>-IZD Plasmid wurden freundlicherweise von Leopold L. Illag dem Labor zur Verfügung gestellt (Klonierungsdetails siehe (Liepinsh et al., 1997)). Das Translationsprodukt dieses Plasmids wurde bereits zur Aufklärung der NMR Struktur der *Death*-Domäne von p75<sup>NTR</sup> verwendet (Liepinsh et al., 1997).

Eine Pipettenspitze mit Bakterien aus dem Glycerolstock wurde auf einer LB-Agar-Platte (100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen. Nach Inkubation

über Nacht wurde mit einem einzelnen Klon eine 50 ml LB-Flüssigkultur (100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) angeimpft. Nach einer weiteren über Nacht Inkubation bei 37°C wurden mit dieser Vorkultur 2x 500 ml LB/Ampicillin/Kanamycin im Verhältnis 1+49 angeimpft und bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach ca. 5 h und einer OD<sub>600</sub> von ca. 0.8 wurde die Expression des Hisp75<sup>NTR</sup>-IZD Fusionproteins mit 1 mM IPTG für weitere 5 h induziert. Die Bakterien wurden 20 min mit 2500 g bei 4°C pelletiert, die Überstände verworfen und die Pellets (ca. 7.5 g/Liter Kultur) bei –80°C weggefroren.

Die Bakterienpellets wurden in 20 ml Lysepuffer (50 mM NaPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8.0) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch 5x 1 min Sonifikation. Unaufgeschlossenes wurde durch eine 30 min, 20 000 g Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Der Überstand wurde durch einen 0.4 µm Sterilfilter filtriert.

0.5-1 ml Ni-NTA-Agarose wurden mit 10-50 ml Lysepuffer äquilibriert. Das Bakterienlysat wurde mit ca. 75-150 cm/h (=0.2 ml/min) über die Ni-NTA-Agarose gegeben. Der Durchfluss wurde spektroskopisch bei 280 nm verfolgt und bis auf Anfangsniveau mit Waschpuffer (50 mM NaPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0) gewaschen. Die Elution erfolgte in einem Schritt mit dem Elutionspuffer (50 mM NaPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8.0). Das Eluat wurde bei –80°C aufbewahrt.

### 5.2.1.3 Verwendung der BIAcore Maschine

Mit der BIAcore-Maschine können Protein-Protein Interaktionen in Lösung detektiert werden. Hierzu wird ein Protein auf einem Chip an eine Matrix gekoppelt, die auf eine Goldschicht aufgebracht ist. Weißes Licht wird an der Metalloberfläche gespiegelt. Das Elektronenplasma im Gold absorbiert Wellenlängen der Resonanzfrequenz. Diese Wellenlänge wird daher nicht reflektiert. Dieser Effekt nennt sich „Surface Plasmon Resonance“ (SPR). Wird das reflektierte Licht über ein Prisma gebrochen, so kann die Resonanzfrequenz als „Schatten“ detektiert werden. Veränderungen in der Umgebung der Goldbeschichtung z.B. durch Bindung eines Proteins aus der Lösung an das matrixfixierte Protein verschieben die Resonanzfrequenz. Eine Veränderung der Resonanzfrequenz wird als Winkelveränderung des „Schattens“ gemessen und als „Response Units (RU)“ relativ zur Ausgangssituation angegeben. Um unspezifische Interaktionen mit dem Matrixmaterial zu detektieren, überfließt die lösliche Probe zuerst eine Probenkammer ohne immobilisiertes Protein, bevor es in

die Probenkammer mit dem kovalent fixierten Protein gelangt. Das Differenzsignal beider Kammern wird als „relative Response Units“ (relRU) angegeben und ist ein Maß für spezifische Bindung. Für die Messungen werden nur sehr kleine Mengen ( $10^{-12}$ - $10^{-9}$  g) an Protein in kleinen Volumina ( $\mu\text{l}$ ) benötigt. Die Sensitivitätsgrenze liegt bei einer Molarität von  $0.1 \times K_D$ . Die Flussgeschwindigkeit beträgt zwischen 1-500  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Es kann somit leicht der Einfluss unterschiedlicher pH-Werte und Salzbedingungen auf die Bindung des Interaktors an das fixierte Protein untersucht werden.

Es wurden rund 600 relRUs der intrazellulären Domäne von p75<sup>NTR</sup> an CM5 Chips kovalent gebunden. CM5 Chips bestehen aus zwei voneinander getrennten carboxymethylierten Dextran Matrizen, der Messzelle und der Kontrollzelle. Die Carboxymehtylgruppe bildet mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-ethyl-N'-(demethylaminopropyl)-cabodiimid (EDC) in einem Aktivierungsschritt einen reaktiven N-Hydroxysuccinimid-Ester. Die zu koppelnden Proteine werden nur über die Messzelle geleitet, wo sie spontan mit den reaktiven Estern eine kovalente Bindung eingehen. Die restlichen N-Hydroxysuccinimid-Ester der Messzelle und der Kontrollzelle werden mit Tris-Hydroxymethyl-aminomethan (Tris) abreagiert. Als Laufpuffer wurde, soweit nicht anders angegeben, 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0.05 mM EDTA, 0.005% P20 bei pH 7.4 (entgast) verwendet. Die Proben wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in 40  $\mu\text{l}$  Puffer injiziert, wovon 20  $\mu\text{l}$  mit einer Pumpengeschwindigkeit von 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  über den Chip gepumpt wurden. Einige Minuten nach dem Probenauftrag wurde in der Regel mit 40  $\mu\text{l}$  1 M NaCl oder 40  $\mu\text{l}$  Glycin (50 mM, pH 2.25) und einigen 100  $\mu\text{l}$  Laufpuffer nachgewaschen.

### 5.2.1.4 Iodierung von Neurotrophinen

2.5  $\mu\text{g}$  Neurotrophin, 1  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3  $\mu\text{l}$  Lactoperoxidase (zuvor 1:10 000 verdünnt), 2.5  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$  wurden mit  $\text{NaPO}_4$  (0.5 M, pH 7.4) auf 15  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde 25 min auf Eis inkubiert. Die Iodierung des Neurotrophins wurde durch Verdünnung mit 235  $\mu\text{l}$   $\text{NaPO}_4$  nahezu vollständig gestoppt. Nach zwei weiteren Stunden auf Eis wurden 2 mg BSA hinzugefügt, um die Assoziation der Neurotrophine an das Plastik des Reagenzgefäßes zu unterbinden. Um die Iodierungseffizienz zu ermitteln, wurde 1  $\mu\text{l}$  Iodierungsansatz mit 1  $\mu\text{l}$  Krebs-Ringer-Hepes-Puffer (KRH) versetzt und mit 1 ml 40% Trichloressigsäure gefällt. 1 min maximale Drehgeschwindigkeit der Tischzentrifuge pelletierte das ausgefallene

Protein, während nicht eingebautes  $^{125}\text{I}$  im Überstand verblieb. Um das Problem zu umgehen, den Überstand bis zum letzten Rest abnehmen zu müssen, wurden nur 500  $\mu\text{l}$  entnommen und im Gammazähler vermessen. Aus der gemessenen Radioaktivität der restlichen 500  $\mu\text{l}$  samt des Neurotrophinpellets darin wurde die Radioaktivität des Pellets errechnet. Das Messergebnis der 500  $\mu\text{l}$  Überstandsprobe wurde von dem Ergebnis der restlichen 500  $\mu\text{l}$  samt Pellet subtrahiert. Das Verhältnis Pellet zu Überstand ergibt die Einbaueffizienz, die bei rund 95% lag. Es ergab sich eine spezifische Aktivität von rund 75 cpm/pg Neurotrophin. Die biologische Aktivität des Neurotrophins wurde unter diesen Bedingungen durch die Iodierung nicht beeinflusst.

#### 5.2.1.5 Dissoziation von Spinalganglien

Für Bindungsstudien wurden frisch präparierte und dissoziierte Maus Spinalganglien verwendet. Hierzu wurde frisch getöteten Mäusen im Alter von 2-3 Tagen die Wirbelsäule herauspräpariert. Das Rückenmark wurde von ventral aus freigelegt und vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die nun freiliegenden Spinalganglien mit einer Pinzette gelöst und in F14 Medium supplementiert mit 10% Pferdeserum (F14/HS) gesammelt. Die an den Ganglien verbleibenden Axonenstümpfe wurden samt Geweberesten entfernt. Die Spinalganglien wurden 10 s mit 1000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Für 10 min wurde bei 37°C in 0.1% Collagenase/F14/HS inkubiert, wiederum 10 min 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Die pelletierten Spinalganglien wurden in 10 ml PBS aufgenommen und erneut pelletiert. Anschließend wurden sie für 30 min bei 37°C in 0.1% Trypsin/PBS angedaut. Nach 10sekündiger Zentrifugation bei 1000 rpm wurde der Überstand verworfen. Die Spinalganglien wurden mehrfach hintereinander in 1-2 ml F14/HS resuspendiert und vorsichtig mit einer angeschmolzenen Pasteurpipette trituriert. Anschließend wurde jeweils 10 s zentrifugiert und die Überstände gesammelt. Die vereinigten Überstände wurden 5 min mit 1500 rpm pelletiert, in 10 ml F14/HS resuspendiert, durch ein 40  $\mu\text{m}$  Zellsieb gefiltert und 2 h in einer 10 cm Kulturschale bei 37°C/10%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Während verunreinigende Fibroblasten fest am Boden adhären, können die Neuronen durch leichtes Schütteln gelöst und mit dem Medium zusammen abgenommen werden.

### 5.2.1.6 Overlayblots

Der Overlayblot wird ähnlich dem Westernblot durchgeführt. Es werden ebenfalls Proteinproben über ein SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Während beim Westernblot mit einem Antiserum gegen ein spezifisches Protein inkubiert wird, werden beim Overlayblot mit einem löslichen, z.B. radioaktiv markiert Protein Interaktoren auf der Blotmembran detektiert. Da der Großteil der Proteine auf der Blotmembran nach dem SDS-PAGE denaturiert vorliegt, kann gegebenenfalls eine Renaturierung vorgenommen werden. Die Renaturierung erfolgte über die vollständige Denaturierung (2x 10 min in 6 M Guanidinium-HCl/HBB Puffer/1 mM DTT) und anschließender schrittweiser Überführung zu reinem HBB Puffer (jeweils 10 min 3, 1.5, 0.75, 0.38, 0.19, 0.0, 0.0 M Guanidinium HCl/HBB Puffer). In beiden Fällen wurde die Membran mit HBB/5% Milchpulver/0.05% NP40 gegen unspezifische Bindungen blockiert, um dann über Nacht in Hybridisationspuffer (Hyb) mit der radioaktiven Probe bei 4°C inkubiert zu werden. Am nächsten Morgen wurde 3-mal jeweils 15 min mit Hyb/1% Milchpulver/0.05% NP40 gewaschen und ein Film bzw. eine Phosphoimagerplatte für 1-12 h der in Saranfolie eingewickelten Blotmembran exponiert. Um die Spezifität der Interaktion zu erhöhen, wurde die KCl Konzentration von 75 mM auf 150 mM erhöht. Als Proben wurden eingesetzt:  $^{125}\text{I}$ -Neurotrophin,  $^{125}\text{I}$ -Neurotrophin gekoppelt an p75<sup>NTR</sup>,  $^{35}\text{S}$ -Cystein markierte und *in vitro* translatierte (siehe 5.2.1.7) intrazelluläre Domäne von p75<sup>NTR</sup>,  $^{35}\text{S}$ -Cystein markiertes NRIF1 und  $^{35}\text{S}$ -Cystein Luziferase. Es wurden jeweils  $10^5$ - $3 \times 10^6$  cpm/ml pro Experimente eingesetzt.

### 5.2.1.7 *In vitro* Translation der intrazellulären Domäne von p75<sup>NTR</sup>

Zur *in vitro* Translation wurde das „TNT-T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System“ der Firma Promega verwendet. Hier erfolgt sowohl die Transkription als auch die Translation in einem einzigen Ansatz. Dem Protokoll folgend wurden die Transkriptions- und Translationskomponenten (12.5 µl TNT-Kaninchen Reticulocyten Lysat, 1 µl Reaktionspuffer, 0.5 µl T3/T7 Polymerase, 0.5 µl Aminosäuremix ohne Cysteine, 2.5 µl  $^{35}\text{S}$ -Cystein (1200 Ci/mlMol), 0.5 µl Rnasin, auf 25 µl Gesamtvolumen mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt) zusammen mit den zu transskribierenden und translatierenden Plasmiden (1 µg pQE-31/p75<sup>NTR</sup>IZD (siehe (Liepinsh et al., 1997)), Luziferase von Promega zusammen mit den Retikulozytenlysaten geliefert) zusammengegeben. Nach 90 min Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion im Eis gestoppt. Nicht eingebautes  $^{35}\text{S}$ -Cystein wurde mit Hilfe von 5 ml G50 Gelsäulen (Roche) abgetrennt. Hierzu

wurden die Säulen mit 6 ml TBS/3 mg/ml BSA Puffer äquilibriert. Der TNT-Ansatz wurde auf die Säule gegeben und mit 400 µl TBS Puffer nachgewaschen. Die nächsten 400 µl wurden aufgefangen und enthielten die radioaktiv markierte Probe, die direkt im Anschluss auf einem SDS-PAGE als richtiges Produkt identifiziert wurde und mit 110 000 cpm/ml für Overlayblots eingesetzt wurde.

#### 5.2.1.8 Kopplung von $^{125}\text{I}$ -Neurotrophin an p75<sup>NTR</sup> für Overlayblots

Es wurden PCNA-Zellen in 10 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 60-80% kultiviert. Diese transformierten Zellen exprimieren große Mengen an p75<sup>NTR</sup>. Sie wurden eine Minute lang mit 0.1% Trypsin/PBS angedaut, die Protease mit DMEM/10%FCS blockiert und die Zellen durch leichtes Schütteln vom Schalenboden abgelöst. Die Zellen wurden pelletiert (3 min, 1000 rpm), in 10 ml KRB Puffer resuspendiert, erneut pelletiert und abschließend in 1 ml KRB aufgenommen. Die Zelldichte wurde mit einer Neubauerkammer ausgezählt und auf  $0.75 \times 10^6$  Zellen/ml mit KRB verdünnt. Jeweils  $1.5 \times 10^6$  Zellen wurden mit 1 nM iodiertem NGF, BDNF oder NT3 für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rad inkubiert. Anschließend wurden die Neurotrophine mit 1 mM BS<sub>3</sub> oder 5 mM EDC innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur kovalent an p75<sup>NTR</sup> gebunden. Der verbleibende chemische Vernetzer wurde mit 400 µl 1 M Tris für 30 min abreagiert und die Zellen abschließend zweimal mit PBS gewaschen. P75<sup>NTR</sup> wurde mit 2% β-Octylglucosid in KRH Puffer/2 mg/ml Phosphatidylcholin eine Stunde lang auf Eis solubilisiert. Unsolubilisierte Membranen und Zellfragmente wurden 30 min bei 100 000 rpm im TLA 100.2 Rotor der Beckman Tischultrazentrifuge pelletiert. Um neurotrophinmarkiertes p75<sup>NTR</sup> anzureichern und von nicht eingebautem  $^{125}\text{I}$ -Neurotrophin abzutrennen, wurde der Überstand über Nacht mit 50 µl Wheat-Germ-Agglutinin (WGA) bei 4°C auf dem Rad inkubiert. Wheat-Germ-Agglutinin bindet p75<sup>NTR</sup> wie auch andere Membranproteine über N-Acetylglucosamine. Pelletiertes WGA wurde 3-mal mit KRH gewaschen und die Membranproteine 2 h mit 1 ml KRH/1% β-Octylglucosid/1 M N-Acetylglucosamin bei Raumtemperatur eluiert.

#### 5.2.1.9 Bindungsstudien an dissoziierten Spinalganglien Neuronen

Die dissoziierten Neuronen (siehe 5.2.1.9) wurden auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Bindungspuffer (KRH, 5 mg/ml BSA, 0.1 mg/ml Cytochrom C) verdünnt. Im 50 ml Reaktionsgefäß wurden 500 µl Zellsuspension mit/ohne Neurotrophin 60 min bei 4°C im

Wasserbad schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde für 60 min durch Zugabe von 0.5 nM  $^{125}\text{I}$ -NGF um die Bindungsstelle kompetiert. Die Proben wurden zu viermal 100  $\mu\text{l}$  auf 700  $\mu\text{l}$  Reaktionsgefäße aufgeteilt, jeweils die Zellen durch Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit für 30 s pelletiert, der Überstand verworfen und die Pellets in der abgeschnittenen Reaktionsgefäßspitze im Gammazähler vermessen. Die  $p75^{\text{NTR}}$  Bindungsstelle zeichnet sich dadurch aus, dass sie jedes der vier Neurotrophine mit ähnlicher Bindungsaffinität binden kann. Wird also mit iodiertem NGF geprobt, so kann die radioaktive Probe sowohl durch einen starken Überschuss (50-1000fach) an nicht iodiertem NGF sowie auch durch nicht iodiertes BDNF oder NT3 verdrängt werden.

### 5.2.1.10 Präparation von Caveolae mit Triton X-100

Jeweils ein Gehirn von sieben Tage alten Mäusen wurde vollständig in 4.2 ml MBS (25 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6.5, 1 mM PMSF) im Glashomogenisator mit 20 Stößen homogenisiert. Unaufgeschlossenes Material wurde mit 10minütiger Zentrifugation bei 700 g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf 1% (v/v) Triton X-100 gebracht und sorgfältig vermischt. Nach einstündiger Solubilisation auf Eis wurden 750  $\mu\text{l}$  des solubilisierten Ansatzes mit 750  $\mu\text{l}$  80% Saccharose/MBS vermengt und mit 500  $\mu\text{l}$  35% Saccharose im Ultrazentrifugenröhrchen überschichtet. Darüber wurde 10 ml kontinuierlicher Saccharosegradient (30%-15%, anfangs 30%-5%) mit einer 10 cm langen Injektionsnadel geschichtet (0.5 ml/min). Dabei verblieb die Nadel die ganze Zeit in der selben Position kurz über dem 35% Material. Die Gradienten wurden austariert und 18 h bei 40 000 rpm, 4°C im SW41 Rotor zentrifugiert. Es wurde sowohl beim Starten als auch beim Abbremsen der Zentrifuge mit minimaler Beschleunigung gearbeitet. Der Gradient wurde abschließend von unten nach oben über die Injektionsnadel mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min geerntet und in 1 ml Fraktionen fraktioniert.

Alternativ wurden PC12 Zellen ebenso wie in 5.2.1.11 allerdings mit Triton X-100/MBS anstelle des  $\text{NaCO}_3$ -Puffers homogenisiert und solubilisiert. Der Gradient wurde wie oben beschrieben präpariert.

### 5.2.1.11 Präparation von Caveolae mit $\text{NaCO}_3$

Der Methode von Song et al. (Song et al., 1996) folgend wurden PC12 Zellen von zwei konfluenten 15 cm Kulturschalen gekratzt und zweimal mit PBS gewaschen

(5 min, 1000 g). Das Zellpellet wurde in 2 ml 0.5 M NaCO<sub>3</sub>, pH 11.0 resuspendiert. Die Homogenisation erfolgte durch 20 Stöße im Glashomogenisator, 3x 10 s Behandlung mit dem Polytron Gewebe Homogenisator und 3x 20 s Sonifikation im Wasserbad. Anschließend wurden 750 µl Solubilisat mit 750 µl 80% Saccharose in MBS/0.25 M NaCO<sub>3</sub> sorgfältig vermengt und mit 500 µl 35% Saccharose/MBS/0.25 M NaCO<sub>3</sub> überschichtet. Im Gegensatz zu Song et al. wurde kein Stufengradient sondern ein kontinuierlicher Gradient von 30-15% Saccharose/MBS/0.25 M NaCO<sub>3</sub> darüber geschichtet. Der Gradient wurde in 1 ml Fraktionen nach 18 h Zentrifugation bei 40 000 rpm, 4°C im SW41 Rotor von unten nach oben geerntet.

#### 5.2.1.12 Präparation von „Postsynaptic Densities“ (PSDs)

Die Präparation von „Postsynaptic Densities“ (PSDs) erfolgte in Anlehnung an (Carlin et al., 1980). Es wurden 10 g Gehirn von 7 Tage alten Mäusen in 40 ml SolA (0.32 M Saccharose, 1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF) im Teflonhomogenisator homogenisiert (1000 rpm, 12x auf und ab). Das Homogenat wurde 1:2 mit SolA verdünnt und unaufgeschlossenes Material durch eine zehnmünütige Zentrifugation mit 1400 g abgetrennt. Das Pellet wurde im Ausgangsvolumen resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 700 g). Die Überstände beider Zentrifugationen wurden vereinigt. Mit einer zehnmünütigen Zentrifugation bei 13 800 g im SS34 Rotor wurden die größeren Vesikel und Membranen pelletiert. Das Pellet wurde in 24 ml SolB (0.32 M Saccharose, 1 mM NaHCO<sub>3</sub>) im Glashomogenisator resuspendiert.

8 ml des resuspendierten Pellets wurden auf einen Stufengradienten aus jeweils 10 ml 0.85 M, 1.0 M und 1.2 M Saccharose/1 mM NaHCO<sub>3</sub> überschichtet. Nach 2 h Zentrifugation bei 21 400 rpm (82 500 g) im SW28 konnten Synaptosomen an der 1.2/1.0 M Saccharose Phasengrenze geerntet werden. Sie wurden mit SolB auf 60 ml pro 10 g Startmaterial verdünnt.

Die 60 ml wurden mit 60 ml 1% Triton X-100/0.32 M Saccharose/12 mM Tris/HCl pH 8.1 für 15 min bei 4°C solubilisiert. Die PSDs wurden in einer erneuten Zentrifugation pelletiert (20 min, 32800 g (16 500 rpm , Ti50.2 Rotor)) und in 2.5 ml SolB resuspendiert.

Die PSDs wurden durch eine weitere Stufengradientenzentrifugation angereichert. Hierzu wurden 2 ml des resuspendierten Pellets auf einen 3 ml 1 M, 3 ml 1.5 M, 4 ml 2 M Saccharose/1 mM NaHCO<sub>3</sub>-Gradienten aufgetragen und 2 h mit 201 800 g (34

300 rpm, SW41 Rotor) zentrifugiert. Die sauberen PSDs wurden an der 1.5 M/2 M Saccharosephasengrenze geerntet und auf 6 ml SolB verdünnt. Nach Verdünnung mit 6 ml 1% Triton X-100/150 mM KCl und 20-minütiger Zentrifugation bei 201 800 g (34 300 rpm, SW41 Rotor) lagen die gereinigten PSDs im Pellet vor und wurden in kleinem Volumen SolB resuspendiert.

### **5.2.2 Charakterisierung, Reinigung und Identifizierung von p75<sup>NTR</sup>-ähnlichen Proteine**

#### **5.2.2.1 Herstellung polyklonaler Seren gegen die intrazelluläre Domäne von p75<sup>NTR</sup>**

Vier männliche Chinchilla Bastard Kaninchen (2.5 kg) wurden über einen Zeitraum von 16 Wochen mit der in 5.2.1.2 hergestellten und gereinigten intrazellulären Domäne von p75<sup>NTR</sup> immunisiert. Dabei wurde 2 Tieren das Freund'sche Adjuvant, bei den anderen beiden Tieren das Adjuvant Gerbu-100 der gereinigten intrazellulären Domäne von p75<sup>NTR</sup> beigemischt. Fünfmal in Abständen von 3 Wochen wurden pro Tier jeweils 250-350 µg Protein in 300-500 µl Adjuvant an sechs Stellen subkutan injiziert. Vor dem Ausbluten der Tiere wurde ein weiteres Mal mit jedoch 1 mg/Tier immunisiert. Nach 12 Tagen wurde das Blut gewonnen. Dem Protokoll von Ed Harlow folgend (Harlow and Lane, 1988) wurde 1 h bei 37°C die Koagulation ermöglicht. Nachdem das koagulierte Blut von der Gefäßwand gelöst wurde, wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 10 000 g wurde der Überstand abgenommen und bei -80°C gelagert. Die Seren wurden den verwendeten Adjuvantien entsprechend als FreundI, FreundII, Gerbul und Gerbull bezeichnet.

#### **5.2.2.2 Organpräparation**

Es wurden Mäuse getötet und die im Text angegebenen Organe entnommen. Sie wurden im 15fachen ihres Feuchtgewichts in MDTH mit einem Ultraturax fein zerhächelt und eine Minute sonifiziert. Der Proteingehalt wurde, wenn angegeben, mittels Bradfordassay bestimmt und äquivalente Proteinmengen im SDS-PAGE aufgetrennt.

#### **5.2.2.3 Dephosphorylierung der FreundI Antigene**

Zur Dephosphorylierung wurde eine modifizierte Lambda Phosphatase mit unselektiver Phosphataseaktivität verwendet (siehe Material). Gehirne von sieben Tage alten p75<sup>NTR</sup><sub>-/-</sub><sup>ExonIV</sup> Mäusen wurden in einem reinen Trispuffer (50 mM Tris, 1 mM PMSF,

pH 8.0) im Glashomogenisator mit 20 Stößen homogenisiert. Die Homogenate wurden auf die Lambda Phosphatase-Pufferbedingungen eingestellt (50 mM Tris, pH 8.0, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) und 1.5 h bei 30°C im Wasserbad mit 250 U/mg Protein inkubiert. Die Proben wurden anschließend direkt mit zweifach konzentriertem Lämmli-puffer versetzt, 10 min bei 95°C gekocht und über ein SDS-PAGE aufgetrennt. Der Einfluß der Dephosphorylierung wurde abschließend im Westernblot mit p75<sup>NTR</sup> Antiseren getestet.

#### 5.2.2.4 Bindungsassay an Spinalganglien

Es wurden Spinalganglien präpariert und dissoziiert (siehe 5.2.1.5). Sie wurden in 5minütiger Zentrifugation mit 1000 g pelletiert, in KRB resuspendiert und mit einer Neubauer Zellzählkammer ausgezählt. Die Suspension wurde auf 50 000 Zellen/ml mit KRB verdünnt. Jeweils 500 µl wurden mit den entsprechenden Neurotrophinen bei 4°C in der Spitze eines 50 ml Falcontubes leicht schwenkend inkubiert. Nach einer Stunde wurde das iodierter Neurotrophin zugegeben und weitere 90 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 4x100 µl in Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt, mit der Tischzentrifuge die Zellen pelletiert (1 min maximale Drehzahl), die Eppendorfspitzen samt Zellpellet abgeschnitten und im Szintillationsmesser ausgezählt.

#### 5.2.2.5 Reinigung des Freundl Antigens

Reinigungsschema siehe Abbildung 15 in Abschnitt 6.2.9. 10-15 Gehirne von 7 Tage alten p75<sup>NTR</sup>+/+ Mäusen wurden im 15fachen ihres Feuchtgewichts in 4°C kaltem MDTH-Puffer im kalten 60 ml Teflondouncer mit 1500 rpm homogenisiert (10-mal auf und ab). Ein Aliquot wurde direkt weggefroren, ein weiteres während der fortschreitenden Reinigung auf 4°C gelagert. Das Homogenat wurde 10 min, 1500 g, 4°C im 50 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde im Ausgangsvolumen in MDTH resuspendiert. Nach 3h Inkubation bei 4°C wurde erneut 10 min 1500 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und weiterverarbeitet, das Pellet hingegen verworfen.

Der 1500 g Überstand wurde mit 1 ml DEAE-Sepharose pro 10 Gehirne 1h bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde 5x 5 min mit 50 ml MDTH/0.01% Digitonin/80 mM NaCl gewaschen (jeweils mit 2 min 500 g pelletiert). Die Sepharose wurde in ein 2 ml Eppendorfreagenzgefäß übertragen und dort 4x 10 min mit jeweils 1 ml MDTH/0.01%

Digitonin/ 180 mM NaCl eluiert. Die 4 Eluate wurden vereinigt. Zur Kontrolle wurde mit MDTH/0.01% Digitonin/1 M NaCl nachgewaschen.

Die vereinigten DEAE-Elutionsfraktionen wurden 30 min auf Eis mit 0.1% TFA inkubiert und mit einem 0.22 µm Spritzenfilter von Agregraten und Sepharose gereinigt. In Fraktionen von 1.8 ml wurde die C4 HPLC Säule beladen. Die Elution erfolgte nach folgendem Protokoll (Puffer A = H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, Puffer B = 80% Azetonitril (Chromatographie Grad)/0.1% TFA): 30 min 0-50% Puffer B, waschen bis der 280 nm Wert Ausgangsniveau erreicht, 60 min 50-60% Puffer B, 10 min 60% Puffer B, 20 min 60-75% Puffer B, 2 min 75-100% Puffer B. Es wurden 1 ml Fraktionen bei einer Flussrate von 0.5 ml/min aufgefangen, die über Nacht unter Vakuum eingetrocknet wurden. Das Freundl Antigen eluierte bei 57-58% Puffer B, was 45.6-46.4% Azetonitril entspricht.

#### 5.2.2.6 Sequenzvergleich und Phosphorylierungsvorhersagen

Zum Vergleich der Aminosäuresequenzen von p75<sup>NTR</sup> und MAP1B wurde das Programm „Align“ des GeneStream Netzwerkes (<http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) mit den Standardparametern verwendet (Pearson et al., 1997). Es wurden die 600 N-terminalen Aminosäuren von Maus MAP1B mit den 152 C-terminalen Aminosäuren von Ratten p75<sup>NTR</sup> verglichen.

Zur Identifizierung potentieller Phosphorylierungsstellen wurden die Teilsequenzen von MAP1B mit dem Programm „NetPhos 2.0“ des „Center for Biological Sequence Analysis“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) analysiert (Blom et al., 1999).

#### 5.2.2.7 Peptidkompetition im Westernblot

Es wurden zwei Peptide synthetisiert, die das potentielle Epitope QRADxxESL und die drei jeweils N- und C-terminal flankierenden Aminosäuren umfassten.

- 1) PS1015: RRIQRADIVESLCSE
- 2) PS1016: KLKQRADSRESLKPA

PS1015 entspricht der Sequenz von p75<sup>NTR</sup> (Maus), während PS1016 die Sequenz von MAP1B (Ratte) widerspiegelt. Gehirne von sieben Tage alten p75<sup>NTR</sup><sub>-/-</sub><sup>ExonIV</sup> Mäusen wurden frisch präpariert, wie oben beschrieben (5.2.2.3) dephosphoryliert, über ein SDS-PAGE aufgetrennt und geblotet. Die Blotmembran wurde in Streifen geschnitten und mit den jeweiligen Antiseren (FreundI 1:3000, FreundII 1:3000, Anti-

p75<sup>NTR</sup> Chao 1:1000) in Abwesenheit und Gegenwart von 0.5 M Peptid über Nacht in TBST/5% Milch bei 4°C inkubiert. Es wurde dreimal je 10 min mit TBST gewaschen, 1.5 h mit dem Peroxidase-gekoppeltem Sekundärserum inkubiert und mit ECL-Plus entwickelt.

#### 5.2.2.8 Präparation von Körnerzellen

Sieben Tage alte Mäuse wurden geköpft. Der Schädel wurde vorsichtig vom Rückenmarkkanal aus aufgeschnitten und die Schädelplatte entfernt. Das Kleinhirn wurde zusammen mit umliegendem Gewebe mit einem Spatel entnommen und in kaltem PBS/BSA (PBS, 1 mg/ml BSA, 10 mM Glucose) von anderen Hirnarealen und Meningen sorgfältig befreit. In 10 ml Proteaselösung (0.5 mg/ml Papain, 1 µl/ml DNase I (10 mg/ml) in PBS/BSA) wurden bis zu 6 Gehirne 20 min bei 37°C im Wasserbad angedaut. Die Lösung wurde dekantiert und die Hirne vorsichtig in 3 ml PBS/BSA mit einer angeschmolzenen Pasteurpipette trituriert (10x). Nach kurzer Sedimentation wurde der Überstand in ein frisches 15 ml Reaktionsgefäß übertragen. Das verbleibende sedimentierte Material wurde noch weitere 2 mal ebenso behandelt und alle Triturationsüberstände gesammelt. Zu den 9 ml der vereinigten Überstände wurden 6 ml Neurobasal Medium hinzugefügt, kurz vermengt und die ausfallende DNA entfernt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 700 g wurden die Zellen in 10 ml Neurobasal Medium resuspendiert und durch ein Zellsieb der Gittergröße 40 µm gereinigt. Die Zellkonzentration wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und in Dichten von 70 000-200 000 Zellen/cm<sup>2</sup> in polylysinbeschichteten (0.01% Polylysin für mindestens 2h bei 37°C, 3x PBS gewaschen) Kulturplatten ausplattiert. Die Kulturen wurden teilweise mit Neurotrophenen (25 ng/ml) versetzt und bis zu einer Woche in Kultur bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> gehalten. Nach vier Tagen wurden die Medien zur Hälfte mit frischem Neurobasal Medium ersetzt.

#### 5.2.2.9 Immunhistochemie

Gehirne der entsprechenden Alter wurden präpariert und Gewebe um das Kleinhirn herum großzügig entfernt. Die Kleinhirne wurden für 3 h in 4% PFA/PBS und über Nacht in 1% PFA/PBS bei 4°C fixiert. In 0.5 M Saccharose/PBS wurde 2-3 Tage inkubiert, bis die Gewebe zu Boden sanken. Die Kleinhirne wurden in Cryoblock™ eingebettet, in flüssigem Stickstoff nahezu vollständig, auf Trockeneis anschließend vollständig durchgefroren. Sie wurden 10 µm dick bei -19°C und einem Anstellwinkel

von 4° parasagittal im Kryotom geschnitten und auf TESPA beschichtete Objektträger aufgezogen. Um im lateralen Differenzierungsgradienten eine definierte Position zu präparieren, wurde nur die sagittale Region verwendet, wo das Cerebellum gerade nicht mehr mit dem Pons verbunden ist.

Zum Färben wurden die Schnitte aufgetaut und an der Luft getrocknet. Nach 10minütiger Fixierung in 100% Ethanol und anschließender Trocknung wurde für 20 min in 80% Methanol, 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert. Nach mehrfachem Waschen in PBS wurde für 1 h in 10% Ziegen Serum/1% BSA/0.2% Triton X-100/PBS blockiert. Die Inkubation mit den jeweiligen Antisera erfolgte über Nacht im Blockierungspuffer. Es wurde erneut mehrfach gewaschen und mit Cy3-assoziiertem sekundären Antikörper in 1:200 Verdünnung für 1.5 h inkubiert. Nach abschließendem Waschen wurde mit Gel/Mount™ überschichtet und mit einem Deckglas abgeschlossen.

### **5.2.3 Vermischtes**

#### **5.2.3.1 NGF-ELISA**

Mikrotiterplatten (Nunc-Immunoplate) wurden über Nacht bei 4°C mit dem monoklonalen anti-NGF Antikörper 27/21 (0.65 µg/ml in ELISA-Karbonatpuffer, 200 µl pro Probe) beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden unspezifische Bindungsstellen durch zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 2% BSA/ELISA-Karbonatpuffer blockiert. Die Probe und NGF-Standardverdünungen (2-1000 pg/ml) wurden jeweils in 150 µl Hankspuffer aufgetragen und über Nacht bei 4°C und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde zweimal mit ELISA-Waschpuffer (250 µl/Probe) gewaschen. Mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (Roche 27/21 anti-NGF, 740 mU/µl, 1:5000 verdünnt) wurde wiederum über Nacht bei 4°C und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer-2 wurde abschließend jeweils mit 150 µl BM-blue-POD-Substrat für 30 min bei Raumtemperatur entwickelt und mit 50 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> die Reaktion gestoppt. Das Ergebnis wurde in einem ELISA Scanner bei 492 nm ausgelesen.

#### **5.2.3.2 Herstellung einer stabilen Zelllinie**

Die Transfektion wurde nach der Kalzium-Phosphat-Präzipitations Methode von Chen und Okayama 1987(Chen and Okayama, 1987) durchgeführt. CaCl<sub>2</sub> bildet mit DNA unter bestimmten pH- und Salzbedingungen ein schwerlösliches Präzipitat, das von den Zellen aufgenommen werden kann. Konfluente 293 Zellen wurden 1:10-1:20 in

10 ml Medium verdünnt, ausplattiert und nach 24 h transfiziert. Zur Transfektion wurden in der angegebenen Reihenfolge in einem Gesamtvolumen von 1 ml zusammenpipetiert: 20 µg Plasmid, 2 µg pSV2pac, 450 µl H<sub>2</sub>O, 50 µl CaCl<sub>2</sub> (2.5 M), 500 µl BBS (pH 6.95), wobei nach Zugabe des CaCl<sub>2</sub> kurz und nach Zugabe des BBS' kräftig geschüttelt wurde. Das Gemisch wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und vorsichtig auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 3% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA liegt zunächst episomal in der Zelle vor (transiente Expression). Die Integration ins Genom erfolgt sporadisch und ohne äußeren Einfluß. Sie führt zur stabilen Expression. Die Selektion stabil exprimierender Zellklone erfolgte mit Puromycin. Dazu wurde das Expressionsplasmid im molaren Verhältnis 10:1 mit dem Resistenzplasmid pSV2-pac (Vara et al., 1986) transfiziert. Das Plasmid kodiert für eine N-Acetyl-Transferase, die das Selektionsantibiotikum inaktiviert. Mit der Selektion wurde 72 h nach der Transfektion durch Zugabe des Antibiotikums (1 µg/ml) begonnen. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die überlebenden Klone isoliert.

### 5.2.3.3 Biologischer Überlebensassay

Die Aktivität von Neurotrophen kann in einem Bioassay quantifiziert werden. Das Überleben dissoziierter Spinalganglien Neuronen ist proportional der im Medium vorliegenden Konzentration an Neurotrophin. Als überlebende Neurone wurden Zellen mit Neuriten gezählt. Die Aktivität des myc markierten NGFs wurde im Vergleich zu unmarkiertem NGF ermittelt.

Die Spinalganglien wurden aus Hühnerembryonen des Embryonalalters E8-9 präpariert. Hierzu wurde die Schale geöffnet, der Embryo geköpft und der Thorax- und Abdominalraum aufgeschnitten. Nach Entfernen des Gastrointestinaltrakts und der sympathischen Kette lagen die Spinalganglien frei zugänglich vor. Sie wurden mit einer Pinzette entnommen, in F14/5%HS-Medium gesammelt und von Geweberesten gesäubert. Anschließend wurden die Ganglien pelletiert (3 min, 1000 rpm) und zweimal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurden die Ganglien 30 min lang in ca. 2 ml 0.1% Trypsin/PBS Lösung bei 37°C angedaut. Die Proteaselösung wurde nach der Zentrifugation abgenommen und die Ganglien zweimal mit einigen Millilitern F14/HS Medium gewaschen. Durch Aufziehen in einer zuvor silikonisierten und in der Bunsenflamme abgestumpften Pasteurpipette wurden die Ganglien vorsichtig dissoziiert. Die Neuronen wurden erneut pelletiert (3 min, 1500 rpm) und in F14/HS resuspendiert. Die Suspension

wurde durch ein Zellsieb mit einem Gitterabstand von 40 µm gefiltert und 2 h in einer 6 cm Kulturschale bei 37°C und 3% CO<sub>2</sub> inkubiert. Während dieser Zeit assoziieren Fibroblasten aus der Suspension fest mit dem Schalenboden, während die Neuronen durch leichtes Schütteln abzulösen sind. Die Neuronen wurden zusammen mit dem Medium entfernt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Zelldichte bestimmt. 1000-1500 Zellen wurden pro Kompartiment einer 48well Kulturplatte in 400 µl Medium ausplattiert. Die Kulturplatten sind zuvor mit 200 µl Polyornithin (0.5 mg/ml in Boratpuffer, pH 8.0) pro Kompartiment bei Raumtemperatur über Nacht beschichtet worden. Die zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschenen und luftgetrockneten Platten wurden anschließend mindestens 4 h mit 200 µl RN22 Überständen oder mit Laminin (10 µg/ml in PBS) beschichtet, zweimal mit PBS gewaschen (nicht trocknen lassen) und mit jeweils 200 µl F14/10%HS pro Kompartiment gefüllt. Es wurden Neurotrophine und myc markierte Neurotrophine in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und die Kulturen bei 37°C und 3% CO<sub>2</sub> inkubiert. Bereits nach 12 h ist deutliches Überleben und Neuritenwachstum in Kulturen mit ausreichender Neurotrophinkonzentration festzustellen.

### 5.2.3.4 Anzucht und Lagerung von *E. coli*-Bakterien

Angaben zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur oder auf Mediumplatten finden sich bei Sambrook et al. (1989). Es wurden folgende Antibiotikakonzentrationen verwendet: Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml. Zur Lagerung von *E. coli* in Glycerinkulturen wurden 700 µl einer über Nacht Kultur mit 300 µl sterilem Glycerin gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und bei -70°C eingefroren.

### 5.2.3.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Die Proben wurden zumeist 30 s im Wasserbad sonifiziert, dann 10 min bei 95°C in SDS-PAGE-Probenpuffer denaturiert, kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und schließlich auf die jeweiligen Polyacrylamidgele aufgetragen. Es wurden diskontinuierliche Gele mit einem 4%igen Sammelgel und unterschiedlichen Trenngelen (siehe jeweils im Text) verwendet. Die Gele wurden zwecks besserer Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Gelläufen in einer Gießkammer (Werkstatt des MPI) für 12 Gele gegossen. Minigele wurden ca. 1 h mit 175 V, präparative HöferGele (14x14 cm) mit 300 V gefahren. Zumeist wurde der „Broad Range“ Proteinmarker von BioRad mit den Größen 203, 116, 97, 66, 45, 31, 21, 14, 6 kD verwendet.

### 5.2.3.6 *Semi-dry* Westernblot

Die SDS-PAGE-Gele wurden in werkstattangefertigten Blotapparaturen auf PVDF Membranen übertragen. Dazu wurden drei Schichten Whatman3MMChr-Papier in Transferpuffer eingeweicht und luftblasenfrei auf die Apparatur gelegt. Die in Methanol angefeuchtete und mit H<sub>2</sub>O gespülte PVDF Membran (Immobilon-P, 0.45 µm, Millipore) wurde daraufgeschichtet, gefolgt von dem Gel ohne Sammelgel und weiteren drei Schichten Whatman3MMChr-Papier. Luftblasen wurden vorsichtig aus dem Stapel herausgedrückt. Für 1 h wurden 3 mA/cm<sup>2</sup> angelegt. Die Markerbanden auf der Blotmembran wurden mit Bleistift markiert und der Antikörper nach dem Blockieren mit 5% Milchpulver in TBST zu dem Milchpulver/TBST hinzugefügt. Je nach Antikörper wurde 1 h bei Raumtemperatur bis zu über Nacht bei 4°C mit dem spezifischen ersten Antikörper inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit TBST (10 min), wurde für mindestens 45 min mit dem gegen den ersten Antikörper gerichteten Zweitantikörper ebenfalls in TBST/5% Milchpulver inkubiert. Der Zweitantikörper ist Peroxidase-gekoppelt und reagiert mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Luminol unter Lichtfreisetzung. Nach abschließendem Waschen der Membran (3-5-mal jeweils 10 min mit TBST) wurde diese Lumineszenzreaktion mit dem „ECL-Plus-Chemilumineszenz-Detektionssystem“ erzeugt und mit einem Röntgenfilm detektiert.

### 5.2.3.7 Entfernung von Antikörpern von Blotmembranen (,Strippen des Blots')

Es wurde 2x 15 min in 1 M NaOH, 5% β-Mercaptoethanol bei 50°C inkubiert, ausgiebig gewaschen und erneut blockiert. Diese Methode zeigt einen starken Rückgang des Signals mit phosphorylierungsabhängigen Antiseren.

### 5.2.3.8 Coomassie Färbung von Gelen

Die Gele wurden ca. 20 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und danach bis zum vollständigen Entfärben des Hintergrundes in Entfärbelösung inkubiert. Der Entfärbeporgang konnte durch kurzes Erhitzen der Lösung in der Mikrowelle beschleunigt werden. Gefärbte Gele wurden nach kurzer Inkubation in Geltrockenlösung zwischen Einmach-Folie (Zellglas) getrocknet.

### **5.2.3.9 Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen**

Das Protokoll ist eine Modifikation nach Damerval et al (Damerval C. et al., 1987). Die gefärbten Gele sind auch für Massenspektroskopie geeignet.

Die Gele wurden 15 min in 10% Essigsäure, 45% Ethanol, 45% H<sub>2</sub>O fixiert. Die Reduktion erfolgte für 2 min in Farmers Reduktionspuffer (30 mM K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>, 30 mM Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>O<sub>3</sub>). Mit viel Wasser wurde ca. 30 min bis zur vollständigen Entfärbung des Gels gewaschen. Für 30 min wurde mit 0.1% AgNO<sub>3</sub> gefärbt. Anschließend wurde 30 s jeweils mit H<sub>2</sub>O und mit 2.5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gewaschen. Bis zu einem geeigneten Schwärzungsgrad wurde mit 2.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1% Formaldehyd gefärbt und die Reaktion mit 10% Essigsäure abgestoppt.

### **5.2.3.10 Kolloidal Coomassie Färbung von SDS-PAGE Gelen**

Den Anweisungen des Herstellers (Sigma) folgend wurden die Gele für 30 min in 12.5% TCA, 3.5% 5 Sulosalicylsäure fixiert. Vier Teile der kolloidal Coomassie Arbeitslösung wurden mit einem Teil Ethanol kräftig gemischt und die Gele für 1-2 h gefärbt. Entfärbt wurde in 10% Essigsäure, 25% Methanol für 1 min bis zu einem Tag wurden die Gele in 25% Methanol darüber hinaus in 25% Ammoniumsulfat gelagert.

### **5.2.3.11 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bio-Rad Protein Assay nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Der Test ist ein kommerzieller Coomassie Blue Protein Assay nach Bradford (Bradford, 1976). Er beruht auf dem Prinzip, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung an Proteine bindet und dabei seine spektralen Eigenschaften ändert. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 465 nm auf 595 nm. Basierend auf (Gogstad and Krutnes, 1982) wurde 50 mM NaOH zu den Proben zum Solubilisieren von Membranen hinzugefügt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin verwendet. Die Messungen wurden in kleinen Volumina (100 µl) auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt.