

6 Ergebnisse

6.1 Biochemischen Aufreinigung intrazellulärer Interaktoren von p75^{NTR}

Intrazelluläre Interaktoren von p75^{NTR} sollten mit biochemischen Methoden über ihre Affinität zu p75^{NTR} gereinigt werden. Es wurden drei unterschiedliche Reinigungsansätze unternommen:

- 1) Affinitätsreinigung des Rezeptor-Interaktorkomplexes in Gegenwart des extrazellulären Liganden
- 2) Affinitätsreinigung über die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR}
- 3) Anreicherung von Rezeptor-Interaktorkomplexen in einer funktionell charakterisierten, subzellulären Fraktion

6.1.1 Affinitätsreinigung in Gegenwart des extrazellulären Liganden

Um die Möglichkeit der Reinigung des p75^{NTR}-Interaktorkomplexes aus Mäusegehirn zu ermitteln, wurde die p75^{NTR} Konzentration im Gehirn bestimmt. Hierzu wurden Verdünnungen von Gehirnlysaten im Westernblot mit Lysaten von PCNA Zellen verglichen. Wie im Labor in Bindungsstudien ermittelt, exprimieren PCNA Zellen rund 4×10^5 p75^{NTR} Rezeptoren pro Zelle. Der densitometrische Vergleich der Westernblotsignale ergibt unter Annahme eines Molekulargewichts von 75 kD für p75^{NTR} eine p75^{NTR} Konzentration von 15.4 ± 1.0 ng/ml Gehirnhomogenat bzw. die absolute Masse von 49.3 ± 3.1 ng p75^{NTR} pro Gehirn (Abbildung 3). Dies konnte durch Bindungsexperimente an Membranen von Gehirnhomogenat bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Reinigung von Interaktoren über Immunpräzipitation des Neurotrophin-p75^{NTR}-

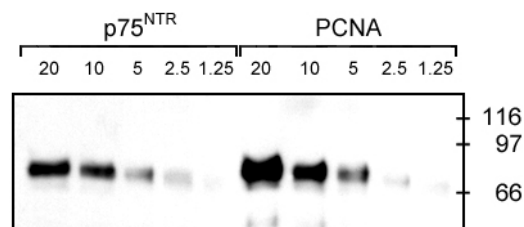


Abbildung 3: Quantifizierung von p75^{NTR} in Gehirnhomogenat

PCNA Zellen und Gehirn von Wildtypmäusen wurden in Lämmli-puffer homogenisiert. Jeweils 20, 10, 5, 2.5, 1.25 µl Homogenat wurde im SDS-PAGE (10% Gel) aufgetrennt, geblotet und über Nacht mit dem anti-p75^{NTR} Gerbull Serum (1:3000) geprobt. 20 µl Gehirnhomogenat in Lämmli-puffer= 1/640-tel Gehirn, 20 µl Lämmli-PCNA-Zellysat= 2000 PCNA-Zellen. Die densitometrische Auswertung der Westernblotsignale ergibt eine Konzentration von 15.4 ± 1.0 ng/ml Gehirnhomogenat bzw. die absolute Masse von 49.3 ± 3.1 ng p75^{NTR} pro Gehirn

Interaktorkomplexes oder mit Hilfe einer Affinitätssäule, die den ternären Neurotrophin-p75^{NTR}-Interaktorenkomplex aus Gewebeextrakten anreichert, ist bei dieser p75^{NTR} Konzentration nur unter unverhältnismäßig großem materiellen Aufwand möglich.

6.1.2 Affinitätsreinigung über die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR}

Die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} kann einerseits direkt in der Affinitätschromatographie zur Aufreinigung eines Interaktors zur Anwendung kommen. Andererseits kann sie zur Etablierung eines Assaysystems verwendet werden, mit dem die fortschreitende Anreicherung eines Interaktors aus Homogenat durch z.B. differenzielle Zentrifugation verfolgt wird. Beide Ansätze wurden mit den sensiblen Techniken der „BIAcore“ Maschine und des „Overlayblots“ vorgenommen.

6.1.2.1 Protein Interaktionsmessungen mit der BIAcoremaschine

In der BIAcore-Maschine werden Proteine kovalent an eine Dextranmatrix gebunden. Über ein Kapillarsystem werden Proteinlösungen an dieser Protein-Dextranmatrix und einer Kontrollmatrix vorbeigeführt werden. Selbst kleinste Interaktionen der immobilisierten Proteine mit Proteinen in Lösung können von dem Gerät detektiert werden. Unspezifisches Bindungssignal wird zu großen Teilen durch die Subtraktion des Signals der Kontrollzelle von dem Signal der Messzelle eliminiert (Details siehe Methoden 5.2.1.3). Die BIAcoremaschine kann einerseits dafür verwendet werden, die Pufferbedingungen für eine anschließende Affinitätschromatographie zu ermitteln. Andererseits kann sie als Assaysystem für zu etablierende Reinigungsverfahren verwendet werden.

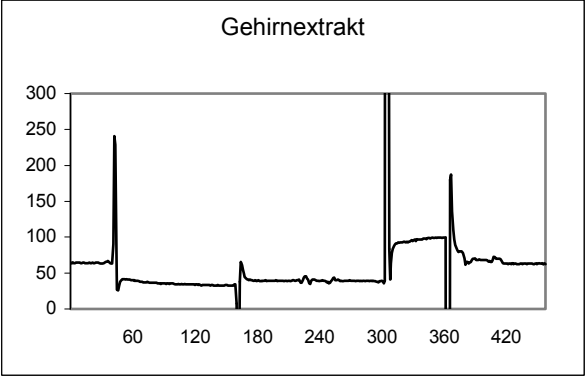
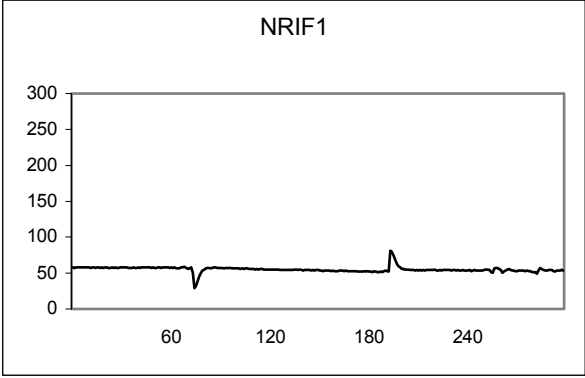
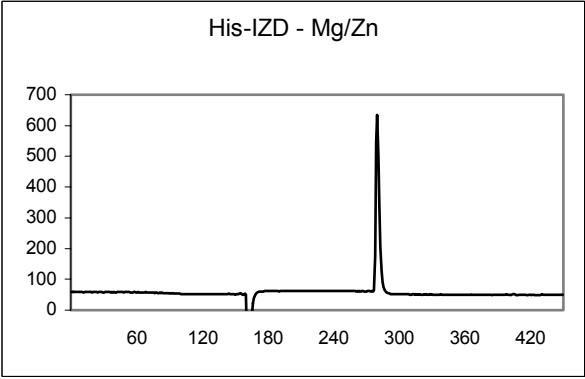
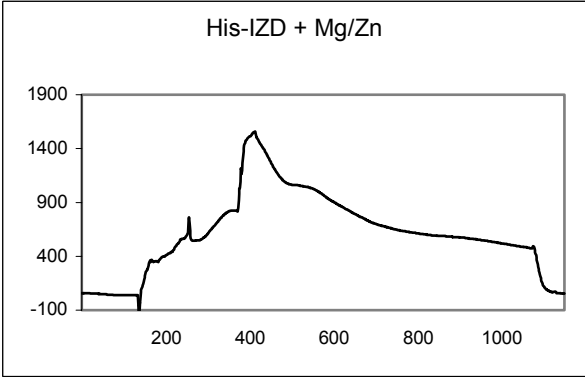
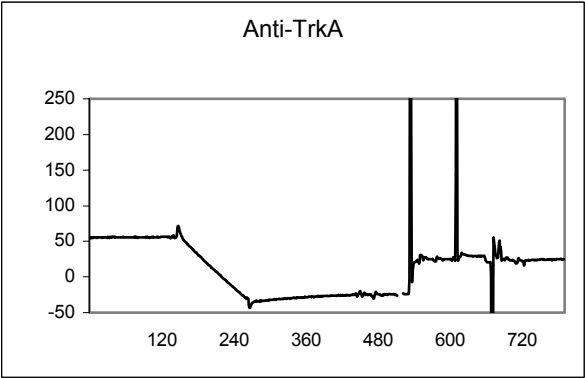
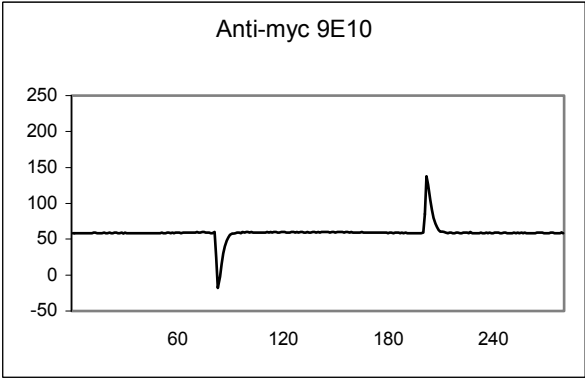
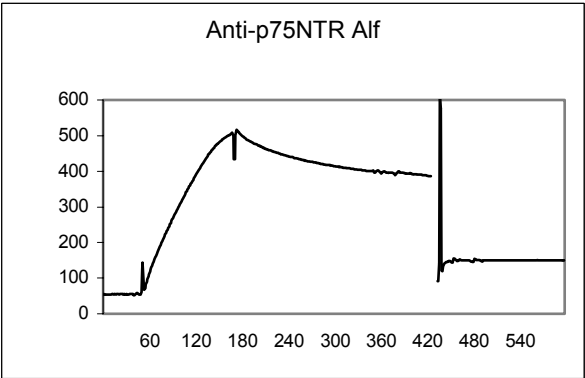
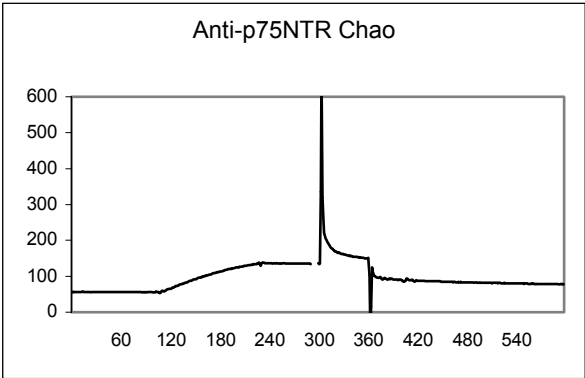
Die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} wurde als histidinmarkiertes Fusionsprotein (His-IZD) mit dem von Liepinsh et al. (Liepinsh et al., 1997) verwendeten Plasmid in Bakterien exprimiert. Es wurde über eine Nickelchelatsäule gereinigt und mit den Vernetzungsreagenzien N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-ethyl-N'-(dimethylamino-propyl)-carbodiimid (EDC) über primäre Amine kovalent an die Carboxymethyldextran-Matrix der BIAcore Maschine gebunden.

Durch Injektion unterschiedlicher Proben wurde die Funktionalität des experimentellen Ansatzes getestet. Die in Klammern angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Zeitachsen der jeweiligen Graphen in der Abbildung 4:

- 1) Spezifische Antiseren gegen die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} zeigten eine feste Bindung an die fixierte His-IZD. Das anti-p75^{NTR} Chao Serum rief nach der Injektion (100-220 s) ein klares Bindungssignal (240-300 s) hervor, das auch nach Glycininjektion (pH 2.25) (300-360 s) nicht vollständig auf den Ausgangswert zurückfiel. Das anti-p75^{NTR} Alf Serum zeigte nach der Injektion (60-180 s) ein starkes Bindungssignal (180-420 s), das sich etwas auswusch und nach Glycininjektion (420-440 s) deutlich zurückging.
- 2) Zwei unspezifische Antikörper hingegen zeigten wie erwartet keine Interaktion. Der gegen das myc-Epitop gerichtete monoklonale anti-myc 9E10 Antikörper führte nach seiner Injektion (80-200 s) zu keinem Bindungssignal. Ebenso zeigte das polyklonale anti-TrkA-Serum nach der Injektion (130-250 s) keine spezifische Bindung. Das unspezifische „negative“ Bindungssignal, das nach 1 M NaCl-Injektion (500-620 s) zurückging, entsteht durch höhere aber unspezifische Affinität des Serums zur Oberfläche der Kontrollzelle.
- 3) Die sechs N-terminalen Histidine der intrazellulären Domäne von p75^{NTR} komplexieren divalente Kationen und ermöglichen darüber die Interaktion mit einer weiteren Gruppe von sechs Histidinen. Tatsächlich führte die Injektion löslicher His-IZD (100 µg/ml, 180-300 s) in Gegenwart von Mg²⁺ (5 mM) und Zn²⁺ (1 mM) (ebenso wie Ca²⁺ und Ni²⁺ (Daten nicht gezeigt)) zu einer sehr starken und langanhaltenden Interaktion mit der matrixfixierten His-IZD (300-1100 s). Erst nach Injektion von NaCl (1 M) ging das Bindungssignal wieder auf Ausgangswerte zurück. In Abwesenheit dieser Ionen konnte keine homologe Interaktion der His-IZD detektiert werden.
- 4) Um eine funktionelle Interaktion zu testen, wurde der einzige bis dahin bekannte aber damals noch nicht veröffentlichte p75^{NTR} Interaktor NRIF1 („Neurotrophin Receptor Interacting Factor 1“ (Casademunt et al., 1999)) injiziert. NRIF1 wurde von Dr. Elisabeth Casademunt als gereinigtes GST-Fusionsprotein zur Verfügung gestellt. Die Injektion von NRIF1 (75 µg/ml, 70-190 s) führte zu keinem Bindungssignal.

Um zytosolische Extrakte auf die Gegenwart von unbekanntem Interaktoren zu testen, wurden Gehirne von acht Tage alten Mäuse homogenisiert. Zytosolische Extrakte (Homogenat, 15 000 g Überstand, 300 000 g Überstand) wurden in verschiedenen Puffern (BIAcore Laufpuffer mit Zusätzen in allen Permutationen (150 mM NaCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl, 1 mM ZnCl) in die BIAcoremaschine injiziert. Wie stellvertre-

Ergebnisse



tend in der Abbildung 4 für die Injektion des 15 000 g Überstands (250 µg/ml, 50-170 s) gezeigt, konnte keine spezifische Bindung festgestellt werden (170-300 s). Vielmehr zeigte sich ein „negatives“ Bindungssignal, das nach Injektion von NaCl (1 M, 300-360 s) auf Ausgangswerte zurückging. Spezifische Bindungssignale können von den unspezifischen Signalen überdeckt sein. Eine weitergehende Anreicherung von Interaktoren vor einem weiteren Test auf Interaktion musste daher vorgenommen werden.

6.1.2.2 Interaktorendetektion mit Overlayblots

Größtmögliche Konzentrierung potentieller Bindungspartner bei zusätzlich gesteigerter Sensitivität wurde mit der Overlayblot-Technik erreicht. Hier werden Proteine ihrer Größe entsprechend in kleinem Volumen im SDS-Gel angereichert. Ihre Konzentration wird anschließend durch den Übertrag auf eine Blotmembran und die damit verbundene Reduzierung des Volumens auf die Fläche maximiert. Die Detektion findet nicht wie im Westernblot über die Interaktion mit einem spezifischen Antikörper sondern über die Interaktion mit einem markierten Protein statt (siehe Methoden 5.2.1.6).

Unterschiedliche radioaktiv markierte Proteine wurden verwendet:

- 1) NGF, BDNF und NT3 wurden mit ^{125}I od markiert und mit dem chemischen Vernetzer BS³ an p75^{NTR} auf PCNA-Zellen im Zustand der Bindung kovalent gebunden. Anschließend wurde der ^{125}I -Neurotrophin-p75^{NTR} Komplex mit Detergenz solubilisiert, mit WGA vom Lysat abgetrennt und zur Detektion in Overlayblots verwendet (100 000 cpm/ml).
- 2) Die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} und als Kontrolle das ähnlich große Protein Luziferase wurden in einer *in vitro* Reaktion translatiert. Durch den Einbau von ^{35}S -Cystein wurde die intrazelluläre Domäne radioaktiv markiert. Nicht einge-

Abbildung 4: Interaktionsmessungen mit der BIAcoremaschine (siehe linke Seite)

Die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} wurde in der BIAcoremaschine immobilisiert und die jeweils angegebenen Proben injiziert. Es ist die Differenz der Messsignale der Messzelle und der Kontrollzelle als "relative Response Units" (relRU) gegen die Zeit (s) aufgetragen. Die im Text in Klammern angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Zeitskala des jeweiligen Graphen. Deutlich sind Interaktionen der p75^{NTR}-spezifischen Antiseren (anti-p75^{NTR} Chao, anti-p75^{NTR} Alf), nicht aber mit den gegen andere Proteine gerichteten Antikörpern (anti-myc 9E10, anti-TrkA) zu detektieren. Eine kationenspezifische Interaktion der Histidinmarkierungen an der His-IZD kann ebenfalls festgestellt werden (His-IZD +Mg/Zn, His-IZD – Mg/Zn). Überraschenderweise interagiert der p75^{NTR} Interaktor NRIF1 jedoch nicht. Auch mit Gehirnextrakten ist keine spezifische Interaktion detektierbar.

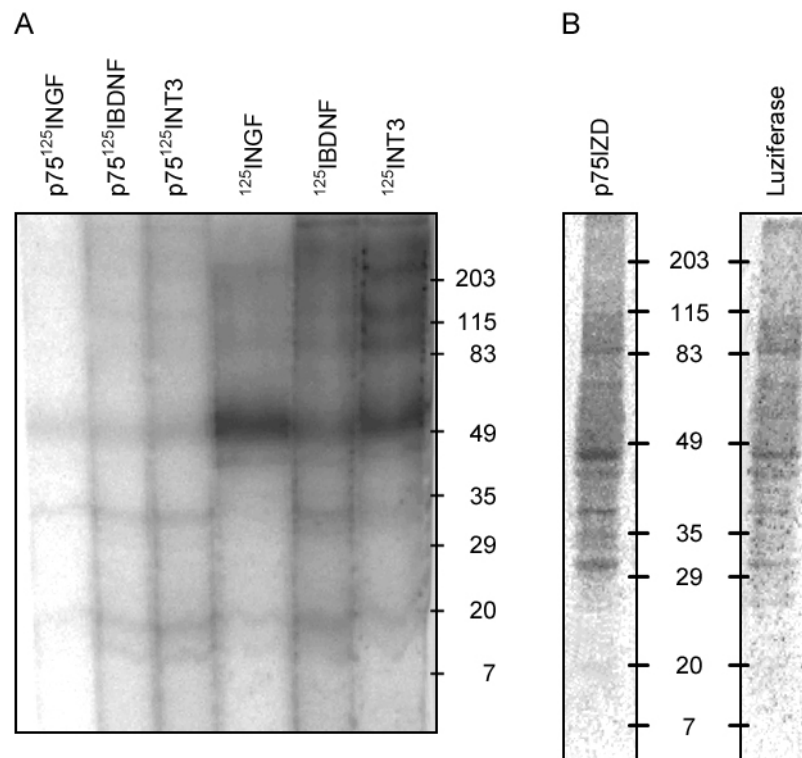


Abbildung 5: Interaktordetektion mit Overlayblots

100 µg Gehirnhomogenat von 8 Tage alten Wildtypmäusen wurde im SDS-PAGE (10-20% Gradientengel) aufgetrennt, geblotet und renaturiert.

(A) Es wurde mit solubilisiertem p75^{NTR/125}I-NGF, p75^{NTR/125}I-BDNF, p75^{NTR/125}I-NT3, ¹²⁵I-NGF, ¹²⁵I-BDNF, ¹²⁵I-NT3 (100 000 cpm/ml) geprobt.

(B) Alternativ wurden die Membranen mit *in vitro* translaterter und ³⁵S-Cystein markierter intrazellulären Domäne von p75^{NTR} (p75I2D) bzw. als Kontrolle mit Luziferase (110 000 cpm/ml) geprobt.

In beiden Ansätzen ist keine spezifische Bindung detektierbar.

bautes Cystein wurde durch Gelfiltration abgetrennt und die markierte Probe zur Detektion in Overlayblots verwendet (110 000 cpm/ml).

Es wurden verschiedene Extrakte (Homogenat, 15 000 g Zentrifugationsüberstand, 300 000 g Zentrifugationsüberstand) unterschiedlicher Gewebe (0, 3, 5, 8 Tage altes Mäusegehirn, Huhnretina Embryonaltag 14, PCNA Lysate, PC12 Lysate) in unterschiedlichen Quantitäten (50-200 µg) elektrophoretisch getrennt und geblotet. Die Blots wurden sowohl direkt als auch nach Renaturierung des Proteins auf der Blotmembran verwendet.

In allen Experimenten wurden alle Signale, wie stellvertretend in Abbildung 5 mit 8 Tage altem Mäusegehirnhomogenat gezeigt, auch mit den Kontrollen (freies radioaktives Neurotrophin (A), bzw. Luziferase (B)) detektiert. Es konnte somit nur unspezifische Bindung festgestellt werden.

6.1.3 Anreicherung von Interaktoren in funktionell charakterisierten, subzellulären Fraktionen

Die zuvor beschriebenen Reinigungsansätze gehen von der Annahme aus, dass trotz Homogenisation und Solubilisation von p75^{NTR} der Rezeptor-Interaktorkomplex *in vitro* in der BIAcoremaschine oder im Overlayblot wiederherstellbar ist. Diese Ansätze führten zu keinem Ergebnis. Um weniger weitreichende Prämissen einer Reinigung zugrunde zu legen, wurde daher versucht, die p75^{NTR} Interaktorbinding im nativen Zustand zu erhalten. P75^{NTR} wurde nach der Homogenisation in möglichst physiologischer Umgebung einerseits in einer funktionell relevanten Membranfraktion, den Caveole, andererseits in einem funktionell relevanten Proteinkomplex, der postsynaptischen Dichte (PSD), präpariert.

6.1.3.1 Präparation von Caveolae

Caveolae sind sphingomyelinreiche Membranfraktionen. Im Gegensatz zur restlichen Membran sind diese Membranbereiche sowohl in Triton X-100 als auch in NaCO₃, pH 11, nicht solubilisierbar. Werden die Solubilisate mit einem Saccharosegradienten überschichtet und zentrifugiert, so schwimmen unsolubilierte Membranfraktionen als Vesikel ihrer Dichte gemäß auf, während lösliches Material am Boden des Zentrifugenröhrchens verbleibt.

Um die Methode mit Ergebnissen der Literatur vergleichen zu können, wurden die Präparationsprotokolle sowohl an PC12 Zellen als auch an Gehirnhomogenaten durchgeführt. Die Solubilisation mit NaCO₃ beließ p75^{NTR} weitgehend in intakten Membranvesikeln (nur für PC12 Zellen dargestellt, Abbildung 6, NaCO₃/anti-p75^{NTR}). Während in der Literatur Triton X-100 Solubilisation zu einer abgeschwächten Konzentrierung von p75^{NTR} in Membranvesikeln führte, konnte hier nahezu kein p75^{NTR} außerhalb der Solubilisatfraktionen detektiert werden (siehe Abbildung 6, Triton X-100/anti-p75^{NTR}). Mit beiden Präparationsprotokollen zeigte sich eine breite Verteilung von p75^{NTR} im Gradienten. Es sind offensichtlich heterogene Vesikel sehr unterschiedlicher Dichten entstanden.

Die Solubilisation mit NaCO₃ erfordert einen pH von 11. Dies ist nicht mit dem Versuch vereinbar, p75^{NTR} in physiologischer Assoziation zu einem Interaktor anzureichern. Der Ansatz wurde daher nicht weiter verfolgt.

Die Verteilung der Triton X-100 resistenten Membranen hingegen wurde in bezug auf ihren p75^{NTR} und Caveolingehalt untersucht. Es zeigte sich, dass unter diesen

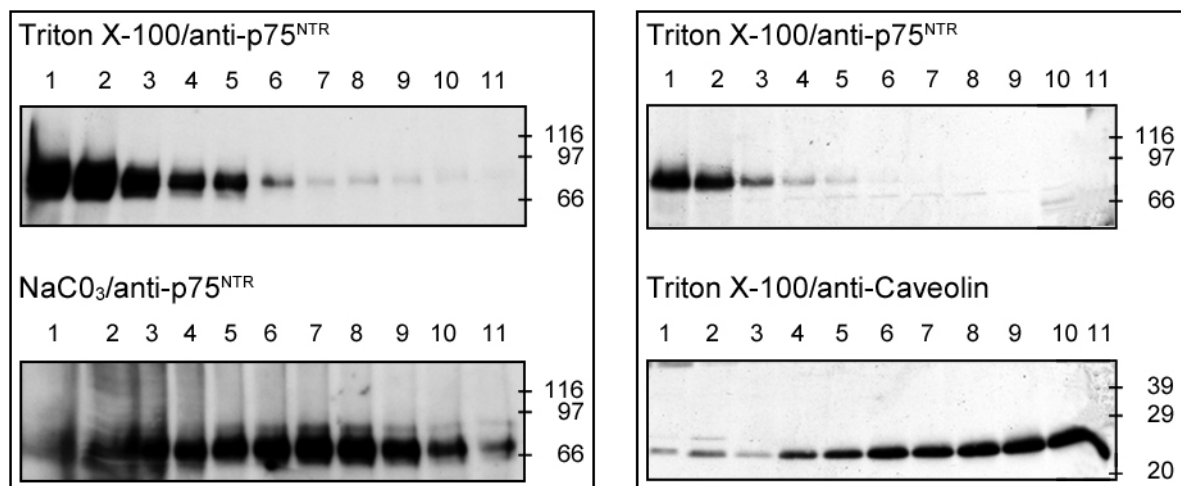


Abbildung 6: Fraktionen der Caveolaereinigung

PC12 Zellen bzw. Gehirnhomogenate wurden solubilisiert (Triton X-100 bzw. NaCO₃), mit einem Saccharosegradienten (35-15%) überschichtet und zentrifugiert. Die Gradienten wurden von unten nach oben in 11 Fraktionen (1-11) geerntet, in 12.5% SDS-Gelen aufgetrennt und geblotet.

Links: Westernblots der Gradientenfraktionen von PC12 Zellpräparationen wurden mit dem anti-p75^{NTR} Chao Serum (1:1000) geprobt. Während p75^{NTR} im Triton X-100 solubilisierten Material vor allem in den Solubilisatfraktionen 1 und 2 und kaum im Saccharosegradienten (3-11) zu finden ist, zeigt sich der Großteil von p75^{NTR} in den NaCO₃ Solubilisatfraktionen in den Gradientenfraktionen.

Rechts: Westernblots der Gradientenfraktionen von Triton X-100 Solubilisat von Gehirnhomogenat wurden bei ca. 50 kD zerteilt und die obere Hälfte mit dem anti-p75^{NTR} Chao Serum (1:1000) (rechts, oben), die untere Hälfte mit dem anti-Caveolin Antiserum (1:1000) inkubiert (rechts, unten). P75^{NTR} findet sich kaum in Fraktionen mit dem Caveolaemarker Caveolin.

Bedingungen nur ein kleiner Bruchteil von p75^{NTR} in Fraktionen zusammen mit Caveolin zu finden ist (Abbildung 6). Da p75^{NTR} schon im Startmaterial in nur geringen Mengen vorhanden ist, ein Großteil bereits durch die Solubilisierung verloren geht und nur ein kleiner Teil in Caveolae ist, wurde die Präparation dieser Subfraktion mit Ziel der p75^{NTR} Interaktorreinigung nicht weiterverfolgt.

6.1.3.2 Präparation von Postsynaptischen Dichten (PSDs)

Wie in der Einleitung beschrieben zeigt p75^{NTR} eine C-terminale PDZ-Bindungsdomäne und kann in der Postsynapse vermutet werden. Es wurden daher Reinigungen der „Postsynaptischen Dichten“ (PSDs) vorgenommen.

Es wurden 200 µg PSD-Protein aus 10 g Ausgangsmaterial gereinigt (siehe 5.2.1.12). 50 µg davon wurden in 15% SDS-Gelen aufgetrennt, geblotet und mit dem anti-p75^{NTR} Chao (Abbildung 7, A) bzw. dem anti-PSD95 (B) Antiserum inkubiert. Der Erfolg der Reinigung wurde durch die starke Anreicherung des PSD-Marker PSD95 im Westernblot bestätigt. Im Vergleich mit dem p75^{NTR}-haltigen PCNA Lysat schien

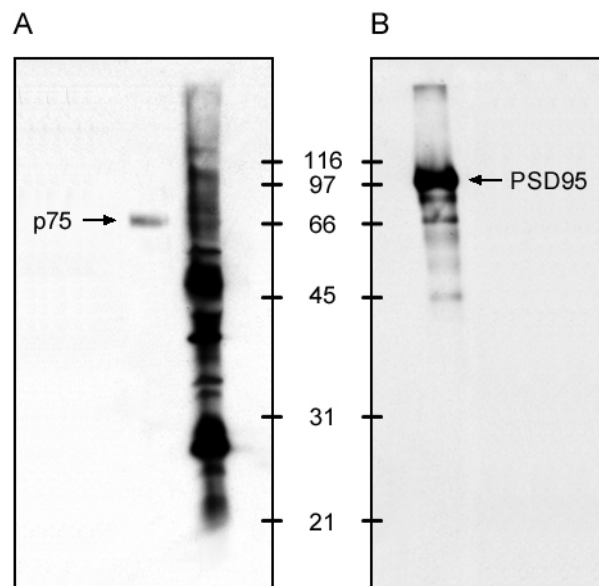


Abbildung 7: Präparation von PSDs

Gereinigte *Postsynaptic Densities* (PSDs) wurden im 15% SDS-PAGE aufgetrennt und geblotet. Zur Zuordnung von $p75^{\text{NTR}}$ wurden Lysate der $p75^{\text{NTR}}$ -reichen Zelllinie PCNA parallel zur Reinigungsfraction der PSD-Präparation auf das Gel aufgetragen ((A), linkes Signal). Es wurde mit anti- $p75^{\text{NTR}}$ Chao (1:1000, (A)) geprobt. Zur Bestätigung der Fraktion als PSD wurde in (B) auf das in PSDs stark angereicherte PSD95 Protein mit anti-PSD95 Antiserum (1:1000) geprobt. Die Gegenwart von $p75^{\text{NTR}}$ in dieser Fraktion ist wegen der sehr dominanten Kreuzreaktivitäten nicht eindeutig feststellbar.

es in Westernblots der Reinigungsfractionen, als wäre auch $p75^{\text{NTR}}$ in der abschließenden PSD-Fraktion vorhanden (A). Allerdings wurde eine eindeutige Aussage durch die Anreicherung einer großen Zahl von sehr starken Kreuzreaktivitäten auch in der direkten Nähe des $p75^{\text{NTR}}$ Signals unmöglich gemacht. Das vermeintliche $p75^{\text{NTR}}$ Signal stellte nurmehr ein Hintergrundsignal dar. Es war insofern nicht zu entscheiden, ob das Signal mit dem gleichen Laufverhalten wie $p75^{\text{NTR}}$ im SDS-PAGE tatsächlich $p75^{\text{NTR}}$ ist.

Die ungewöhnlich starke Anreicherung von Kreuzreaktivitäten in dieser Fraktion lässt über die Spezifität der Signale spekulieren. Eventuell wurden Proteine mit Homologien zu $p75^{\text{NTR}}$ angereichert. Tatsächlich konnte mit einem im Rahmen dieser Arbeit produzierten anti- $p75^{\text{NTR}}$ Serum Hinweise auf $p75^{\text{NTR}}$ -ähnliche Proteine gefunden werden. In Anbetracht der Breite der unternommenen Reinigungsversuche, der Größe der aufgeworfenen Probleme, nicht zu letzt der Publikation einer großen Zahl von mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-System identifizierter intrazellulärer Interaktoren von $p75^{\text{NTR}}$ zusammen mit der erstaunlichen Perspektive, die sich durch die im folgenden

Abschnitt beschriebenen neu gewonnenen Seren eröffnete, wurde die Fragestellung der Arbeit modifiziert.

6.2 Charakterisierung, Reinigung und Identifizierung von p75^{NTR}-ähnlichen Proteinen

Die öffentlich zugänglichen p75^{NTR} Seren sind von geringer Qualität. Alle zeigen deutliche Kreuzreaktivitäten. Zuweilen, wie bei der Anreicherung von p75^{NTR} in postsynaptischen Dichten (PSDs), verhindern sie die Auswertung des Experiments. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit in Kaninchen neue polyklonale Antiseren gegen die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} der Ratte erzeugt (siehe Methoden 5.2.2.1). Diese Seren zeigen hohe Selektivität und Affinität für p75^{NTR} auch in Gehirnhomogenaten. Eins der vier Seren zeigt jedoch eine erstaunliche und bemerkenswerte Kreuzreaktivität, die auf die Existenz von p75^{NTR}-ähnlichen Molekülen verwies. Diese Hypothese wurde durch weitere Erkenntnisse gestützt und führte zur Neuorientierung des Projektes.

6.2.1 P75^{NTR} Antiserum zeigt Westernblotsignal auch in p75^{NTR} -/- Mäusen

Vier Kaninchen wurden mit der bakteriell exprimierten intrazellulären Domäne von p75^{NTR} immunisiert, die Liepinsh et al. zur Bestimmung der NMR Struktur verwendete (siehe Methoden 5.2.2.1)(Liepinsh et al., 1997). Die Spezifität der Seren für p75^{NTR} konnte einerseits durch Abwesenheit des Signals in Westernblots von Gehirnhomogenat, die mit den den Präimmunsereen geprobt wurden, gezeigt werden. Andererseits verschwand das Signal der Seren FreundII (FII), Gerbul (GI) und Gerbull (GII) weitgehend in Westernblots von Gehirnhomogenaten des p75^{NTR}-/-^{ExonIII} Teil-*Knockout* und vollständig in Westernblots von Gehirnhomogenaten des vollständigen *Knockout* p75^{NTR}-/-^{ExonIV} (Abbildung 8 (A)). Alle Seren zeichnen sich durch starke Westernblotsignale aus und sind auch noch in Verdünnungen von 1:10 000 einsetzbar (Daten nicht gezeigt).

Das Serum eines der vier Kaninchen, das im folgenden als FreundI Antiserum bezeichnet wird, reagiert darüber hinaus jedoch mit mindestens vier weiteren Antigenen ähnlicher Größe wie p75^{NTR}. Im Gegensatz zu dem verschwommenen p75^{NTR} Signal zeigen diese Antigene scharfe Banden im Westernblot. Überraschenderweise sind die FreundI Antigene nicht nur in wildtyp Mäusen sondern auch in Gehirnhomogenat sowohl des p75^{NTR}-Teil-*Knockout* p75^{NTR}-/-^{ExonIII} als auch im vollständigen p75^{NTR}-*Knockout* p75^{NTR}-/-^{ExonIV} mit gleicher Stärke zu detektieren. Es handelt sich daher um das Genprodukte mindestens eines von p75^{NTR} verschiedenen Gens.

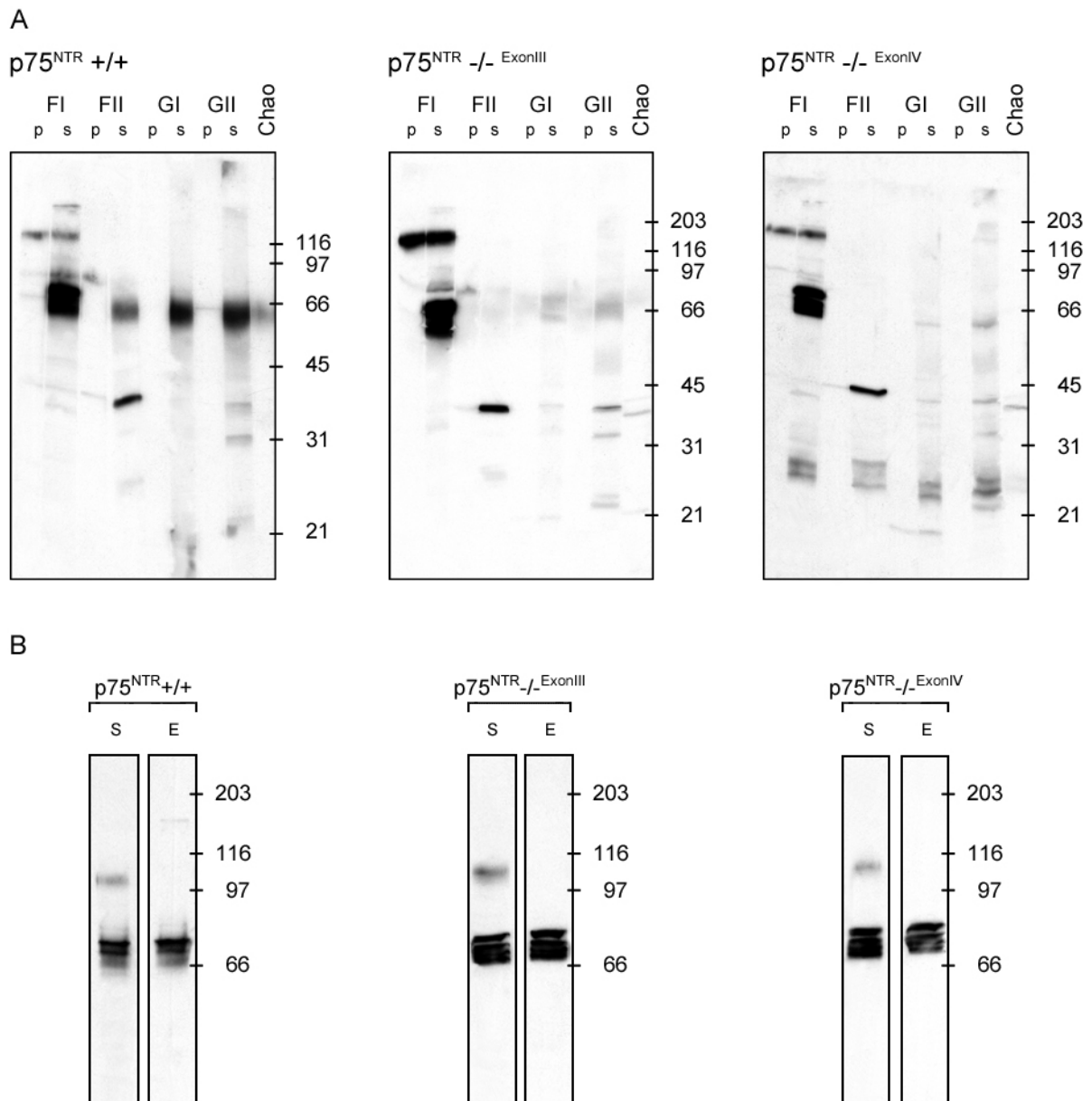


Abbildung 8: Serenvergleich

Gehirnhomogenate (jeweils ca. 100 µg) von 7 Tage alten p75^{NTR}+/+, p75^{NTR}-/-^{ExonIII}, p75^{NTR}-/-^{ExonIV} Mäusen wurden im SDS-Gel (12.5%) aufgetrennt und geblotet.

(A) Streifen der Blotmembran wurden einzeln mit den jeweiligen Präimmuseren (P) bzw. Seren (S) (1:1000) und mit dem anti-p75^{NTR} Chao Serum über Nacht inkubiert und entwickelt. Alle vier Seren zeigen ein Signal auf der Höhe des p75^{NTR} Chao Signals (in diesem Gel bei rund 66 kD). Während die Westernblotsignale des FreundII, Gerbul, Gerbull sowie des Chao Serums im Teil-Knockout p75^{NTR}-/-^{ExonIII} stark zurückgehen und im vollständigen Knockout p75^{NTR}-/-^{ExonIV} gänzlich verschwinden, bleibt das FreundI Signal konstant.

(B) Die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} wurde an Säulenmaterial immobilisiert und das FreundI Serum über diese Säule gereinigt. Proben der Gehirnhomogenate wurden mit dem FreundI-Serum (S) und dem gereinigten Säuleneluat (E) geprobt (1:1000, über Nacht). Während die Signale bei rund 66 kD vor und nach der Reinigung konstant bleiben, erweist sich ein Signal bei ca. 100 kD als unspezifisch und ist im Eluat nicht mehr zu detektieren.

Auch das Signal der Kreuzreaktivität ist spezifisch. Es kann ebenfalls nicht mit dem Präimmunserum detektiert werden (Abbildung 8 (A), jeweils F1, P). Zudem zeigt auch Freundl Serum, das durch seine Bindung an die intrazelluläre Domänen von p75^{NTR} an einer Affinitätssäule gereinigt wurde, diese Kreuzreaktivität (Abbildung 8 (B), jeweils E). Unspezifisch kreuzreagierende Antikörper im Freundl Serum, die ein ca. 100 kD großes Protein detektieren, wurden in diesem Reinigungsschritt abgetrennt.

6.2.2 Freundl Antigene sind nur im ZNS exprimiert

Die Westernblotanalyse unterschiedlicher Gewebe von acht Tage alten p75^{NTR}^{-/-}ExonIII Mäusen zeigte in den getesteten Organen (Schnurrbarthaut, Thymus, Herz, Lunge, Leber, Milz, Magen, Niere, Darm, Muskel, Rückenhaut) auch nach langer Exposition keine Freundl Antigene. Im Homogenat des Auges konnte ein sehr schwaches Signal festgestellt werden (Abbildung 9 (A)). Im Gehirn (Cortex, Hippocampus, Cerebellum, restliches Gehirn) und dem Rückenmark hingegen waren die Freundl Antigene deutlich in den Homogenaten zu detektieren (Abbildung 9 (B), 1-5). Im peripheren Nervensystem (Spinalganglien, Ischiasnerv) konnten die Freundl Antigene nicht festgestellt werden (ebendort, 6,7). Im Spinalganglienhomogenat fanden sich zwei schwache Signale deutlich kleinerer Molekülmasse.

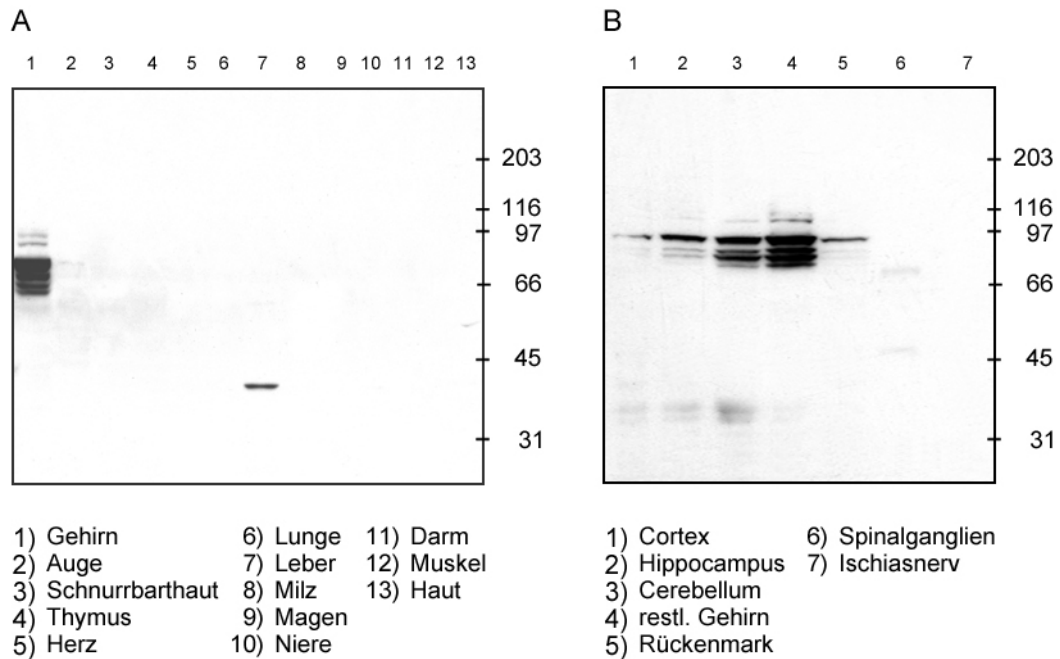


Abbildung 9: Expression der Freundl Antigene in Organen und ZNS-Regionen

Die Gewebe wurden 7 Tage alten p75^{NTR}^{-/-}ExonIV Tieren entnommen und in MDTH homogenisiert. Jeweils 50 µg Homogenat wurde auf 12.5% Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit dem Freundl Serum (1:3000, über Nacht) inkubiert. Die Freundl Antigene sind nur im ZNS zu detektieren (A 2, B 1-5).

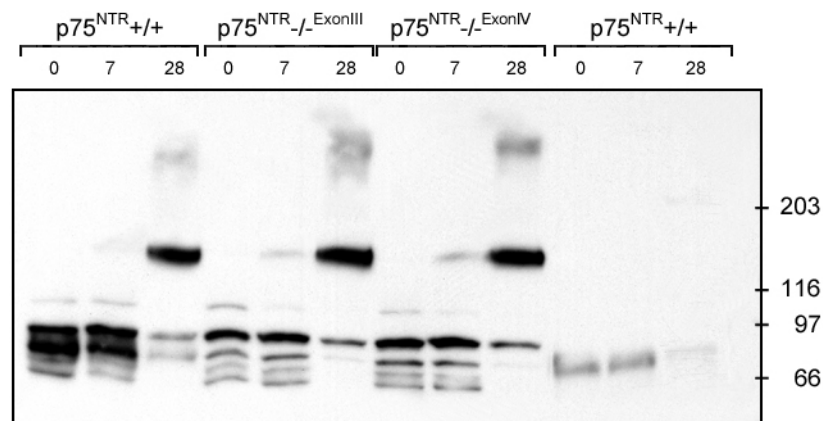


Abbildung 10: Postnatale Runterregulation der Freundl Antigene und von p75^{NTR}

Gehirne von frisch geborenen, 7 und 28 Tage alten p75^{NTR}+/+, p75^{NTR}-/-^{ExonIII} und p75^{NTR}-/-^{ExonIV} Mäusen wurden entnommen und im 15fachen ihres Feuchtgewichts in MDTH homogenisiert. Jeweils 20 µl Homogenat (ca. 100 µg) wurde auf 10% Polacrylamidgelen aufgetrennt und mit dem Freundl Serum (1:3000, über Nacht) inkubiert. Die Membran mit den letzten drei Proben wurden abgetrennt und mit dem p75^{NTR}-spezifischen Gerbull Serum (1:3000, über Nacht) geprobt. Sowohl die Freundl Antigene als auch p75^{NTR} zeigen einen starken Signlrückgang in den Proben von 28 Tage alten Gehirnen.

6.2.3 Freundl Antigene werden postnatal herunterreguliert

Die Westernblotanalyse von Gehirnhomogenaten zeigte eine starke entwicklungsabhängige Regulation der Freundl Antigene. So sind die Antigene in der ersten postnatalen Woche deutlich zu detektieren. In der vierten Woche hingegen ist kaum noch ein Freundl Signal festzustellen (Abbildung 10). Die Runterregulation der Expression findet in wildtyp und p75^{NTR}-/- Mauslinien gleichermaßen statt. Die Signale der wildtyp Gehirnhomogenate erscheinen zum Teil aufgrund des überlagerten p75^{NTR} Signals leicht stärker. Wie mit dem p75^{NTR}-spezifischen Gerbull Antiserum gezeigt, verläuft die Abnahme der Freundl Antigene und von p75^{NTR} in vergleichbarer Weise (Abbildung 10, letzten 3 Proben). Die Identität der auftauchenden Signale bei ca. 150 kD und ca. 300 kD in Homogenaten von 28 Tage alten Tieren wurde nicht untersucht.

6.2.4 Freundl Antigen Westernblotsignal ist kalziumabhängig

Das Westernblotsignal des Freundl Antigens zeigte sich stark kalziumabhängig. In Abwesenheit von Kalzium im MDTH Puffer und/oder zusätzlicher Zugabe des Kalziumchelators EDTA (1 mM) war kaum ein Signal detektierbar (Abbildung 20, (A) 1, 3). Schon 0.5 mM zugesetztes Kalzium führte zu einem starken Signal (ebendort (A) 2). Dieser Aspekt der Freundl Antigene wurde ausführlicher im Abschnitt 6.2.12 untersucht.

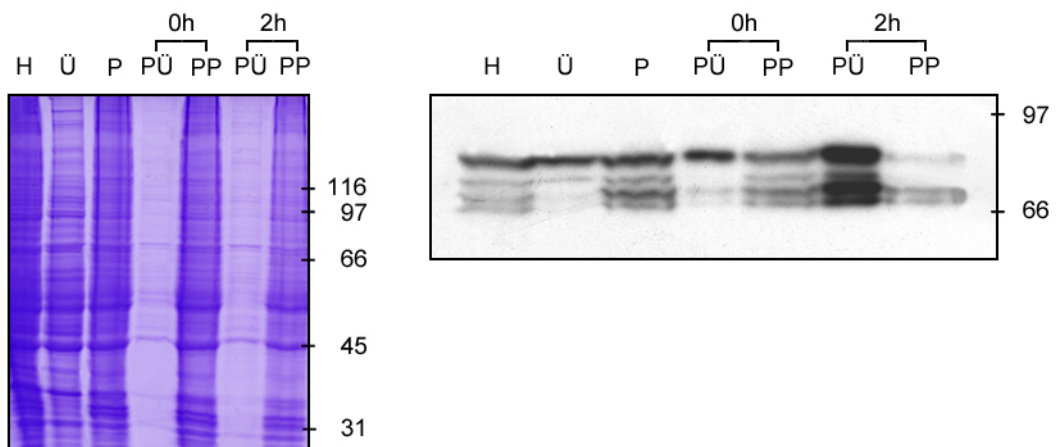


Abbildung 11: Fraktionswechsel der Freundl Antigene nach Inkubation

Das Gehirn einer 7 Tage alten $p75^{NTR-/-ExonIV}$ Maus wurde in MDTH homogenisiert (H). Nach 10minütiger Zentrifugation findet sich wenig des Freundl Signals im 1500 g Überstand (Ü), der Großteil hingegen im Pellet (P). Wird das Pellet resuspendiert und sofort erneut zentrifugiert, so zeigt sich wenig Freundl-Signal im Überstand (PÜ), der Großteil hingegen noch immer im Pellet (PP). Wird jedoch erst nach 2 Stunden erneut zentrifugiert, so wechselt das Freundl Signal in den 1500 g Überstand (PÜ). Wie im Coomassie gefärbten Gel deutlich wird, vollziehen nur wenige Proteine diesen Übergang.

6.2.5 Freundl Antigene wechseln die Zentrifugationsfraktion nach Inkubation

Wurde Gehirn von 7 Tage alten Mäusen im 15fachen Feuchtgewicht MDTH homogenisiert, so fand sich der Großteil der Freundl Antigene bereits nach 10 min Zentrifugation bei 1500 g im Pellet (Abbildung 11, Überstand (Ü) und Pellet (P)). Wurde das Pellet im Ausgangsvolumen in MDTH resuspendiert und sofort erneut 10 min, 1500 g zentrifugiert, so verblieben die Freundl Antigene nach wie vor im Pellet (ebendort, 0h, Überstand (PÜ) und Pellet (PP)). Wurde hingegen erst nach 2 Stunden Inkubation bei 4°C zentrifugiert, so wechselten die Antigene die Fraktion und fanden sich nun im Probenüberstand (ebendort, 2h, Überstand (PÜ), Pellet (PP)). Wie im Coomassie gefärbten Gel ersichtlich verblieb der Großteil der Proteine des resuspendierten Pellets auch nach Inkubation im Pellet. Längere Inkubation und Inkubation bei Raumtemperatur hatten keinen Einfluss auf diesen Wechsel. Proteinabbau war nicht beobachtbar. Der Wechsel war unabhängig vom Genotyp der Mäuse. $P75^{NTR+/+}$, $p75^{NTR-/-ExonIII}$ und $p75^{NTR-/-ExonIV}$ verhielten sich gleich. In Homogenaten ohne Kalzium im Puffer verblieben die Antigene bereits bei der ersten Zentrifugation im Überstand (Daten nicht gezeigt).

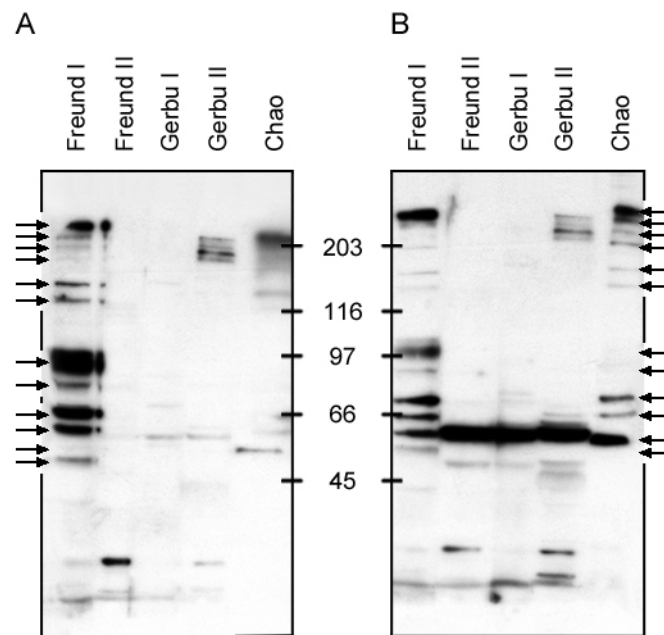


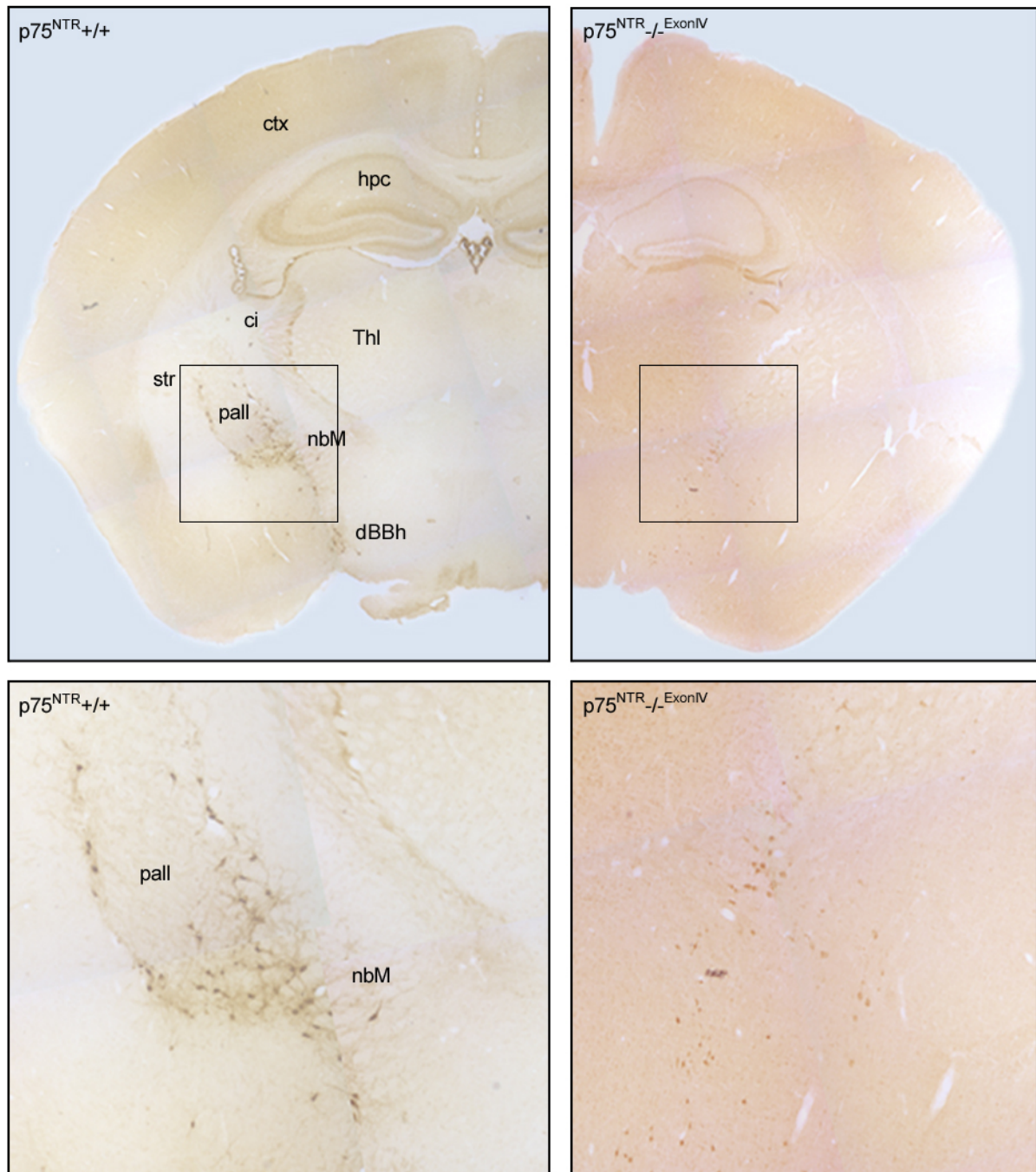
Abbildung 12: p75^{NTR} Antiseren kreuzreagieren mit FreundI Antigenen in dephosphoryliertem Gehirnhomogenat

Gehirn einer 7 Tage alten p75^{NTR}_{-/-}^{ExonIV} Maus wurde in Tris-Puffer homogenisiert. Ein Teil des Homogenats wurde mit modifizierter Lambda-Phosphatase versetzt und 1.5 h bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden über 10% SDS-Gele aufgetrennt und geblotet. Die Blotmembranen wurden in Streifen geschnitten und mit den Seren FreundI, FreundII, GerbuI, GerbuII (alle 1:3000) und anti-p75^{NTR} Chao (1:1000) inkubiert. Nach Dephosphorylierung detektierten alle Seren deutlich ein Protein bei ca. 60 kD. Das anti-p75^{NTR} Chao Serum detektierte zudem deutlich auch die anderen FreundI Antigene.

6.2.6 p75^{NTR} Seren detektieren FreundI Antigene in dephosphoryliertem Gehirnhomogenat

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Seren FreundII, GerbuI und GerbuII hergestellt. Wie in Abschnitt 6.2.1 gezeigt, sind diese Seren spezifisch für p75^{NTR}. Einige der FreundI Antigene wurden auch in Westernblots dieser Seren detektiert (Abbildung 12 (A)). Etwas deutlicher konnten die FreundI Antigene mit dem kommerziell erhältlichen anti-p75^{NTR} Chao Serum festgestellt werden (ebendort). Doch auch hier stellten die FreundI Antigene nur kaum sichtbare Hintergrundssignale dar, die erst nach längerer Exposition und selbst dann nur schwach erkennbar waren.

Wurde jedoch Gehirn von 7 Tage alten p75^{NTR}_{-/-}^{ExonIV} Mäusen homogenisiert und 1.5 Stunden bei 30°C mit einer modifizierten Lambda-Phosphatase inkubiert (Methoden 5.2.2.3), so zeigte sich mit allen verwendeten p75^{NTR} Seren insbesondere eine Kreuzreaktivität als deutliches Westernblotsignal (siehe Abbildung 12 (B)). Das anti-p75^{NTR} Chao Serum detektierte darüber hinaus auch einen Großteil der übrigen FreundI Antigene (ebendort).



ci Capsula Interna	dBBh Diagonales Band von Broca	nbM Nucleus Basalis Meynert	str Striatum
ctx Cortex	hpc Hippocampus	pall Pallidum	Thl Thalamus

Abbildung 13: p75^{NTR}-ähnliche Immunfärbung in p75^{NTR}-/-^{ExonIV} Basal Ganglien

Frontale Kryotomschnitte von 19 (p75^{NTR}+/+, links) bzw. 17 (p75^{NTR}-/-^{ExonIV}, rechts) Tage alten Gehirnen wurden mit dem Freundl Antiserum immungefärbt. Die erkennbaren Regionen sind markiert. Die umrandeten Areale in den oberen beiden Abbildungen sind darunter vergrößert dargestellt. Während in p75^{NTR}+/+ Schnitten deutlich Zellkörper und Zellfortsätze der Neuronen des Nucleus Basalis Meynert und des Diagonalen Band von Broca angefärbt sind, verbleiben in den p75^{NTR}-/-^{ExonIV} Schnitten angefärbte Zellkörper in diesen Regionen. Dieser Befund deutet auf die Kolokalisation von p75^{NTR} und Freundl Antigenen hin.

6.2.7 P75^{NTR}-ähnliche Immunfärbung in p75^{NTR} -/- Basal Ganglien

In Gehirnen von erwachsenen Mäusen ist die p75^{NTR} Expression auf eine kleine Zahl sehr spezifischer Neuronen, wie z.B. die Neuronen des Nucleus basalis Meynert und dem diagonalen Band von Brocca, beschränkt. In Zusammenarbeit mit Dr. Gennadij Raivich in der Arbeitsgruppe für Neuroanatomie von Prof. Dr. Kreutzberg am Max Planck Institut für Neurobiologie wurden 19 (p75^{NTR}+/+) bzw. 17 (p75^{NTR}-/-^{ExonIV}) Tage alte Gehirne in PFA fixiert, eingebettet und gefroren. 10 µm dünne Frontalschnitte wurden mit dem Kryotom angefertigt. Nach Fixierung wurden sie mit dem Freundl Serum (1:150) inkubiert und DAB gefärbt. Tatsächlich konnten sowohl die Zellkörper als auch die Neuriten von Neuronen dieser beiden Regionen mit dem Freundl Antiserum angefärbt werden (Abbildung 13, links). In Schnitten von p75^{NTR}-/-^{ExonIV} Gehirn verblieb ein stark reduziertes aber deutliches Signal der Zellkörper (ebendort, rechts). Das verbleibende Signal im p75^{NTR}-*Knockout* ist daher als Freundl-Antigen-Signal zu interpretieren. Die im *Knockout* verschwindende Neuritenfärbung hingegen ist ein p75^{NTR} Signal, wie im Vergleich mit anderen p75^{NTR} Seren bestätigt wurde (Daten hier nicht gezeigt). P75^{NTR} und das Freundl Antigen zeigen sich somit in den gleichen Zellpopulationen kolokalisiert.

6.2.8 P75^{NTR}-ähnliche Bindung an dissoziierten Spinalganglien von p75^{NTR}-/- Tieren

Die Existenz von p75^{NTR}-ähnlichen Proteinen konnte auch noch über eine weitere spezifische Eigenschaft von p75^{NTR} gezeigt werden: p75^{NTR} bindet alle Neurotrophine mit vergleichbarer Affinität. Ein Neurotrophin kann daher durch einen Überschuss eines anderen Neurotrophins von p75^{NTR} verdrängt werden. Eine p75^{NTR}-ähnliche Bindungsstelle konnte in Bindungsstudien an dissoziierten Spinalganglien des vollständigen *Knockout* p75^{NTR}-/-^{ExonIV} nachgewiesen werden.

Sowohl wildtyp als auch p75^{NTR}-/-^{ExonIV} Spinalganglien wurden dissoziiert (12 500 Zellen/100 µl). Während ein Teil der Neuronen ausschließlich mit ¹²⁵I markiertem NGF inkubiert wurde (0.6 nM), wurde ein weiterer Teil zusätzlich mit der 640fachen Konzentration an nicht radioaktiv markiertem NGF oder BDNF (jeweils 385 nM) versetzt. Nach insgesamt 2.5 Stunden Inkubation wurden die Zellen pelletiert und die an den Zellen haftende Radioaktivität vermessen. Sowohl in wildtyp Neuronen (Abbildung 14, ersten 3 Balken) als auch in Neuronen von p75^{NTR}-/-^{ExonIV} Tieren (ebendort, zweiten 3 Balken) ist eine deutliche Reduktion des gebundenen radioaktiven ¹²⁵I-NGF zu detektieren.

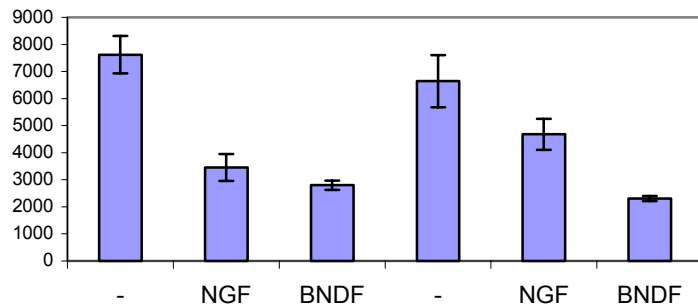


Abbildung 14: p75^{NTR}-ähnliche Bindung in p75^{NTR}^{-/-ExonIV} Spinalganglien

Spinalganglien von 4 Wochen alten p75^{NTR}^{+/+} (ersten 3 Balken) und von p75^{NTR}^{-/-ExonIV} (zweiten 3 Balken) Mäusen wurden dissoziiert. Jeweils 12 500 Zellen in 100 µl Bindungspuffer wurden in Bindungspuffer (-), mit 385 nM NGF oder 385 nM BDNF bei 4°C inkubiert. Allen Proben wurde 0.6 nM ¹²⁵I-NGF zugesetzt. Die Aktivität (cpm) der pelletierten Zellen wurde gemessen und im Graphen aufgetragen. An Spinalganglien beider Genotypen konnte ¹²⁵I-NGF sowohl durch einen Überschuss an NGF als auch an BDNF verdrängt werden. Dieses Verhalten ist bisher nur für p75^{NTR} beschrieben.

6.2.9 Reinigung der Freundl Antigene

Die besondere Rolle, die p75^{NTR} in der TNFR-Superfamilie einnimmt (siehe Einleitung), deutet auf die Möglichkeit weiterer p75^{NTR}-ähnlicher Proteine. Die zuvor dargestellten Ergebnisse unterstützten diese Vermutung und zeigen, dass die Freundl Antigene solche Moleküle darstellen. Eine Reinigung der Antigene erschien daher geboten und wurde durchgeführt.

Da das Freundl Antiserum eine Immunpräzipitation nur von p75^{NTR} nicht aber der Freundl Antigene zuließ, wurden die Freundl Antigene unter Ausnutzung ihrer biochemischen Eigenschaften gereinigt. Als Ausgangsmaterial wurde Gehirn von p75^{NTR}^{+/+} wildtyp Mäusen verwendet. Sieben Tage alte Mäuse erschienen als guter Kompromiss zwischen Expressionslevel der Antigene und der Gehirngröße (siehe Abbildung 10).

Zur chromatographischen Reinigung stehen drei unterschiedliche Reinigungsprinzipien zur Verfügung: Reinigung über 1) die geladene Proteinoberfläche (Ionenaustauscher, Isoelektrische Fokussierung (IEF)), 2) den hydrophoben Proteinkern (*Reversed-Phase* Chromatographie) und 3) über die Proteingröße (Gelfiltration, SDS-PAGE). Die Reinigung der Freundl Antigene aus Gehirnhomogenat wurde über Ionenaustauscher (DEAE, Hydroxyapatit), Gelfiltration, zweidimensionale Gelelektrophorese (IEF, SDS-PAGE) und Kombinationen dieser Techniken versucht. Da sich jeweils eine große Zahl an Proteinen vergleichbarer Größe anreicherte, konnte in

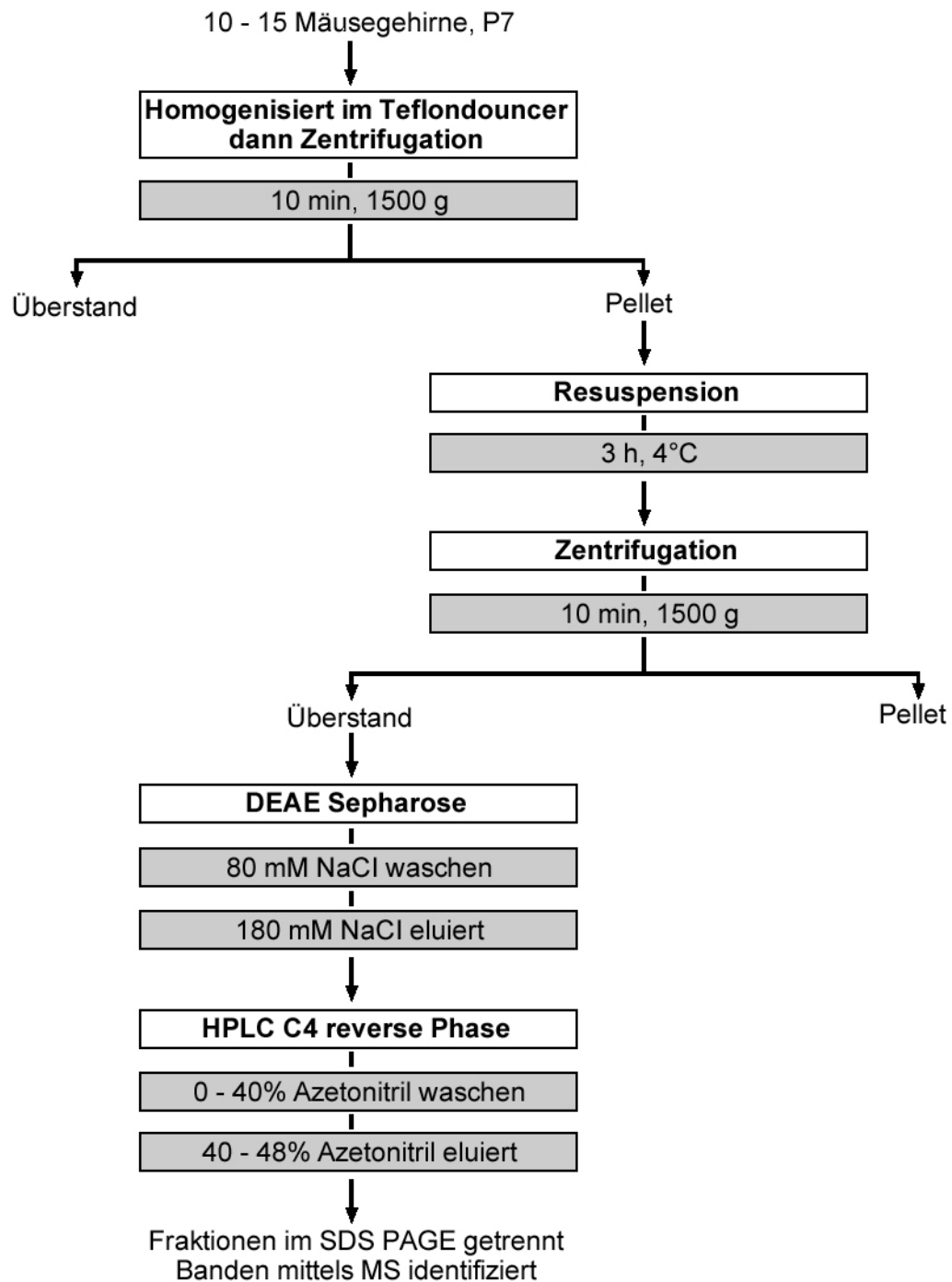


Abbildung 15: Reinigungsschema

Nach Homogenisation wurde der in 6.2.5 beschriebene Wechsel der Freundl Antigene vom Pellet in den Überstand zu einer ersten starken Anreicherung verwendet. Anschließend wurden die Antigene im Reaktionsgefäß an 1 ml DEAE Sepharose gebunden, mehrfach mit jeweils 50 ml MDTH/80 mM NaCl gewaschen und durch Zugabe von 5x 1 ml MDTH/180 mM NaCl eluiert. Die vereinigten Eluate wurden an ein C4-Reversed-Phase HPLC-Säule gebunden und mit einem 50-60% Puffer B (40-48% Azetonitril) eluiert. Die anschließende Auftrennung der Elutionsfraktionen im SDS-PAGE ermöglichte im Vergleich mit Westernblots der Fraktionen die Zuordnung der Westernblotsignale zu Coomassie gefärbten Proteinbanden im Gel. Die Banden wurden ausgeschnitten, trypsinisiert und mittels MALDI-TOF Massenspektroskopie identifiziert.

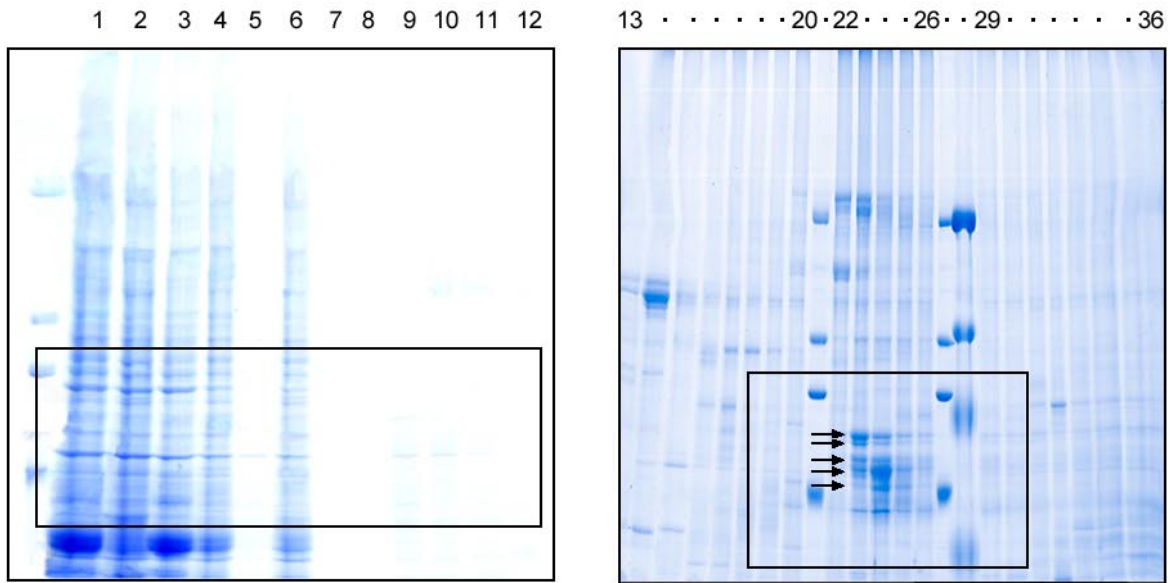
keinem der Experimente eine eindeutige Zuordnung des Westernblotsignals zu einem Protein im Silbergel erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Eine starke Anreicherung konnte jedoch durch den in 6.2.5 beschriebenen Wechsel der Zentrifugationsfraktion erzielt werden (Abbildung 11). Es wurden daher 10-15 Gehirne von 7 Tage alten p75^{NTR}+/- Mäusen im 15fachen ihres Feuchtgewichts in kaltem MDTH homogenisiert (ca. 50 ml, Abbildung 16, A und B, Probe 1). Nach Zentrifugation (10min, 1500 g) fand sich auch in diesem präparativen Ansatz der Großteil der Freundl Antigene im Pellet (Abbildung 16, A und B, Probe 3 und 4). Der Wechsel vom Pellet in den Überstand nach Resuspension des Pellets und Inkubation bei 4°C erfolgte nicht so effizient wie unter 6.2.5 beobachtet. Nur rund die Hälfte und vor allem die höhermolekularen Freundl Antigene fanden sich nach erneuter Zentrifugation im Überstand (Abbildung 16, A und B, Probe 5 und 6). Da jedoch nur ein sehr kleiner Teil des Gesamtproteins den Wechsel vollzog, stellte auch unter diesen Bedingungen dieser Schritt eine effiziente Anreicherung dar.

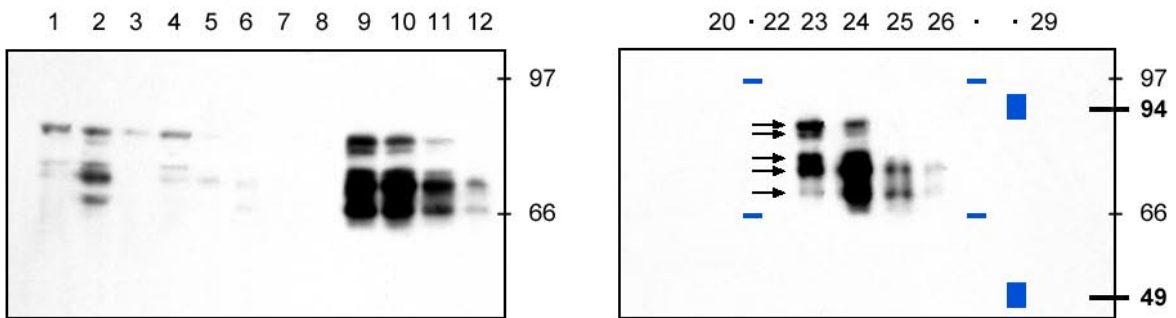
Die Freundl Antigene aus dem letzten 1500 g Überstand wurden im 50 ml Reaktionsgefäß vollständig von 1ml DEAE Sepharose gebunden (Abbildung 16, A und B, Probe 7 und 8). Da sie über einen großen Salzbereich eluierten, wurden sie nach mehrfachem Waschen mit jeweils 50 ml MDTH/80 mM NaCl und dem Transfer in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit viermal einem Milliliter MDTH/180 mM NaCl eluiert (Abbildung 16, A und B, Probe 9-12). Dies ermöglichte eine 10fache Volumenreduktion.

Die vereinigten DEAE Eluate wurden schrittweise (jeweils 2 ml) in eine *C4-Reverse-Phase* HPLC-Säule injiziert (Abbildung 16, C, 0-30 min). Nach anfänglichem Waschen mit 0-50% Puffer B (0-40% Azetonitril) erfolgte die Elution mit einem einstündigen 50-60% Puffer B Gradienten (40-48% Azetonitril, Gradientenverlauf in Abbildung 16, C, rot eingezeichnet). Die Antigene eluierten bei einer Puffer B Konzentration von 57-58% (Azetonitrilkonzentration von 45.6-46.4%, Abbildung 16, C, blau hervorgehobener Bereich). Die Elutionsfraktionen wurden unter Vakuum über Nacht eingedampft und auf 7.5-15% präparativen Gradientengelen aufgetrennt (Abbildung 16, A, Probe 21-25). In der gleichen Elektrophoreseapparatur zeitgleich aufgetrennte Proben wurden auf PVDF-Membranen geblotet und mit dem Freundl Antiserum geprobt (Abbildung 16, B, Probe 21-25). Fünf Proteinbanden konnten mit Hilfe der Marker und der Abstände der Proteine relativ zueinander den Westernblotsignalen zugeordnet werden (siehe Pfeile).

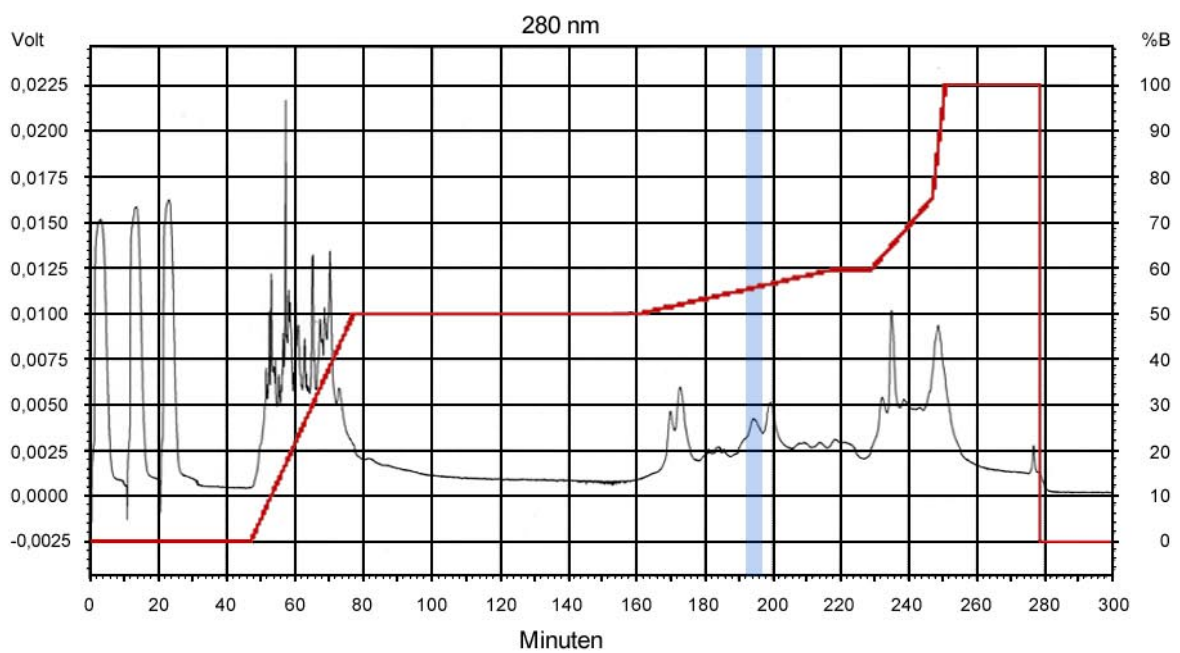
A



B



C



Während der gesamten Reinigung wurde ein kleiner Teil des anfänglichen Homogenats bei 4°C inkubiert. Es wurde eine starke Veränderung des Westernblotsignals festgestellt (Abbildung 16, A und B, Probe 1 und 2). Die sehr hohe Varianz des Westernblotsignals machte daher die Bestimmung von Reinigungsfaktoren für die einzelnen Reinigungsschritte unmöglich.

Abbildung 16: Reinigungsfractionen und HPLC-Elutionsprofil (vorangelegene Seite)

(A) und (B): Jeweils 50 µl der Reinigungsfractionen wurden auf 7.5-15% Gradientengelen aufgetrennt und mit kolloidal Coomassie gefärbt. Parallel aufgetrennte Gele wurden geblotet, die Markerpositionen auf der Blotmembran markiert und mit dem Freundl Antiserum (1:3000) inkubiert. Die in (A) umrandeten Regionen sind mit den Westernblotausschnitten in (B) identisch.

(C): Elutionsprofil der C4 *Reversed-Phase* HPLC Säule. In rot ist der Elutionsgradient eingetragen. Die blaue Hervorhebung bezeichnet den Bereich, in dem die Freundl Antigene von der Säule eluiert wurden.

Auf die Gele wurde aufgetragen:

1) Homogenat	13) 0-45 min d. HPLC-Elution	25) 196-197 min
2) Homogenat nach 8h	14) 46-79 min	26) 198-199 min
3) 1500 g Überstand	15) 80-159 min	27) Marker
4) 1500 g Pellet	16) 160-181 min	28) Marker
5) 1500 g Überstand d. resusp. Pel.	17) 182-183 min	29) 200-201 min
6) 1500 g Pellet d. resusp. Pel.	18) 184-185 min	30) 202-209 min
7) DEAE Durchfluss	19) 186-187 min	31) 210-219 min
8) DEAE Waschfraktion	20) 188-189 min	32) 220-229 min
9) DEAE Elution1	21) Marker	33) 230-239 min
10) DEAE Elution2	22) 190-191 min	34) 240-249 min
11) DEAE Elution3	23) 192-193 min	35) 250-259 min
12) DEAE Elution4	24) 194-195 min	36) 260-280 min

6.2.10 Identifikation der Freundl Antigene als N-Terminus von MAP1B

Mit Hilfe des entwickelten Westernblots konnten sechs Banden auf dem kolloidal Coomassie gefärbten Gel als die Freundl Antigene identifiziert werden (Abbildung 16, A und B, Pfeile). Anhand ihres Laufverhalten auf dem Gel wurden ihre Größen als 84.5, 82.0, 77.0, 72.6, 70.7 und 67.0 +/-2% kD bestimmt. Diese sechs Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und einzeln in der Arbeitsgruppe Jan Hofsteenge am Friedrich Miescher Institut in Basel nach tryptischem Verdau mittels MALDI-TOF und Nano-ESI Massenspektroskopie alle eindeutig als N-terminale Fragmente von MAP1B identifiziert (Abbildung 17). Massenvergleiche deuten darauf hin, dass allen sechs Proteinbanden ein Fragment der ersten rund 600 Aminosäuren zugrunde liegt (siehe auch Diskussion).

```

MAP1B   MATVVVEATEPEPSGSGIGNPAASTSPSLSHRFLDSKFYLLVVVGETVTEEHLRRAIGNIELGIRSWDTNLECNLDQELK
      . . . . . : . : :
p75IZD  KRW---NSCKQNKQGANSRFPVNTT PP-----

MAP1B   LFVSRHSARFSPEVPGQKILHHRSDVLETVVLINPSDEAVSTEVRMITDAARHKLLVLTGQCFENTGELLQSGSFSFQ
      : : : : : : : : : : : : :
p75IZD  -----PE--GK-LH-----SDSGISVDSQSL-----H-----

MAP1B   NFIEIFTDQEI GELLSTTHPANKASLTLCPEEGDWKNSNLDRHNLQDFINIKLNASILPEMEGLSEPTTEYLSESEVVP
      : : . . . : : : : : : : : : : : : :
p75IZD  -----DQQ-----THTQTASGQAL---KGD---GNL-----YSSLE-----LTKREEVE

MAP1B   SPFDILEPPTSGGFLKLSKPCCYIFPGGRGDSALFAVNGFNMLINGGSEKSCFWKLIRHLDRVDSILLTHIGDDNLPGI
      . : : : : : : : : : : : : :
p75IZD  K-----LNGDT-----W---RHL-----

MAP1B   NSMLQRKIAELEEBERSQGSTNSDWMENLISPDLGVFLNVPENLKDPEPNIKMKRSIEEACFTLQYLNKLSMKPEPLFR
      . : : : : : : : : : : : : :
p75IZD  -----AGELGY-----QPE---HIDSFTEAC-----

MAP1B   SVGNTIEFVILFQKMGVVKLEMYVLNPKSSKEMQYFMQQTGTNKDKAELILPNGQEVDPISYLTSSSLIVWHPANP
      : : . . . : : : : : : : :
p75IZD  -----PVRA-----LLASW-GA-QDSATL-----DA-----

MAP1B   AEKIIRVLFPGNSTQYNILEGLEKLKHLDFLKQPLATQKDLTGQVPTPPVKQVKIQQRADSRESLKPATKPVASKSV
      . : : . . . : : : : : : : :
p75IZD  -----LLAALRRI-----QQRADIVESL-----CSESTATSEV

```

Abbildung 17: Sequenzvergleich der IZD von p75^{NTR} und dem N-Terminus von MAP1B

Es wurden der N-Terminus von MAP1B (Maus) mit der intrazellulären Domäne von p75^{NTR} (Ratte) mit dem Programm „Align“ verglichen. Es zeigen sich nur wenige Übereinstimmungen zwischen den beiden Proteinen. Allerdings zeigt sich die umrandete Region als potentielles, der Kreuzreaktivität zugrunde liegendes Epitop. Die im MALDI-TOF identifizierten Peptide sind blau, die Nano-ESI sequenzierten Peptide rot wiedergegeben.

6.2.11 Die Freundl Antigene werden von einem MAP1B Antiserum detektiert

In der Literatur konnte nur ein N-terminal spezifisches Antiserum gefunden werden. Dieses Serum wurde gegen die ersten 15 Aminosäuren von MAP1B gebildet. Dieses als N1-15 bezeichnete Serum wurde freundlicherweise von Dr. Peter J. Brophy zur Verfügung gestellt. Um zu bestätigen, dass die Westernblotsignale den gereinigten Proteinen richtig zugeordnet wurden und die massenspektroskopisch identifizierten Proteine tatsächlich die Freundl Antigene sind, wurden Gehirnhomogenate sowohl mit dem Freundl Antiserum als auch dem N1-15 Antiserum geprobt. Die Westernblotsignale zeigen große Übereinstimmung (Abbildung 18). Die Freundl Antigene wurden somit als N-Terminus von MAP1B bestätigt.

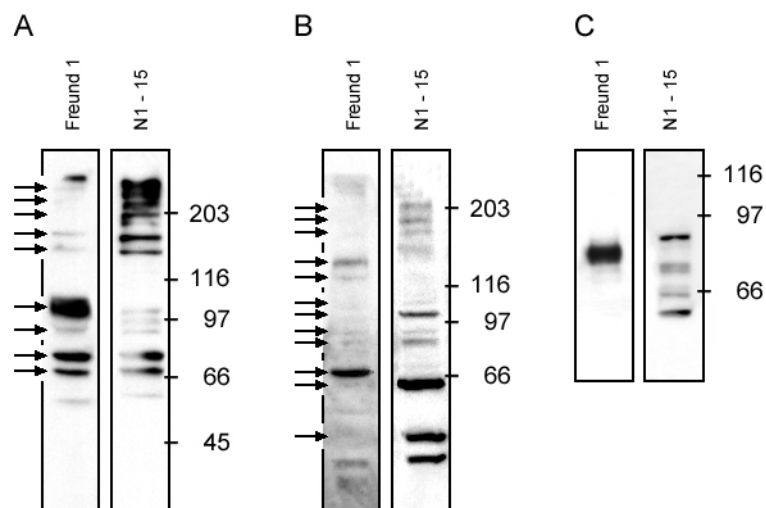


Abbildung 18: Das MAP1B Serum N1-15 detektiert die Freundl Antigene

Die Seren Freundl (1:3000) und N1-15 (1:1000) wurden verglichen. Hierzu wurden unterschiedliche Proben mit beiden Seren getestet: (A) Gehirn von 7 Tage alten $p75^{\text{NTR}}_{-/-\text{ExonIV}}$ Mäusen in MDTH homogenisiert; (B) Gehirn von 7 Tage alten $p75^{\text{NTR}}_{-/-\text{ExonIV}}$ Mäusen in Lämmli-Puffer homogenisiert; (C) $p75^{\text{NTR}}_{+/+}$ Körnerzellkulturen in Lämmli-Puffer homogenisiert. Die Übereinstimmung der detektierten Signale ist in (A) und (B) offensichtlich (siehe Pfeile). In (C) detektiert das Freundl Serum dominant $p75^{\text{NTR}}$. Das N1-15-Serum zeigt aber auch dort deutlich die Gegenwart von MAP1B-Fragmenten.

6.2.12 QRADxxESL-Peptide kompetieren nicht um Bindungsepitop

Kreuzreaktivitäten von Antikörper liegen strukturelle Homologien zwischen Proteinen zugrunde. Die intrazelluläre Domäne von $p75^{\text{NTR}}$ und der N-Terminus von MAP1B zeigen sehr geringe Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen. Allerdings enthalten beide die Aminosäuresequenz QRADxxESL (Abbildung 17). Interessanterweise enthält diese Region Serine, die von dem Analyseprogramm NetPhos 2.0 (Blom et

al., 1999) als potentielle Phosphorylierungsstellen eingestuft werden. P75^{NTR} enthält in diesem Epitop nur ein, MAP1B hingegen zwei Serine. Sowohl die Antiserenkreuzreaktivität als auch die zuvor beschriebene Phosphorylierungsabhängigkeit der Antikörperkreuzreaktion (siehe 6.2.6) fände hier sein molekulares Korrelat.

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem Epitop um die Bindungsstelle des Antiserums handelt, wurde ein Konkurrenzexperiment vorgenommen. Hierzu wurden 15 Aminosäure lange Peptide synthetisiert, die dieses Epitop zusammen mit jeweils drei N- und C-terminal flankierenden Aminosäuren umfasste. Das Peptid PS1015 entstammte der Sequenz von p75^{NTR}, das Peptid PS1016 der von MAP1B (siehe 5.2.2.7).

Das FreundII und das anti-p75^{NTR} Chao Antiserum kreuzreagieren vor allem mit dephosphorylierten MAP1B. Es sind also vor allem Antikörper gegen das unphosphorylierte Epitop vorhanden. Die Bindung der unphosphorylierten Peptide mit den Antikörpern sollte daher in Westernblots von dephosphoryliertem Gehirnhomogenat ein reduziertes Westernblotsignal zur Folge haben.

Es wurde dephosphoryliertes Gehirnhomogenat von p75^{NTR}_{-/-}^{ExonIV} Mäusen im SDS-PAGE aufgetrennt, geblotet und Streifen der Blotmembran mit dem FreundII Antiserum und dem anti-p75^{NTR} Chao Antiserum in Gegenwart und Abwesenheit von 0.5 M Peptid inkubiert. In keiner der Kombinationen zeigten die Peptide eine signifikante Wirkung (siehe Abbildung 19). Es ist daraus zu schließen, dass die Peptide mit der Sequenz QRADxxESL in der verwendeten Form nicht das Epitop der Kreuzreaktivität darstellen. Das Experiment erfordert jedoch ausführliche Diskussion (siehe dort).

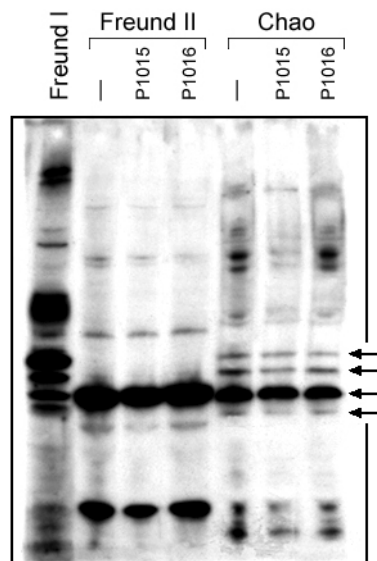


Abbildung 19: Peptidkompetition

Es wurde dephosphoryliertes Gehirnhomogenat von $p75^{NTR-/-ExonIV}$ Mäusen im 10% SDS-PAGE aufgetrennt, geblotet und die Blotmembran in Streifen geschnitten. In Gegenwart der angegebenen Peptide (0.5 M) wurde mit dem anti- $p75^{NTR}$ /anti-MAP1B FreundI, dem anti- $p75^{NTR}$ FreundII und dem anti- $p75^{NTR}$ Chao Serum geprobt. Es konnte kein Einfluss der Peptide auf die Westernblotsignale feststellt werden.

6.2.13 Calpain-Proteolyse führt zum N-Terminus von MAP1B

Die Kalziumabhängigkeit des FreundI Westernblot Signals kann unterschiedlich Ursache haben. Einerseits kann kalziumabhängig eine Veränderung der Sekundärstruktur erfolgen. Andererseits kann das MAP1B Fragment kalziumabhängig posttranslational modifiziert sein. Eine dritte Möglichkeit besteht in der kalziumabhängigen Proteolyse des intakten MAP1Bs, durch die das aminoternale Fragment erzeugt wird.

Eine proteolytische Aktivität konnte gezeigt werden. Der Einsatz eines Proteaseinhibitorcocktails während der Homogenisation führte zu einem deutlich schwächeren Signal als in Homogenaten mit oder ohne PMSF (Abbildung 20 (A), (B), 5, 4, 2).

Die Serinprotease Calpain ist *in vitro* als MAP1B Protease beschrieben. Die entstandenen Spaltfragmente wurden bisher nicht untersucht (Billger et al., 1988). Um die für die N-terminale Abspaltung verantwortliche Protease zu identifizieren, wurden daher neben den unspezifischen Inhibitoren EDTA, PMFS und einem Proteaseinhibitorcocktail der Firma Boehringer sowohl ein unspezifischer kalziumabhängiger Serinprotease Inhibitor (Leupeptin), als auch ein spezifischer Inhibitor der

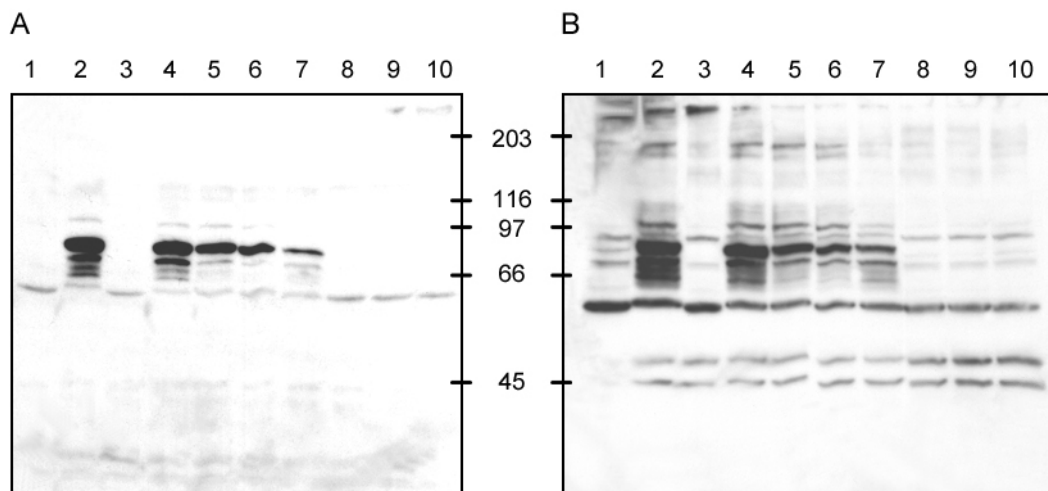


Abbildung 20: Proteaseinhibitoren

Einzelne Gehirne von 7 Tage alten $p75^{\text{NTR-/-ExonIV}}$ Mäusen wurden homogenisiert in:

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1) MDTH ohne Kalzium | 6) MDTH mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin |
| 2) MDTH | 7) MDTH mit 320 $\mu\text{g/ml}$ Acetylcalpastatin |
| 3) MDTH ohne Kalzium mit 1mM EDTA | 8) Lämmli-puffer |
| 4) MDTH mit 1mM PMSF | 9) Lämmli-puffer mit Boehringer Complete |
| 5) MDTH mit Boehringer Complete | 10) Lämmli-puffer mit 320 $\mu\text{g/ml}$ Acetylcalpastatin |

Jeweils 20 μl (ca. 100 μg) wurden in 10% SDS-PAGE aufgetrennt, geblotet und (A) mit dem Freund I Serum bzw. (B) dem anti-MAP1B N1-15 Serum über Nacht geprobt.

Serinprotease Calpain (Acetylcalpastatin) während der Homogenisation eingesetzt. Die spezifischen Calpaininhibitoren reduzierten die Westernblotsignale des N-terminalen MAP1Bs stark (ebendort (A) und (B), 6, 7, 4). Mit dieser Arbeit konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, dass Calpain zur Abspaltung der ersten rund 600 Aminosäuren von MAP1B führt.

6.2.14 MAP1B Fragmente auch *in vivo* detektierbar

Proteolyse ist ein häufiges Nebenprodukt von Gewebekompositionen. Essentiell für die Bedeutung des identifizierten MAP1B-Fragments ist daher die Frage, ob die gereinigten MAP1B-Fragmente auch *in vivo* detektierbar sind.

Wurde das Mäusegehirn direkt in Lämmli-puffer homogenisiert, so reduzierte sich der Gehalt an MAP1B Fragment in den Homogenaten sehr stark (Abbildung 20, (A) und (B) Probe 8). Proteaseinhibitorzusätze zeigten bei Homogenisation im Lämmli-puffer keinen Unterschied im Ergebnis (Abbildung 20 (A) und (B), Probe 9 und 10). Während das Freund I Westernblotsignal im Originalblot sehr schwach und in der Reproduktion in Abbildung 20 nicht sichtbar war (Vergleiche aber Abbildung 18 (B)),

wurden MAP1B Fragmente noch immer vom N1-15 Serum detektiert (Abbildung 20 (B), Probe 8 und 10).

Um dem Argument zu begegnen, die hohe Kalziumkonzentration der Zellzwischenräume würde auch trotz denaturierenden SDSs des Lämmli-puffers für eine reduzierte Calpainaktivierung ausreichen, wurde für ein zusätzliches Experiment ein Zellkultursystem gewählt. In den Kulturen konnte durch mehrfaches Waschen mit kalziumfreien PBS direkt vor der Lyse das extrazelluläre Kalzium vollständig entfernt werden. Das rund 1000fach niedriger konzentrierte intrazelluläre Kalzium wurde während der Lyse einerseits im Homogenisationpuffer verdünnt und konnte andererseits mit EDTA depletiert werden. Eine Calpainaktivierung konnte somit ausgeschlossen werden.

Es wurden Kulturen cerebraler Körnerzellen von $p75^{NTR+/-}$ Mäusen nach 3 Tagen Kultur in Lämmli-puffer lysiert. Westernblots der Proben wurden sowohl mit dem Freundl Serum als auch mit dem N1-15 Serum geprobt. Das Hauptsignal auf den Freundl geprobt Westernblot erwies sich als $p75^{NTR}$ (Abbildung 18 (C); siehe auch Abbildung 21 (A)). Ob die Signale dicht oberhalb und unterhalb davon MAP1B-Fragmente darstellen, konnte nicht festgestellt werden. Das N1-15 Serum hingegen zeigte deutliche MAP1B-Fragmentsignale (Abbildung 18 (C)).

6.2.15 Neurotrophine zeigen keinen Einfluss auf die Spaltung von MAP1B

Wie in dieser Arbeit gezeigt, proteolysiert Calpain MAP1B *in vivo*. Neurotrophine reduzieren die Calpainaktivität in PC12 Zellen (Pinter et al., 1994). Es wurde daher untersucht, ob Neurotrophine in Körnerzellkulturen die Konzentration des N-terminalen MAP1B-Fragments regulieren.

Es wurden Körnerzellen in Neurobasalmedium ohne, mit NGF, BDNF oder NT3 Zusatz (jew. 25 ng/ml) für 1, 2 und 3 Tage kultiviert. Nach Lyse in Lämmli-puffer in Gegenwart von Proteaseinhibitoren war bis auf kleine, nicht reproduzierbare Schwankungen der Signale im Westernblot kein Unterschied zwischen den Kulturbedingungen feststellbar (Abbildung 21 (B)). Auch eine Kultivierung über 5 Tage zeigte keinen Einfluss auf MAP1B-Fragmente (nicht gezeigt).

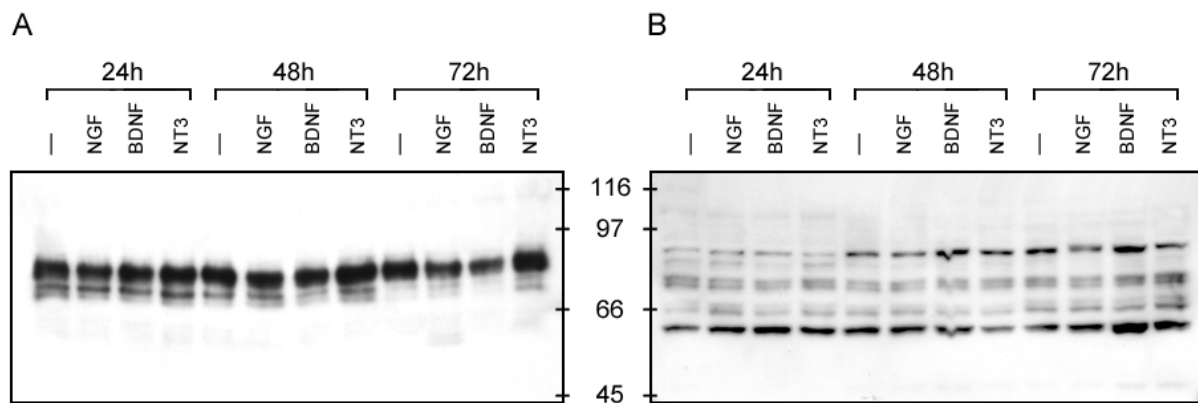


Abbildung 21: Einfluss von Neurotrophinen auf den N-Terminus von MAP1B in Körnerzellkulturen

Körnerzellkulturen wurden in einer Dichte von 200 000 Zellen/cm² 1, 2 und 3 Tage lang in Neurobasalmedium ohne, mit NGF, mit BDNF oder mit NT3 (jew. 25 ng/ml) Zusatz kultiviert. In Lämmli-puffer homogenisiert, im 10% Gel getrennt und geblotet wurde mit dem anti-p75^{NTR} Gerbull Serum (links, 1:3000) bzw. dem anti-MAP1B N1-15 Serum (rechts, 1:1000) geprobt. Während mit dem N1-15 Serum kein signifikanter Einfluss auf den Gehalt des N-Terminus von MAP1B festgestellt werden konnte, zeigte das Gerbull Serum eine Runterregulation von p75^{NTR} sowohl in Gegenwart von NGF als auch von BDNF.

6.2.16 Neurotrophin abhängige Runterregulation von p75^{NTR} in Körner Zellen

Die Untersuchung von Körnerzellen führte jedoch zu einem überraschenden Ergebnis. Zwar konnte keine Regulation der Proteolyse von MAP1B gezeigt werden, dafür zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Neurotrophine auf den Expressionslevel von p75^{NTR}. So wurde p75^{NTR} nach drei Tagen sowohl in Gegenwart von NGF als auch von BDNF um rund 30% bzw. 40% herunterreguliert (Abbildung 21 (A)). Dies ist bemerkenswert, da Körnerzellen zwar den BDNF Rezeptor TrkB und den NT3 Rezeptor TrkC nicht jedoch den NGF-Rezeptor TrkA exprimieren. Die Runterregulation der Expression von p75^{NTR} durch NGF muß daher über den Neurotrophin-rezeptor p75^{NTR} selbst erfolgen.

Interessanterweise verhalten sich BDNF und NT3 unterschiedlich. Zwar sind die Trk Rezeptoren beider Neurotrophine exprimiert und beide können gleichermaßen an p75^{NTR} binden, trotzdem führt nur BDNF nicht aber NT3 zur Runterregulation von p75^{NTR}.

Körnerzellen proliferieren in der äußersten Schicht des Cerebellums („external granule layer“ (EGL)), migrieren dann mit zunehmender Differenzierung durch die sog. Molekulare Schicht („molecular layer (ML)) bis zur inneren Körnerzellschicht („inner granule cell layer“ (IGL)). Das Einwandern beginnt und endet in der zweiten postnatalen Woche (Goldowitz and Hamre, 1998). P75^{NTR} konnte *in vivo* während

dieser Differenzierungsstadien in den entsprechenden Schichten des Cerebellum detektiert werden (Abbildung 22). Ob die Abnahme der p75^{NTR} Expression ursächlich oder nur rein korrelativ mit der Ausdifferenzierung der Körnerzellen zusammenhängt, ist Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen.

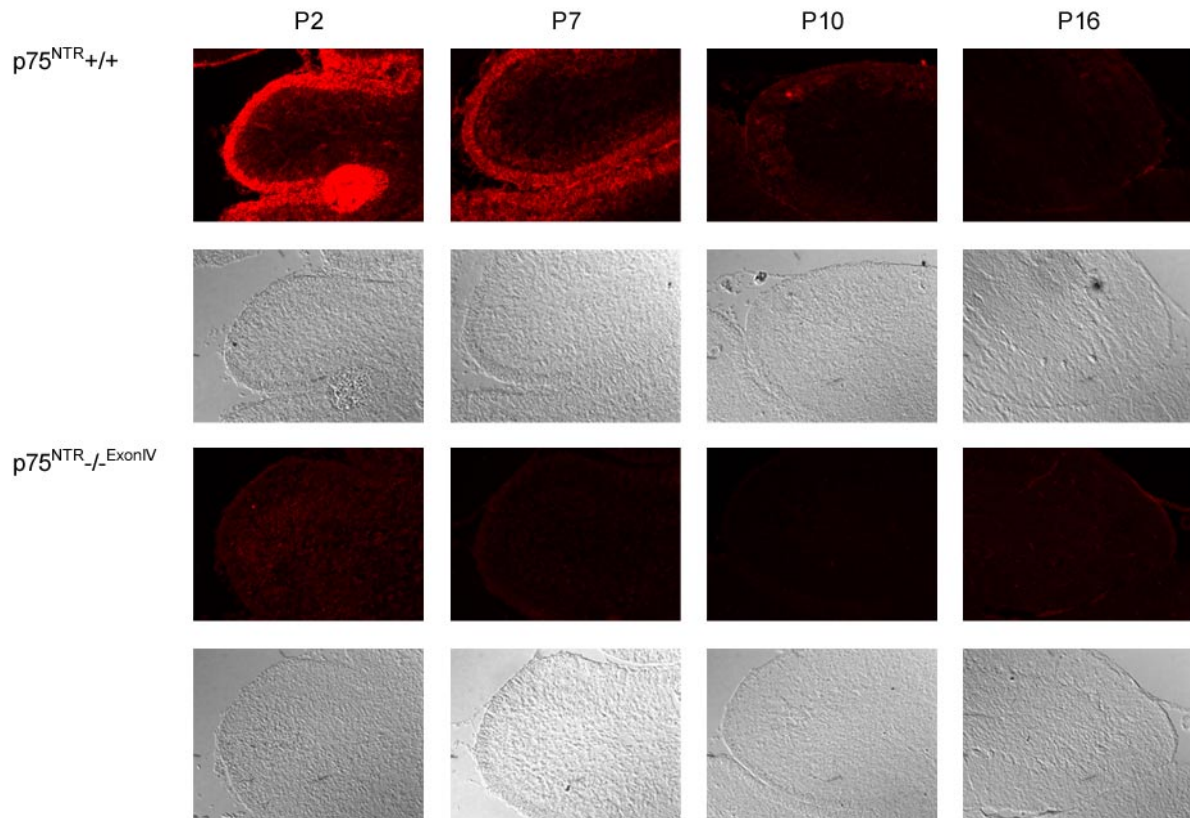


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung von p75^{NTR} mit dem Gerbull Serum in Parasagittalschnitten des Cerebellum

Cerebella von 2, 7, 10 und 16 Tage alten Mäusen wurden in PFA fixiert, eingebettet und eingefroren. Es wurden 10 µm dicke Kryotomschnitte hergestellt. Es wurde mit dem p75^{NTR}-spezifischen Gerbull Serum (1:500) inkubiert und mit Cy3 gekoppeltem anti-Kaninchen Serum detektiert. Es wurden jeweils Fluoreszenzaufnahmen und dazugehörige Hellfeldaufnahmen der Schnitte von p75^{NTR}+/+ und p75^{NTR}-/-ExonIV Tieren aufgenommen (20fache Vergrößerung). P75^{NTR} ist vor allem in der proliferierenden äußeren Zellschicht exprimiert, kann aber schwächer auch in P7 und P10 Schnitten in tieferen Cerebellumsschichten detektiert werden. Nach Abschluss der Proliferation und Migration von Körnerzellen ist in Schnitten von P16 Tieren kein p75^{NTR} Signal mehr feststellbar.