

7 Diskussion

7.1 Biochemische Reinigung eines intrazellulären Interaktors von p75^{NTR}

Diese Arbeit wurde zu einem Zeitpunkt begonnen, als große Fortschritte im Verständnis der funktionellen Rolle von p75^{NTR} gemacht wurden. So zeigte sich, dass p75^{NTR} nicht nur als Korezeptor die Bindungsaffinität der Tyrosinkinase-Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC moduliert (Chao and Hempstead, 1995; Huber and Chao, 1995; Ross et al., 1996; Gargano et al., 1997), sondern auch als eigenständiger Rezeptor fungiert. Überraschenderweise zeigte sich p75^{NTR} jedoch nicht als Überlebensvermittelnder Rezeptor wie die Trk-Rezeptoren sondern als Zelltodrezeptor ((Bamji et al., 1998), (Davey and Davies, 1998), (Casaccia-Bonnel et al., 1996), (Frade et al., 1996)). Obwohl p75^{NTR} zwar alle Neurotrophine mit ähnlicher Affinität bindet, wurde das Zelltodsignal jedoch nicht von allen Neurotrophinen gleichermaßen ausgelöst. Die zugrunde liegenden Signalwege waren unbekannt. Bis zum Beginn dieser Arbeit konnten nur die Beteiligung von Sphingomyelin in Zelllinien (Dobrowsky et al., 1994) und NF κ B in Schwannzellen (Carter et al., 1996; Cosgaya and Shooter, 2001) gezeigt werden. Ein direkter intrazellulärer Interaktor von p75^{NTR} war auch 10 Jahre nach der Klonierung des Rezeptors nicht publiziert.

Das inzwischen vielfach und häufig erfolgreich angewandte *Yeast-Two-Hybrid*-System zum Klonieren von Proteininteraktoren hatte bis zum Beginn dieser Arbeit nicht zur Publikation eines Interaktors von p75^{NTR} geführt. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein. Zum einen findet bei dieser Technik die Interaktion im Zellkern statt, dessen biochemische Eigenschaften sich deutlich von den Bedingungen an der Plasmamembran unterscheiden. Ferner werden im *Yeast-Two-Hybrid*-System nur Proteinteile exprimiert. Die Ausbildung funktionaler Sekundär- und Tertiärstrukturen mag dadurch häufig nur unvollständig erfolgen. Zudem können weitere Moleküle zur Bildung eines stabilen Komplexes notwendig sein, etwas das vom *Yeast-Two-Hybrid*-System kaum erfasst werden kann. Es wurde daher versucht, ähnlich wie zur Identifikation von Interaktoren verwandter Rezeptoren auf die Methoden klassischer biochemischer Reinigungen zurückzugreifen (TNFR2 (Rothe et al., 1994), Fas (Kischkel et al., 1995; Muzio et al., 1996)).

Werden in Zelllinien exogene Rezeptoren exprimiert, so müssen die Komponenten für die intrazelluläre Signalweiterleitung nicht vorhanden sein. Wenn der exprimierte Rezeptor ein Zelltodrezeptor ist, so ist darüber hinaus die Vermehrung von Zellen mit fehlender oder defekter Signalweiterleitung bevorzugt. Beides stellt daher die erfolgreiche Reinigung eines intrazellulären Interaktors in Frage. Zentral für diese Arbeit

war daher die Wahl von Gehirn als Ausgangsmaterial. Während der Entwicklung bis kurz nach der Geburt von Mäusen findet sich p75^{NTR} dort endogen exprimiert (Yan and Johnson, Jr., 1988; Yan and Johnson, Jr., 1987). Die Wahl der Maus als Ausgangsorganismus wurde durch die Produktion der ersten vollständig p75^{NTR}-freien Maus durch Georg Dechant ((von Schack et al., 2001)) in unserem Labor bestimmt. Da kein zelluläres oder biochemisches Assaysystem zur Evaluierung von potentiellen Interaktoren zur Verfügung stand, war die Existenz dieser Mäuse für zwei der drei unternommenen Reinigungsansätze für Kontrollreinigungen unerlässlich.

Es wurden drei Reinigungsansätze in Betracht gezogen:

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

7.1.1 Affinitätsreinigung in Gegenwart des extrazellulären Liganden

Alle vier Neurotrophine binden mit ähnlichen Affinitäten an p75^{NTR}. Nicht alle Liganden führen zur gleichen biologischen Reaktion. Es kann daher angenommen werden, dass unterschiedliche Liganden auf unterschiedliche intrazelluläre Interaktoren wirken. Die Reinigung eines intrazellulären Interaktors sollte idealerweise daher in Gegenwart extrazellulärer Liganden erfolgen.

Die Wahl der Reinigungsmethode hängt zentral von der Konzentration der zu reinigenden Komponenten ab. Der direkteste biochemische Zugang zu Interaktoren ergibt sich über die Techniken Immunpräzipitation und Affinitätschromatographie. Insofern wurde untersucht, ob die Konzentration von p75^{NTR} in Gehirnhomogenaten die Anwendung dieser Techniken zulässt. Die Konzentration von p75^{NTR} in Gehirnhomogenaten wurde bestimmt. In sieben Tage alten Mäusen beträgt sie 15.4 ± 1.0 ng/ml Gehirnhomogenat bzw. 49.3 ± 3.1 ng p75^{NTR} pro Gehirn. Zur Identifizierung eines unbekanntes Proteins werden rund 500-1000 ng gereinigtes Protein benötigt. Bei einer Konzentration von 15 ng/ml p75^{NTR} ist selbst unter Annahme einer 100%igen Ausbeute sowohl p75^{NTR}s als auch seines Interaktors ein Minimum von 35-70 ml Homogenat erforderlich. Große Volumina stellen bei Affinitätschromatographien im Gegensatz zu Immunpräzipitationen kein Hindernis dar. Die Säule kann mit großen

Mengen im Durchfluss beladen werden und leicht und ausgiebig gewaschen werden. Um die Neurotrophine für den p75^{NTR}-Interaktorkomplex frei zugänglich anzubieten, sollten myc-markierte Neurotrophine über das myc-Epitop mit einem Antiserum ausgerichtet und nicht kovalent an das Säulenmaterial gebunden werden.

Es kann jedoch angenommen werden, dass aufgrund von sterischer Unzugänglichkeit, Denaturierung und Verlust beim Waschen nur maximal 10% der immobilisierten Neurotrophine von p75^{NTR} Molekülen gebunden werden. Mit ebenfalls 10% Ausbeute kann auch die Bindung des löslichen Interaktors an p75^{NTR} angenommen werden. Um 500-1000 ng Interaktor zu reinigen, muss daher unter optimalen Bedingungen mindestens der 100fache Überschuss an Liganden an der Säule vorgelegt werden (NGFmyc->50 µg). Um Unwägbarkeiten wie z.B. geringe Affinität oder schnelle Dissoziation in die Berechnung mit einzubeziehen, müssen daher 500-2500 µg myc-markiertes Neurotrophin an das Säulenmaterial gebunden werden (siehe hierzu auch (Harlow and Lane, 1988)). Im Rahmen dieser Arbeit produzierte stabile Zelllinien (Daten nicht gezeigt) sezernieren jedoch nicht mehr als 37 ng/ml NGFmyc in das Medium. Dies macht die Produktion von 50-250 Litern (=500-2500 µg NGFmyc) konditionierten Mediums pro Säule notwendig. Da die Lebensdauer einer solchen Säule zudem stark begrenzt ist, ist dieser Ansatz nicht praktikabel. Höhere Expressionslevel erhält man in Hefezellen oder Baculovirus infizierten Insektenzellen. Beide Systeme standen zum Zeitpunkt dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe nicht zur Verfügung. Zudem ist bei den hohen Expressionsraten in diesen Systemen anzunehmen, dass nur ein Teil des produzierten Neurotrophins tatsächlich vollständig gefaltet und glucosyliert und somit funktionell intakt ist.

7.1.2 Affinitätsreinigung über die intrazelluläre Domäne

Zur Reinigung eines Interaktors wurde daher die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} verwendet. Zwar geht die Ligandenabhängigkeit im experimentellen Ansatz verloren, doch ergeben sich dem vorangegangenen Ansatz gegenüber deutliche Vorteile:

Die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} kann in großen Mengen hergestellt werden. Somit ergibt sich die Möglichkeit, Interaktoren aus großen Volumina von homogenisiertem Mäusegehirn mit Hilfe von Affinitätschromatographie zu reinigen. Zudem muss kein Detergenz zur Solubilisation eingesetzt werden, da keine Transmembrandomäne im Protein vorhanden ist. Dadurch besteht nicht wie bei 7.1.1 die Gefahr, zusammen mit den Membranen auch Interaktoren von p75^{NTR} abzutrennen. Nicht

zuletzt eröffnet sich durch *in vitro* Translation die Möglichkeit, die intrazelluläre Domäne radioaktiv zu markieren und als Probe für sensitive Techniken wie die Overlayblot Technik zu verwenden.

Darüber hinaus wurde mittels NMR-Spektroskopie gezeigt, dass die bakteriell exprimierte intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} eine vollständig gefaltete *Death*-Domäne besitzt (Liepinsh et al., 1997; Liepinsh et al., 1997). In anderen Zelltodrezeptoren der Proteinfamilie ist insbesondere diese Domäne für die Assoziation von Interaktoren verantwortlich (Feinstein et al., 1995). Darüber hinaus führte dieser Ansatz auch bei den verwandten Rezeptoren TNFR2 und Fas zur Reinigung intrazellulärer Interaktoren (Rothe et al., 1994; Kischkel et al., 1995).

Die Bindung zweier Proteine in Lösung ist in hohem Grad von den Eigenschaften des Puffers abhängig. Salzzusammensetzung, Salzkonzentration, pH, Temperatur und Flussgeschwindigkeit sind wichtige während einer Affinitätschromatographie zu optimierende Parameter. Da über Interaktoren von p75^{NTR} nichts bekannt war, konnten diese Parameter nicht wesentlich eingeschränkt werden. Zudem stand kein biologischer oder biochemischer Assay zur Verfügung, der Veränderungen der Parameter bewertbar gemacht hätte. Die Etablierung eines Testsystems, das mit geringen Probenmengen in kurzer Zeit Interaktoren detektieren konnte, war daher für den Erfolg dieser Arbeit von Nöten. Damit sollte einerseits die Parameteroptimierung einer Affinitätsreinigung andererseits die Verfolgung der fortschreitenden Anreicherung von Interaktoren in Homogenatfraktionierungen ermöglicht werden.

7.1.2.1 Proteininteraktionsmessungen mit der BIAcoremaschine

Ein solches Testsystem stellt die BIAcore Maschine dar. Protein wird in einer kleinen Probenkammer an einer Matrix immobilisiert und löslichen Proteinproben ausgesetzt. Der zur Detektion verwendete „Surface Plasmon Resonance“-Effekt lässt die Detektion eines Interaktors in Konzentrationen von bis zu einem Zehntel der Dissoziationskonstanten zu. Aufgrund des geringen Volumens und der daraus resultierenden Vernachlässigbarkeit kinetischer Effekte können sehr unterschiedliche Pufferbedingungen in kurzer Zeit getestet werden.

Es wurde die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} kovalent an die BIAcorematrix gebunden. Es konnte gezeigt werden, dass sie zugänglich sowohl für kleine Proteine und kleine Interaktionen (Abbildung 4, His-IZD + Mg/Zn) als auch für große Proteine mit starker Bindungsaffinität (ebendort anti-p75^{NTR} Chao, anti-p75^{NTR} Alf) war.

Spezifische Interaktionen konnten von unspezifischen unterschieden werden (ebendort anti-TrkA, anti-myc 9E10).

Die Interaktion mit dem gereinigten intrazellulären Interaktor NRIF1 konnte überraschenderweise nicht detektiert werden. Auch der Einsatz unterschiedlicher Pufferzusammensetzungen, die sich an den von Dr. Elisabeth Casademunt etablierten Bedingungen zur NRIF1-p75^{NTR} Immunpräzipitation orientierten, ermöglichte keine messbare Interaktion. Unterschiedliche Ursachen mögen dem zugrunde liegen: Erstens fehlen im BIAcoreansatz die Salzkomponenten, die dem Immunpräzipitationsansatz aus den lysierten Zellen zugeführt werden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass trotz weitreichender Puffervariation die für die BIAcoremaschine geeigneten Bedingungen nicht gefunden wurden. Zweitens fand die von Dr. Elisabeth Casademunt durchgeführte Immunpräzipitation in Zelllysaten statt. Die Beteiligung zytosolischer Proteine, die im BIAcoreansatz fehlten, könnte die Interaktion von NRIF1 und p75^{NTR} stabilisiert haben. Und drittens zeigte sich das gereinigte NRIF1-Protein als sehr instabil. Durch Proteolyse kann die Bindungsfähigkeit verloren gegangen sein. Zudem können Abbauprodukte mit der Interaktion interferiert haben. Wie sich später herausstellte, interagiert NRIF1 tatsächlich noch mit mindestens TRAF6 (Gentry et al., 2001), einem intrazellulären Interaktor des mit p75^{NTR} verwandten TNF-Rezeptors.

In Ermangelung einer weiteren Positivkontrolle wurden direkt Gehirnextrakte auf Interaktion getestet. In den Lysaten sollten alle auch nur peripher an der Bindung beteiligten Proteine vorhanden sein. Trotz Variation der Salzkomponenten im Puffer konnte nur eine „negative Bindung“, also eine unspezifische Interaktion mit dem Matrixmaterial detektiert werden. Auch nach Abtrennung hochmolekularer Komponenten durch Zentrifugation konnte nur unspezifische Bindung festgestellt werden. Ein schwaches spezifisches Bindungssignal kann dadurch verdeckt sein. Es kann aber auch die Konzentration des Interaktors zu gering gewesen sein. Für einen schwachen Interaktor ($K_D=10^{-6}$ mol/l, Molekulargewicht = 30 000 g/mol) wäre bei einer Sensitivitätsgrenze von $0.1 \times K_D$ immerhin eine Konzentration von 3 µg/ml notwendig. Für einen starken Interaktor ($K_D=10^{-9}$ mol/l, M=30 000 g/mol) hingegen sollte bereits eine Konzentration von 3 ng/ml ausreichen. Die Anwendung einer sensitiveren Technik und eine weitere Anreicherung möglicher Interaktoren waren daher geboten.

7.1.2.2 Interaktorendetektion mit Overlayblots

Die drastischste Form der Anreicherung wird in der Overlayblot-Technik erreicht. Hier werden die Proteine eines zytosolischen Extrakts durch SDS-Gelelektrophorese ihrer Molekülmasse entsprechend im Gel in sehr kleinem Volumen angereichert. Die lokale Konzentration erreicht durch die Reduktion des Volumens auf die Fläche beim Bloten ein Maximum. Diese Blots werden mit löslichem p75^{NTR} auf Interaktoren geprobt. Durch radioaktive Markierung der p75^{NTR} Proben wird eine weitere Steigerung der Sensitivität gegenüber der BIAcore Maschine und der Affinitätschromatographie erreicht. Der gesuchte Interaktor wird zwar im SDS-Gel denaturiert, wurde jedoch auf der Blotmembran Renaturierungsschritten unterworfen. Auch wenn die Renaturierung nur unvollständig erfolgt sein mag, so sollten insbesondere die kleineren, unglycosylierten, zytosolischen Proteine zumindest eine Teilrenaturierung ihrer Sekundärstruktur erfahren haben.

Mit dieser Technik ergibt sich erneut die Möglichkeit, die Ligandenabhängigkeit des p75^{NTR} Signals zu berücksichtigen. Hierzu wurden radioaktiv markierte Neurotrophine kovalent an p75^{NTR} gebunden und auf die Membranen gegeben. Alle detektierten Signale konnten auf die Bindung der Neurotrophine, nicht aber von p75^{NTR} an Proteine auf der Membran zurückgeführt werden. Wie schon zuvor erwähnt sind Neurotrophine stark basische Proteine und interagieren auf Grund ihrer Ladung unspezifisch mit vielen Proteinen.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde anschließend wiederum nur die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} als Probe verwendet. Die radioaktiv markierte, *in vitro* translatierte intrazelluläre Domäne ergab eine große Anzahl deutlicher Signale. Alle diese Signale konnten jedoch ebenfalls mit der Kontrollprobe detektiert werden. Da unbekannt war, zu welchem Zeitpunkt in der Entwicklung des Mäusegehirns die Konzentration von Interaktoren am größten ist, wurden Extrakte unterschiedlicher postnataler Alter geprobt (Daten nicht gezeigt). Da in der Retina das Zelltodsignal über p75^{NTR} gezeigt werden konnte, wurden auch Retinaextrakte geprobt (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurden unterschiedliche durch Zentrifugation angereicherte Extrakte getestet (Daten nicht gezeigt).

Alle diese Experimente lieferten keinen Ansatzpunkt zur Reinigung eines Interaktors. Ein mögliches Problem mag der allen Experimenten gleichermaßen zugrunde liegende Ansatz darstellen, die p75^{NTR} Interaktorbindung erst nach Homogenisation unter *in vitro* Bedingungen herzustellen. Unphysiologische Pufferbedingungen, das

Fehlen weiterer Bindungsproteine oder durch die Homogenisation veränderte posttranslationale Modifikationen mögen die Ursache dafür sein, dass keine Interaktoren detektiert werden konnten.

7.1.3 Anreicherung des Rezeptor-Interaktorkomplexes in einer funktionell charakterisierten, subzellulären Fraktion

Interaktoren sollten im Zustand der Bindung an p75^{NTR} angereichert werden. Zwei unterschiedliche Kompartimente boten sich für diesen Ansatz an: Erstens konnte die Lokalisation von p75^{NTR} in Caveolae gezeigt werden (Bilderback et al., 1997). Zweitens besitzt p75^{NTR} ein PDZ-Bindungsmotiv, was seine Lokalisation z.B. in der postsynaptischen Dichte vermuten lässt. Präparationen beider Kompartimente wurden vorgenommen.

Caveolae sind sphingomyelin- und caveolinreiche Membrandomänen. In der Literatur sind zwei unterschiedliche Protokolle zu ihrer Präparation beschrieben (Okamoto et al., 1998). Einerseits werden sie als Triton X-100-, andererseits als NaCO₃-resistente Membranfraktionen definiert. Grundlage beider Präparationen ist, dass sich der Solubilisierung widerstehende Membranvesikel bilden. Werden diese mit einem Saccharosegradienten abnehmender Dichte überschichtet, so schwimmen sie ihrer Zusammensetzung entsprechend bis zu einer ihnen charakteristischen Dichte auf.

Überraschenderweise fand sich p75^{NTR} nur in NaCO₃- kaum aber in Triton X-100-Präparationen in als Caveolae bezeichneten Fraktionen. Dies mag mit den Befunden von Bilderback et al. übereinstimmen, wo eine Reduzierung des Signals erwähnt, nicht aber gezeigt wird.

Dem unterschiedlichen Verhalten von p75^{NTR} in den Triton X-100- im Gegensatz zur NaCO₃-Solubilisierungen kann zugrunde liegen, dass palmitoyliertes p75^{NTR}, wie für Ras und andere lipidmodifizierte Proteine gezeigt wurde (Song et al., 1996), von Triton X-100 aus den Caveolae herausgelöst wird.

Die von Bilderback et al. festgestellte Komigration von p75^{NTR} und Caveolin trifft, wenn überhaupt, nur auf einen sehr kleinen Teil des Triton X-100 Solubilisats zu. Im Gegensatz zu Bilderback wurde in dieser Arbeit jedoch kein 30%/5% Stufengradient sondern ein 35-15% kontinuierlicher Saccharosegradient verwendet, der das heterogene Verhalten der detergentunlöslichen Membranen sichtbar machte (siehe hierzu auch (Smart et al., 1995)).

Da das Ziel dieses Ansatzes die gemeinsame Reinigung von p75^{NTR} und intrazellulären Interaktoren unter physiologischen Bedingungen war, die NaCO₃ Präparation jedoch bei einem pH von 11.0 erfolgte, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

In der physiologischeren Triton X-100 Präparation hingegen ist die Ausbeute zu gering, als dass eine Reinigung Aussicht auf Erfolg gehabt hätte.

Auch die Reinigung von postsynaptischen Dichten zeigte das heterogene Verhalten von p75^{NTR}. Während der Großteil sich wiederum tritonlöslich zeigte und somit für den weiteren Verlauf der Reinigung verloren war, teilte sich der unlösliche Rest auf sehr unterschiedliche Präparationsfraktionen auf. Ob in der abschließenden gereinigten Fraktion p75^{NTR} vorhanden war, konnte aufgrund der äußerst starken Kreuzreaktivitäten des Serums nicht eindeutig ausgewertet werden. Da jedoch mit sehr großem Materialaufwand (10 g Mäusegehirn = 40 Gehirne) ein Gesamtproteingehalt von nur knapp 200 µg in der abschließenden Fraktion erhalten wurde, die wenn überhaupt nur geringe Mengen p75^{NTR} enthielt, führte auch dieser Ansatz nicht zu der gewünschten Anreicherung eines Interaktors.

7.1.4 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Für den Erfolg einer biochemischen Reinigung ist das Ausgangsmaterial essentiell. Es sollte in großem Umfang zugänglich sein und die zu reinigende Komponente nach Möglichkeiten stark exprimiert sein. P75^{NTR} ist in Neuronen während der Entwicklung exprimiert. Postnatal ist p75^{NTR} vor allem im Gehirn exprimiert. Eine weitere Eingrenzung auf eine Gehirnregion mit besonders hoher p75^{NTR} Konzentration war wegen der breiten Expression des Rezeptors nicht möglich. Obwohl im ZNS weit verbreitet wurde für p75^{NTR} nur eine niedrige absolute Expression von rund 50 ng pro Gehirn ermittelt. Die Reinigung über die physiologische Ligandenbindung erforderte wegen der sehr niedrigen p75^{NTR} Konzentration in Homogenaten den Einsatz im Rahmen dieser Arbeit nicht zu produzierend großer Mengen an Neurotrophenen.

Es wurde daher mit der *in vitro* hergestellten intrazellulären Domäne von p75^{NTR} gearbeitet. Dies erlaubte Vorexperimente für die Affinitätschromatographie mit der BIAcoremaschine. Diese Experimente deuteten auf eine geringe Konzentration auch des zu identifizierenden intrazellulären Interaktors hin. Eine deutliche Anreicherung mußte erreicht werden.

Die starke Anreicherung unter allerdings denaturierenden Bedingungen mit der Overlayblot-Technik führten zu keiner detektierten Bindung. Die Anreicherung unter physiologischeren Bedingungen in subzellulären Fraktionen zeigten ein sehr heterogenes Verhalten von p75^{NTR} und waren daher ebenfalls nicht zielführend.

Weitere Möglichkeiten der biochemischen Anreicherung sind die Gelfiltration und die Ionenaustauscherchromatographie. Aus den folgenden Gründen wurde jedoch eine prinzipielle Neuorientierung der Arbeit vorgenommen:

- 1) Im Verlauf dieser Arbeit zeigte sich der Rezeptor weit über seinen Einfluß auf Zellüberleben und Zelltod hinaus auch in unterschiedliche axonale Wachstumsprozesse (Walsh et al., 1999; Brann et al., 1999; Yamashita et al., 1999), Zellzykluskontrolle (Frade, 2000), Proliferation (Chittka and Chao, 1999; Salehi et al., 2000; Ye et al., 1999; Benzel et al., 2001), Differenzierung (Seidl et al., 1998) (Botchkareva et al., 1999), Schmerzkontrolle (Petersen et al., 1998), Neurotransmitterwechsel (Slonimsky et al., 2001) bis hin zu neuronaler Plastizität (M. Korte, persönliches Gespräch) involviert. Die Einbindung von p75^{NTR} in sehr unterschiedliche biologische Aktivitäten lässt auch sehr unterschiedliche intrazelluläre Signalwege vermuten. Um die Trennung der Signale zu ermöglichen, ist eine räumliche und zeitliche Trennung sowie eine geringe zelluläre Konzentration der Interaktoren anzunehmen. Da kein Organ bekannt ist, das in großen Quantitäten zugänglich ist und die endogene Anreicherung eines dieser intrazellulären Interaktoren vermuten lässt, erscheint eine Reinigung daher unmöglich.
- 2) In der Zwischenzeit sind eine große Zahl von intrazellulären Interaktoren publiziert worden (Bilderback et al., 1997; Khursigara et al., 1999; Chittka and Chao, 1999; Irie et al., 1999; Salehi et al., 2000; Bibel et al., 1999; Ye et al., 1999; Casademunt et al., 1999; Yamashita et al., 1999; Mukai et al., 2000; Kong et al., 2001; Wang et al., 2000; Benzel et al., 2001). Die große Zahl an Interaktoren, der Mangel an Daten, die außerhalb von überexprimierenden Zelllinien gewonnen wurden, und die Tatsache, dass die Interaktoren nahezu alle mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-System identifiziert wurden, lässt diese Interaktoren teilweise kritisch betrachten. Die Hauptfrage stellt sich trotzdem nicht mehr so dringend nach möglichen intrazellulären Interaktoren, sondern vielmehr nach der Aufklärung, ob und in was für Kontexten die identifizierten Interaktoren *in vivo* von p75^{NTR} aktiviert werden.
- 3) Aufgrund der mangelhaften Antiseren gegen p75^{NTR}, die z.B. die Auswertung der PSD-Fractionen verhinderte, wurden im Rahmen dieser Arbeit polyklonale Antiseren gegen die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} der Ratte produziert. Eins

dieser Seren deutete auf die Existenz weiterer p75^{NTR} ähnlicher Moleküle hin. Wie im folgenden beschrieben konnte eine große Zahl weiterer Hinweise auf solche Moleküle gesammelt werden. Es wurde daher das produzierte Antiserum genutzt, ein Protein mit Homologie zu p75^{NTR} zu reinigen.

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

7.2.1 Antiserenhinweise auf p75^{NTR}-ähnliche Moleküle

Die Produktion von neuen p75^{NTR} Antiseren erfolgte zu einem Zeitpunkt, als mit RT-PCR eine um wesentliche Teile der extrazellulären Domäne verkürzte Splicevariante von p75^{NTR} detektiert wurde (von Schack et al., 2001). Wie sich zeigte, war der zuvor von Lee et al. (Lee et al., 1992) produzierte *Knockout* (p75^{NTR}-/-^{ExonIII}) unvollständig, da diese Spliceform dort noch immer exprimiert wurde. Mit den herkömmlichen p75^{NTR} Seren war eine Detektion der Splicevariante auf Proteinlevel nicht möglich gewesen. Interessant war daher die Beobachtung, dass die neu produzierten Antiseren im Teil-*knockout* von Lee (p75^{NTR}-/-^{ExonIII}) ein diffuses verbleibendes Signal zeigten, während in dem vollständigen *Knockout* von Georg Dechant (p75^{NTR}-/-^{ExonIV}) kein Signal zurückblieb (Abbildung 8). Überraschenderweise lieferte das Freundl Antiserum jedoch sowohl in p75^{NTR} wildtyp Mäusen als auch im p75^{NTR}-/-^{ExonIII} Teil-*Knockout* und sogar in Homogenaten des vollständigen p75^{NTR}-/-^{ExonIV} *Knockout* zusätzliche sehr starke Signale. Die Möglichkeit, dass p75^{NTR} somit nicht nur eine funktionelle Splicevariante sondern gar ein ganzes Homolog zur Seite stehen könnte, erschien von großem Interesse.

Strukturelle Homologie ist häufig die Grundlage auch funktioneller Verwandtschaft. Diese zeichnete sich in den detektierten Antigenen ab. Es wurde sowohl eine vergleichbare entwicklungsabhängige Regulation der Expression von p75^{NTR} und der Freundl Antigene, als auch ihre zeitgleiche Lokalisierung in der kleinen Neuronenpopulation im Nucleus Basalis Meynert und dem diagonalen Band von Broca beobachtet (Abbildung 13).

Ein weiterer Hinweis auf die Existenz zu p75^{NTR} funktionell verwandter Proteine konnte ausgemacht werden. So zeigte sich in dem vollständigen p75^{NTR}-/-^{ExonIV} *Knockout* nicht nur das überraschende p75^{NTR}-ähnliche Westernblotsignal, sondern auch eine p75^{NTR}-ähnliche Bindungsstelle, die jedoch leider nicht mit chemischen Vernetzern weiter charakterisiert werden konnte (Abbildung 14).

Strukturelle Homologie, zeitgleiche Expression, charakteristische Bindungsübereinstimmung und nicht zuletzt die in der Einleitung beschriebene Sonderrolle p75^{NTR}s in seiner Rezeptorfamilie deuteten daher auf die Existenz p75^{NTR}-ähnlicher Proteine.

7.2.2 Reinigung der p75^{NTR}-ähnlichen Proteine

Während sich die Reinigung eines intrazellulären Interaktors von p75^{NTR} im ersten Teil dieser Arbeit unter anderem wegen des Fehlens eines Assaysystems als problematisch erwies, bot sich mit dem Freundl Serum ein hervorragendes Werkzeug zur Etablierung einer Reinigungsprozedur der Freundl Antigene.

Die Reinigung erfolgte über klassische chromatographische Reinigungsverfahren. Im Laufe der Reinigung offenbarten sich weitere interessante Aspekte der Antigene. So reichert sich erstaunlicherweise viele Proteine gleicher Größe sowohl an Ionenaustauschern als auch in Gelfiltrationen und selbst bei 2D-Gelelektrophorese an, so dass eine Identifikation der Antigene nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Die Existenz eines großen heterogenen Komplexes musste daher angenommen werden. Das Elutionsverhalten von der Ionenaustauschersäule zeigte sich dementsprechend breit. Zudem erwies sich der Komplex als sehr groß. In Gegenwart von Kalzium konnten die Antigene bereits in 10-minütiger Zentrifugation mit nur 1500 g präzipitiert werden (Abbildung 11). Die Gegenwart von Detergenz änderte nichts an diesem Verhalten (Daten nicht gezeigt). In Abwesenheit von Kalzium allerdings verblieben die Antigene im Überstand. Dieser Übergang erwies sich als dynamisch: wurde das Pellet samt Antigenen in Gegenwart von Kalzium resuspendiert und nach 2 Stunden erneut zentrifugiert, so fanden sich die Antigene nun im Überstand (Abbildung 11).

Da Kalzium in eine große Zahl sehr unterschiedlicher Mechanismen involviert ist, legt die Analyse dieser Beobachtung unterschiedliche zugrunde liegende Mechanismen nahe. Dieser Übergang könnte durch die Wirkung einer kalziumabhängigen Protease erklärt werden. Jedoch wirkt diese nicht auf die Freundl Antigene, da sich deren Laufverhalten im Gel nicht verändern. Zudem ist nicht mit der Aktivität einer breit wirkenden Protease zu rechnen, da nur ein kleiner Teil des übrigen Proteins aus dem Pellet in den Übergang wechselt.

Wahrscheinlicher sind daher zwei weitere Vorgänge: Die Freundl Antigene zeigten sich phosphoryliert. Daher kann zusammen mit einer kalziumabhängigen Veränderung dieser posttranslationalen Modifikationen die Affinität zum Komplex gelöst worden sein. Vermutlich parallel dazu mag dem Fraktionswechsel darüber hinaus die Veränderung des Bindungspartners zugrunde liegen, was in Anbetracht der später aufgeklärten Identität der Freundl Antigene als Mikrotubuli assoziierte Proteine wohl das wahrscheinlichste ist. So ist vor allem die rasche Depolymerisation von Mikro-

tubuli in Abhängigkeit von Kalzium ab einer Konzentration von nur 0.5 mM beschrieben (Tran et al., 1997; Gal et al., 1988; O'Brien et al., 1997).

Unter Ausnutzung dieses Fraktionswechsels mit nachfolgender Ionenaustauscher- und Reverse Phase Chromatographie konnte eine effiziente und schnelle Reinigungsprozedur etabliert werden. Aufgrund des kalziumabhängigen Westernblotsignals war eine Quantifizierung der Reinigungseffizienz nicht möglich. Trotz des starken Sensitivitätsverlusts des Serums im abschließenden Elutionsschritt war die Zuordnung der Westernblotsignale zu den sehr deutlich angereicherten Proteinen im Gel eindeutig möglich. Die Proteine wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF und Nano-ESI Massenspektroskopie untersucht. Alle untersuchten Peptide der analysierten Proteine zeigen vollständige Übereinstimmung mit Peptiden des N-Terminus des Mikrotubuli Assoziierten Protein 1B (MAP1B). Die anschließende Detektion der Freundl Antigene mit einem gegen den Aminoterminus von MAP1B spezifischen Antiserum bestätigten eindeutig ihre Identität.

7.2.3 Was ist MAP1B

MAP1B ist ebenso wie MAP1A, MAP2 und tau ein Mikrotubuli bindendes Molekül. Die genaue Funktion dieser Proteine entschlüsselt sich nur langsam, wird allerdings mit Neuritenwachstum und Mikrotubulistabilität in Verbindung gebracht. MAP1B ist Substrat einer großen Zahl sehr vielfältig regulierter Kinasen, Phosphatasen und Glucosidasen, die diese Proteine an einer Vielzahl von Positionen modifiziert (Abbildung 23). MAP1B wird vor allem neuronal exprimiert (Wiche et al., 1991; Schoenfeld and Obar, 1994). Es ist das erste detektierbare Mikrotubuli assoziierte Protein im sich entwickelnden Gehirn (Bloom et al., 1985; Tucker et al., 1989). Bereits 14 Tage nach der Befruchtung ist es nachweisbar (Fawcett et al., 1994) und wird mit fortschreitender Entwicklung des Gehirns herunterreguliert (Riederer et al., 1986). Die Expression bleibt in plastischen Arealen allerdings auch im adulten Gehirn erhalten (Viereck et al., 1989; Schoenfeld et al., 1989; Bloom et al., 1985; Tucker and Matus, 1988). Im peripheren Nervensystem bleibt die Expression auf hohem Level konstant (Ma et al., 1997). Während Regenerationsprozessen verändert sich der Expressionslevel nicht. Nur im PNS kommt es zu erhöhter Expression in Schwann Zellen (Ma et al., 1999). *Knockout*-Mäuse sind lebensfähig, zeigen allerdings schwere neuronale Defekte. Im peripheren Nervensystem kommt es zu reduzierter Axonenzahl, mangelhafter Myelinisierung und verlangsamter Reizweiterleitung. Im Gehirn homozygoter MAP1B^{-/-} Mäusen fehlt das Corpus Callosum und Bündel fehlgeleiteter Axone sind

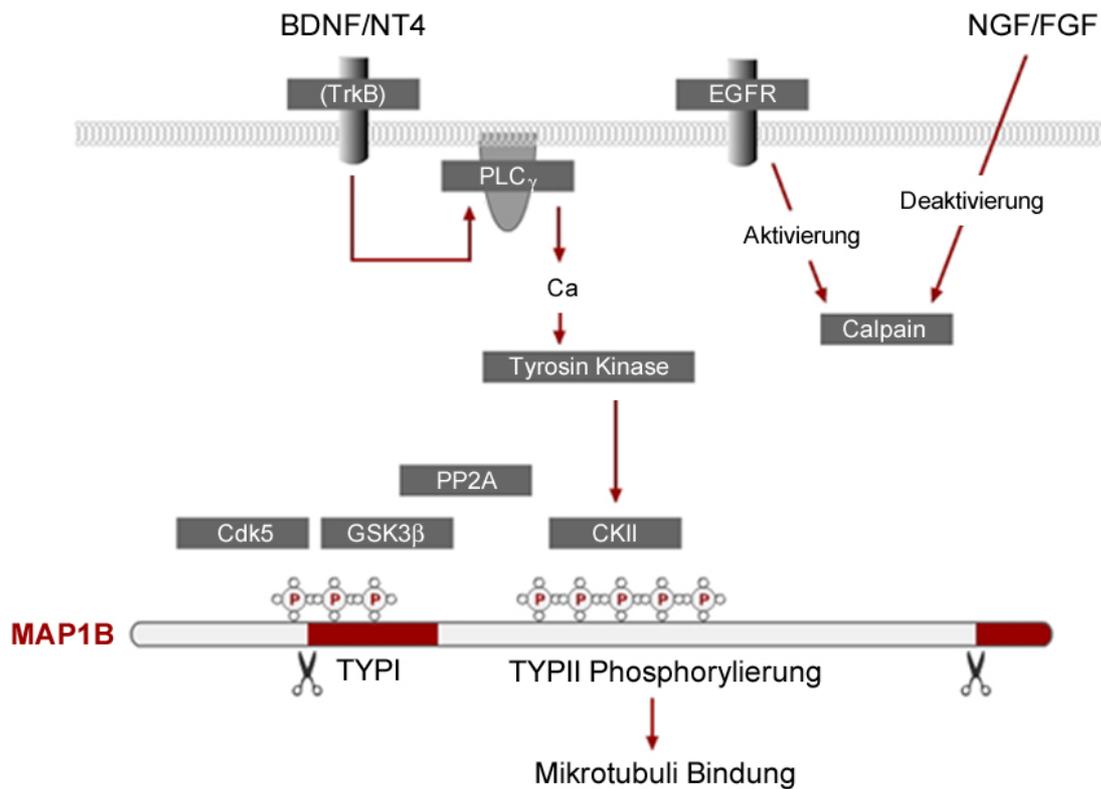


Abbildung 23: MAP1B

MAP1B ist 2463 AA groß. Der C-Terminus (rote Kappe rechts) wird abgespalten und lagert sich an den N-Terminus (links) an. Die nicht näher charakterisierten Typl und Typll Phosphorylierungen sind willkürlich plaziert. In dieser Arbeit wurde der N-Terminus gereinigt. Die Calpainschnittstelle ist vor der ebenfalls rot markierten Mikrotubulibindungsdomäne eingezeichnet. Aus der Literatur bekannte MAP1B modifizierende Proteine und sie regulierende Signalkaskaden sind angedeutet.

festzustellen (Meixner et al., 2000). Auch eine generelle Verlangsamung der neuronalen Entwicklung wurde beschrieben (Takei et al., 1997). In Kulturen neuronaler Zelllinien und primärer Neuronen wurde eine starke Korrelation von MAP1B Expression und axonalem Wachstum beobachtet (Boyne et al., 1995). Tatsächlich führt die Antisense Depletion des Proteins zur Verhinderung von Neuritenwachstum (Brugg et al., 1993). Ähnlich wie hyperphosphoryliertes Tau Protein (Grundke-Iqbal et al., 1986; Lovestone and Reynolds, 1997) findet sich hyperphosphoryliertes MAP1B in Ablagerungen in Alzheimer Patienten (Tangles) (Hasegawa et al., 1990; Ulloa et al., 1994b).

MAP1B besteht aus 2463 Aminosäuren (Lien et al., 1991; Lien et al., 1994). Die C-terminalen 263 Aminosäuren werden posttranslational abgespalten. Dieses rund 32 kD große Protein lagert sich als *Light Chain 1* (LC1) an den N-Terminus an (Hammarback et al., 1991; Wiche et al., 1991; Schoenfeld and Obar, 1994; Togel et al.,

1999). MAP1B besitzt eine recht kleine und von den anderen Mikrotubuli assoziierten Proteinen (MAPs) verschiedene Mikrotubulibindungsdomäne (Noble et al., 1989). Zusätzlich zu Mikrotubuli bindet es auch Actinfilamente (Pedrotti et al., 1996; Togel et al., 1998). Im Gegensatz zu anderen MAPs bindet es nur schwach an Mikrotubuli (Bloom et al., 1985). MAP1B ist stark phosphoryliert und auch Glukosylierungen und Phospholipidinteraktionen konnten nachgewiesen werden (Hart, 1997; Yamauchi et al., 1997). Der Einfluss der Phosphorylierung auf die Mikrotubulibindung und deren Stabilisierung wird widersprüchlich beschrieben (Lindwall Cole 1984; Goold et al., 1999; Brugg and Matus, 1991). Die subzelluläre Lokalisation ist phosphorylierungsabhängig (Ulloa et al., 1994a; Bush et al., 1996). Zwar sind einige Kinasen und auch Phosphatasen bekannt die auf MAP1B wirken (CKII (Diaz-Nido et al., 1988; Ulloa et al., 1993b; Ulloa et al., 1993a), GSK3 β (DiTella et al., 1996) (Lucas et al., 1998), CDK5 (Pigino et al., 1997), PP2A/PP2B (Gong et al., 2000)), eine genaue Analyse des Einflusses einzelner Phosphorylierungsstellen auf die Funktion von MAP1B wurde bisher jedoch nicht veröffentlicht.

7.2.4 Sequenzhomologie zwischen p75^{NTR} und MAP1B

Kreuzreaktivitäten von Antiseren können zwei Ursachen zugrunde liegen: Einerseits können sie durch Proteinverunreinigung beim Immunisieren der Tiere, andererseits durch strukturelle Homologien hervorgerufen sein. Da das Freundl Antiserum auch nach Affinitätsreinigung mit dem Antigen unverändert stark die Freundl Antigene im Westernblot detektierte, konnten Verunreinigungen ausgeschlossen werden.

Strukturelle Homologien können in der Primär-, Sekundär- oder Tertiärstruktur auftreten. Die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} zeigt diese drei Strukturmodi. Auch das zur Immunisierung verwendete bakteriell exprimierte Fusionsprotein ist vollständig gefaltet, wie von Liepinsh et al 1997 mittels NMR-Analyse gezeigt wurde. Das Freundl Antiserum präzipitiert allerdings nicht die nativen Freundl Antigene. Eine Homologie in der Tertiärstruktur ist daher auszuschließen, da, wie in dieser Arbeit gezeigt, keine hochaffinen und daher dauerhaft an p75^{NTR} haftenden Interaktoren existieren und somit kein Antikörperbindungsepitop von einem Interaktor verdeckt wird.

Da das Antiserum vor allem das durch die SDS-Gelelektrophorese denaturierte Protein detektiert, ist von einer Homologie auch nicht in der Sekundär- sondern in der Primärstruktur, also der Aminosäuresequenz, auszugehen.

Die Freundl Antigene konnten eindeutig als N-Terminus von MAP1B identifiziert werden. Da die Seren sehr sensitiv waren, stand zu vermuten, dass das zugrunde liegende Epitop groß wäre. Der Vergleich der beiden Proteinsequenzen zeigte zwei nahezu vollständig verschiedene Proteine. Einzig die Sequenz QRADxxESL mit sieben von neun identischen Aminosäuren zeigte große Homologie und kam daher als kreuzreagierendes Epitop in Frage.

Dieses Epitop enthält in MAP1B ein und in p75^{NTR} zwei Serine, die potentielle Phosphorylierungsstellen darstellen. Wie gezeigt kreuzreagieren auch p75^{NTR}-spezifische Antiseren stark mit MAP1B, wenn dieses dephosphoryliert wurde. Dieser Befund fände hier sein molekulares Korrelat. Das vorgenommene Peptidkompetitionsexperiment konnte das Epitop nicht als Ursache der Kreuzreaktivität bestätigen. Dieses Ergebnis ist allerdings kritisch zu betrachten:

- 1) Peptidkompetitionen bergen die Gefahr, dass das Peptid in anderer Konformation als das entsprechende Epitop im Protein vorliegt. Eine effiziente Konkurrenz könnte dadurch verhindert werden.
- 2) Eine Interaktion des Peptids mit dem MAP1B-Fragment ist denkbar. Auch in diesem Fall wäre keine Konkurrenz des Westernblotsignals notwendigerweise erkennbar. Dieser Gedankengang ist insofern interessant, als das Epitop in p75^{NTR} die sechste Helix der *Death*-Domäne, einem Protein-Protein-Interaktionsmodul, darstellt (Liepinsh et al., 1997). Tatsächlich wird auch das in dem Peptidkompetitionsexperiment verwendete 15 Aminosäuren lange Peptid von Programmen zur Vorhersage der Sekundärstruktur als helical angenommen (White et al., 1994).

Obwohl die Sequenz QRADxxESL nicht als Ursache für die Kreuzreaktivität bestätigt werden konnte, zeigt die Analyse, dass zukünftige Experimente die Bedeutung dieser interessanten Sequenz erkunden sollten. Zur Charakterisierung der Affinität dieses Epitops mit p75^{NTR} bieten sich wiederum die schon verwendeten Techniken des Overlayblots und der BIAcore-Maschine an. Um die Hürden der Peptidkompetition zu umgehen, wäre die Produktion unterschiedlicher Deletionsmutanten zur Verifikation der Sequenz QRADxxESL als Grundlage der Kreuzreaktivität zielführend.

7.2.5 Die MAP1B Fragmente

Es wurden MAP1B Fragmente unterschiedlicher Größe gereinigt. In allen angewandten chromatographischen Verfahren verhielten sich diese Fragmente gleich. Auch in der isoelektrischen Fokussierung zeigten alle einen nahezu einheitlichen pI von ca. 6.5 (Daten nicht gezeigt). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das unterschiedliche Laufverhalten auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen zurückzuführen ist. Dies ist für das vollständige MAP1B gezeigt und ist auch bei dem verwandten Mikrotubuli assoziierten Protein Tau ein bekanntes Verhalten (Pedrotti et al., 1996). Zudem konnte gezeigt werden, dass Calpain die für die Abspaltung der Fragmente verantwortliche Protease ist. Calpain proteolysiert seine Substrate zumeist nur an einer Position (Sato and Kawashima, 2001). Die Lokalisierung der in der Massenspektroskopie identifizierten Peptide zusammen mit den Daten über die Proteingröße und seinen isoelektrischen Punkt weisen die rund 600 ersten Aminosäuren als die zugrundeliegende Struktur aus. Die Bedeutung dieser Struktur wird in dem Abschnitt 7.2.7 ausführlich diskutiert.

Von großer Bedeutung ist, dass die Existenz des MAP1B-Fragments nicht nur in Gegenwart von 10 mM Kalzium sondern auch in Gegenwart von Calpaininhibitoren gezeigt werden konnte (Abbildung 18, B, C). Dabei wurden die Gehirne direkt in Lämmli-puffer mit Zusatz von EDTA und Proteaseinhibitoren homogenisiert. Während es hier durch die hohe Kalziumkonzentration im Gewebe während der Homogenisation zur Aktivierung von Calpain kommen könnte, wurde in Körnerzellkulturen hingegen das extrazelluläre Kalzium durch Waschen entfernt. Die Lyse hat dort insofern eine Verdünnung des intrazellulären Kalziums zur Folge. Eine kalzium-induzierte Calpainaktivierung kann daher ausgeschlossen werden. Zudem wurde beobachtet, dass Kalziumeinstrom durch z.B. den Ionophoren A23187 alleine nicht zur Aktivierung von Calpain ausreicht (Penna et al., 1999; Tremblay et al., 2000). Diese Experimente zeigen daher, dass MAP1B bereits vor der Homogenisation *in vivo* proteolysiert wurde.

7.2.6 Funktionelle Beziehungen zwischen p75^{NTR} und MAP1B

Ergibt sich aus der Primärstruktur nur eine periphere und spekulative Beziehung zwischen p75^{NTR} und MAP1B, so wird auf funktioneller Ebene eine überraschende und attraktive Beziehung deutlich: Beide Proteine sind hauptsächlich in Neuronen exprimiert. Beide zeigen eine starke Runterregulation zum Zeitpunkt der Ausdifferenzierung von Neuronen. Beide sind direkt in axonales Wachstum involviert. Und

Neurotrophine führen zur Signaltransduktion über $p75^{\text{NTR}}$ einerseits und regulieren MAP1B und MAP1B modifizierende Proteine andererseits.

Die Neurotrophinabhängigkeit von MAP1B ergibt sich auf zwei Ebenen. Einerseits regulieren die Neurotrophine die Expression von MAP1B, andererseits regulieren sie die MAP1B modifizierenden Proteine. So wurde gezeigt, dass NGF die MAP1B Expression hochreguliert (Aletta et al., 1988; Drubin et al., 1988). Die MAP1B modifizierenden Proteine Casein Kinase II und cdk5 werden neurotrophinabhängig aktiviert, bevor sie MAP1B phosphorylieren (Ulloa et al., 1993b; Tokuoka et al., 2000). Die Phosphorylierung von MAP1B ist essentiell für seine Funktion. Die Inhibition sowohl der Casein Kinase II als auch der cdk5 ebenso wie die Depletion von MAP1B führen zur vollständigen Unterbindung des Neuritenwachstum (Ulloa et al., 1993b; Pigino et al., 1997; Brugg et al., 1993). Auch die Kinase GSK3 β und die beiden Phosphatasen PP2A und PP2B sind in das Neuritenwachstum involviert und haben MAP1B als Substrat. Ihre Neurotrophinabhängigkeit ist nicht direkt gezeigt. Es ergeben sich jedoch gute Hinweise darauf, dass sie ebenfalls in neurotrophinabhängige Signalkaskaden involviert sind (Sanchez et al., 2001) (Blanquet, 2000).

Wie in dieser Arbeit gezeigt wird MAP1B zusätzlich zu den zuvor erwähnten Enzymen auch durch die Protease Calpain modifiziert. Interessanterweise wird auch die Aktivität von Calpain durch Neurotrophine reguliert (Oshima et al., 1989). Und auch dieses Protein ist, wie alle zuvor diskutierten, in Neuritenwachstum involviert. Im Gegensatz zu diesen beschleunigt sich jedoch das Wachstum, wenn seine Aktivität herabgesetzt wird (Shea et al., 1991) (Pinter et al., 1994). Interessanterweise kommt es auch ohne Neurotrophinzugabe nur durch Inhibition von Calpain zu Neuritenwachstum (Giasson et al., 1999). Ebenso wie die zuvor erörterten Proteine lässt sich daher eine funktionelle Beziehung zwischen $p75^{\text{NTR}}$ und auch Calpain herstellen. Es bietet sich sogar ein spekulativer Mechanismus der $p75^{\text{NTR}}$ -Calpain Modulation an:

Calpain ist eine kalziumabhängige Protease. Kalziumeinstrom durch glutamatabhängige Ionenkanäle kann mittels Calpain unter anderem zu Dendritenrückzug führen (Wilson et al., 2000). Auch Neurotrophine können mittels $p75^{\text{NTR}}$ einen Kalziumeinstrom bewirken (Jiang et al., 1999). Es kann daher ebenfalls mit einer Modulation der Neuritenarchitektur über Calpain gerechnet werden. Dieses Zusammenspiel wird auch durch die Existenz einer PEST-Sequenz in $p75^{\text{NTR}}$ nahegelegt (Large et al., 1989). So wurde gezeigt, dass Calpain an PEST-Sequenzen bindet (Shumway et al., 1999). Während die Beeinflussung der

Neuritenarchitektur mittels p75^{NTR} und Calpain noch nicht experimentell gezeigt wurde, konnte die Zusammenarbeit dieser beiden Moleküle jedoch in einem anderen biologischen Zusammenhang tatsächlich gezeigt werden: p75^{NTR} und Calpain sind in Zelltod involviert. Schon die Expression eines Teils der intrazellulären Domäne von p75^{NTR} führt zum Zelltod. Er wird jedoch durch exogene Inhibitoren von Calpain unterbunden (Coulson et al., 2000).

7.2.7 Calpain und der N-Terminus von MAP1B

Nachdem Neurotrophine, p75^{NTR}, Calpain, MAP1B modifizierende Enzyme und MAP1B selber sowohl molekular als auch funktionell in enge Beziehung gesetzt sind, muss nun noch eine besondere Eigenheit von Calpain hervorgehoben werden, die dem in dieser Arbeit gereinigten N-Terminus von MAP1B neue Bedeutung zuweist:

Eine Proteolyseerkennungssequenz für Calpain ist nicht bekannt. Die Calpainproteolyse resultiert nicht in einer Vielzahl kleiner und kleinster Fragmente. Vielmehr trennt diese Protease zumeist an nur einer einzigen Position funktionelle Domänen, z.B. regulatorische Domänen von Effektordomänen, voneinander ab. Die Proteolyse bewirkt dadurch eine Aktivierung bzw. Hyperaktivierung zuweilen auch eine Reduktion der Aktivität des jeweiligen Proteins (ausführlich in (Sato and Kawashima, 2001)). Im Gegensatz zu rein degenerativen Proteasen wie z.B. lysosomalen Proteasen spielt Calpain daher eine wichtige regulative Rolle in der Signaltransduktion.

Diese Erkenntnis wirft die Frage auf, ob auch die entstandenen MAP1B-Fragmente eine besondere Funktion besitzen. Wie bereits ausgeführt liegt den gereinigten Proteinen ein einziges vermutlich unterschiedlich posttranslational modifiziertes Fragment der ersten rund 600 Aminosäuren zugrunde. Interessanterweise reicht diese Region bis an die Tubulinbindungsdomäne von MAP1B heran, umfasst diese aber gerade nicht mehr. Dieser Bereich wurde zudem als Bindungsstelle für das MAP1B interagierende Protein *Light Chain 1* (LC1) identifiziert (Togel et al., 1998). Die Interaktion dieser beiden Proteine reguliert ihr Mikrotubuli- und Stress-Fiber-Bindungsverhalten (Togel et al., 1998). Während die Expression des N-Terminus von MAP1B und der LC1 kein deutlich von gesamt MAP1B und LC1 unterschiedliches Verhalten zeigt, so hat die Expression nur des N-Terminus dramatische Folgen. Der zufällige Teil-*Knockout* von MAP1B, der in einem Verbleib der ersten N-terminalen 571 Aminosäuren von MAP1B resultierte, zeigte in heterozygoten Tieren die auch im

vollständigen *Knockout* ersichtlichen Missbildungen. Homozygote Tiere dieses Teil-*Knockout* im Gegensatz zum vollständigen *Knockout* starben jedoch bereits kurz nach dem Blastozystenstadium (Embryonaltag 3.5) kurz vor der Neuralfaltung (Embryonaltag 8.0) (Edelmann et al., 1996). Offensichtlich birgt der N-Terminus von MAP1B eine lethale und bisher nur unzureichend beachtete Komponente. Interessant ist in diesem Kontext, dass auch in helikalen Filamenten von Alzheimerpatienten 80 kD Bruchstücke von MAP1B gefunden wurden, die jedoch nicht weiter untersucht sind. Es ist ferner beschrieben, dass die MAP1B phosphorylierende Kinase cdk5 in Alzheimerpatienten durch Calpain Teilen ihrer Regulationsuntereinheit beraubt wird, unreguliert zytoskeletale Proteine phosphoryliert und dadurch zum Zelltod führt (Nguyen et al., 2001).

Es stellt sich somit eine Reihe von Fragen: Proteolysiert Calpain MAP1B in Abhängigkeit von Neurotrophinen? Wird diese Regulation über $p75^{\text{NTR}}$ oder die Trk Rezeptoren vermittelt? Ist die Proteolyse MAP1Bs phosphorylierungsabhängig? Hat die Proteolyse den Umbau nur des Zytoskeletts zur Folge oder kann ein Einfluss auf das Zellüberleben gezeigt werden?

7.2.8 Neurotrophinabhängige Proteolyse des N-Terminus von MAP1B

Da die Beantwortung dieser Fragen eines zellulären Systems bedurfte, wurden Körnerzellkulturen im Labor etabliert. Diese Zellen proliferieren in der äußeren Schicht des Cerebellums und wandern während der ersten zwei postnatalen Wochen unter Neuritenwachstum in tiefere Schichten des Gehirns bis an die dort positionierten Purkinjizellen ein (Goldowitz and Hamre, 1998). Die Zellen können auch in Abwesenheit von Neurotrophinen kultiviert werden. Ihre Differenzierung in Kultur folgt der Differenzierung im Gewebe. Körnerzellen exprimieren die Neurotrophinrezeptoren $p75^{\text{NTR}}$, TrkB und TrkC nicht aber TrkA. Mit zunehmender Differenzierung wird $p75^{\text{NTR}}$ (Abbildung 22) herunterreguliert. Körnerzellen in der inneren Körnerzellschicht exprimieren kein $p75^{\text{NTR}}$ mehr. Durch die Abwesenheit von TrkA bietet sich die Möglichkeit, den verwendeten Rezeptorsignalweg zu identifizieren. Das Neurotrophin NGF wird in diesem System nur von $p75^{\text{NTR}}$ gebunden, kann also auch nur über diesen Rezeptor aktiv werden. Die übrigen Neurotrophine hingegen binden in Kulturen von wildtyp Mäusen beide Rezeptoren, in Kulturen von $p75^{\text{NTR}}/-$ Mäusen jedoch nur an ihren jeweiligen Trk Rezeptor. Dieses Kultursystem stellt somit ideale Bedingungen zur Untersuchung der oben formulierten Fragen dar.

Nach drei Tagen in Kultur konnte kein Einfluss von Neurotrophinen auf die Konzentration des MAP1B Fragments mit einem Antiserum gegen die ersten 15 Aminosäuren von MAP1B detektiert werden (Abbildung 21). Allerdings ist in der Literatur gezeigt, dass Calpain zusätzlich zu erhöhter Kalziumkonzentration ein weiteres Signal zur Aktivierung benötigt (Penna et al., 1999; Tremblay et al., 2000). In vorläufigen Experimenten konnte tatsächlich sogar unter Verwendung des Kalziumionophores A23187 in Körnerzellen keine MAP1B Proteolyse beobachtet werden (nicht gezeigt).

Ursache hierfür kann Calpastatin sein. Dieser endogene Calpaininhibitor blockiert Calpain insbesondere in Gegenwart von Kalzium (Memertino and Croall, 1984). Dadurch kann die Proteaseaktivität auch bei sich ändernden Kalziumkonzentrationen konstant gehalten werden. Neurotrophine regulieren die Calpainaktivität nicht sofort sondern erst im Laufe mehrerer Tage und resultiert auch dann nur in einer Reduzierung auf 50% (Oshima et al., 1989). Der starke Rückgang der MAP1B Expression in den Körnerzellkulturen mag diesen Effekt nur noch schwer identifizierbar machen. Auch wenn Neurotrophine eine Rolle in diesen Prozessen spielen, so scheint ihre Aktivität von weiteren bisher unbekanntem Faktoren abhängig.

7.2.9 Experimenteller Ausblick

Die biochemische Reinigung eines intrazellulären Interaktors von p75^{NTR} zeigte sich als nicht durchführbar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass p75^{NTR} in sehr heterogenem zellulären Umfeld zu finden ist. Dies reflektiert die zunehmende Erkenntnis, dass der Rezeptor über die klassischen Funktionen des Zellüberlebens/ Zelltods in eine große Zahl von weiteren zellulären Prozessen involviert ist. So konnte unter anderem in unserem Labor von Dr. Toshihide Yamashita die Verbindung zu dem das Zellskelett regulierende G-Protein RhoA hergestellt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Hinweise auf p75^{NTR}-ähnliche Moleküle führte zur Reinigung des N-Terminus von MAP1B. Es konnte gezeigt werden, dass Calpain den N-Terminus von MAP1B abspaltet. Seine Existenz auch *in vivo* wurde gezeigt. Bisher ist die Existenz dieses Bruchstücks nicht bekannt gewesen. Durch die Kreuzreaktivität des Freundl Serums wurde auf eine kurze Homologiesequenz von MAP1B und p75^{NTR} aufmerksam gemacht, die in p75^{NTR} Bestandteil der *Death*-Domäne ist. Hierüber könnte sich die in der Literatur andeutende Zusammenarbeit der beiden Moleküle ergeben. Dies ist insbesondere deshalb attraktiv, da auch

Calpain an p75^{NTR} binden und p75^{NTR} für den zur Aktivierung notwendigen Kalziumeinfluß beitragen könnte.

Insofern gilt es zu in Zukunft zu zeigen

- 1) Ob die p75^{NTR} Homologiesequenz tatsächlich auch zu einer molekularen Interaktion der beiden Proteine führt. Auf diesem Wege könnte eventuell sogar das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit, einen intrazellulären Interaktor von p75^{NTR} zu identifizieren, erreicht werden. Hierzu bieten sich die schon verwendeten Techniken der BIAcoremaschine und der Overlayblot-Technik an.
- 2) welches zu Neurotrophinen und Kalziumeinfluss zusätzliche Signal die Calpain-proteolyse von MAP1B reguliert.
- 3) was die genaue Funktion des N-Terminus von MAP1B ist. Hier ist insbesondere noch einmal auf den lethalen Phänotyp des Teil-*Knockout* zu verweisen, der die ersten 571 Aminosäuren von MAP1B exprimiert. Eventuell ist die zu untersuchende Interaktion mit p75^{NTR} ein Schlüssel zu diesem Phänomen.
- 4) ob die erstmals festgestellte Runterregulation von p75^{NTR} in Gegenwart von NGF oder BDNF auch *in vivo* zu detektieren ist. Hinweise aus der Literatur legen einen ursächlichen Zusammenhang zwischen p75^{NTR} Expression und Proliferations- bzw. Differenzierungsstatus der Zelle nahe. Hierzu werden gegenwärtig immunhistologische Untersuchungen vorgenommen. Vorläufige Experimente deuten tatsächlich auf ein Proliferationssignal von p75^{NTR} hin.