

Untersuchungen über die funktionelle Rolle des Neurotrophinrezeptors p75^{NTR}

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Durchgeführt am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Abteilung Neurobiochemie, in
Martinsried/München, sowie am
Friedrich Miescher-Institut in Basel

Rüdiger Schweigreiter

Basel
August 2002

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde YA .
2002. Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of
hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. J Neurosci. 22: 854-
62.

von Schack D, Casademunt E, Schweigreiter R, Meyer M, Bibel M, Dechant G. 2001.
Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects
both in the nervous and the vascular system. Nat Neurosci. 4: 977-8.

Andere Publikation:

Sommerfeld MT, Schweigreiter R, Barde YA, Hoppe E. 2000. Down-regulation of the
neurotrophin receptor TrkB following ligand binding. Evidence for an
involvement of the proteasome and differential regulation of TrkA and
TrkB. J Biol Chem. 275: 8982-90.

Eingereicht zur Beurteilung: 12.09.2002
Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2002
1.Gutachter: Prof. Yves-Alain Barde
2.Gutachter: Prof. Georg Dechant

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Neurotrophine	3
2.1.1	Struktur der Neurotrophine	3
2.1.2	Funktion der Neurotrophine	4
2.2	Neurotrophinrezeptoren	5
2.2.1	Trk-Rezeptoren	6
2.2.2	p75 ^{NTR}	8
2.2.2.1	Struktur von p75 ^{NTR}	8
2.2.2.2	Die Rezeptorisoform s-p75 ^{NTR}	10
2.2.2.3	Signalwege von p75 ^{NTR}	11
2.2.2.4	Zelluläre Effekte von p75 ^{NTR}	15
	Aufgabenstellung dieser Arbeit	18
3	MATERIAL und METHODEN	19
3.1	Materialien	19
3.1.1	Geräte	19
3.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	20
3.1.3	Enzyme	21
3.1.4	‘Kits’	21
3.1.5	Bakterien	21
3.1.6	Zelllinien	21
3.1.7	Tiere	22
3.1.8	Plasmide	22

3.1.9	Oligonukleotide	22
3.1.10	Antikörper	23
3.1.11	Neurotrophine und andere Proteinfaktoren	24
3.1.12	Medien	24
3.1.13	Lösungen	25
3.2	Methoden	28
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	28
3.2.2	Proteinchemische Methoden	31
3.2.3	Zellbiologische Methoden	35
3.2.4	Arbeiten mit Mäusen	42
4	ERGEBNISSE	44
4.1	Charakterisierung der Rezeptorisoform s-p75^{NTR}	44
4.1.1	Identifizierung von s-p75 ^{NTR} in Primärzellen	44
4.1.2	Charakterisierung von transfiziertem s-p75 ^{NTR} in 293 Zellen	46
4.1.3	Vergleich der Zahl von Schwanzzellen in der Exon III- und Exon IV-Mutante im N. ischiaticus	48
4.2	In-vitro-Assays für potenzielle Funktionen von p75^{NTR}	49
4.2.1	Apoptose-Assay	50
4.2.2	Zellwanderungsassay	58
4.2.3	Rho-Modulationsassay	60
4.2.4	Untersuchung des Aktinzytoskeletts nach RhoA-Aktivierung in primären Neuronen	67
4.2.5	Globale Genexpressionsanalyse in primären Neuronen	70
4.2.6	Regulation von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten durch NGF und p75 ^{NTR} in primären Neuronen	80

5 DISKUSSION	85
5.1 Charakterisierung der Rezeptorisoform s-p75^{NTR}	85
5.2 Apoptose-Assay	88
5.3 Zellwanderungsassay	92
5.4 Rho-Modulationsassay und Neuritenwachstum	95
5.5 Globale Genexpressionsanalyse in primären Neuronen	99
5.6 Regulation von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten durch NGF und p75^{NTR} in primären Neuronen	103
Ausblick	106
6 ABKÜRZUNGEN	108
7 LITERATURVERZEICHNIS	113
8 DANKSAGUNG	128
9 LEBENSLAUF	129

1 ZUSAMMENFASSUNG

Neurotrophine sind für die Entwicklung und Funktion des Nervensystems von Wirbeltieren unabdingbar. Sie entfalten ihre vielfältigen Funktionen über zwei Typen von Transmembranrezeptoren. Einerseits binden sie an die Trk-Rezeptoren, andererseits an den Neurotrophinrezeptor $p75^{NTR}$. Obwohl $p75^{NTR}$ der erste klonierte Neurotrophinrezeptor war, wird die Wirkungsweise von Trk-Rezeptoren heute besser verstanden als von $p75^{NTR}$. Erstens besitzen Trk-Rezeptoren als Rezeptortyrosinkinasen im Gegensatz zu $p75^{NTR}$ eine intrinsische enzymatische Aktivität, was die Aufklärung ihrer Signaltransduktionsmechanismen bedeutend erleichtert hat. Zweitens vermitteln Trk-Rezeptoren die klassische trophische Funktion der Neurotrophine, $p75^{NTR}$ hingegen neuartige Funktionen von Neurotrophinen, die zuvor noch nicht bekannt waren. Diese nicht-klassischen Funktionen, wie beispielsweise die Zelltod auslösende Wirkung von NGF, werden erst seit den letzten Jahren untersucht. Drittens konnte die Funktion der Trk-Rezeptoren in vollständigen Deletionsmutanten der Maus analysiert werden, wohingegen von $p75^{NTR}$ erst seit kurzem ein vollständiger Knockout existiert. In unserem Labor war nämlich gefunden worden, dass eine Spleißvariante von $p75^{NTR}$ in der bereits beschriebenen Deletionsmutante noch exprimiert wird.

Am Beginn dieser Doktorarbeit stand die nähere Charakterisierung dieser Spleißvariante im Vordergrund. Um ihre physiologische Relevanz zu klären, wurde zunächst versucht, die Spleißvariante als endogenes Protein zu detektieren. Dies gelang in Kulturen aus primären Schwanzzellen. Wie zudem gezeigt wurde, ist diese Rezeptorisoform in einer in unserem Labor generierten Deletionsmutante von $p75^{NTR}$ nicht mehr vorhanden. Darüber hinaus wurde ein erheblich stärkerer Schwanzzellphänotyp in der neuen Deletionsmutante gefunden im Vergleich zur bereits beschriebenen. Letztere stellt somit einen Hypomorph dar. Die Funktion von $p75^{NTR}$ konnte nunmehr erstmals mit Hilfe eines vollständigen Knockouts untersucht werden.

Wurde $p75^{NTR}$ zunächst lediglich eine die Trk-Rezeptoren modulierende Funktion zugeschrieben, war bei Beginn dieser Doktorarbeit in mehreren Ansätzen gezeigt worden, dass $p75^{NTR}$ unabhängig von den Trk-Rezeptoren eigenständige Signalaktivität besitzt, die zudem derjenigen der Trk-Rezeptoren entgegengerichtet sein kann. Für eine detaillierte molekulare Analyse der Funktion von $p75^{NTR}$ ist ein *In-vitro*-Assay unverzichtbar. Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war deshalb die Etablierung eines solchen Assays.

Ein *In-vitro*-Assay für $p75^{NTR}$ unter Verwendung der vollständigen Deletionsmutante konnte in cerebellären Körnerzellen etabliert werden. Aktivierung von $p75^{NTR}$ mit NGF führt zu einer Erhöhung der RhoA-Aktivität. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch TNFR, wie $p75^{NTR}$ ein Mitglied der TNFR-Überfamilie, RhoA aktiviert, obgleich mit einer klar unterschiedlichen Kinetik. Die TNF α -vermittelte Regulation von RhoA hemmte das Auswachsen von Neuriten. Im cerebellären Kultursystem konnte jedoch kein Effekt von NGF auf das Neuritenwachstum festgestellt werden. Weil Rho aber auch die Transkription steuern kann, wurde die Wirkung von NGF auf das Genexpressionsmuster von Körnerzellen mit einem 'Gene-Profiling'-Experiment analysiert. Es wurden 69 Gene, die durch NGF entweder hoch- oder hinunterreguliert werden und zum Teil 'Cluster' bilden, gefunden. Mit Hilfe der vollständigen Deletionsmutante wurden bisher GAP-5

und GluR2 als neue Zielgene von p75^{NTR} identifiziert. GluR2 kodiert für eine der vier AMPA-Rezeptor-Untereinheiten und spielt eine zentrale Rolle für die synaptische Plastizität. Da in einem unabhängigen Ansatz ein Defekt bei der Ausprägung von hippocampalem LTD ('long term depression'), einer Form von synaptischer Plastizität, im vollständigen Knockout von p75^{NTR} gefunden worden war, wurde der weitere Schwerpunkt dieser Arbeit auf den AMPA-Rezeptor gelegt. Die weitere Untersuchung aller AMPA-Rezeptor-Untereinheiten im Hippocampus ergab, dass neben GluR2 auch GluR3 ein Zielgen von p75^{NTR} ist und dass zudem GluR2 wie auch GluR3, jedoch nicht GluR1 und GluR4, *in vivo* im p75^{NTR}-Knockout im Vergleich zum Wildtyp in ihrer Expression signifikant verändert sind.

Diese Befunde legen eine veränderte Stöchiometrie des AMPA-Rezeptors im p75^{NTR}-Knockout nahe und liefern einen Erklärungsansatz für das veränderte LTD in der p75^{NTR}-Deletionsmutante. Zudem erweitern sie das Konzept der Bedeutung von Neurotrophinen für die synaptische Plastizität im Allgemeinen und der von p75^{NTR} im Speziellen.

2 EINLEITUNG

Das Nervensystem von Wirbeltieren in seiner außerordentlichen Komplexität erforderte für seine Evolution neuartige biologische Lösungen. Während das aus exakt 302 Neuronen bestehende Nervensystem des einfach gebauten Fadenwurms *C. elegans* durch starre genetische Programme hinreichend determiniert ist (White J.G. et al., 1986), sind für die Choreographie der rund 8.5×10^{10} Neuronen des menschlichen Gehirns flexiblere Mechanismen nötig (Williams R.W. und Herrup K., 1988). Tatsächlich muss nicht nur die enorm große Zahl von Nervenzellen reguliert werden, auch das Verknüpfungsmuster der Neuronen untereinander muss in einer für den Organismus sinnvollen Weise etabliert werden. Dies bedingt eine hohe Flexibilität der zugrunde liegenden Mechanismen nicht nur während der Embryonalentwicklung, sondern auch zeitlebens im adulten Organismus. Ein entscheidender Schritt in diese Richtung wurde durch einen grundlegenden Wechsel im Konstruktionsprinzip von Nervensystemen gesetzt. Wird in niederen Tieren wie *C. elegans* das Nervensystem mit individuell identifizierbaren Neuronen, deren Überleben und Verknüpfungen exakt definiert sind, assembliert, wird das Nervensystem der Wirbeltiere aus einem ursprünglich großen Überschuss von Neuronen modelliert. Ausschließlich Zellen, die funktionelle Verknüpfungen etablieren können, überleben, alle anderen werden durch programmierten Zelltod eliminiert. Bei der Steuerung dieses Prozesses spielen neurotrophe Faktoren als Überlebensfaktoren eine Schlüsselrolle (Purves D., 1988). In entgegengesetzter Weise bringen sie während der Embryonalentwicklung bestimmte Neuronen jedoch auch gezielt zum Absterben durch Auslösen von Apoptose. Neurotrophe Faktoren kontrollieren ferner die Morphologie und funktionelle Identität von Neuronen. Im maturen Nervensystem modulieren sie darüber hinaus die synaptische Transmission und tragen so zu einem weiteren Charakteristikum von Nervensystemen der Wirbeltiere bei, nämlich einer ausgeprägten synaptischen Plastizität.

2.1 Neurotrophine

2.1.1 Struktur der Neurotrophine

Die am besten untersuchten neurotrophen Faktoren sind die Neurotrophine (für eine Übersicht siehe z.B. Barde Y.-A., 1990; Bibel M. und Barde Y.-A., 2000). Sie bilden eine Genfamilie, die in höheren Wirbeltieren vier Mitglieder umfasst: 'nerve growth factor' (NGF), 'brain-derived neurotrophic factor' (BDNF), Neurotrophin-3 (NT3) sowie Neurotrophin-4/5 (NT4/5). NT4 wurde zuerst in *X. laevis* entdeckt, NT5 scheint das Ortholog in Säugetieren zu sein. Mit der Ausnahme von NT4/5 sind die Gensequenzen hochkonserviert.

Neurotrophine werden zunächst als Präproform synthetisiert und anschließend als non-kovalent verknüpfte Homodimere sezerniert. Die prozessierten, maturen Proteinmonomere haben ein Molekulargewicht von 13 kDa. Interessanterweise wurde vor kurzem gezeigt, dass auch die Proform eines Neurotrophins aktiv sein kann und dass

diese Aktivität derjenigen der maturen Form entgegengesetzt ist (Lee R. et al., 2001). Pro-NGF hat im Vergleich zu prozessiertem NGF eine signifikant höhere Affinität zu p75^{NTR}, was mit verstärktem Vermögen, unter *In-vitro*-Bedingungen Zelltod auszulösen, einhergeht (siehe 2.1.2 und 5.2).

In ihrer räumlichen Struktur sind Neurotrophinprotomere durch einen so genannten Cysteinknoten charakterisiert, ein Faltnmotiv aus drei Paaren antiparalleler β -Faltblattstränge, das durch Disulfidbrücken zwischen sechs Cysteinen geformt wird (für eine Übersicht siehe z.B. Ibáñez C.F., 1998). Tatsächlich sind die Struktureigenschaften zwischen den einzelnen Neurotrophinen so konserviert, dass *in vitro* Heterodimere gebildet werden können, wobei jedoch unklar ist, ob diese Beobachtung auch für die *In-vivo*-Situation relevant ist (Jungbluth S. et al., 1994). Die Dimerbildung legt jedoch nahe, dass Neurotrophine nach Binden an den Rezeptor wiederum zu einer Rezeptordimerisierung führen (siehe 2.2.1 sowie 2.2.2.1).

Obwohl Neurotrophine in Säugetieren am besten untersucht sind, wurden Vertreter in allen Vertebratenphyla identifiziert. Das phylogenetisch älteste Neurotrophingen wurde in Kieferlosen Fischen, Agnatha, nachgewiesen und ist damit rund 460 Millionen Jahre „alt“ (Hallböök F., 1999). Interessanterweise wurde bisher kein einziges Neurotrophinhomolog in Wirbellosen gefunden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in Wirbellosen mit komplexem Nervensystem, beispielsweise Cephalopoden, die noch dazu im Vergleich zu *C. elegans* oder *D. melanogaster* in molekularbiologischer Hinsicht wenig studiert worden sind, Neurotrophine vorkommen (Barde Y.-A., 1994; Jaaro H. et al., 2001). Die zentrale Rolle dieser Genfamilie für die Funktionalität des Wirbeltiernervensystems ist mittlerweile jedenfalls gut dokumentiert.

2.1.2 Funktion der Neurotrophine

Neurotrophine wurden ursprünglich als Überlebensfaktoren für Nervenzellen beschrieben. Spezifische Subpopulationen von Neuronen werden durch spezifische Neurotrophine unterstützt. Im peripheren Nervensystem wurde dieses Konzept mit sensorischen und sympathischen Neuronen am weitesten ausgearbeitet (für eine Übersicht siehe z.B. Bibel M. und Barde Y.-A., 2000). Neurotrophine werden in limitierter Menge von zu innervierendem Zielgewebe produziert und von Neuronen unbedingt zum Überleben benötigt. Die Gesamtzahl an Nervenzellen wird so über die lokale Verfügbarkeit von Neurotrophinen reguliert und gleichzeitig an das vorhandene Zielgewebe angepasst. Tatsächlich war NGF der erste identifizierte „Wachstumsfaktor“ überhaupt.

Wie der Name aber bereits nahe legte, war die Funktion dieses Proteins von Beginn an nicht auf eine reine Überlebensrolle beschränkt. Vielmehr wurde bereits in den 1950er-Jahren erkannt, dass NGF *in vitro* von sensorischen und auch sympathischen Ganglien Neuronenwachstum massiv induzieren kann (für eine Übersicht siehe z.B. Levi-Montalcini R., 1966). *In vivo* wurde beobachtet, dass NGF die Anzahl und Länge der Dendriten von sympathischen Neuronen erhöht (Ruit K.G. et al., 1990). Auch für BDNF, NT3, und NT4/5 konnte in unterschiedlichen Ansätzen ein stimulierender Effekt auf die Länge von Axonen sowie die Komplexität der dendritischen Verzweigung nachgewiesen

werden (Cohen-Cory S. und Fraser S.E., 1995; McAllister A.K. et al., 1995 und 1997). Jüngst wurde in einem transgenen Mausmodell der Effekt von Neurotrophinen auf die Steuerung von sensorischen und Motoneuronen während der Embryonalentwicklung zeitlich aufgelöst *in vivo* demonstriert (Tucker K.L. et al., 2001).

Gut dokumentiert ist mittlerweile auch der Einfluss von Neurotrophinen auf die synaptische Transmission und darüber hinaus auf die synaptische Plastizität. Neurotrophine können Neuronen nicht nur depolarisieren, sondern auch zur vermehrten Ausschüttung von Neurotransmittern anregen. Umgekehrt kann elektrische Aktivität von Neuronen zur Sekretion von Neurotrophinen führen (für eine Übersicht siehe z.B. Thoenen H., 1995). Bereits auf der Ebene von einzelnen Zellen kann dabei ein hoher Grad an Komplexität erreicht werden. Mit sympathischen Neuronen wurde kürzlich gezeigt, dass Neurotrophine die Ausschüttung von entweder erregenden oder hemmenden Neurotransmittern modulieren (Yang B. et al., 2002). Diese Beobachtungen ergänzen Studien, die eine direkte Rolle von Neurotrophinen bei der Modulation der synaptischen Plastizität *in vivo* postulieren. Am klarsten wurde dies anhand von BDNF und TrkB bei der Ausbildung von Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus demonstriert. LTP ist signifikant verringert in hippocampalen Schnitten von BDNF-defizienten Mäusen, kann jedoch restituiert werden durch Zugabe von BDNF (Korte M. et al., 1995 und 1996). BDNF scheint diese Funktion über TrkB zu vermitteln, da nach genetischer Deletion von *trkB* LTP im Hippocampus stark verringert ist (Minichiello L. et al., 1999), jedoch nicht nach Deletion von $p75^{NTR}$ (Korte M., persönliche Mitteilung). Der genaue Wirkmechanismus ist noch unklar, jedoch scheinen sowohl prä- als auch postsynaptische Prozesse eine Rolle zu spielen (Schuman E.M., 1999).

Überraschenderweise fördern Neurotrophine, im Speziellen NGF, nicht nur das Überleben von Neuronen, sondern unter bestimmten Bedingungen auch deren Absterben durch Auslösen von Apoptose. Dieser Effekt wird vom Neurotrophinrezeptor $p75^{NTR}$ vermittelt (siehe 2.2.2.4).

Die Wirkung von Neurotrophinen ist nicht auf neuronale Zellen beschränkt, wie am Beispiel von NGF, das die Wanderung von Schwannzellen fördert, aufgezeigt wurde (Anton E.S. et al., 1994; siehe auch 4.2.2). Interessanterweise scheinen Neurotrophine in der Modulation des Immunsystems, so in pathologischen Prozessen wie Entzündung und Autoimmunerkrankungen, speziell auch als Mediatoren zwischen dem Immun- und Nervensystem, eine wichtige Funktion inne zu haben (für eine Übersicht siehe z.B. Serafeim A. und Gordon J., 2001; Skaper S.D., 2001; siehe auch 5.5).

2.2 Neurotrophinrezeptoren

Neurotrophine üben ihre vielfältigen und zum Teil gegensätzlichen Funktionen über zwei Rezeptortypen aus. Die Mitglieder der Trk-Rezeptor-Familie binden Neurotrophine selektiv, der Neurotrophinrezeptor $p75^{NTR}$ dagegen bindet alle Neurotrophine mit ähnlicher Affinität, siehe Abbildung 1.

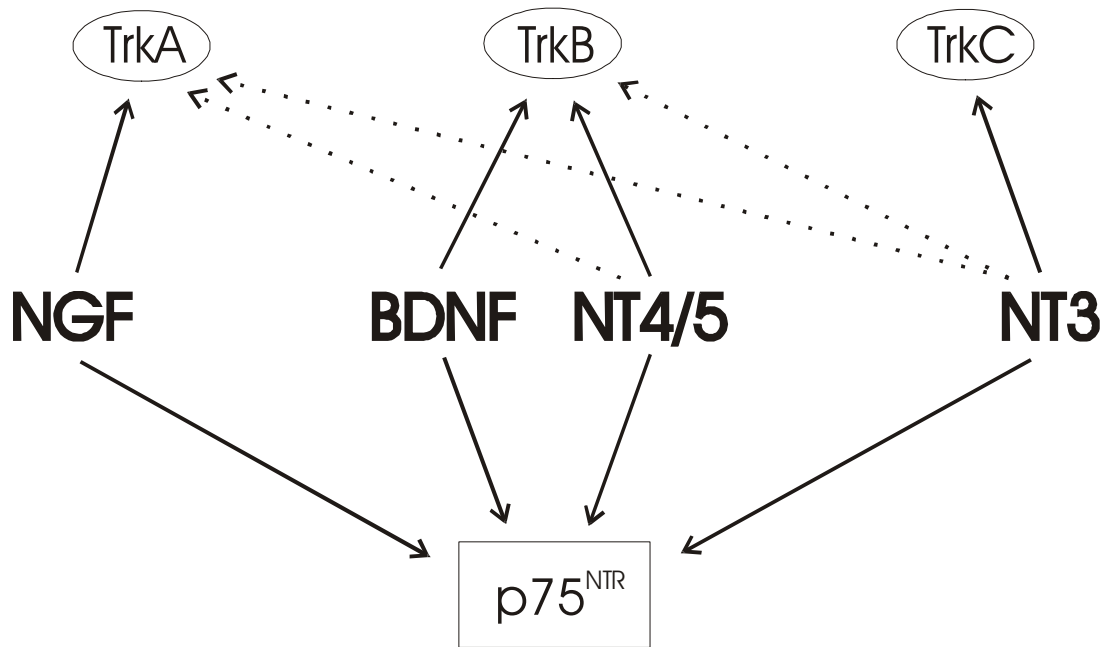


Abb. 1 Das Zwei-Rezeptoren-System der Neurotrophine

Während alle Neurotrophine mit ähnlicher Affinität an p75^{NTR} binden, zeigen sie für Trk-Rezeptoren eine selektive Affinität. TrkA wird präferenziell von NGF gebunden, mit geringerer Affinität auch von NT3 und NT4/5. TrkB interagiert vorzugsweise mit BDNF und NT4/5, daneben auch mit NT3, TrkC ausschließlich mit NT3.

Ein solches Zwei-Rezeptoren-System ist ungewöhnlich für eine Ligandenfamilie. Es erhöht einerseits die Komplexität der Wirkungsmechanismen, andererseits erschwert es die experimentelle Analyse.

2.2.1 Trk-Rezeptoren

Die Trk-Rezeptoren gehören zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen (für eine Übersicht siehe z.B. Barbacid M., 1994). In Säugetieren wurden drei *trk*-Gene identifiziert. Sie kodieren für TrkA-C mit einem Molekulargewicht von jeweils rund 140 kDa und selektiver Affinität für die einzelnen Neurotrophinliganden (siehe Abbildung 1). Im Gegensatz zu p75^{NTR} wurden für diese Rezeptorenfamilie außer den Neurotrophinen keine weiteren Liganden gefunden (siehe 2.2.2.1). Trk-Rezeptoren vermitteln einen großen Teil der für Neurotrophine beschriebenen Effekte. Schwere, zum Teil letale, Entwicklungsstörungen der Maus in Geninaktivierungsstudien zeigen, dass sie für eine normale Entwicklung unerlässlich sind (Barbacid M., 1994).

Bindung von Neurotrophinen an Trk-Rezeptoren führt zu Rezeptortyrosin-Phosphorylierung, was die Aktivierung von Signalkaskaden zur Folge hat. Im Gegensatz zu p75^{NTR} sind die molekularen Details der Aktivierung und Signaltransduktion bis hin zu spezifischen zellulären Effekten weitgehend entschlüsselt (für eine Übersicht siehe

z.B. Huang E.J. und Reichardt L.F., 2001; Patapoutian A. und Reichardt L.F., 2001). Für die Analyse war dabei sehr hilfreich, dass die Mechanismen der Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion unter Rezeptortyrosinkinase konserviert sind und für einige Rezeptoren, wie beispielsweise EGFR oder PDGFR, bereits beschrieben waren. Bindung von Neurotrophinen bedingt zunächst eine Rezeptordimerisierung. Dies löst in der Kinasedomäne eine Autophosphorylierung von drei Tyrosinresten im so genannten 'activation loop' aus. Eine dadurch bedingte Strukturänderung exponiert knapp außerhalb der Kinasedomäne zwei weitere Tyrosinreste, die ebenfalls phosphoryliert werden. Diese beiden Tyrosinreste sind die Ausgangspunkte von Signalkaskaden. Sie dienen als Binde- und Aktivierungsstelle für Andockproteine, an die wiederum Adaptorproteine binden, welche die Trk-Rezeptoren schließlich an drei intrazelluläre Haupt-Signalwege koppeln: den Ras-Raf-MEK-MAPK-Weg, den PI3K-Akt-Weg sowie den PLC γ -PKC-Weg. Dieser modulhafte Aufbau ermöglicht eine flexible Einbindung in das jeweilige zelluläre Signalnetzwerk und davon abhängig unterschiedliche zelluläre Effekte wie neuronales Überleben, neuronale Differenzierung, Neuritenwachstum sowie Modulation der synaptischen Plastizität. Zahlreiche Vernetzungen zwischen den einzelnen Signalkomponenten erhöhen dabei die Komplexität. Dies ermöglicht beispielsweise die Aktivierung von unterschiedlichen Signalwegen durch zwei unterschiedliche Liganden mit ein und demselben Rezeptor (Minichiello L. et al., 1998; Belliveau D.J. et al., 1997).

Bemerkenswert an Trk-Rezeptoren ist die Vielzahl an Spleißvarianten. Für alle drei Rezeptoren wurden jeweils mehrere Spleißisoformen gefunden, die sich in der extra- oder intrazellulären Domäne und folglich in der Ligandenbindung oder Signalaktivität voneinander unterscheiden. Eine besondere Rolle scheinen dabei zwei trunkierte Spleißvarianten von TrkB, T1 und T2, zu spielen (Klein R. et al., 1990; Middlemas D.S. et al., 1991). In beiden ist die intrazelluläre Domäne von TrkB substituiert durch ein kurzes Stück alternativ gespleißter Sequenz. Sie werden in der frühen postnatalen Entwicklung hochreguliert und sind im adulten Gehirn stärker exprimiert als TrkB (Fryer R.H. et al., 1996). Beide finden sich auch in nichtneuronalen Zellen, die kein TrkB enthalten. In einem *In-vitro*-Ansatz wurde zudem gezeigt, dass sie inhibitorisch auf die Signaltransduktion von TrkB wirken (Eide F.F. et al., 1996; Ninkina N. et al., 1996). Die Relevanz dieser Befunde für die *In-vivo*-Situation ist bis jetzt allerdings noch unklar.

In Wirbellosen wurde bisher ein zu den Trk-Rezeptoren homologes Transmembranprotein, Ltrk, gefunden (van Kesteren R.E., 1998). Sequenzanalysen damit zeigten, dass die erste *trk*-Sequenz vor mindestens 600 Millionen Jahren entstanden sein muss. Liganden für Ltrk konnten bisher nicht identifiziert werden. Die Untersuchung von komplexen Wirbellosenspezies sollte die evolutionären Ursprünge von Neurotrophin- als auch Neurotrophinrezeptorsequenzen klären helfen (Jaaro H. et al., 2001).

2.2.2 p75^{NTR}

2.2.2.1 Struktur von p75^{NTR}

p75^{NTR} war der erste klonierte Neurotrophinrezeptor (Radeke M.J. et al., 1987; Johnson D. et al., 1986). Wurde er ursprünglich über seine Fähigkeit, NGF zu binden, identifiziert, stellte sich später heraus, dass er alle vier Neurotrophine mit einer Affinität von rund 10^{-9} M bindet. Dies ist ein signifikant geringerer Wert als für Neurotrophinbindung auf Neuronen gemessen wurde (ungefähr 10^{-11} M) (Rodriguez-Tébar A. et al., 1990). Bei diesen hochaffinen Bindungsstellen scheint es sich um Komplexe zwischen Trk-Rezeptoren und p75^{NTR} zu handeln (siehe 2.2.2.3).

p75^{NTR} ist sowohl palmitoyliert als auch glykosiliert (siehe 4.1.2). Es war nicht nur der erste Neurotrophinrezeptor, sondern auch der erste Vertreter der TNFR-Überfamilie, die 29 Mitglieder umfasst, darunter die beiden TNF-Rezeptoren 1 und 2, Fas (Apo-1/CD95) und die Death-Rezeptoren (TRAIL-R1-4) (für eine Übersicht siehe z.B. Locksley R.M. et al., 2001; Bodmer J.-L. et al., 2002). Das charakteristische Strukturelement dieser Familie sind Cystein-reiche Domänen (CRDs) im extrazellulären Teil, die durch jeweils drei Disulfidbrücken stabilisiert werden. Neben vier CRDs besitzt p75^{NTR} im intrazellulären Teil mehrere Domänen und Faltmotive, die jeweils charakteristische Funktionen nahe legen. Gemeinsam mit einigen anderen Mitgliedern der TNFR-Überfamilie, unter anderem Fas und TNFR-1, hat p75^{NTR} eine so genannte 'Death Domain' (Liepinsh E. et al., 1997). Sie stellt eine Plattform für Proteininteraktoren dar, die Zelltod auslösende Signalwege initiiert. Weiters besitzt p75^{NTR} ein kurzes Sequenzstück mit hoher Homologie zur Sequenz von Mastoparan, einem 14mer-Peptid in Wespengift, das G-Proteine aktivieren kann (Dostaler S.M. et al., 1996). Der C-Terminus TSPV-C ist ein typisches PDZ-Domänen bindendes Sequenzmotiv. PDZ-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsmodule, die vor allem in neuronalen Transmembranproteinen wie Rezeptoren und Ionenkanälen gefunden wurden (Harris B.Z. und Lim W.A., 2001). Diese Ansammlung von Bindungsmotiven lässt ein vielfältiges Interaktionsmuster mit intrazellulären Proteinpartnern erwarten. Tatsächlich besitzt p75^{NTR} wie alle anderen Mitglieder der TNFR-Überfamilie keine enzymatische Aktivität, sondern entfaltet seine Signalaktivitäten über Assoziation mit, und Dissoziation von, zytoplasmatischen Interaktoren. Wie in 2.2.2.3 näher beschrieben, ist eine große Zahl solcher intrazellulären Bindungsproteine bekannt.

Auch die extrazelluläre Domäne ist Bindungsstelle für ein großes Repertoire von Liganden. Außer den bereits erwähnten Neurotrophinen wurden folgende Faktoren als Liganden nachgewiesen: ein Glykoprotein des Tollwutvirus – RV (rabies virus)-Glykoprotein (Tuffereau C. et al., 1998), CRNF – ein Proteinfaktor mit Neurotrophin-ähnlicher Funktion aus der Schnecke *L. stagnalis* (in dieser Spezies wurde auch Ltrk gefunden) (Fainzilber M. et al., 1996), ein Proteinfragment des Prionenproteins PrP (26-106) (Della-Bianca V. et al., 2001), das β -Amyloidpeptid – ein Proteinfragment von APP (Yaar M. et al., 2002) – sowie das Gangliosid GT1b (Yamashita T. et al., 2002). Neben den Neurotrophinen vermögen auch GT1b sowie das β -Amyloidpeptid den Rezeptor zu aktivieren.

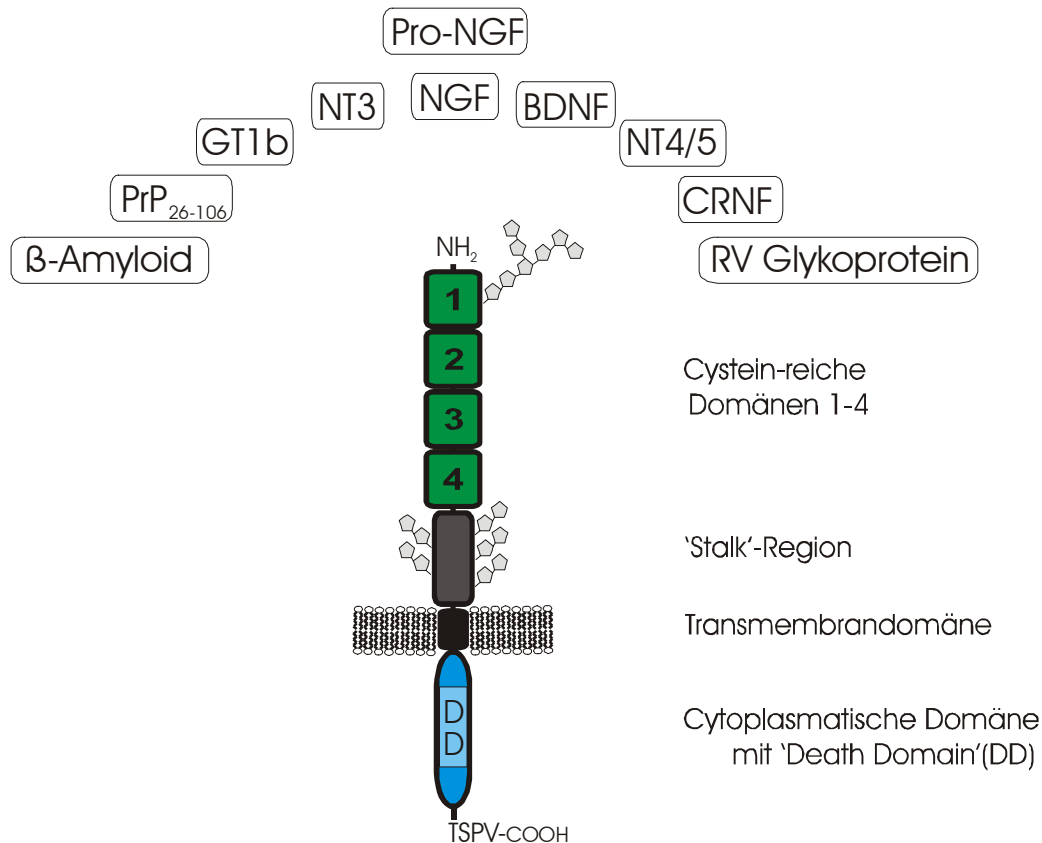


Abb. 2 Liganden von p75^{NTR} sowie schematische Darstellung seiner Struktur

Die Struktur von p75^{NTR} ist durch einige für die TNFR-Überfamilie charakteristische Strukturelemente ausgezeichnet. Die erste der Cystein-reichen Domänen enthält eine N-Glykosilierungsstelle, die 'Stalk'-Region ist mehrfach O-glykosiliert. Neben den Neurotrophinen wurden noch weitere Proteine wie auch Proteinfragmente (β-Amyloid und PrP₂₆₋₁₀₆) sowie das Gangliosid GT1b als Liganden identifiziert.

In Wirbellosen wurde bisher keine p75^{NTR}-ähnliche Sequenz gefunden. Im niederen Wirbeltiermodell *X. laevis* wurden kürzlich die ersten zwei homologen Gene von p75^{NTR} in Form von p75^{NTRa} und p75^{NTRb} charakterisiert (Hutson L.D. und Bothwell M., 2001). Weiters konnten auf bioinformatischem Weg zwei Sequenzen mit hoher Homologie zu p75^{NTR}, NRH1 und 2, in mehreren Wirbeltierspezies identifiziert werden (Kanning K.C. et al., 2001). Bemerkenswerterweise ist p75^{NTR} genomisch mit dem HoxB-Cluster auf Chromosom 17 (Mensch) assoziiert (Bentley K.L. et al., 1995). Da es vier Hox-Cluster A-D gibt, die vermutlich durch zwei Duplikationsschritte einer Vorläufersequenz entstanden sind, wirft dies die Frage auf, ob an den entsprechenden Stellen in den anderen drei Hox-Clustern p75^{NTR}-homologe Sequenzen zu finden sind.

2.2.2.2 Die Rezeptorisoform s-p75^{NTR}

Kürzlich wurde in unserem Labor die erste Spleißvariante von p75^{NTR} beschrieben (Doktorarbeit von David von Schack). Sie wurde mittels RT-PCR in sympathischen Ganglien des Huhns gefunden und anschließend in der Maus bestätigt. Sie entsteht durch einen alternativen Spleißvorgang, bei dem das die Cystein-reichen Domänen 2-4 kodierende Exon III übersprungen wird. Transfektion der cDNA in 293 Zellen führt zur Synthese eines 38 kDa-Proteins. Bindungsstudien zeigten, dass dieses die Fähigkeit, Neurotrophine zu binden, verloren hat. Die restliche Sequenz ist jedoch im Vergleich zu vollständigem p75^{NTR} erhalten und mit ihm identisch (Abbildungen 3 und 7). Da das Molekulargewicht der neuen Isoform signifikant verringert ist, wurde sie s('short')-p75^{NTR} genannt, im Gegensatz zu FL-p75^{NTR}, der vollständigen (oder 'full length') Isoform. Wenn nicht spezifisch anders vermerkt, bezieht sich in dieser Arbeit die Bezeichnung „p75^{NTR}“ immer auf FL-p75^{NTR}.

Interessanterweise ist s-p75^{NTR} in der in Lee K.F. et al., 1992, beschriebenen Deletionsmutante von p75^{NTR} noch vorhanden. Sowohl in Gehirn als auch Rückenmark von p75^{NTR}-defizienten Mäusen konnte s-p75^{NTR} mit Hilfe von RT-PCR nachgewiesen werden (Doktorarbeit von David von Schack). Für die Inaktivierung des p75^{NTR}-Gens ist nämlich genau das Exon III deletiert worden.

Da außer eines Teils der extrazellulären Domäne die trunkierte Isoform intakt ist – vor allem auch der intrazelluläre Teil – wurde die Frage gestellt, ob in diesem p75^{NTR}-Knockout das Gen funktionell tatsächlich vollständig ausgeschaltet ist. Diese Frage erschien besonders relevant angesichts der Tatsache, dass ektopisch exprimiertes s-p75^{NTR} mit Trk-Rezeptoren interagiert, wie es zuvor bereits für FL-p75^{NTR} nachgewiesen worden war (siehe 2.2.2.3).

Aus diesem Grund wurde eine neuartige Deletionsmutante von p75^{NTR} in unserem Labor generiert, in der das Exon IV durch homologe Rekombination entfernt wurde. Die erste, unvollständige Deletionsmutante von p75^{NTR} wird entsprechend Exon III-Mutante, die neue Exon IV-Mutante genannt. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, handelt es sich bei Letzterer um einen vollständigen Knockout von p75^{NTR}, da in ihr weder FL- noch s-p75^{NTR} detektierbar ist. Mit dieser Mutante konnte die Funktion von p75^{NTR} erstmals mit Hilfe eines vollständigen Knockouts untersucht werden.

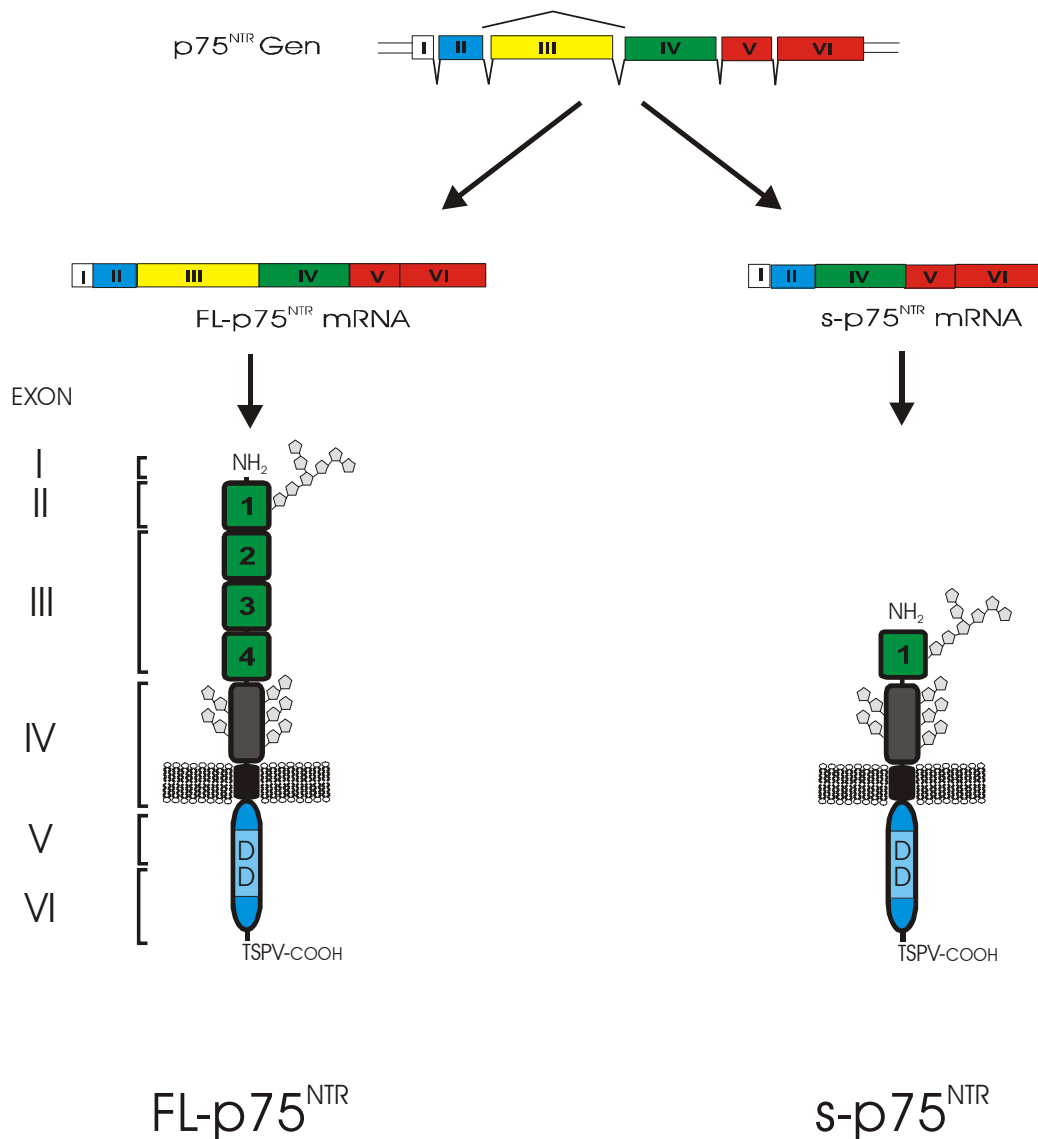


Abb. 3 Die Rezeptorisoform s- $p75^{NTR}$

Die Rezeptorisoform s- $p75^{NTR}$ entsteht durch alternatives Spleißen der $p75^{NTR}$ mRNA bei dem das Exon III deletiert wird. Der Isoform fehlen drei der vom Exon III kodierten Cystein-reichen Domänen. Obwohl dadurch die Fähigkeit zur Bindung von Neurotrophinen verloren geht, bleiben sowohl die Transmembran- als auch intrazelluläre Domäne intakt. Auch die Glykosilierungsstellen sind sämtliche in der Sequenz erhalten.

2.2.2.3 Signalwege von $p75^{NTR}$

Wurde $p75^{NTR}$ anfänglich lediglich als Modulator von Trk-Funktionen betrachtet, ist mittlerweile eine vielfältige eigenständige Signalaktivität dieses Rezeptors nachgewiesen

(für eine Übersicht siehe z.B. Roux P. und Barker P., 2002; Hempstead B.L., 2002). Die Konformation des aktivierten Rezeptors ist zurzeit noch ungeklärt. Als Mitglied der TNFR-Überfamilie ist eine trimere Form nahe liegend. Im Unterschied zur TNF-Liganden-Überfamilie liegen Neurotrophine jedoch nicht als Trimere, sondern als Dimere vor, was eine Rezeptordimerisierung erwarten ließe, analog zur Trk-Aktivierung.

p75^{NTR} wirkt über Rekrutierung von zytoplasmatischen Proteinen. Der aktivierte Rezeptor fungiert dabei als nichtenzymatische Plattform für spezifische intrazelluläre Proteine, die nach Binden an p75^{NTR} ihrerseits eine Interaktionskaskade auslösen. In großem Detail wurde dieses Konzept an Vertretern wie TNFR1 und 2, CD-40 sowie Fas ausgearbeitet (für eine Übersicht siehe z.B. Nagata S., 1997; Ashkenazi A. und Dixit V.M., 1998). Eine wesentliche Erkenntnis dieser Studien ist, dass zahlreiche der gefundenen Interaktionspartner gemeinsam von mehreren Rezeptoren genutzt werden. Überraschenderweise trifft dies für p75^{NTR} nur bedingt zu. Lediglich für eine Minderheit der gefundenen zytoplasmatischen Interaktionspartner war eine Funktion beschrieben, wie etwa für RhoA, der Großteil sind neuartige Proteine, teilweise ohne jede Sequenzhomologie zu bereits bekannten Proteinen.

In Abbildung 4 werden die bisher identifizierten Interaktoren der intrazellulären Domäne von p75^{NTR} gemäß ihrer postulierten Funktion aufgelistet.

Nur von einem Teil dieser mit dem 'Yeast-Two-Hybrid'-System identifizierten Interaktoren sind die von ihnen über unterschiedliche Rezeptoren der TNFR-Überfamilie ausgelösten Signalwege bekannt. TRAF1 (Duckett C.S. et al., 1997), TRAF2 (Rothe M. et al., 1994), TRAF3 (Devergne O. et al., 1996), TRAF5 (Nakano H. et al., 1996), TRAF6 (Cao Z. et al., 1996), RIP2 (McCarthy J.V. et al., 1998), FAP-1 (Nakai Y. et al., 2000) wie auch IRAK (Cooke E.L. et al., 2001) modulieren die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB. TRAF2 (Liu Z.G. et al., 1996), TRAF5 (Akiba H. et al., 1998) und TRAF6 (Baud V. et al., 1999) vermögen darüber hinaus die MAP-Kinase JNK zu aktivieren, RIP2 kann auch Zelltod auslösen (McCarthy J.V. et al., 1998). Die MAP-Kinasen ERK 1 und 2 translozieren in den Zellkern und aktivieren Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 und ATF-2 (Tibbles L.A. und Woodgett J.R., 1999). Caveolin ist das zentrale strukturbildende Protein von Caveolae, das sind Mikrodomänen in der Plasmamembran, die selektiv angereichert sind mit Signalmolekülen, darunter im Besonderen Sphingomyelin (Schlegel A. und Lisanti M.P., 2001). Die GTPase RhoA besitzt mehrere Effektorproteine, die am besten charakterisierten sind die beiden Rho-Kinasen ROCK1 und 2 (Amano M. et al., 2000).

In direkten Zusammenhang mit p75^{NTR} konnten NFκB, Ceramid, MAP-Kinasen sowie Rho-GTPasen gebracht werden. In mehreren unterschiedlichen Ansätzen wurde gezeigt, dass p75^{NTR} NFκB aktiviert (Carter B.D. et al., 1996; Ladiwala U. et al., 1998; sowie Mamidipudi V. et al., 2002; Irie S. et al., 1999; Khursigara G. et al., 2001; Khursigara G. et al., 1999; Ye X. et al., 1999). Ebenfalls in mehreren Zellsystemen wurde p75^{NTR}-induzierte Sphingomyelinhydrolyse und daraus resultierende Ceramidproduktion nachgewiesen (Dobrowsky R.T. et al., 1994; Brann A.B. et al., 2002). Da p75^{NTR}-induzierte Sphingomyelinhydrolyse hauptsächlich in Caveolae lokalisiert ist, könnte Caveolin ein verbindendes Element zwischen p75^{NTR} und einer bis dato hypothetischen Sphingomyelinase sein. Darüber hinaus wurde gefunden, dass p75^{NTR} mit den MAP-Kinasen ERK1 und 2 nicht nur interagiert, sondern sie (Susen K. et al., 1999), ebenso wie

JNK (Casaccia-Bonnel P. et al., 1996), auch aktivieren kann. In beiden Fällen scheint die Aktivierung über Ceramid zu laufen. JNK wiederum kann das Tumorsuppressorprotein p53 nach Aktivierung von p75^{NTR} hochregulieren (Aloyz R.S. et al., 1998). Über Ceramid aktiviert p75^{NTR} weiters die GTPase Rac (Harrington A.W. et al., 2002), wie RhoA ein Mitglied der Rho-Unterfamilie von kleinen GTP bindenden Proteinen. p75^{NTR} interagiert nicht nur mit, sondern moduliert auch die Aktivität von RhoA (Yamashita T. et al., 1999). Im Gegensatz zu Rac sind die zugrunde liegenden Signalmechanismen jedoch unklar. Inhibitorexperimente lassen auf eine Rolle der Proteinkinase A schließen (Yamashita T.; unveröffentlichte Ergebnisse). Das intrazelluläre Signalrelay-Protein 14-3-3ε scheint im Zelltod auslösenden Signalweg p75^{NTR} – NADE zu liegen (Kimura M.T. et al., 2001). Eine schematische Gesamtübersicht über intrazelluläre Bindungsproteine und Signalkomponenten ist in Abbildung 4 gegeben.

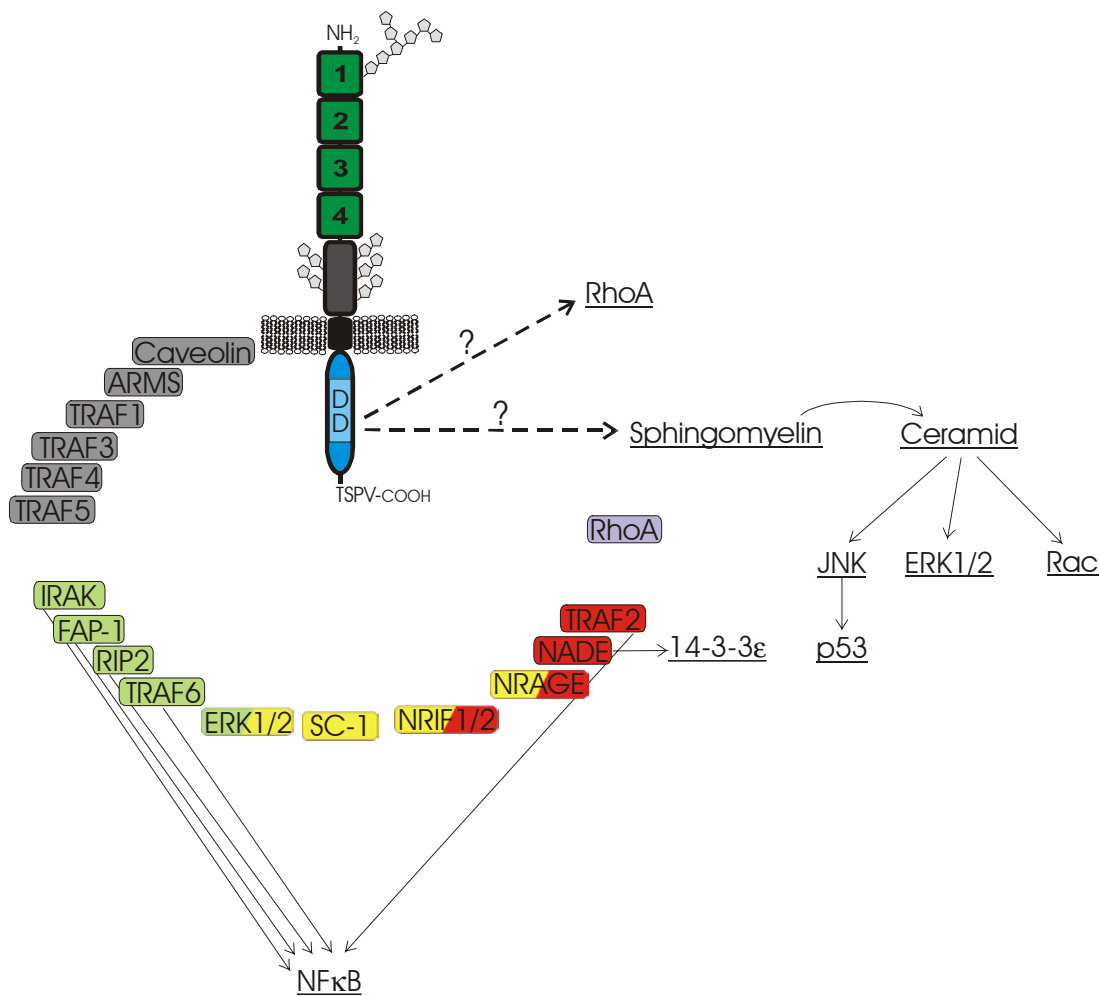


Abb. 4 Intrazelluläre Bindungsproteine und Signalwege von p75^{NTR}

p75^{NTR} fungiert mit seiner intrazellulären Domäne als Interaktionsplattform für zahlreiche Bindungspartner. Die dadurch ausgelösten Signalkaskaden sind noch nicht vollständig entschlüsselt (gestrichelte Pfeile). Als zentrale Komponenten von durch p75^{NTR} modulierten Signalwegen wurden bisher Rho-GTPasen, Ceramid, NFκB sowie

MAP-Kinasen identifiziert. Die im Zusammenhang mit Signalaktivität von p75^{NTR} postulierten Funktionen der Bindungspartner sind farbkodiert dargestellt. Rote Interaktionspartner induzieren über p75^{NTR} Zelltod, grüne fördern das Überleben, gelbe beeinflussen den Zellzyklus, violette modulieren das Zytoskelett. Von grau markierten Proteinen ist die Funktion im Zusammenhang mit p75^{NTR} noch offen. Die Signalaktivität von p75^{NTR} kann dabei durch Trk-Rezeptoren, die mit p75^{NTR} über die extra- als auch intrazelluläre Domäne interagieren, beeinflusst werden. Im Einzelnen wurden bisher folgende Interaktoren der intrazellulären Domäne identifiziert:

Funktion	Protein	Typ	Referenz
Zelltod	TRAF2	Interaktionspartner von TNFR	Ye X. et al., 1999
	NADE	kein Homolog	Mukai J. et al., 2000
	NRAGE/MAGE-D1	Mitglied der MAGE-Familie	Salehi A.H. et al., 2000
	NRIF1 und 2	kein Homolog	Casademunt E. et al., 1999
Überleben	RIP2	Interaktionspartner von TNFR1 und CD-40	Khursigara G. et al., 2001
	FAP-1	Interaktionspartner von Fas	Irie S. et al., 1999
	TRAF6	Interaktionspartner von u.a. CD40, aber nicht TNFR	Khursigara G. et al., 1999
	ERK1 und 2	MAP-Kinasen p42 und p44	Volonte C. et al., 1993
	IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase	Mamidipudi V. et al., 2002
Zellzyklus	SC-1	kein Homolog	Chittka A. und Chao M.V., 1999
	NRAGE/MAGE-D1	anti-proliferative Funktion	
	NRIF1 und 2	anti-proliferative Funktion	
	ERK1 und 2	pro-proliferative Funktion	
Zytoskelett	RhoA	Mitglied der Rho-Unterfamilie von kleinen GTP bindenden Proteinen; Modulation des Neuritenwachstums	Yamashita T. et al., 1999
Unbekannte Funktion	TRAF1	Interaktionspartner von TNFR	Ye X. et al., 1999
	TRAF3	Interaktionspartner von u.a. CD30, aber nicht TNFR	Ye X. et al., 1999
	TRAF4	kein Interaktionspartner bekannt	Ye X. et al., 1999
	TRAF5	Interaktionspartner von TNFR	Ye X. et al., 1999
	Caveolin	Strukturprotein von Caveolae; vermutlich Ankerfunktion	Bilderback T.R. et al., 1997
	ARMS	kein Homolog	Kong H. et al., 2001

Ein umfassendes Verständnis der Signalaktivität von p75^{NTR} wird aber nicht nur durch die große Zahl an intrazellulären Bindungsproteinen erschwert, sondern auch durch die strukturelle und funktionelle Interaktion von p75^{NTR} mit den Trk-Rezeptoren. Die beiden Rezeptortypen sind nämlich nicht nur oft ko-exprimiert, sondern interagieren auch physisch, wie mit allen drei Trk-Rezeptoren und p75^{NTR} gezeigt werden konnte (Bibel M. et al., 1999). An der Interaktion sind sowohl die intrazellulären als auch

Transmembrandomänen beteiligt. Diese Rezeptorassoziation ist funktionell relevant aus mehreren Gründen. Erstens sind die Komplexe hochaffine Bindungsstellen für Neurotrophine (Hempstead B.L. et al., 1991). Zweitens wird durch die Assoziation die Ligandendiskriminierung der Trk-Rezeptoren erhöht. Dies ist besonders relevant für TrkA und TrkB, die jeweils mehr als ein Neurotrophin binden (Benedetti M. et al., 1993; Bibel M. et al., 1999). Und drittens spielt die direkte physische Interaktion der beiden Rezeptortypen vermutlich eine wichtige Rolle bei der gegenseitigen inhibitorischen Beeinflussung ihrer Signalaktivitäten. Eine solche wurde in mehreren Experimenten nachgewiesen (Yoon S.O. et al., 1998; Kohn J. et al., 1999).

2.2.2.4 Zelluläre Effekte von p75^{NTR}

Die Funktion von p75^{NTR} wurde in einer Vielzahl an Zellsystemen untersucht. Obwohl sich die Expression von p75^{NTR} nicht auf das Nervensystem beschränkt, ist seine Funktionsweise in neuronalen und glialen Zelltypen am besten dokumentiert. Wie bei der Analyse von Signaltransduktionsmechanismen ist man bei funktionellen Studien mit einem Hauptproblem konfrontiert. Neurotrophine aktivieren nicht nur p75^{NTR}, sondern auch die Trk-Rezeptoren. Deshalb muss bei jedem Ansatz sichergestellt werden, dass ein beobachteter Neurotrophineffekt kausal auf p75^{NTR} zurückgeführt werden kann. Dies kann erstens durch Blockierung der Trk-Aktivität, wie beispielsweise durch den kommerziell erhältlichen Trk-Inhibitor K252a, erreicht werden. Da dieser Kinaseinhibitor tatsächlich jedoch nur eine mäßige Substratspezifität besitzt, können Effekte auf andere Signalkomponenten nicht ausgeschlossen werden. Kinasen liegen auch in von p75^{NTR} aktivierten Signalwegen. Umgekehrt kann zweitens p75^{NTR} durch funktionsblockierende Anti-p75^{NTR}-Antikörper ausgeschaltet werden. Bei dieser Methode könnten jedoch auch Homologe von p75^{NTR} erkannt und blockiert werden. Zudem lässt sich oft nur schwer zwischen agonistischen und antagonistischen Antikörpern unterscheiden. So zeigte sich, dass einer der meistgenutzten funktionsblockierenden Anti-p75^{NTR}-Antikörper, mc192 (Chandler C.E. et al., 1984), in sensorischen Neuronen tatsächlich NFκB aktiviert (Kimpinski K. et al., 1999). Der dritte und aussagekräftigste Ansatz ist die Verwendung von Exon IV-Deletionsmutanten. Mit dieser Kontrolle kann mit Sicherheit festgestellt werden, ob p75^{NTR} für einen beobachteten Effekt nötig ist.

In unterschiedlichen experimentellen Ansätzen wurde für p75^{NTR} eine kausale Rolle für drei zelluläre Funktionen gefunden: Zelltod und Überleben, Modulation des Zytoskeletts sowie Zellzyklus. Diese werden folgend im Einzelnen vorgestellt.

Zelltod

Aktives Auslösen von programmiertem Zelltod war die erste beschriebene Funktion von p75^{NTR} (Rabizadeh S. et al., 1993). Dieser Befund mit einer Zelllinie wurde mittlerweile mit zahlreichen Primärzellsystemen wie auch *in vivo* bestätigt. Im Speziellen wurde gezeigt, dass Aktivierung von p75^{NTR} mit NGF und auch BDNF den Zelltod von sympathischen Neuronen (Bamji S.X. et al., 1998), sensorischen Neuronen (Barrett G.L. und Bartlett P.F., 1994), hippocampalen Neuronen (Friedman W.J., 2000), Oligodendrozyten (Casaccia-Bonnel P. et al., 1996) sowie Schwannzellen (Soilu-

Hanninen M. et al., 1999) *in vitro* auslöst. *In vivo* wurde mit Hilfe von $p75^{NTR}$ -Deletionsmutanten herausgefunden, dass die Anzahl von cholinergen Vorderhirnneuronen im $p75^{NTR}$ -Knockout signifikant erhöht ist (Naumann T. et al., 2002). Die Anzahl von apoptotischen retinalen Ganglienzellen wie auch von apoptotischen Zellen im Rückenmark ist im $p75^{NTR}$ -Knockout zudem verringert (Frade J.M. und Barde Y.-A., 1999). Überexpression der intrazellulären Domäne von $p75^{NTR}$ in einem transgenen Mausmodell führt zu ausgedehntem Zelltod von kortikalen, sensorischen wie auch sympathischen Neuronen (Majdan M. et al., 1997). Interessanterweise scheint Trk-Aktivität die apoptotische Wirkung von $p75^{NTR}$ zu blockieren (Yoon S.O. et al., 1998). Es ist unklar, ob dieser Effekt durch die physische Interaktion der beiden Rezeptortypen bedingt ist (siehe 2.2.2.3) oder durch Dominanz von Trk über $p75^{NTR}$ -initiierte Signalwege. Bemerkenswerterweise scheint $p75^{NTR}$ am durch Neurotrophinmangel (und deshalb fehlende Trk-Aktivierung) ausgelösten Zelltod beteiligt zu sein. Sympathische Neuronen von $p75^{NTR}$ -defizienten Tieren sterben in Kultur nach Neurotrophindeprivation verzögert im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Bamji S.X. et al., 1998). Reduktion der Konzentration von $p75^{NTR}$ durch Antisense-Oligonukleotide in perinatalen sensorischen Neuronen erhöht ihre Überlebensrate bei Entzug von NGF (Barrett G.L. und Bartlett P.F., 1994). *In vivo* ist der natürliche Ablauf von Zelltod von sympathischen Neuronen in $p75^{NTR}$ -defizienten Tieren blockiert (Bamji S.X. et al., 1998).

In einer Reihe von experimentellen Ansätzen wurde JNK als eine zentrale Komponente von $p75^{NTR}$ -induziertem Zelltod identifiziert (Casaccia-Bonofil P. et al., 1996; Bamji S.X. et al., 1998; Friedman W.J., 2000). JNK kann sowohl durch Rac als auch Ceramid aktiviert werden (siehe 2.2.2.3). Es gibt Hinweise, dass der weitere Signalweg über p53 (Aloyz R.S. et al., 1998) und Caspasen (Wang X. et al., 2001; Troy C.M. et al., 2002) läuft. Als potenzielle Startpunkte von apoptotischen Signalwegen wurden die $p75^{NTR}$ -Interaktoren TRAF2 und 6, NRAGE/MAGE-D1, NADE und vor allem NRIF1 charakterisiert (siehe 2.2.2.3). Die Anzahl an apoptotischen retinalen Ganglienzellen in *nrif1*-Knockout-Mäusen ist ähnlich stark reduziert wie in $p75^{NTR}$ -Knockout-Tieren (Casademunt E. et al., 1999). Die detaillierten Bedingungen, unter denen $p75^{NTR}$ ein Zelltod auslösendes Signal sendet, sind noch nicht geklärt. Nicht nur stirbt stets nur ein Bruchteil von allen $p75^{NTR}$ exprimierenden Zellen, in manchen Fällen scheint $p75^{NTR}$ auch ein entgegengesetztes Signal zu vermitteln und das Überleben von Zellen zu fördern.

Überleben

Hinweise auf eine potenzielle Überlebensfunktion von $p75^{NTR}$ fanden sich bereits zu Beginn der Analyse der Exon III-Mutante. So ist die sensorische und sympathische Innervierung von unterschiedlichem Zielgewebe in dieser entweder stark reduziert oder fehlt völlig (Lee K.F. et al., 1992; Lee K.F. et al., 1994). Mit Hilfe der Exon IV-Mutante konnte ein signifikanter Verlust von sensorischen Neuronen in $p75^{NTR}$ -Knockout-Mäusen bestätigt werden (von Schack D. et al., 2001). Damit konsistent ist der Befund, dass $p75^{NTR}$ über Aktivierung von NF κ B das Überleben von sensorischen Neuronen *in vitro* fördert (Hamanoue M. et al., 1999). In einer Studie wurde gezeigt, dass $p75^{NTR}$ offensichtlich abhängig vom Entwicklungsstadium tatsächlich sowohl das Absterben als auch das Überleben von sensorischen Neuronen induzieren kann (siehe auch oben;

Barrett G.L. und Bartlett P.F., 1994). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist auch die Anzahl an Schwanzzellen in der Exon IV-Mutanten stark verringert (siehe 4.1.3). Ferner zeigen die p75^{NTR}-Interaktoren TRAF6, RIP2, FAP-1, ERK1/2 sowie IRAK *in vitro* anti-apoptotische Wirkung, welche über die Aktivierung von NFκB vermittelt werden könnte (siehe 2.2.2.3). Diese Befunde legen die Schlussfolgerung nahe, dass p75^{NTR} unter definierten Bedingungen analog zu Trk-Rezeptoren eine Überlebensfunktion innehaben kann.

Modulation des Zytoskeletts

Als weitere zelluläre Funktion von p75^{NTR} wurde die Modulation des Zytoskeletts in neuronalen und glialen Zellen erkannt. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde eine von p75^{NTR} abhängige Modulation des Neuritenwachstums festgestellt. Aktivierung von p75^{NTR} beschleunigt das Neuritenwachstum sowohl von dissoziierten hippocampalen (Brann A.B. et al., 1999) als auch Ciliarneuronen (Yamashita T. et al., 1999). *In-vivo*-Analysen zeigten, dass Deletion des p75^{NTR}-Gens das Auswachsen von sensorischen und Motoneuronen während der Embryonalentwicklung hemmt (Yamashita T. et al., 1999). Andererseits gibt es auch die Beobachtung, dass im myelinisierten ZNS das Wachstum von sympathischen Axonen in Abwesenheit von p75^{NTR} verstärkt ist (Walsh G.S., et al., 1999). Offenbar trägt p75^{NTR} zur Wachstumsblockade von Axonen im ZNS-Myelin bei. In Schwanzzellen moduliert p75^{NTR} deren Mobilität. *In vitro* stimuliert Aktivierung von p75^{NTR} die Wandergeschwindigkeit (Anton E.S. et al., 1994), wohingegen Inaktivierung des p75^{NTR}-Gens die Mobilität von Schwanzzellen verringert (Bentley C.A. und Lee K.F.).

Alle genannten Beobachtungen haben Veränderungen des Zytoskeletts gemein. Bei der Analyse der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen wurden in letzter Zeit signifikante Fortschritte erzielt. So wurde die kleine GTPase RhoA als intrazelluläres Bindungsprotein von p75^{NTR} identifiziert (Yamashita T. et al., 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass p75^{NTR} auch den Aktivitätszustand von RhoA modulieren kann. Versuche mit Zelllinien ergaben, dass p75^{NTR} RhoA konstitutiv aktiviert, Ligandenbindung jedoch zu einer raschen Inaktivierung führt (Yamashita T. et al., 1999). Interessanterweise moduliert p75^{NTR} den Aktivitätszustand von Rac, das wie Rho zur Unterfamilie der Rho-GTPasen gehört, in entgegengesetzter Weise – Aktivierung von p75^{NTR} mit NGF erhöht die Aktivität von Rac (siehe 2.2.2.3). Da die am besten dokumentierte Funktion der Rho-GTPasen die Modulation der Dynamik des Aktinzytoskeletts ist (Ridley A.J., 2000), könnten sie die zentralen Regulatoren dieser p75^{NTR}-Funktion sein.

Zellzyklus

Hinweise auf eine mögliche Rolle von p75^{NTR} in der Regulation des Zellzyklus stammen von *In-vitro*-Studien mit intrazellulären Interaktoren von p75^{NTR}. Überexpression von SC-1, NRAGE/MAGE-D1 sowie NRIF1 und 2 in Zelllinien führt zu einer reduzierten Proliferationsrate (siehe 2.2.2.3). Interessanterweise induziert Aktivierung von p75^{NTR} in postmitotischen retinalen Ganglienzellen einen Wieder-Eintritt in den Zellzyklus, bevor das Apoptoseprogramm initiiert wird (Frade J.M. et al., 2000). Mechanistische Details einer möglichen Kopplung zwischen Zelltod und Zellzyklus sind jedoch noch unklar. Grundsätzlich kann eine zwischen Wildtyp- und p75^{NTR}-Knockout-Tieren

unterschiedliche Gesamtzahl eines spezifischen Zelltyps nicht nur durch eine geänderte Apoptose- sondern auch Proliferationsrate bedingt sein.

Aufgabenstellung dieser Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war erkannt, dass Neurotrophine über $p75^{NTR}$ neuartige Funktionen ausüben, die den durch Trk-Rezeptoren vermittelten zum Teil entgegengerichtet sind. Für eine detaillierte molekulare Analyse der Signalaktivität von $p75^{NTR}$ war ein *In-vitro*-Ansatz unablässig. Das hauptsächliche Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines *In-vitro*- $p75^{NTR}$ -Assays. Idealerweise sollten damit ein $p75^{NTR}$ -vermittelter Effekt auf zellulärer Ebene dargestellt und parallel dazu die zugrunde liegenden biochemischen und molekularbiologischen Mechanismen mit entsprechenden Methoden identifiziert werden. Zentrale Ausgangspunkte waren dabei die Beobachtungen, dass $p75^{NTR}$ programmierten Zelltod auslösen wie auch die Dynamik des Aktinzytoskeletts modulieren kann. Um Neurotrophineffekte mit Sicherheit auf $p75^{NTR}$ zurückführen zu können, ist eine vollständige Deletionsmutante des $p75^{NTR}$ -Gens unabdingbar. Von entscheidender Bedeutung war deshalb die Charakterisierung der neu generierten Exon IV-Mutante im Vergleich zur Exon III-Mutante hinsichtlich der Rezeptorisoform s- $p75^{NTR}$. Überhaupt war zu Beginn dieser Arbeit noch unklar, ob diese Rezeptorisoform tatsächlich als endogenes Protein existiert. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb auch, s- $p75^{NTR}$ als Protein in Gewebe oder Primärzellen zu identifizieren.

3 MATERIAL und METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Bakterienschüttler: ISF-4-V (Adolf Kühner AG)
Bakterieninkubator (Heraeus)
Beobachtungskammer für Video-Imaging (konstruiert von Dr. Beat Ludin, F.M.I.)
CCD-Kamera: MicroMAX (Princeton Instruments, Inc.)
FACS-Gerät: FACSCalibur (Becton Dickinson)
Filmentwickler: Curix 60 (Agfa)
Geldokumentationssystem: Gene Genius (Syngene)
Heizblock: 2099 (Liebisch)
Mikroskope: Leica DM IRBE (Leica), Axioplan 2 imaging (Zeiss), Leica MZ6 (Leica), Eclipse TS100 (Nikon)
Ofen: WTB binder
PCR-Maschine: GeneAmp[®] PCR System 9700 (Perkin Elmer), Mastercycler gradient (eppendorf)
Polaroidkamera: MP-4 Land Camera (Polaroid)
Powersupply: Standard Power Pack P25 (Biometra[®])
Proteingele: Tall Mighty Small, Vertical Slab Gel Unit, Model SE280 (Hoefer Pharmacia Biotech)
Rotator: Mixing Rotor (Renner GmbH)
Schüttler: Thermomixer 5436 (eppendorf)
Spektralphotometer: Ultrospec 3000*pro* (Amersham Biosciences)
Sterilbank: Class II Type A/B3 (Beckman), HF 48 (Gelaire[®] Flow Laboratories)
Ultraschallgerät: Labsonic 2000 (B.Braun)
Ultraschallwasserbad: Sonorex Super RK102H (Bandelin electronic)
Waagen: PM4600 DeltaRange[®], AG204 DeltaRange[®] (jeweils Mettler Toledo)
Wasserbad: DC50 (Haake)
Wasserultrafiltrationsanlage: Seralpur 90 CN, Seralpur CF (jeweils Seral)
Western Semi-Trocken Transfer-Kammer: Werkstatt vom Max-Planck-Institut für Biochemie)
Western Wet Transfer-Kammer: Transphor Electrophoresis Unit, TE 50x (Hoefer Pharmacia Biotech)
Wippe: Assistent 348/1 (Karl Hecht GmbH & Co. KG)
Wirbler: Vortex-Genie[™] (Scientific Industries, Inc.)
Zellinkubatoren: IG150 (Jouan), Cytoperm und CO₂-Auto-Zero (Heraeus), Water-Jacketed Incubator (Forma Scientific)
Zentrifugen: 5415 D und 5417 R (eppendorf), 3K30 (Sigma/B. Braun), Varifuge 3.0R und Labofuge GL (Heraeus), Sorvall RC-5B Plus und RT 7 (DuPont Instruments)

3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien (Reinheitsgrad „Für die Analyse“) wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma, Serva, Merck, Roth oder Riedel-de Haën bezogen. Zellkultureinwegmaterial stammte von Nunc, Costar, Falcon und Greiner.

30% Acrylamid/Bis Solution, 37.5:1 (2.6% C) (Bio-Rad)
Type VII Low Gelling Temperature Agarose (Sigma)
Ammoniumpersulfat (Bio-Rad)
Annexin-V-Alexa™568 (Roche)
Aprotinin (Roche)
Bromphenolblau (Serva)
BSA, Fraktion V (Sigma)
Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva)
DAPI (Serva)
Deckgläser (Assistent; Karl Hecht GmbH & Co. KG)
DMSO (Sigma)
DNA-Molekulargewichtsmarker: 1 kb DNA Leiter (Roth)
DTT (Fluka)
dNTP Set, 100 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Amersham Biosciences)
ECL+plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences)
Einmach-Folie (Einzelhandel)
Ethidiumbromidlösung 1% (Sigma)
Glutathion-Sepharose™4B (Amersham Biosciences)
Fibronectin (Gibco™ Invitrogen Corp.)
Film: Hyperfilm™ ECL™ (Amersham Biosciences)
Filter 0.22 µm und 0.45 µm: Stericup™ (Millipore)
Forskolin (Sigma)
Immobilon™-P Transfer Membrane (PVDF) (Millipore)
IPTG (Roche)
Kapillarspitzen: GELoader Tips, 1-10 µl (Eppendorf)
Laminin1 (Gibco™ Invitrogen Corp.)
Laminin2 (Gibco™ Invitrogen Corp.)
Leupeptin (Roche)
β-Merkaptoethanol (Merck)
Mounting Medium: Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc.)
Nonidet P-40 (Sigma)
Objektträger (Menzel)
Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Gibco™ Invitrogen Corp.)
10x PCR-Puffer (Perkin Elmer)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) (Sigma)
PMSF (Roth)
Poly-L-Ornithin (MW 30000-70000); 0.01% Lösung (Sigma)
Poly-L-Lysin (MW 70000-150000); 0.01% Lösung (Sigma)
Propidiumiodid (Sigma)
Protein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences)
Proteinbestimmungsassay: Bio-Rad D_C Protein Assay (Bio-Rad)
Proteinmarker: Precision Protein Standards™, Prestained, Broad Range (Bio-Rad) und Prestained Protein Marker, Broad Range (New England Biolabs, Inc.)
Saran-Plastikfolie (Dow Chemical Company)

SDS (Merck)
Silikonfett (Wacker Chemie)
Slide-A-Lyzer[®] Dialyse-Kassetten, 3500MWCO (Pierce)
Staurosporin (Alexis Corp.)
TEMED (Sigma)
Triton X-100 (Sigma)
TRIzol[™] (Gibco[™] Invitrogen Corp.)
Trockenmilchpulver (Einzelhandel)
Trypsin-EDTA (Gibco[™] Invitrogen Corp.)
Tween 20 (Sigma)
Vitronectin (Gibco[™] Invitrogen Corp.)
Wasser (Sigma)
Whatman 3MMChr Papier (Whatman)
Wheat germ lectin Sepharose[™] 6MB (Amersham Biosciences)
Ziegen Serum (NGS) (Sigma)

3.1.3 Enzyme

AmpliTa[®]q DNA-Polymerase (Perkin Elmer)
DNaseI, RNase-frei (Roche)
Kollagenase (Worthington Biochemical Corp.)
Papain (Sigma)
Proteinase K (Roche)
RNase A (Roche)
Reverse Transkriptase SuperScript[™]II (Gibco[™] Invitrogen Corp.)
Taq DNA-Polymerase (Gibco[™] Invitrogen Corp.)
Trypsin (Worthington Biochemical Corp.)

3.1.4 ‘Kits’

Effectene[™] Transfektion (Qiagen)
RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen)

3.1.5 Bakterien

E. coli Stamm DH5 α (Promega)

3.1.6 Zelllinien

Soweit nicht anders angegeben, waren alle Zelllinien in der Abteilung vorhanden.

293 (ATCC #CRL 1573); Humane, embryonale Nierenzelllinie, die mit Adenovirus Typ5 (Ad5)-DNA transformiert worden ist.
293T Gleich wie 293, jedoch zusätzlich mit dem SV40 Large T Antigen transfiziert (erhalten von Dr. Stefan Grimm vom Max-Planck-Institut für Biochemie in

BHK	Martinsried/München). (ATCC #CCL-10); Fibroblasten-Zelllinie aus der Niere junger Hamster (erhalten von Dr. Stefan Grimm vom Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried/München).
CEM-S	Humane T-Zell Lymphoma-Zelllinie (erhalten von Prof. Peter Krammer am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg).
Kym-1	(Sekiguchi M. et al., 1985); Humane Rhabdomyosarkoma-Zelllinie (erhalten von Dr. Hartmut Engelmann vom Institut für Immunologie der LMU München).
MCF-7	(ATCC #HTB-22); Humane Mammakarzinoma-Zelllinie (erhalten von Dr. Hartmut Engelmann vom Institut für Immunologie der LMU München).
N20.1	(Verity A.N. et al., 1993); Maus-Oligodendrozytenlinie, die mit dem SV40 Large T Antigen transformiert worden ist (erhalten von Prof. Monique Dubois-Dalque vom Institut Pasteur in Paris).
PCNA	(Radeke M.J. et al., 1987); p75 ^{NTR} -überexprimierende Maus-LTK-Fibroblasten. Sie wurden mit genomischer DNA aus (Ratten-) PC12 Zellen transfiziert und mittels FACS auf Expression von p75 ^{NTR} selektiert.
WEHI-164-S	Ein Subklon der Maus-Fibrosarkoma-Zelllinie WEHI 164 (ATCC #CRL-1751) (erhalten von Dr. Hartmut Engelmann vom Institut für Immunologie der LMU München).

3.1.7 Tiere

C57Bl/6-Wildtyp-Mäuse: - Tierhaus des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried/München
- RCC Ltd, Itingen, Schweiz

p75^{ExonIII}-Linie: gemischter C57Bl/6-SV129 Hintergrund

p75^{ExonIV}-Linie: gemischter C57Bl/6-SV129 Hintergrund

EGFP-Aktin-Mäuse: zur Verfügung gestellt von Dr. Andrew Matus am F.M.I. (Fischer M. et al., 1998)

3.1.8 Plasmide

pcDNA3 (Invitrogen)

pEGFP-C1 (Clontech)

pcDNA3 – FL-p75^{NTR} (Bibel M. et al., 1999)

pcDNA3 – s-p75^{NTR} (von Schack D. et al., 2001)

pGEX-2T – TRBD (Ren X.D. et al., 1999)

3.1.9 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden bei metabion GmbH, Martinsried/München, oder Microsynth GmbH, Balgach, Schweiz, bestellt.

Die Sequenz ist stets in 5' → 3' Richtung angegeben.

mp75Ex4-S3
2590

GAT GGA TCA CAA GGT CTA CGC
TGT TGG AGG ATG AAT TTA GGG

pGK-2	AAG GGG CCA CCA AAG AAC GG
p75-U ₂	CAA GCC GTG CAC CGA GTG C
p75-D ₂	GTA GGC ACG GGT CCA CGT G
p75-KoD ₁	CGT CCT GCA CGA CGC GAG C
BDNF-s	GAC AAG GCA ACT TGG CCT AC
BDNF-as	ATT GGG TAG TTC GGC ATT GC
FL-p75-s	CCT GCC TGG ACA GTG TTA CG
FL-p75-as	GCC AAG ATG GAG CAA TAG ACA G
GAP-5-s	GTT GAA ACT TGG AAA GGT GGT
GAP-5-as	TCA TAT AAT ACC AAG AGG ATC C
GAPDH-s	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
GAPDH-as	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA
GARG-8/LIX-s	AGC TCG CCA TTC ATG CGG ATG
GARG-8/LIX-as	CTA TTG AAC ACT GGC CGT TCT
GluR2-s	CAA GGC AAG GCT GTC AAT
GluR2-as	GAT ATC GGA TGC CTC TCA CC
IP10-s	CCT ATC CTG CCC ACG TGT TG
IP10-as	CGC ACC TCC ACA TAG CTT ACA
JE-s	AGA GAG CCA GAC GGA GGA AG
JE-as	GTC ACA CTG GTC ACT CCT AC
KC-s	AAC GGA GAA AGA CAG ACT G
KC-as	GAC GAG ACC AGG AGA AAC AG
NGF-s	CTC CGG TGA GTC CTG TTG AA
NGF-as	CCA AGG ACG CAG CTT TCT AT
NT3-s	GGT GAA CAA GGT GAT GTC CAT C
NT3-as	GCT GCC CAC GTA ATC CTC CA
NT4-s	GGT GCT GGG CGA GGT GCC TGC
NT4-as	GGC ACG GCC TGT TCG GCT GAG
rtTA-s	CTC GAC GCC TTA GCC ATT G
rtTA-as	ATC GGT AAA CAT CTG CTC AAA CTC
s-p75-s	TGC CTG GAC AAG ATC CCT GG
s-p75-as	GGC CTG AGG CAG TCT GTG TG
Stat1-s	GCC CGA CCC TAT TAC AAA AA
Stat1-as	CTG CCA ACT CAA CAC CTC TG
TrkA-s	CGC AAC TGT CTG GTG GGT CAG GG
TrkA-as	GCC TGC AGA CGC GCG TGC AC
TrkB-s	ACC GTG ACC TGG CCA CCC GG
TrkB-as	CCC GCT GCC AGC ATC CGA GC
TrkC-s	CCA CTA CAA CAA TGG CAA CTA
TrkC-as	GTG TAG TGA TGC CAT GGT TGA

3.1.10 Antikörper

Primärantikörper

Anti-Aktin-Antikörper	monoklonal	(Chemicon International, Inc.)
Anti-Fas-Antikörper	monoklonal	(Upstate, Inc.)
Anti-GluR1-Antikörper	polyklonal	(Upstate, Inc.)
Anti-GluR2-Antikörper	polyklonal	(Chemicon International, Inc.)

Anti-GluR3-Antikörper	polyklonal	(DPC Biermann GmbH)
Anti-GluR4-Antikörper	polyklonal	(Upstate, Inc.)
Anti-KC-Antikörper	polyklonal	(Assay Designs, Inc.)
Anti-NGF-Antikörper	monoklonal	(Klon 27/21; in unserem Labor produziert)
Anti-p75 ^{NTR} -Antikörper	monoklonal	(Klon 192; Chemicon International, Inc.)
Anti-p75 ^{NTR} -Antikörper	polyklonal	(Promega)
Anti-p75 ^{NTR} -Antikörper	polyklonal	(erzeugt von Tim Hucho in unserem Labor)
Anti-p75 ^{NTR} -Antikörper	polyklonal	(zur Verfügung gestellt von Dr. Philip Barker, McGill University, Montreal, Kanada)
Anti-RhoA-Antikörper	monoklonal	(Santa Cruz, Inc.)
Anti-ROCK1-Antikörper	polyklonal	(Santa Cruz, Inc.)
Anti-ROCK2-Antikörper	polyklonal	(Santa Cruz, Inc.)
Anti-rtTA-Antikörper	monoklonal	(Clontech)
Anti-Stat1-Antikörper	polyklonal	(Santa Cruz, Inc.)

Sekundärantikörper

Esel Anti-Schaf-IgG-Antikörper	HRP-gekoppelt	(Sigma)
Esel Anti-Ziege-IgG-Antikörper	HRP-gekoppelt	(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)
Schaf Anti-Maus-IgG-Antikörper	DTAF-gekoppelt	(dianova)
Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	HRP-gekoppelt	(Pierce)
Ziege Anti-Maus-IgG-Antikörper	Cy TM 3-gekoppelt	(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)
Ziege Anti-Maus-IgG-Antikörper	HRP-gekoppelt	(Pierce)

3.1.11 Neurotrophine und andere Proteinfaktoren

Rekombinante Neurotrophine (NGF, BDNF, NT3) stammten von Genentech, Inc. oder Regeneron Amgen Partners. Sie waren in CHO Zellen oder in *E. coli* produziert worden. Rekombinantes murines TNF α wurde von Roche bezogen. p75^{NTR}-‘receptor body’ wurde in unserem Labor in A293 Zellen produziert (Doktorarbeit von David von Schack). Rekombinantes humanes GGF-2 wurde von Cambridge Neuroscience, Inc. erhalten.

3.1.12 Medien

Standardmedien für *E. coli* Bakterien wurden gemäß etablierten Protokollen angesetzt (Ausubel F.M. et al., 1993; Sambrook J. und Russell D.W., 2001). Bestandteile von Bakterienmedien stammten von DIFCO oder Invitrogen.

Ampicillin (Roth)

BME, Basalmedium (Eagle) (mit Earle’s Salzen, ohne L-Glutamin) (GibcoTM Invitrogen Corp.)

Click-RPMI Medium (Biochrom KG)

DMEM (mit Glutamax ITM, 4500 mg/l D-Glukose, Natriumpyruvat) (GibcoTM Invitrogen Corp.)

DMEM/F-12 (1:1) (mit Glutamax IITM) (GibcoTM Invitrogen Corp.)

Fötale Kälberserum (FCS) (30 min bei 56°C inaktiviert) (Sigma oder GibcoTM Invitrogen Corp.)

Geneticin Disulfat (G418) (Sigma)

Gentamycinsulfat (Sigma)

L-Glutamin (Gibco™ Invitrogen Corp.)
HEPES (Gibco™ Invitrogen Corp.)
Natriumbikarbonat (Gibco™ Invitrogen Corp.)
Natriumpyruvat (Gibco™ Invitrogen Corp.)
Neurobasal (Gibco™ Invitrogen Corp.)
Nicht-essenzielle Aminosäuren (Gibco™ Invitrogen Corp.)
Penicillin-Streptomycin (Gibco™ Invitrogen Corp.)
RPMI 1640 (mit Glutamax I™) (Gibco™ Invitrogen Corp.)
SATO-Medium: DMEM supplementiert mit BSA Fraktion V 100 µg/ml; Putrescin 16 µg/ml;
Natriumselenit 30 nM; Transferrin 100 µg/ml; Insulin 5 µg/ml; Progesteron
60 ng/ml; Thyroxin (T3) 0.4 µg/ml; Tri-iodothyroxin (T4) 0.3 µg/ml (alle
Supplementkomponenten von Sigma)
Supplement B27 (Gibco™ Invitrogen Corp.)
Ultraser®HY (Gibco™ Invitrogen Corp.)

3.1.13 Lösungen

Nicht näher beschriebene Lösungen wurden gemäß etablierten Protokollen angesetzt (Ausubel F.M. et al., 1993; Sambrook J. und Russell D.W., 2001). Wenn nicht anders vermerkt, ist immer die Zusammensetzung der 1x-Lösung angegeben.

BBS (2x)

280 mM NaCl
1.5 mM Na₂HPO₄
50 mM BES
mit NaOH auf pH 6.95

Coomassie-Färbelösung

50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Eisessig
0.4% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

Coomassie-Entfärbelösung

10% (v/v) Methanol
5% (v/v) Eisessig

DISG-Puffer

0.235 mM KH₂PO₄
0.246 mM Na₂HPO₄
0.137 M NaCl
5.365 mM KCl
5.41 mM Glukose
58.4 mM Saccharose
mit NaOH auf pH 7.1
Die Lösung wurde steril-filtriert.

Geltrocknungslösung

20% (v/v) Methanol
5% (v/v) Glyzerin

Kaplan-Puffer

1% Nonidet P-40

10% Glyzerin

10 µg/ml je Aprotinin und Leupeptin

1 mM PMSF

in 1x TBS

Aprotinin, Leupeptin und PMSF wurden stets frisch zugegeben.

Laemmli-Puffer (5x)

0.32 M Tris pH 6.8

44% (v/v) Glyzerol

25% (v/v) β-Merkaptoethanol

12.5% (w/v) SDS

0.001% (w/v) Bromphenolblau

Lysispuffer „Aufreinigung von GST-RBD-Fusionsprotein“

50 mM Tris pH 7.5

1% (v/v) Triton X-100

150 mM NaCl

5 mM MgCl₂

1 mM DTT

10 µg/ml je Aprotinin und Leupeptin

1 mM PMSF

Die Lösung wurde steril-filtriert um Präzipitate zu vermeiden.

DTT, Aprotinin, Leupeptin und PMSF wurden stets frisch zugegeben.

Lysispuffer „Affinitätspräzipitations-Assay für Rho-GTP“

50 mM Tris pH 7.2

1% Triton X-100

150 mM NaCl

10 mM MgCl₂

10 µg/ml je Aprotinin und Leupeptin

1 mM PMSF

Die Lösung wurde steril-filtriert um Präzipitate zu vermeiden.

Aprotinin, Leupeptin und PMSF wurden stets frisch zugegeben.

Lysispuffer „Genotypisierung“

100 mM Tris pH 8.5

5 mM EDTA

0.2% SDS

200 mM NaCl

100 µg/ml Proteinase K

Proteinase K wurde stets frisch zugegeben.

PBS (Gibco™ Invitrogen Corp.)**PBS/BSA/Glukose**

0.1% (w/v) BSA Fraktion V

10 mM Glukose

in 1x PBS

Die Lösung wurde steril-filtriert und auf -20°C gelagert.

SDS-Elektrophoresepuffer (5x)

0.125 M Tris Base
0.86 M Glyzin
0.5% (w/v) SDS

TBS (10x)

0.2476 M Tris Base
1.369 M NaCl
26.8 mM KCl
mit HCl auf pH 7.4

TBST

50 mM Tris Base
150 mM NaCl
0.1% (v/v) Tween 20

TE

10 mM Tris pH 7.4
1 mM EDTA pH 8.0

Tyrode's Puffer

25 mM Hepes pH 7.5
120 mM NaCl
4.8 mM KCl
2 mM CaCl_2
2 mM MgCl_2
0.6% Glukose
5 μM Glyzin

Waschpuffer „Aufreinigung von GST-RBD-Fusionsprotein“

50 mM Tris pH 7.5
0.5% Triton X-100
150 mM NaCl
5 mM MgCl_2
1 mM DTT
10 $\mu\text{g/ml}$ je Aprotinin und Leupeptin
1 mM PMSF

Die Lösung wurde steril-filtriert um Präzipitate zu vermeiden.
DTT, Aprotinin, Leupeptin und PMSF wurden stets frisch zugegeben.

Waschpuffer „Affinitätspräzipitations-Assay für Rho-GTP“

gleich wie Lysispuffer „Affinitätspräzipitations-Assay für Rho-GTP“

Western Blot Transferpuffer 'Semi-Dry-Blotting'

48 mM Tris Base
39 mM Glyzin
20% (v/v) Methanol
0.00375% (w/v) SDS

Western Blot Transferpuffer 'Wet-Blotting'

20 mM Tris Base
148.75 mM Glyzin
20% (v/v) Methanol

3.2 Methoden

Grundlegende molekularbiologische Methoden wie Plasmidpräparation und Agarose-Gelelektrophorese, als auch grundlegende mikrobiologische Methoden wie die Transformation von Bakterien und die Handhabung von bakteriellen Kulturen wurden, so nicht anders angegeben, gemäß etablierten Standardprotokollen durchgeführt (Ausubel F.M. et al., 1993; Sambrook J. und Russell D.W., 2001).

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden Zellen mit PBS gewaschen und in 26 µl TRIzol[®]/cm² Kulturfläche lysiert. Nach Zugabe von 1/10x Volumen an Chloroform wurde die Suspension für 10 min geschüttelt und anschließend für 10 min bei 14000 rpm mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die dabei entstandene obere wässrige Phase (die auch die RNA enthält) wurde abgenommen und mit 1x Volumen Isopropanol versetzt. Nach Fällung über 10 min auf Eis wurde die RNA bei 14000 rpm für 10 min mit einer Tischzentrifuge pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, und in 500 µl 10 mM Tris pH 7.5 / 5 mM MgCl₂ resuspendiert. Um Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde die RNA über 1 hr mit 20 u/ml DNase I bei 37°C inkubiert. Mittels Extraktion mit 1x Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde das Protein wieder entfernt. Nach Abnehmen der oberen wässrigen Phase wurde die RNA durch Zugabe von 1/10x Volumen an 3 M Na-Azetat pH 6.0 sowie 1x Volumen an Isopropanol über 5 min auf Eis gefällt und über 10 min Zentrifugation in einem SM24-Rotor bei 15000 rpm auf 4°C pelletiert. Die RNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach wenigen Minuten Lufttrocknung in 55 µl 10 mM Tris pH 7.5 resuspendiert. Um eine vollständige Resuspension zu erreichen, wurde die RNA vor der spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung über 15 min auf 37°C geschüttelt.

3.2.1.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. In einem ersten Schritt wurde diese Menge Gesamt-RNA mit 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml) versetzt und mit autoklaviertem a.d. auf 12 µl aufgefüllt. Nach 10 min auf 70°C wurden 4 µl 5x 'First Strand'-Puffer, 2 µl 0.1 M DTT sowie 0.4 µl einer 25 mM dNTP-Mischung (äquimolare Mengen dATP, dGTP, dCTP und dTTP) zugegeben. Nach Inkubation auf 42°C für 2 min wurde 1 µl Reverse Transkriptase SuperScript[™]II (200 u/µl) zugegeben und für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 15 min beendet. Die cDNA wurde direkt für eine PCR verwendet.

3.2.1.3 Semiquantitative PCR

Die optimale Anzahl der für die Amplifizierung erforderlichen Zyklen wurde für jeden Marker so bestimmt, dass die Detektionsgrenze überschritten wurde, die PCR aber noch nicht die Sättigungsphase erreicht hatte. Für die Visualisierung der Banden wurde Ethidiumbromid verwendet. Die Reaktionslösung von 50 µl setzte sich immer wie folgt zusammen: 1x Polymerasepuffer, je 0.2 µM Strang- und Gegenstrangprimer, 0.2 mM dNTP-Mischung (äquimolare Mengen dATP, dGTP, dCTP und dTTP), 1.5 mM MgCl₂, 1 µl template cDNA. 2.5 u AmpliTaq[®] DNA-Polymerase wurden nach einer initialen Denaturierungsphase (3 min 94°C; siehe unten) individuell zupipettiert ('Hot Start'). Während die Zykluszahl (n), die Annealing-Temperatur (T_a) und die Extensionszeit (t_e) für jeden Marker spezifisch war, wurde jede PCR-Reaktion nach folgendem Grundschema durchgeführt: 3 min 94°C; [30 s 94°C, 30 s T_a, t_e 72°C] n Zyklen; 5 min 72°C

Die einzelnen Marker sind wie folgt spezifiziert:

	T _a	t _e	n
BDNF	60°C	40 s	30
FL-p75 ^{NTR}	63°C	40 s	30
GAP-5	49°C	50 s	30
GAPDH	64°C	30 s	18
GARG-8/LIX	63°C	30 s	42
GluR2	55°C	30 s	32
IP-10	63°C	30 s	25
JE	60°C	40 s	32
KC	63°C	40 s	25
NGF	60°C	30 s	35
NT3	60°C	30 s	30
NT4	55°C	30 s	35
rtTA	58°C	50 s	35
s-p75 ^{NTR}	66°C	30 s	30
Stat1	55°C	40 s	32
TrkA	65°C	30 s	30
TrkB	64°C	30 s	30
TrkC	55°C	30 s	30

3.2.1.4 Microarray-Experiment nach Affymetrix, Inc.

RNA-Isolierung

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde die TRIzol[®]-Methode (siehe 3.2.1.1) mit der RNeasy[®]-Methode von Qiagen kombiniert. Von einer Probe wurden mindestens 15 µg Gesamt-RNA benötigt. Diese Menge konnte von primären cerebellären Kulturen aus zwei 10 cm Platten mit einer Zelldichte von jeweils 0.11x10⁶ Zellen/cm² gewonnen werden. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 26 µl TRIzol[®]/cm² Kulturfläche

lysiert. Nach Zugabe von 1/10x Volumen an Chloroform wurde die Suspension für 10 min geschüttelt und anschließend für 10 min bei 14000 rpm mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die dabei entstandene obere wässrige Phase (die auch die RNA enthält) wurde abgenommen und mit 1x Volumen Isopropanol versetzt. Nach Fällung über 10 min auf Eis wurde die RNA bei 14000 rpm für 10 min mit einer Tischzentrifuge pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in 100 µl autoklaviertem a.d. aufgenommen. Nach Lösen des Pellets wurden 350 µl Lysisbuffer RLT inklusive β-Merkaptoethanol (RNeasy[®]) zugegeben, gut gemischt und mit 250 µl Ethanol versetzt. Die Probe wurde anschließend auf eine Mini-Säule (RNeasy[®]) aufgetragen und für 30 s bei 10000 rpm mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 700 µl Buffer RW1 (RNeasy[®]) und zwei Waschschriffen mit jeweils 500 µl Buffer RPE (RNeasy[®]) wurde mit 50 µl autoklaviertem a.d. eluiert (1 min Zentrifugation mit 500 rpm). Um die Ausbeute an RNA zu erhöhen, wurde der Elutionsschritt mit gleichem Volumen wiederholt. Die Quantität an Gesamt-RNA wurde spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt (gemessen in a.d.), die Qualität spektralphotometrisch bei 260/280 nm (gemessen in 10 mM Tris pH 7.5). Da die Konzentration der Gesamt-RNA für das Microarray-Experiment mindestens 1.5 µg/µl betragen musste, wurde sie nochmals mit 1/10x Volumen 3 M Na-Azetat pH 6.0 und 1x Volumen Isopropanol über 5 min in Eis gefällt und bei 4°C über 10 min bei 20817 x g pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in autoklaviertem a.d. zu einer Konzentration von 1.5 µg/µl aufgenommen und durch 15 min Schütteln bei 37°C gelöst.

cDNA- und cRNA-Synthese, Hybridisierung, Lesen des Chips

Diese Schritte wurden von technischem Personal der Affymetrix-Service-Einheit des F.M.I. durchgeführt. Sie werden deshalb nur in kürzester Form beschrieben. Aus der Gesamt-RNA wurde zunächst doppelsträngige cDNA mit Hilfe eines T7-(dT)₂₄ Primers synthetisiert. Davon wurde in einer *In-vitro*-Transkription mit Hilfe von Biotin-gekoppeltem dUTP Biotin-markierte einzelsträngige cRNA synthetisiert. Diese wurde nach Fragmentierung mit den Oligonukleotiden auf dem GeneChip[®] U74Av2 hybridisiert. Nach einem sorgfältigen Waschschriff wurde der hybridisierte GeneChip[®] mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat inkubiert und das Fluoreszenzsignal von jedem Oligonukleotid mit einem GeneArray[®] Scanner abgelesen. Das dabei auf dem GeneChip[®] generierte Signalmuster wurde mittels spezieller Software analysiert.

Datenaufbereitung

Die GeneChip[®]-Rohdaten wurden mit dem Programm Affymetrix Microarray Suite 5 analysiert. Zunächst wurde für die beiden Zeitintervalle „4 Stunden NGF“ und „12 Stunden NGF“ ermittelt, ob sich das Hybridisierungssignal eines Gens im Vergleich zu „Anti-NGF-Antikörper“ verändert hat. Dazu wurden die einander entsprechenden Hybridisierungssignale auf einem GeneChip[®]-Paar für jedes Gen miteinander verglichen und gemäß dem ‘Wilcoxon signed rank test’ ein Änderungs-p-Wert berechnet. Bei diesem Test wird jedes Gen wie folgt kategorisiert. Ein Änderungs-p-Wert von < 0.003 bedeutet eine Steigerung der Hybridisierungsintensität (‘increase’, I), 0.003 < p-Wert < 0.005 eine marginale Steigerung der Hybridisierungsintensität (‘marginal increase’, MI), 0.995 < p-Wert < 0.997 eine marginale Verringerung der Hybridisierungsintensität (‘marginal decrease’, MD) und p > 0.997 eine Verringerung der Hybridisierungs-

intensität ('decrease', D). Gene mit $0.005 < p\text{-Wert} < 0.995$ wurden als unverändert klassifiziert ('no change', NC). Bei der Auflistung von Genen wurden sowohl die marginalen als auch nicht-marginalen Veränderungen berücksichtigt. Der Änderungs-p-Wert eines Gens von einem GeneChip[®]-Paar wurde anschließend mit dem entsprechenden Änderungs-p-Wert des zweiten GeneChip[®]-Paares verglichen (das Experiment wurde im Duplikat durchgeführt, siehe 4.2.5). Dabei wurden in der „UND“-Schnittstelle eines Venn-Diagramms alle jene Gene identifiziert, deren Hybridisierungsintensität sich in beiden Ansätzen des Duplikats erhöht oder in beiden verringert. Übereinstimmung zwischen den beiden Ansätzen ist die wichtigste Maßnahme, um das Hintergrundrauschen in der Analyse zu reduzieren. Anschließend wurden für die ausgewählten Gene mit dem (von Affymetrix, Inc. empfohlenen) 'One-Step Tukey's Biweight Estimate'-Algorithmus die Expressionswerte berechnet. Gene mit einem Detektions-p-Wert > 0.05 in beiden Ansätzen wurden als „nicht exprimiert“ eliminiert. Von den übrigen wurde die Expressionswertänderung zwischen zwei Bedingungen ermittelt. Dabei wurden wiederum alle Gene mit einer Änderung < 2.00 eliminiert. Das Ergebnis war eine Liste von Genen, deren Expression sich zwischen dem Kontrollwert (Anti-NGF-Antikörper-behandelte Zellen) und einem Testwert (4 oder 12 hrs NGF-Stimulation) um mindestens den Faktor 2.00 erhöht oder verringert hat. Eine starke numerische Änderung des Expressionswertes ist oft durch geringe Expression bedingt (je näher ein Expressionswert bei Null liegt, desto stärker fällt der Änderungswert aus; ist ein Expressionswert Null, ist die Expressionswertänderung unendlich). Aus diesem Grund wird für eine Änderung zu oder von einem Expressionswert < 50 kein Änderungsfaktor angegeben, sondern von einer „Ab-“ beziehungsweise „Anschaltung“ des betreffenden Gens gesprochen (siehe 4.2.5).

3.2.2 Proteinchemische Methoden

3.2.2.1 Protein-Isolierung

Zellkultur

Zellen wurden auf Eis einmal mit kaltem PBS gewaschen und mit $10\ \mu\text{l}$ Laemmli-Puffer/ cm^2 Kulturfläche lysiert. Das Lysat wurde gewirbelt und nach 8 min auf 95°C aliquotiert und auf -80°C weggefroren. Jedes Aliquot wurde nur einmal aufgetaut.

Gewebe

Gewebestücke wurden nass gewogen. Das Gewicht in [mg], geteilt durch 65, entsprach dem Volumen des Lysispuffers in [ml], in dem das Gewebe homogenisiert wurde. Diese empirische Formel ergibt eine Gesamt-Proteinkonzentration von ungefähr 5-10 mg/ml. Das Gewebe wurde zuerst in einem Douncer zerrieben und anschließend in einem Wasserbad für 30 s mit Ultraschall behandelt. Das Lysat wurde gewirbelt, für 8 min auf 95°C erhitzt, aliquotiert und auf -80°C weggefroren. Jedes Aliquot wurde nur einmal aufgetaut.

3.2.2.2 Aufreinigung von Anti-NGF-Antikörper

Hybridomzellen, die den monoklonalen Anti-NGF-Antikörper 27/21 sezernieren, wurden in Produktionsmedium (siehe 3.2.3.1) kultiviert. Der Überstand der Hybridomzellen wurde gesammelt, zu 10% mit Waschbuffer (100 mM Natrium-Phosphatbuffer pH 7.0) versetzt und durch eine 0.45 µm Membran filtriert. Anschließend wurde der Überstand auf eine Protein A Sepharose™-Säule (5 mm Durchmesser) geladen. Die Säule war mit 1.5 ml Gelbettvolumen Protein A Sepharose beladen und mit Waschbuffer äquilibriert worden. Es wurde jeweils 1 l Überstand mittels Schwerkraft durch die Säule geschickt. Die Flussrate wurde auf ungefähr 0.5 ml/min eingestellt. Anschließend wurde der Antikörper mit Elutionsbuffer (0.1 M Glyzin pH 3.0) eluiert. Es wurden 1 ml Fraktionen in vorbereiteten 0.5 ml Neutralisierungsbuffer (1 M Tris pH 9.0) gesammelt. Für jede Fraktion wurde die Proteinkonzentration spektralphotometrisch bestimmt ($A_{280\text{nm}}$). Die Fraktionen mit hoher Proteinkonzentration wurden vereinigt und mit einer Dialysierkassette dreimal gegen jeweils 1 l PBS dialysiert. Nach erneuter Messung der Proteinkonzentration durch $A_{280\text{nm}}$ wurde der Antikörper à 50 µl aliquotiert und weggefroren.

3.2.2.3 Aufreinigung von GST-Rhotekin

Das Expressionskonstrukt pGEX-2T – TRBD, in der die Rho bindende Domäne von Rhotekin (TRBD) an die Glutathion bindende Domäne von Glutathion-S-Transferase (GST) im Vektor pGEX-2T fusioniert ist, wurde in *E.coli* Bakterien vom Stamm DH5α transformiert (Selektion mit 100 µg/ml Ampicillin). Von dieser transformierten Linie wurden zunächst 25 ml einer Übernacht-Kultur gezogen. Die Start-Kultur wurde auf drei 2 l Kolben mit jeweils 500 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) verteilt und bis zu einer OD_{600} von 0.8 gezogen. An diesem Punkt wurde die Expression des GST-TBRD Fusionsproteins mit 1 mM IPTG induziert und die Bakterien bei 32°C für weitere 5 hrs kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4°C über 10 min mit 4000 rpm (SLA-3000 Rotor) abzentrifugiert und in 4 ml Lysisbuffer/mg Pellet-Nassgewicht lysiert. Von dieser Stelle an wurden alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt. Das Lysat wurde in 15 ml Aliquots in 30 ml Plastikzentrifugenbecher transferiert und mit sieben 15 s Pulsen zu 46 W, unterbrochen von jeweils 1 min Intervallen, sonifiziert. Zelltrümmer wurden bei 13000 rpm (Rotor HB-4) über 30 min abzentrifugiert und der Überstand auf gründlich gewaschene und mit Lysisbuffer äquilibrierte Glutathion-Sepharose übertragen. Pro Milliliter ursprünglicher Bakterienkultur wurden 0.66 µl Gelbettvolumen Glutathion-Sepharose verwendet. Von diesem Schritt an wurde bei 4°C Raumtemperatur gearbeitet und die Materialien auf Eis gelagert. Nach 60 min Inkubation unter Rotation wurde die mit TBRD beladene Sepharose 4x mit je 15 ml Waschbuffer und 1x mit Waschbuffer, versetzt mit 10% Glycerol, gewaschen (jeweils 3 min Zentrifugation mit 1500 rpm im RT-H250 Rotor). Abschließend wurde die TBRD-Sepharose in 6.66 µl Waschbuffer, versetzt mit 10% Glycerol, pro Milliliter ursprünglicher Bakterienkultur resuspendiert, à 250 µl aliquotiert und bei –80°C weggefroren.

3.2.2.4 Affinitätspräzipitations-Assay für Rho-GTP

Alle Schritte dieses Assays wurden bei 4°C Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen wurden auf Eis zunächst zweimal mit kaltem TBS gewaschen. Durch Schrägstellen der Kulturschale nach dem zweiten Waschschrift wurde alles TBS entfernt. Die Zellen

wurden mit 15 µl kaltem Lysispuffer/cm² Kulturfläche lysiert. Das Lysat wurde mit 13000 x g über 5 min zentrifugiert, 20 µl des Überstandes abgenommen für die Detektion von Gesamt-Rho und der Rest auf TBRD-Sepharose transferiert. Die TBRD-Sepharose wurde zuvor mit Lysispuffer gründlich gewaschen (um das Glycerol zu entfernen) und äquilibriert. Pro Zellprobe wurden ungefähr 20 µg TBRD eingesetzt, das entspricht ungefähr 70 µl an in 3.2.2.3 beschriebener TBRD-Sepharose-Suspension. Nach 60 min Inkubation unter Rotation wurde die Sepharose 4x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen (5000 rpm in Tischzentrifuge über 1 min). Nach dem letzten Waschschrift wurde der Lysispuffer bis auf 40 µl entfernt, 10 µl 5x Laemmli-Puffer zugegeben, und Rho-GTP durch Erhitzen auf 95°C für 10 min von der Sepharose gelöst. Mit Kapillarspitzen wurde das Eluat auf 13%iges SDS-PA-Gel aufgetragen.

3.2.2.5 SDS-PAGE

Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht mittels denaturierender diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zu diesem Zweck wurde das 'Tall Mighty Small'-System von Hoefer Pharmacia Biotech verwendet. Nach Gießen des Trenngels wurde die Geloberfläche mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Fokussiergel gegossen. Im Folgenden ist die Zusammensetzung der unterschiedlich stark konzentrierten Trenngele sowie des invarianten Fokussiergels für jeweils ein Gel zusammengefasst (in ml).

	Trenngel				Fokussiergel
	8%	10%	12%	13%	
30% Acrylamid/ 0.8% Bisacrylamid	4.00	5.00	6.00	6.50	0.65
1.5 M Tris pH 8.8/ 0.4% SDS	3.75	3.75	3.75	3.75	1.25
a.d.	7.25	6.25	5.25	4.75	3.05
10% Ammonium- persulfat	0.05	0.05	0.05	0.05	0.025
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.005

Fertige Gele wurden für höchstens zwei Wochen, eingewickelt in befeuchtetes Papier, in Plastikfolie auf 4°C gelagert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde jede Probe für 3 min auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Während des Laufs durch das Fokussiergel wurde die Stromstärke auf 13 mA/Gel gehalten, nach Eintritt der Proben in das Trenngel wurde auf 26 mA/Gel erhöht. Nachdem der Marker den unteren Rand erreicht hatte, wurde der Lauf beendet und das Gel entweder einer Coomassie-Färbung (siehe 3.2.2.7) oder Western Blotting (siehe 3.2.2.6) zugeführt.

3.2.2.6 Western Blotting

Semi-Dry-Blotting

Proteine wurden elektrophoretisch mit einer Semi-Dry-Transferapparatur auf eine PVDF-Membran übertragen („geblottet“). Dazu wurde auf der Metallbodenplatte der Blotapparatur - der Kathode - das Gel und die Membran in folgender Weise geschichtet: drei Blätter von in Transferpuffer eingeweichtes Whatman 3MM Papier, in reinem Methanol angefeuchtete und mit Transferpuffer gespülte PVDF-Membran, das Gel (das Fokussiergel wurde zuvor abgetrennt), drei Blätter von in Transferpuffer eingeweichtes Whatman 3MM Papier. Die Blätter Whatman 3MM Papier, die Membran und das Gel hatten jeweils die gleiche Abmessung. Luftblasen wurden mit einer Pipette vorsichtig aus dem Stapel herausgedrückt. Der Deckel - die Anode - wurde fixiert und mit ungefähr 2 kg beschwert. Es wurde für 1 hr mit 5 mA/cm² Gelfläche geblottet. Anschließend wurde mit der Membran wie unten beschrieben verfahren.

Wet-Blotting

Für einen über die gesamte Gelfläche sehr gleichmäßigen Membrantransfer erwies sich die ‘Wet-Blotting’-Methode besser geeignet. Auch bei diesem Ansatz wird ein Stapel bestehend aus Whatman 3MM Papier, Gel und PVDF-Membran assembliert: ein in Transferpuffer eingeweichtes Blatt Whatman 3MM Papier, das Gel, die PVDF-Membran (in reinem Methanol angefeuchtet und mit Transferpuffer gespült), ein in Transferpuffer eingeweichtes Blatt Whatman 3MM Papier. Dieser Stapel wurde zwischen zwei mit Transferpuffer befeuchtete Schwämme gelegt und in einer Halterung in der entsprechenden Orientierung (das Gel auf der Seite der Anode, die Membran auf der Seite der Kathode) in die Kammer, die mit Transferpuffer gefüllt ist, gehängt. Es wurde die maximale Stromstärke angelegt (ungefähr 0.9 A bei rund 100 V) und typischerweise über 60 min geblottet. Der Transferpuffer wurde für zwei Blot-Vorgänge verwendet.

Unabhängig vom verwendeten Blotting-Protokoll wurde die Membran anschließend für 1 hr auf RT in Blockierlösung (TBST plus 3.5-5% (w/v) Trockenmilch, siehe unten) unter Agitation inkubiert. Danach wurde der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung zugegeben und auf 4°C ü/n inkubiert. Die Antikörperverdünnungen waren wie folgt:

Anti-Aktin-Antikörper	1:15000
Anti-GluR1-Antikörper	1:1000
Anti-GluR2-Antikörper	1:2000
Anti-GluR3-Antikörper	1:3000
Anti-GluR4-Antikörper	1:1000
Anti-KC-Antikörper	1:2000
Anti-p75 ^{NTR} -Antikörper (Klon 192)	1:2000
Anti-p75 ^{NTR} -Antikörper (Tim Hucho)	1:10000
Anti-p75 ^{NTR} -Antikörper (Phil Barker)	1:2000
Anti-RhoA-Antikörper	1:2000
Anti-ROCK1-Antikörper	1:1000
Anti-ROCK2-Antikörper	1:2000
Anti-rtTA-Antikörper	1:1000
Anti-Stat1-Antikörper	1:2000

Nach 3x 10 min Waschen mit TBST wurde der jeweilige Sekundärantikörper in Blockierlösung (3.5% Trockenmilch; für Anti-Aktin- sowie Anti-p75^{NTR}-Antikörper [Tim Hucho] jeweils 5%) für 1 hr auf RT zugegeben (immer in einer Verdünnung von 1:10000). Nach vier jeweils einstündigen Waschschritten mit TBST wurde die Membran einer ECL-Detektion zugeführt. Zu diesem Zweck wurde nach Angaben des Herstellers die Proteinseite der Membran für 5 min mit Detektionslösung (Reagens A: Reagens B im Verhältnis 40:1) benetzt, in Plastikfolie eingewickelt und damit ein Film über einen sinnvollen Zeitraum exponiert.

3.2.2.7 Coomassiefärbung von PA-Gelen

PA-Gele wurden zunächst ü/n in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurden sie in mehrmals zu wechselnde Entfärbelösung transferiert. Der Entfärbeporgang wurde durch kurzes Erhitzen der Entfärbelösung in der Mikrowelle beschleunigt. Gefärbte Gele wurden in Gel-trockenlösung ü/n äquilibriert und zwischen Einmach-Folie getrocknet.

3.2.2.8 WGA-Präzipitation

Zellen wurden auf Eis einmal mit kaltem PBS gewaschen und mit 18 µl kaltem Kaplan-Puffer/cm² Kulturfläche lysiert. Das Lysat wurde über 10 min bei 4°C mit 16000 x g pelletiert. Der Überstand wurde mit WGA-Sepharose ü/n unter Rotation bei 4°C inkubiert. Pro Ansatz wurden 20 µl Gelbettvolumen WGA-Sepharose verwendet. Die Sepharose wurde vor der Inkubation mit Kaplan-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die Probe 3x mit Kaplan-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Volumen auf 40 µl eingestellt. 20 µl der Suspension wurden mit 5 µl 5x Laemmli-Puffer versetzt, für 10 min auf 95°C erhitzt, und das Eluat mit einer Kapillarspitze auf ein PA-Gel aufgetragen. In der anderen 20 µl Fraktion wurde die Sepharose sedimentiert, der Überstand verworfen und 40 µl Kaplan-Puffer, versetzt mit 1 M N-Azetyl-D-Glukosamin, zugegeben (N-Azetyl-D-Glukosamin wurde direkt in Kaplan-Puffer durch Erwärmen auf 50°C gelöst). Nach Inkubation über 2 hrs unter Rotation auf RT wurde die Sepharose sedimentiert, der Überstand abgenommen und mit 10 µl 5x Laemmli-Puffer versetzt. Nach Erhitzen auf 95°C für 10 min wurde die Probe auf einem PA-Gel analysiert.

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

293, 293T, BHK, PCNA

Diese vier Zelllinien wurden in DMEM, supplementiert mit 10% FCS und 1% P-S, auf unbeschichteten Zellkulturschalen bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert.

WEHI-164-S, MCF-7

Diese zwei Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 10% FCS und 1% P-S, auf unbeschichteten Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Kym-1

Diese Zelllinie wurde in Click-RPMI Medium (Biochrom KG), supplementiert mit 1.175 g/l NaHCO₃, 10% FCS und 1% P-S, auf unbeschichteten Zellkulturschalen bei 37% und 5% CO₂ kultiviert.

CEM-S

Diese Zelllinie wurde in RPMI 1640 Medium, supplementiert mit 10 mM HEPES, 2 mg/ml Gentamycinsulfat und 10% FCS, in Suspension bei 37% und 5% CO₂ kultiviert.

N20.1

Diese Zelllinie wurde in DMEM : Ham F-12 (1:1) Medium, supplementiert mit 3.38 g/l HEPES, 2.16 g/l Na₂(HCO₃)₂, 90 mg/l Gentamycinsulfat, 100 µg/ml G418 sowie 10% FCS, auf unbeschichteten Zellkulturschalen bei 37% und 5% CO₂ kultiviert.

Hybridomzellen

Diese den Anti-NGF-Antikörper 27/21 produzierenden Zellen wurden nach dem Auftauen zunächst in DMEM, supplementiert mit 10% FCS, in Suspension bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Nach zwei Passagen wurde auf serumfreies Produktionsmedium (DMEM, supplementiert mit 2% Ultrosor[®], 1% L-Glutamin, 0.5% Natriumpyruvat, 1% nichtessenzielle Aminosäuren sowie 0.001% β-Merkaptoethanol) gewechselt. In diesem wird die Antikörpersekretion induziert. Jeden Tag wurde Produktionsmedium zugegeben, sodass sich die Zellen permanent im Wachstum befanden. Einmal pro Woche wurde das Medium abgenommen, für 5 min mit 2000 rpm zentrifugiert, und auf 4°C bis zum Beladen der Protein A Sepharose-Säule gelagert (siehe 3.2.2.2).

3.2.3.2 Präparation und Kultivierung von primären Schwannzellen

Für die Präparation von primären Schwannzellen wurden Nervi ischiatici von p3-Mäusen verwendet. Nerven wurden proximal bis zum Rückenmark freigelegt, distal bis zu den Verzweigungen ins Fußgelenk. Nach Heraustrennung wurden sie in DISG-Puffer gelagert und von Resten fremden Gewebes befreit. Anschließend wurden sie in 0.5 ml DISG-Puffer in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und 0.5 ml einer 5 mg/ml Kollagenaselösung (in DISG-Puffer frisch gelöste Kollagenase) zugegeben. Die Nerven wurden bei 37°C für 7-9 min unter regelmäßigem Schütteln inkubiert bis sie aufzuschwellen begannen. Dann wurden 100 µl einer 2.5%igen Trypsinlösung (in DISG-Puffer frisch gelöstes Trypsin) zugegeben und nach weiteren 4-5 min auf 37°C wurde der Verdau durch Zugabe von 2 ml DMEM, supplementiert mit 10% FCS, gestoppt. Die Nerven wurden über 5 min mit 1200 rpm sedimentiert, in DMEM, supplementiert mit 10% FCS und 10 u/ml DNase I, aufgenommen und mit einer silikonisierten, in der Flamme polierten, Pasteurpipette trituriert. Die Zellen wurden danach in einer Neubauer-Kammer gezählt und in einer Dichte von 1.6×10^4 Zellen/cm² in DMEM, supplementiert mit 10% FCS, ausplattiert. Die Kulturschalen waren zuvor mit 0.01%iger Poly-L-Lysin-Lösung für mindestens 2 hrs auf 37°C beschichtet und 3x mit PBS gewaschen worden. Sie wurden ohne zu trocknen verwendet.

3.2.3.3 Präparation und Kultivierung von primären cerebellären Neuronen

Für die Präparation von primären cerebellären Neuronen wurden Cerebella von p7-Mäusen verwendet. Cerebella wurden in PBS/BSA/Glukose gelagert und von Meningen und Blutgefäßen befreit. Anschließend wurden sie für 20 min auf 37°C in PBS/BSA/Glukose mit 0.5 mg/ml Papain (wurde vor Gebrauch frisch in PBS/BSA/Glukose gelöst) und 10 u/ml DNase I inkubiert (pro Cerebellum 1 ml Lösung). Danach wurde die Lösung abgenommen und 3 ml PBS/BSA/Glukose zugegeben. Cerebella wurden mit einer in der Flamme polierten Pasteurpipette in drei Phasen trituriert. Zunächst 10x sehr langsam, dann 15x gemäßigt, zum Schluss 15x stark. Zwischen jeder Phase wurde die Zellsuspension nach Absetzen der Gewebestücke abgenommen und durch PBS/BSA/Glukose ersetzt. Zur gesammelten Zellsuspension wurde das gleiche Volumen Neurobasal-Medium, supplementiert mit 1x B27 und 2 mM L-Glutamin, gegeben und genomische DNA aus zerstörten Zellen mit einer Pipette entfernt. Zellen wurden danach mit 1200 rpm über 5 min pelletiert, der Überstand vorsichtig abgenommen, in 10 ml Neurobasal-Medium, supplementiert mit 1x B27 und 2 mM L-Glutamin resuspendiert und durch ein Zellsieb (40 µm) geschickt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen in einer Neubauer-Kammer bestimmt und die Zellen in einer Dichte von 0.11×10^6 Zellen/cm² in Zellkulturschalen in Neurobasal-Medium, supplementiert mit 1x B27 und 2 mM L-Glutamin, ausplattiert. Die Schalen waren zuvor mit 0.01%iger Poly-L-Lysin-Lösung für mindestens 2 hrs auf 37°C beschichtet und 3x mit PBS gewaschen worden. Sie wurden ohne zu trocknen verwendet.

3.2.3.4 Präparation und Kultivierung von primären hippocampalen Neuronen

Primäre hippocampale Neuronen wurden aus Hippocampi von 16.5 dpc Mausembryonen gewonnen. Männchen wurden dazu ü/n mit Weibchen verpaart, und Weibchen mit einem Vaginalpropfen am Morgen separiert. Der Mittag dieses Tages wurde als 0.5 dpc gezählt. Die Hippocampi wurden in PBS/BSA/Glukose gelagert und von kortikalen Strukturen befreit. Anschließend wurden sie für 5 min auf 37°C in 2 ml PBS/BSA/Glukose mit 0.1 mg/ml Papain (wurde vor Gebrauch frisch in PBS/BSA/Glukose gelöst) und 10 u/ml DNase I inkubiert. Danach wurde die Lösung abgenommen und 3 ml PBS/BSA/Glukose zugegeben. Hippocampi wurden mit einer in der Flamme polierten Pasteur-Pipette 10x langsam trituriert und nach Zugabe von 3 ml BME-Medium, supplementiert mit 1x B27, 0.45% (w/v) Glukose und 2 mM L-Glutamin wurden die Zellen über 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 10 ml BME-Medium, supplementiert mit 1x B27, 0.45% Glukose und 2 mM L-Glutamin, resuspendiert. Nach Passieren durch ein 40 µm Zellsieb wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt und in einer Dichte von 0.11×10^6 Zellen/cm² in Zellkulturschalen in BME-Medium, supplementiert mit 1x B27, 0.45% Glukose, 2 mM L-Glutamin, ausplattiert. Die Kulturschalen waren zuvor mit einer 0.01%igen Poly-L-Ornithin-Lösung ü/n auf 37°C beschichtet und 3x mit PBS gewaschen worden. Sie wurden ohne zu trocknen verwendet.

3.2.3.5 Transfektionsmethoden

CaPO₄-Präzipitation

Zellen wurden am Vortag der Transfektion so gesplittet, dass sie am nächsten Tag ungefähr 40-50% konfluent waren. 293 Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen transfiziert. Pro Schale wurde in einem 4 ml Röhrchen die folgende Transfektionslösung in dieser Reihenfolge zusammenpipettiert: 450 µl a.d., 2.5 µg Konstrukt DNA plus 2.5 µg Vektor DNA (die Gesamtmenge an DNA sollte 5 µg nicht unterschreiten), 50 µl CaCl₂, kurz geschüttelt, 500 µl 2x BBS-Puffer pH 6.95, sehr heftig über 1 min geschüttelt. Nach 20 min Inkubation auf RT wurde die Lösung tropfenweise zu 9 ml Medium pipettiert und die Zellen ü/n bei 3% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde anschließend gewechselt, die Zellen mehrmals gewaschen und in frischem Zellkulturmedium wieder bei 10% CO₂ inkubiert. Nach ungefähr 48 hrs wurden die Zellen geerntet. Kym-1 Zellen wurden in 15 cm Kulturschalen transfiziert. Der Ansatz war der gleiche wie für 293 Zellen, die Menge der Reagenzien wurde jedoch um den Faktor 2.5 erhöht, der vergrößerten Kulturfläche entsprechend. Die 2.5 ml an Transfektionslösung wurden tropfenweise auf 17.5 ml Medium pipettiert und die Zellen für 5 hrs bei 3% CO₂ inkubiert. Danach wurde gründlich gewaschen und in frischem Kulturmedium wieder bei 5% CO₂ inkubiert.

Effectene™

WEHI-164-S Zellen wurden nach der Effectene™ Methode von Qiagen transfiziert. Grundsätzlich wurde dabei nach den Angaben des Herstellers verfahren, doch wurde das Protokoll für diesen speziellen Zelltyp im Detail optimiert. Zellen wurden zwei Tage vor der Transfektion so gesplittet, dass sie am Tag der Transfektion ungefähr 70-80% konfluent waren. WEHI-164-S Zellen wurden in 10 cm Schalen transfiziert. 3 µg Konstrukt DNA wurden in 300 µl DNA-Kondensierungs-Buffer EC aufgenommen und 24 µl Enhancer zugegeben. Nach 5 min Inkubation auf RT wurden 75 µl Effectene Transfektionsreagens (zu eingesetzter DNA im Verhältnis 1:25) zugegeben und kurz geschüttelt. Nach 10 min Inkubation auf RT wurden 3 ml Kulturmedium zugefügt und die Mischung tropfenweise auf die Zellen zu 7 ml Medium pipettiert. Das Medium auf den Zellen wurde unmittelbar vorher gewechselt. Zellen wurden anschließend unter den üblichen Bedingungen für 7.5 hrs inkubiert, bevor das Transfektionsmedium entfernt und nach gründlichem Waschen mit normalem Zellkulturmedium ersetzt wurde.

3.2.3.6 Erzeugung von stabil transfizierten Zelllinien

WEHI-164-S und Kym-1 Zellen wurden gemäß den in 3.2.3.5 beschriebenen Protokollen transfiziert. Als wesentlicher Unterschied wurde für diesen Ansatz jedoch linearisierte DNA verwendet. Dies sollte die rekombinative Integration des Plasmids außerhalb des Inserts in das Wirtsgenom gewährleisten. Für die Selektion von transfizierten Zellen wurde zusätzlich ein *neo*-Selektionsplasmid im molaren Verhältnis 1:10 zum Markerplasmid ko-transfiziert. Zwei oder drei Tage (abhängig von der Zelldichte) nach der Transfektion wurde die Selektion mit Wechsel auf G418 enthaltendes Kulturmedium gestartet. Die ideale Konzentration von G418 wurde zuvor für beide Zelllinien durch Titration bestimmt. Dabei wurde jene Mindestkonzentration ermittelt, bei der nicht-transfizierte Zellen vollständig absterben. Für beide Linien war diese Konzentration 250

μg G418/ml Kulturmedium. Nach Beginn der Selektion wurde das Medium jeden Tag gewechselt um abgestorbene Zellen zu entfernen. Sofern einzelne Klone herangewachsen waren (typischerweise nach drei bis vier Wochen), wurden sie mit Klonier-Ringen vereinzelt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit PBS gewaschen, alles PBS gründlich abgesaugt und die autoklavierten Metallringe, die auf der Unterseite mit Silikonfett beschichtet waren, in rascher Folge auf die einzelnen Klone auf der Kulturschale aufgesetzt. In jeden Ring wurden anschließend 20 μl einer 0.5x Trypsin/EDTA-Lösung (1:2 mit PBS) pipettiert und nach wenigen Minuten Inkubation auf RT wurde mit 100 μl Medium neutralisiert. Die Zellen innerhalb eines Rings wurden durch mehrmaliges Pipettieren von der Schale gelöst und dissoziiert und in ein 96well transferiert. In weiterer Folge wurde ein Klon in Selektionsmedium bis in 10 cm Schalen hochgezogen. An dieser Stelle wurden Aliquots weggefroren (siehe 3.2.3.7)

3.2.3.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit 0.5x Trypsin/EDTA-Lösung von der Oberfläche gelöst, in den Zellen entsprechendem Kulturmedium aufgenommen, gezählt, und pelletiert. Anschließend wurden sie auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert, auf Gefrier Röhrchen à 1.8 ml aliquotiert und auf Eis zwischengelagert. Das Einfriermedium basierte auf dem jeweils verwendeten Kulturmedium, das für diesen Zweck jedoch mit 20% FCS und 10% DMSO supplementiert wurde. Die Gefrier Röhrchen wurden dann in eine Kryobox (Nalgene® Cryo 1°C Freezing Container, Nunc), aufgefüllt mit Isopropanol auf RT, transferiert und auf -80°C gestellt. Am nächsten Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff überstellt.

Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurden Zellen aus flüssigem Stickstoff heraus auf Trockeneis gegeben und von dort direkt in ein 37°C Wasserbad gestellt. Noch bevor sie vollständig aufgetaut waren, wurden sie in vorgewärmtes Kulturmedium überführt, typischerweise 12 ml in einem 15 ml Falcon-Röhrchen. Nach Durchmischung wurden die Zellen pelletiert, in 6 ml Kulturmedium aufgenommen und in eine 6 cm Schale ausplattiert. Typischerweise waren die Zellen am nächsten Tag konfluent und konnten expandiert werden.

3.2.3.8 Propidiumiodid/FACS-Assay

Zellen wurden in 6well Platten in einer Dichte von 0.1×10^6 Zellen/ cm^2 ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde TNF (20 ng/ml), Anti-Fas-Antikörper (500 ng/ml), NGF (100 ng/ml) oder Staurosporin (2 μM) zugegeben und über 16 hrs stimuliert. Danach wurde das Kulturmedium gesammelt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 0.1x Trypsin/EDTA-Lösung (1:10 mit PBS) behandelt. Unter Schütteln wurden die Zellen vom Substrat gelöst, zum Überstand gegeben und mit 1200 rpm über 5 min pelletiert. Anschließend wurden sie in kaltem 80% Ethanol resuspendiert und über 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden sie wieder pelletiert, mit kaltem PBS einmal gewaschen und zu 2×10^6 Zellen/ml in PBS mit 0.1% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 2.5 u/ml RNaseA und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidiumiodid aufgenommen. Die Proben wurden im Dunkeln auf 4°C ü/n inkubiert. Für die FACS-Messung wurde die Zellen zunächst in einem FSC/SSC-

Diagramm gespreitet und Signale von Zelltrümmern sowie Zellaggregaten (bei sehr hohen und sehr kleinen FSC/SSC-Werten) ausgeklammert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen gemäß ihrer Fluoreszenzintensität zwischen 620 und 700 nm in einem FL3-Histogramm dargestellt (Propidiumiodid wurde von einem Argonlaser bei 488 nm angeregt). Pro Experiment wurden 10^4 Zellen gemessen. Mit unbehandelten Zellen wurde für die Fluoreszenzverteilung ein Kontrollprofil bestimmt. Als apoptotisch wurde dabei die Region zwischen der Ordinate und dem ersten Peak, dem sogenannten G_0/G_1 -Peak, definiert (siehe 4.2.1). Die Anzahl der Zellen in dieser Region wurde als Fraktion der Gesamtzellzahl ausgedrückt und als apoptotischer Index gewertet.

3.2.3.9 AnnexinV/FACS-Assay

WEHI-164-S Zellen wurden in 6cm Platten in einer Dichte von 0.035×10^6 Zellen/cm² ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen gemäß der in 3.2.3.5 beschriebenen Methode mit p75^{NTR}- und EGFP-Expressionsplasmid sowie pcDNA3-Vektor transfiziert. Nach 24 hrs wurde NGF (100 ng/ml) auf mit p75^{NTR} transfizierte Zellen für 24, 34 und 46 hrs zugegeben. Kontrollzellen wurden gemeinsam mit 24 hrs NGF-Zellen geerntet, die übrigen NGF-Zellen entsprechend später. Das Kulturmedium wurde gesammelt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, unter ständigem Schütteln mit 0.1x Trypsin/EDTA-Lösung von der Schale gelöst und zum Überstand gegeben. Die Zellen wurden danach pelletiert (1200 rpm über 5 min) und in 0.5 ml kaltem PBS/3% BSA resuspendiert. Von diesem Schritt an wurden die Zellen auf Eis gehalten. Primärer Anti-p75^{NTR}-Antikörper (Klon mc192) wurde 1:100 zugegeben, für 30 min inkubiert, die Zellen daraufhin einmal mit PBS/3% BSA gewaschen und in 100 µl Annexin-V-AlexaTM 568-Markierungslösung (1:50 Verdünnung von Annexin-V-AlexaTM 568 in 10 mM HEPES pH 7.4/140 mM NaCl/5 mM CaCl₂) resuspendiert. Anschließend wurde sekundärer Schaf Anti-Maus-IgG-Antikörper, gekoppelt an DTAF, 1:100 zugegeben, für 15 min auf Eis und anschließend für 15 min auf RT inkubiert. Zwecks Volumenerhöhung wurde die Suspension mit 1 ml 10 mM HEPES pH 7.4/140 mM NaCl/5 mM CaCl₂ aufgefüllt, die Zellen pelletiert, mit 1 ml 10 mM HEPES pH 7.4/140 mM NaCl/5 mM CaCl₂ gewaschen und in 0.5 ml 10 mM HEPES pH 7.4/140 mM NaCl/5 mM CaCl₂ für das FACS-Experiment resuspendiert. Sowohl der Fluoreszenzfarbstoff AlexaTM 568 als auch DTAF wurden mit einem Argonlaser bei 488 nm angeregt. AlexaTM 568 wurde durch Fluoreszenz zwischen 620 und 700 nm im FL3-Kanal detektiert, DTAF bei rund 500 nm im FL1-Kanal. Zuerst wurde von den Zellen ein FSC/SSC-Profil erstellt und nach Eliminierung von Signalen mit sehr hohen und sehr niedrigen FSC/SSC-Werten wurde die AlexaTM 568-Fluoreszenzverteilung in einem FL3-Histogramm, die DTAF-Fluoreszenzverteilung in einem FL1-Histogramm dargestellt. Pro Experiment wurden 10^4 Zellen gemessen. Mit Hilfe von unbehandelten Zellen wurde für jede Fluoreszenzverteilung ein Kontrollprofil erstellt. Sowohl im FL1- als auch FL3-Histogramm wurde eine Region für hohe Fluoreszenzwerte definiert. Die Zahl der Zellen in diesen Regionen wurde jeweils für jede Probe bestimmt und als Fraktion der Gesamtzellzahl angegeben. Im FL1-Histogramm wurden diese als transfizierte Zellen gewertet, im FL3-Histogramm als apoptotische (siehe 4.2.1).

3.2.3.10 Immunocytochemische Färbung

Cerebella wurden wie in 3.2.3.3 beschrieben präpariert und die Zellsuspension in einer Dichte von 0.11×10^6 Zellen/cm² und in einem Mindestvolumen von 3 ml (je niedriger die Flüssigkeitssäule im well, desto stärker der durch den Flüssigkeitsmeniskus resultierende Zelldichtegradient von der Behälterwandung zur Mitte hin) in 24wells auf Deckgläser ausplattiert. Die Deckgläser waren zuvor ü/n in 70% Ethanol gewaschen, unter UV-Licht getrocknet und mit Poly-L-Lysin beschichtet worden. Nach Kultivierung ü/n wurden die Zellen für die Immunfärbung verwendet.

RhoA

Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und mit frisch zubereitetem 4% (w/v) PFA (PFA wurde in PBS durch Erhitzen auf 95°C für 3 min gelöst, die Lösung anschließend filtriert) über 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und mit PBS/10% NGS/0.1% Triton X-100 über 15 min permeabilisiert. Nach 1x Waschen mit PBS wurde Anti-RhoA-Antikörper in 1:200 Verdünnung in PBS/3% NGS/0.1% Triton X-100 für ü/n bei 4°C zugegeben. Nach 4x 5 min Waschschritten mit PBS wurde sekundärer Ziege Anti-Maus-IgG-Antikörper, gekoppelt an CyTM3, in 1:250 Verdünnung in PBS/3% NGS/0.1% Triton X-100 zugegeben und für 90 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Zellen wurden von diesem Schritt an möglichst im Dunkeln gelagert. Nach 6x 5 min Waschschritten mit PBS wurde mit PBS/0.1% Triton X-100/DAPI (1:10000) über 10 min auf RT inkubiert. Nach 6x 5 min Waschschritten mit PBS wurde 1x mit a.d. gewaschen und das Deckglas mit 15 µl Mounting Medium eingedeckelt.

3.2.3.11 Migrationsassay

Nervi ischiatici wurden wie in 3.2.3.2 beschrieben präpariert und die Zellsuspension in einer Schale ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und die Schwannzellen durch Schütteln in einer 0.5x Trypsin/EDTA-Lösung vor anderen Zelltypen, vor allem Fibroblasten, vom Substrat gelöst (Schwannzellen lösen sich leichter als beispielsweise Fibroblasten). Nach Neutralisierung mit DMEM, supplementiert mit 10% FCS und 1% P-S, wurden die Zellen mit einer silikonisierten Pasteurpipette in ein Röhrchen transferiert das ü/n mit PBS/3% BSA gefüllt gewesen war. Die Zellen wurden pelletiert (1200 rpm über 6 min) und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Darauf hin wurden die Zellen in maximal 2 ml PBS mit einer silikonisierten Pasteurpipette resuspendiert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt (das ebenfalls ü/n mit PBS/3% BSA gefüllt gewesen war) und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Die Zellen wurden wieder pelletiert (3500 rpm über 3 min in einer Tischzentrifuge) und entweder in SATO-Medium, supplementiert mit 10% FCS und 0.3% LGA, oder in DMEM, supplementiert mit 10% FCS, 1% P-S und 0.3% LGA, zu einer Konzentration von 4×10^4 Zellen/µl mit einer silikonisierten Pasteurpipette resuspendiert (3% LGA wurde als Stammlösung auf der Basis von PBS verwendet. Die Agarose wurde autoklaviert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Bei Gebrauch wurde ein Aliquot zuerst für 15-20 min auf 95°C erhitzt und danach auf 42°C gehalten).

Im Fall von SATO-Medium wurde ein 1.5 µl Tropfen der Zellsuspension in die Mitte eines 12well gesetzt und nach 15 min auf 4°C mit 50 µl SATO-Medium, supplementiert mit je 10 µg/ml Laminin1, Laminin2 (Merosin), Fibronectin und Vitronectin überschichtet. Nach 2 hrs bei 37°C/10% CO₂ wurden in die Schale 2 ml SATO-

Medium/0.3% LGA pipettiert und für 10 min auf 4°C gestellt. Auf das gelierte Medium wurden weitere 2 ml SATO-Medium gegeben, das mit Forskolin für eine Gesamtkonzentration von 10 µM supplementiert war. Neurotrophine wurden für eine Gesamtkonzentration von 500 ng/ml zugegeben, p75^{NTR}-‘receptor body’ für 1 µg/ml. Das Medium wurde nur über dieses Flüssigvolumen gewechselt.

Im Fall von DME-Medium wurde ein 1.5 µl Tropfen der Zellsuspension in die Mitte eines 12well gesetzt. Das well ist zuvor mit einer 0.01%igen Poly-L-Lysin-Lösung für mindestens 2 hrs auf 37°C beschichtet, 3x mit PBS und 1x mit a.d. gewaschen und ü/n getrocknet worden. Vor unmittelbarem Gebrauch ist mit 1 ml a.d. ein Flüssigkeitsring zwischen Wandung und Bodenfläche gelegt und das well für 1 hr in den Inkubator gestellt worden (auf diese Weise wurde sowohl das Poly-L-Lysin als auch die lokale Atmosphäre in der Schale mit Wasser gesättigt, sodass die Flüssigkeit im 1.5 µl Tropfen nicht vor dem Gelieren abgezogen wird). Nachdem der Tropfen über 15 min auf 4°C geliert worden war, wurde er nach Entfernen der 1 ml a.d. mit 2 ml DMEM, supplementiert mit 10% FCS, 1% P-S und 0.3% LGA, überschichtet und nochmals für 10 min auf 4°C gestellt. Auf das gelierte Medium wurden weitere 2 ml DMEM, supplementiert mit 10% FCS und 1% P-S, aufgefüllt. Neurotrophine wurden für eine Gesamtkonzentration von 500 ng/ml zugegeben, p75^{NTR}-‘receptor body’ für 1 µg/ml. Das Medium wurde nur über dieses Flüssigvolumen gewechselt.

3.2.3.12 Life-Imaging von EGFP-Aktin-Neuronen

Cerebella von p7-EGFP-Aktin-Mäusen wurden wie in 3.2.3.3 beschrieben präpariert und die Zellsuspension in einer Dichte von 0.11×10^6 Zellen/cm² auf Deckgläser ausplattiert. Die Deckgläser waren zuvor mit 0.01%iger Poly-L-Lysin-Lösung für mindestens 2 hrs auf 37°C beschichtet und 3x mit PBS gewaschen worden. Sie wurden ohne zu trocknen verwendet. Nach 24 hrs wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und das Deckglas in eine Beobachtungskammer eingespannt. Während des Beobachtungszeitraumes wurden die Zellen in Tyrode’s Puffer gehalten. Mit einer CCD-Kamera wurde in 10 s Intervallen Bilder unter einem Fluoreszenzmikroskop in einer 37°C Atmosphäre aufgenommen.

3.2.4 Arbeiten mit Mäusen

3.2.4.1 Genotypisierung

Schwanzbiopsie und Extraktion von genomischer DNA

Mäusen im Alter von mindestens zwei Tagen wurde rund 1 mm der Schwanzspitze abgeschnitten. Die Schwanzspitze wurde in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß mit 0.5 ml Lysispuffer transferiert und bei 55°C ü/n rotiert. Ungelöstes Gewebematerial wurde danach bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0.5 ml Isopropanol versetzt und geschüttelt bis DNA ausgefallen war. Diese wurde mit einer Feinpinzette in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß mit 200 µl TE transferiert und ü/n unter Rotation bei 55°C gelöst.

PCR

Eine Genotypisierung-PCR wurde wie folgt zusammengesetzt: 1x Polymerasepuffer, je 0.2 μ M Genotypisierungprimer, 0.2 mM dNTP-Mischung (äquimolare Mengen dATP, dGTP, dCTP und dTTP), 1.5 mM MgCl₂, 2 μ l genomische DNA, 2.5 u Taq-Polymerase, mit a.d. aufgefüllt auf 50 μ l. Die Reaktion wurde nach folgendem Grundschema durchgeführt:

3 min 94°C; [30 s 94°C, 30 s T_a, t_e 72°C] n Zyklen; 5 min 72°C

Für die Genotypisierung der Exon III-Mutante wurden folgende Primer und Bedingungen angewandt:

p75-U₂ und p75-D₂ zur Detektion des Wt *p75^{NTR}*-Allels; Produkt: ca. 200 bp

p75-U₂ und p75KoD₁ zur Detektion des mutanten *p75^{NTR}*-Allels; Produkt: ca. 600 bp

Alle drei Primer wurden in einer Reaktion verwendet. T_a betrug 63°C, t_e 40 s, die Anzahl der Zyklen war 30.

Für die Genotypisierung der Exon IV-Mutante wurden folgende Primer und Bedingungen angewandt:

2590 und mp75Ex4-S3 zur Detektion des Wt *p75^{NTR}*-Allels; Produkt: ca. 500 bp

2590 und pGK-2 zur Detektion des mutanten *p75^{NTR}*-Allels; Produkt: ca. 700 bp

Alle drei Primer wurden in einer Reaktion verwendet. T_a betrug 61°C, t_e 40 s, die Anzahl der Zyklen war 30.

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der Rezeptorisoform s-p75^{NTR}

Für eine Analyse der funktionellen Rolle von p75^{NTR} ist eine vollständige Deletionsmutante des *p75^{NTR}*-Gens unabdingbar. Im Gegensatz zur Exon III-Mutante sollte in der neu generierten Exon IV-Mutante die in unserem Labor von David von Schack entdeckte Rezeptorisoform s-p75^{NTR} deletiert sein. Zu Beginn dieser Arbeit war die Frage noch offen, ob diese Spleißvariante nicht nur als mRNA, sondern auch als endogene Rezeptorisoform existiert. Das Ziel dieses ersten Projektes war deshalb, s-p75^{NTR} als Protein in primären Zellen oder in Gewebe zu identifizieren und auch seine Abwesenheit in der neuen Mutante zu zeigen.

4.1.1 Identifizierung von s-p75^{NTR} in Primärzellen

Für eine Identifizierung stand vorerst ein kommerziell erhältliches Antiserum gegen p75^{NTR} (Promega) zur Verfügung. Dieses erkennt ein intrazelluläres Epitop und wurde von David von Schack bereits erfolgreich zum Nachweis von in 293 Zellen ektopisch produziertem s-p75^{NTR} verwendet. Ausgangsmaterial war Gewebe aus Gehirn oder Rückenmark der Maus, in dem die mRNA von s-p75^{NTR} auch zum ersten Mal nachgewiesen worden war (Dissertation von David von Schack). s-p75^{NTR} sollte zwar in der Exon III-Mutante, nicht jedoch in der Exon IV-Mutante detektierbar sein. Gemäß dieser Strategie wurde zunächst versucht, in Extrakten aus Gesamthirn und Rückenmark von Wildtyp, Exon III- sowie Exon IV-Mutanten ein für s-p75^{NTR} spezifisches Signal im Western Blot zu detektieren. Das Molekulargewicht sollte nach der in 293 Zellen ektopisch produzierten Isoform bei 38 kDa liegen (Dissertation von David von Schack; siehe auch 4.1.2).

Mit diesem Ansatz ergaben sich jedoch zwei Probleme. Erstens war das Antiserum gegen p75^{NTR} für heterogenes Primärgewebe zu unspezifisch, und zweitens schien die Menge der s-p75^{NTR}-Isoform im Verhältnis zu FL-p75^{NTR} grundsätzlich gering zu sein (Daten nicht gezeigt). Ein alternatives Antiserum gegen p75^{NTR} war zu dieser Zeit nicht zur Hand. Da s-p75^{NTR} jedoch vermutlich nicht gleichmäßig im Gehirn/Rückenmark exprimiert wird, wurden einige Strukturen einzeln analysiert. Folgende neuronale als auch nichtneuronale Gewebe, die in funktionellem Zusammenhang mit einem Vaskulogenesedefekt der Exon IV-Mutante stehen (siehe 5.1), wurden auf s-p75^{NTR} untersucht:

Kortex, Striatum, Cerebellum, Hippocampus, Bulbus olfactorius, N. ischiaticus, N. cruralis, Spinalganglien, Aorta sowie Herz.

In keiner dieser Strukturen konnte ein für s-p75^{NTR} eindeutiges spezifisches Signal im Western Blot erhalten werden (Daten nicht gezeigt).

Aus der Literatur war indes bekannt, dass p75^{NTR} vor allem in Schwannzellen sehr stark exprimiert wird (Johnson E.M. Jr. et al., 1988); aus diesem Grund wurde auch der N. ischiaticus analysiert. Es war ferner bekannt, dass die Expression von p75^{NTR} in

Schwanzzellen während der Entwicklung eng reguliert ist. Sie ist auf Embryonal- sowie sehr frühe postnatale Stadien beschränkt (Heumann R. et al., 1987; Yan D. und Johnson E.M. Jr., 1987). Im adulten Organismus wird p75^{NTR} in Schwanzzellen nur als Reaktion auf eine Läsion des peripheren Nervensystems exprimiert (Taniuchi M. et al., 1986; Heumann R. et al., 1987), wie es auch massiv hochreguliert wird, wenn Schwanzzellen – egal welchen Alters – nach Dissoziation in Kultur gebracht werden (DiStefano P.S. und Johnson E.M. Jr., 1988).

Gemäß dieser Überlegung wurden Kulturen dissoziierter Schwanzzellen aus Nervi ischiatici von p3-Mäusen auf das Vorhandensein der s-p75^{NTR}-Isoform untersucht. Diese Kulturen sollten neben FL-p75^{NTR} nicht nur große Mengen s-p75^{NTR} exprimieren, Extrakte daraus sollten aufgrund der Homogenität der Kulturen auch weniger Kreuzreaktivität mit dem Anti-p75^{NTR}-Antiserum zeigen. Tatsächlich konnte mit diesem Ansatz zum ersten Mal ein klares Signal detektiert werden, welches zwar in der Exon III-Mutante, jedoch nicht in der Exon IV-Mutante zu sehen ist (Abbildung 5).

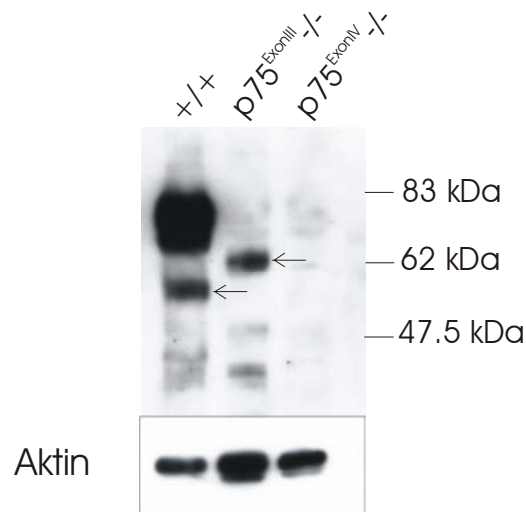


Abb. 5 Nachweis von s-p75^{NTR} in primären Schwanzzellen

Aus Nervi ischiatici von Wildtyp, *p75^{ExonIII}-/-* und *p75^{ExonIV}-/-* Mäusen, jeweils im Alter von p3, wurden Schwanzzellen isoliert und in Kultur gebracht. Nach einem Tag wurden Proteinextrakte gewonnen und p75^{NTR} mittels Western Blotting und mit einem gegen die intrazelluläre Domäne von humanem p75^{NTR} gerichteten Antiserum (Promega) detektiert. Die potenzielle trunkierte Rezeptorisoform im *p75^{ExonIII}-/-* Extrakt ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Im Wildtyp könnte die Rezeptorisoform weniger stark glykosiliert sein und der mit einem Pfeil markierten Bande entsprechen. Zum Vergleich der Proteinkonzentration der Extrakte wurde die Menge an Aktin in einem separaten Ansatz bestimmt. Im Vergleich zu den Extrakten aus Wildtyp und *p75^{ExonIV}-/-* Zellen wurde der besseren Darstellung von vermutetem s-p75^{NTR} wegen fünfmal mehr Extrakt aus *p75^{ExonIII}-/-* Zellen auf das Gel aufgetragen.

Dieses differenziell gebildete Protein wurde auch von zwei anderen Anti-p75^{NTR}-Antiseren, die ebenfalls gegen die intrazelluläre Domäne gerichtet sind, bestätigt (Abbildung 6).

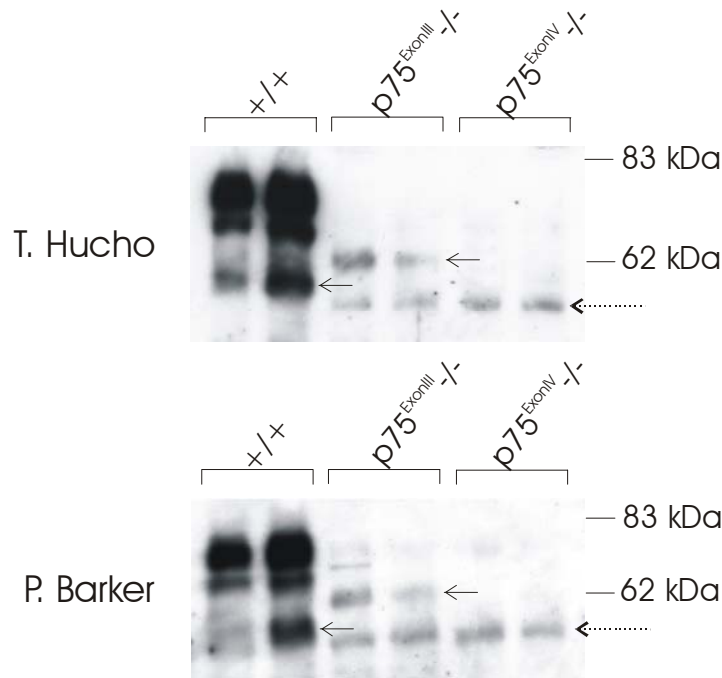


Abb. 6 Nachweis von s-p75^{NTR} in primären Schwannzellen mit verschiedenen Anti-p75^{NTR}-Antisera

Extrakte von primären Schwannzellen der Genotypen Wildtyp, *p75^{ExonIII}* -/- sowie *p75^{ExonIV}* -/- wurden wie unter Abbildung 5 beschrieben gewonnen und im Duplikat auf das Gel aufgetragen. Die jeweils zweite Spur eines Genotyps entspricht derjenigen in Abbildung 5. Nach Western Blotting wurde p75^{NTR} mit Hilfe von zwei weiteren Antisera detektiert. Beide sind gegen die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} der Maus gerichtet, eines wurde von Phil Barker zur Verfügung gestellt, eines von Tim Hucho in unserer Arbeitsgruppe angefertigt. Durchgezogene Pfeile zeigen auf die trunkierte Rezeptorisoform in der Exon III-Mutante sowie im Wildtyp, in dem diese vermutlich weniger stark glykosiliert ist. Gestrichelte Pfeile zeigen auf unspezifische Banden, die zwar von beiden hier verwendeten Antisera, jedoch nicht vom in Abbildung 5 verwendeten Antiserum erkannt werden.

Problematisch erschien das festgestellte Molekulargewicht von 62 kDa, welches nicht dem von in 293 Zellen ektopisch produziertem s-p75^{NTR} entsprach. Aus diesem Grund wurde s-p75^{NTR} nach Transfektion in 293 Zellen genauer untersucht.

4.1.2 Charakterisierung von transfiziertem s-p75^{NTR} in 293 Zellen

Wie in 4.1.1 erwähnt, erhält man nach Transfektion von 293 Zellen mit s-p75^{NTR} cDNA ein klares Signal bei 38 kDa im Western Blot nach Detektion mit Anti-p75^{NTR}-Antiserum. Das Molekulargewicht für p75^{NTR} setzt sich jedoch nicht allein aus dem Polypeptid zusammen – FL-p75^{NTR} hat nur ein berechnetes Molekulargewicht von 42.6 kDa –, sondern auch aus Zuckermodifikationen. Speziell nachgewiesen wurden N- und O-spezifische Glykosilierungen, die den übrigen berechneten 32.6 kDa zugrunde liegen

(Johnson D. et al., 1986; Radeke M.J. et al., 1987). Sequenzanalysen zeigten, dass alle theoretisch definierten Glykosilierungsstellen in s-p75^{NTR} erhalten sind (Abbildung 7).

FL-p75 ^{NTR}	1	MDRLRLLLLLLLLLLLLGVSF ^{blue} GGAKETCSTGMYTHSGE ^{blue} CCKACNLGEGVAQPCGAN ^{red} QTVCEPC
s-p75 ^{NTR}	1	MDRLRLLLLLLLLLLLLGVSF ^{blue} GGAKETCSTGMYTHSGE ^{blue} CCKACNLGEGVAQPCGAN ^{red} QTVCEPC
FL-p75 ^{NTR}	61	LDSVTFSDVVSATEPCKPCTECLGLQSMSAPC ^{green} VEADDAVCRCSYGY ^{blue} YQDEETGRCEACSV
s-p75 ^{NTR}	61	LDS
FL-p75 ^{NTR}	121	CGVGSGLV ^{green} FSCQDKQNTVCEE ^{blue} CEPETYSD ^{blue} EANHVDPCLPCTV ^{green} CE ^{blue} DT ^{blue} ERQLRECTPWADAE
s-p75 ^{NTR}	121	
FL-p75 ^{NTR}	181	CEEIPGRWIT ^{red} RST ^{orange} PPEGSDV ^{red} TTP ^{orange} STQ ^{red} EPEAPPERDLIA ^{red} STVAD ^{orange} TV ^{red} TTVMG ^{red} SSQP ^{red} VV ^{red} TRGT
s-p75 ^{NTR}	181	IPGRWIT ^{red} RST ^{orange} PPEGSDV ^{red} TTP ^{orange} STQ ^{red} EPEAPPERDLIA ^{red} STVAD ^{orange} TV ^{red} TTVMG ^{red} SSQP ^{red} VV ^{red} TRGT
FL-p75 ^{NTR}	241	ADNL ^{green} LIPVYCSILAA ^{green} VVGLVAYIA ^{green} FKRWNSCKQNKQGANSRPNQTP ^{green} PEGEK ^{green} LHSDSGI
s-p75 ^{NTR}	241	ADNL ^{green} LIPVYCSILAA ^{green} VVGLVAYIA ^{green} FKRWNSCKQNKQGANSRPNQTP ^{green} PEGEK ^{green} LHSDSGI
FL-p75 ^{NTR}	301	SVDSQSLHDQQTHTQTASAQALKGDGNLYSSLPLTKREEVEKLLNGDTWRHLA ^{green} GELGYQP
s-p75 ^{NTR}	301	SVDSQSLHDQQTHTQTASAQALKGDGNLYSSLPLTKREEVEKLLNGDTWRHLA ^{green} GELGYQP
FL-p75 ^{NTR}	361	EHIDSF ^{green} THEACPVRALLASWGAQDSATLDALLAALRRIQRADIVESL ^{green} CSESTATSPV
s-p75 ^{NTR}	361	EHIDSF ^{green} THEACPVRALLASWGAQDSATLDALLAALRRIQRADIVESL ^{green} CSESTATSPV

Abb. 7 Sequenzvergleich von FL-p75^{NTR} und s-p75^{NTR}

Ein Aminosäuresequenzvergleich der beiden p75^{NTR}-Isoformen FL und s aus Maus zeigte, dass alle postulierten Glykosilierungsstellen von FL-p75^{NTR} in s-p75^{NTR} erhalten sind. Rot markiert sind N-Glykosilierungsstellen, orange potenzielle O-Glykosilierungsstellen. Die Transmembrandomäne ist grün markiert, das Signalpeptid blau.

Berücksichtigte man alle diese Glykosilierungen für die Berechnung des Molekulargewichts von endogenem s-p75^{NTR}, addierte also 32.6 kDa Zuckerreste zu den berechneten 29.4 kDa Polypeptid, ergab sich ein theoretisches Gesamtgewicht von 62 kDa für die s-p75^{NTR}-Isoform. Dies entsprach exakt dem in primären Schwanzzellen gefundenen Signal und führte zur Überlegung, dass es sich bei dem in 293 Zellen ektopisch produzierten s-p75^{NTR} um eine nur teilweise glykosilierte Isoform handeln könnte. Um zu testen, ob s-p75^{NTR} in 293 Zellen auch vollständig glykosiliert wird – wenn auch nur in geringem Umfang –, wurde es in 293 Zellen nach transienter Transfektion überproduziert, mit zuckerbindendem WGA (wheat germ agglutinin; ein Lektin) präzipitiert und nach Western Blotting mit Anti-p75^{NTR}-Antiserum detektiert. Zum Vergleich dienten überproduziertes unpräzipitiertes FL- wie auch s-p75^{NTR}. Wie in Abbildung 8 zu sehen, war die vollständig glykosilierte s-p75^{NTR}-Isoform tatsächlich auch in 293 Zellen vorhanden, sie musste für eine klare Detektion jedoch zuvor angereichert werden.

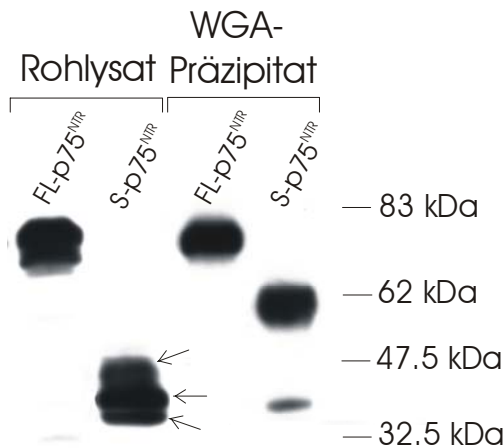


Abb. 8 Transfektion von 293 Zellen mit FL-p75^{NTR} und s-p75^{NTR}
 293 Zellen wurden mit FL-p75^{NTR} und s-p75^{NTR} cDNA transfiziert und nach 48 Stunden lysiert. Eine Hälfte des Extraktes wurde jeweils mit WGA-Sepharose inkubiert, dann wurde im Präzipitat nach Western Blotting p75^{NTR} detektiert. In der anderen Hälfte wurde p75^{NTR} direkt im Rohlysate detektiert. Es wurde jeweils das gleiche Volumen Lysat beziehungsweise Eluat verwendet. Als Antiserum wurde das gleiche wie in Abbildung 5 verwendet. Im Rohlysate wurde transfiziertes s-p75^{NTR} als Dreifachbande detektiert (Pfeile).

Interessanterweise lag ektopisch überproduziertes s-p75^{NTR} im Rohlysate als Dreifachbande vor. Die drei Banden mit eng beieinander liegendem Molekulargewicht könnten unterschiedliche Glykosilierungsstufen darstellen (siehe 5.1).

Diese Experimente zeigten, dass die endogene s-p75^{NTR}-Variante in einem geeigneten Zellsystem als Protein detektiert werden kann. Sie zeigten ferner, dass zunächst widersprüchliche Ergebnisse zwischen endogener und transient produzierter s-p75^{NTR}-Isoform durch unterschiedlich starke Glykosilierung erklärt und in Übereinstimmung gebracht werden können.

4.1.3 Vergleich der Zahl von Schwanzzellen in der Exon III- und Exon IV-Mutante im *N. ischiaticus*

Die zuvor beschriebenen Experimente demonstrierten, dass sowohl FL- als auch s-p75^{NTR} in Schwanzzellen vergleichsweise stark exprimiert sind. Obwohl die Funktion von p75^{NTR} in diesem Zelltyp noch nicht genau bekannt ist, bot dieses System die Möglichkeit, potenzielle Unterschiede im Phänotyp zwischen der Exon III- und Exon IV-Mutante und damit eine mögliche Funktionalität von s-p75^{NTR} zu dokumentieren.

Als grundlegender Parameter wurde die Anzahl an Schwanzzellen pro Tier im *N. ischiaticus* in den drei Genotypen Wildtyp, Exon III-Mutante und Exon IV-Mutante bestimmt. Wie für die Experimente in 4.1.1 wurden Nervi ischiatici aus p3-Mäusen

isoliert (freipräpariert von den Verzweigungen im Rückenmark bis zu den Verzweigungen im Fuß), von Bindegewebe befreit, nach Behandlung mit Trypsin und Kollagenase mechanisch dissoziiert und die Zellzahl mit einer Neubauer-Kammer bestimmt. Die Anzahl an Schwanzzellen in der Exon IV-Mutante war nicht nur im Vergleich zum Wildtyp, sondern auch, und vor allem, im Vergleich zur Exon III-Mutante signifikant verringert (Abbildung 9).

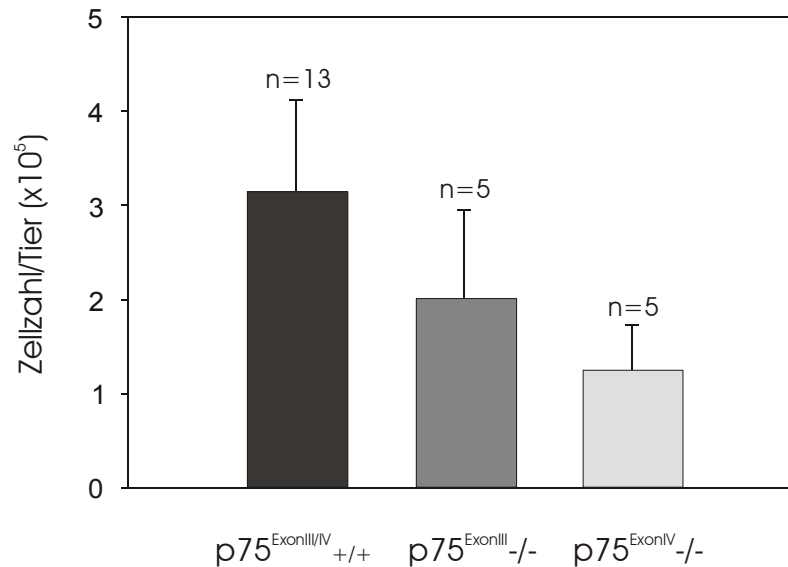


Abb. 9 Anzahl der Schwanzzellen im N. ischiaticus von Wildtyp-, $p75^{ExonIII}$ -/- und $p75^{ExonIV}$ -/- Mäusen

Die Anzahl an Schwanzzellen aus Nervi ischiatici pro Tier ist für die drei Genotypen $p75^{Exon III/IV} +/+$, $p75^{ExonIII} -/-$ und $p75^{ExonIV} -/-$ vergleichend dargestellt. Es wurden jeweils p3-Mäuse mit dem gemischten genetischen Hintergrund (C57Bl/6-SV129) verwendet.

In der Exon IV-Mutante war die Zellzahl im Vergleich zur Exon III-Mutante um knapp 40 Prozent reduziert. Mögliche Ursachen für die reduzierte Anzahl von Schwanzzellen in $p75^{NTR}$ -Knockout-Mäusen im Allgemeinen, und in der Exon IV-Mutante im Speziellen, werden in 5.1 diskutiert.

Gemeinsam mit den in 5.1 angeführten Befunden unterstrich dieses Ergebnis die phänotypische Unterschiedlichkeit der Exon IV- von der Exon III-Mutante.

4.2 *In-vitro*-Assays für potenzielle Funktionen von $p75^{NTR}$

Der Schwerpunkt der Doktorarbeit lag im Etablieren eines funktionellen *In-vitro*-Assays für $p75^{NTR}$. Es werden hier die verschiedenen Ansätze, die zu diesem Zweck verfolgt wurden, im Einzelnen vorgestellt.

4.2.1 Apoptose-Assay

Auswahl eines geeigneten Zellsystems

Wie in 2.2.2.4 dargelegt, wurde p75^{NTR} als Zelltodrezeptor beschrieben, homolog zum strukturell verwandten TNF-Rezeptor oder Fas. Da zelluläre Assays für TNF α -vermittelten Zelltod vorhanden waren, wurde zunächst nach einer Zelllinie mit entsprechend hoher Sensitivität gegenüber TNF α gesucht. Eine solche verfügt offenbar über die geeignete Proteinmaschinerie, um nach Aktivierung des TNF-Rezeptors programmierten Zelltod einzuleiten. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft von p75^{NTR} mit TNF-Rezeptoren war denn die Überlegung, dass ein solches System auch permissiv gegenüber p75^{NTR}-vermitteltem Zelltod sein könnte. Darüber hinaus waren bereits intrazelluläre Proteininteraktoren identifiziert worden, die sowohl von p75^{NTR} als auch von TNF-Rezeptoren rekrutiert werden (siehe 2.2.2.3). Zusätzlich sollte die Zelllinie kein endogenes p75^{NTR} exprimieren, um rekombinante p75^{NTR}-Konstrukte testen zu können.

Zunächst wurden in einer Literatursuche folgende geeignet erscheinende Kandidatenlinien ausgesucht:

Kym-1	eine humane Rhabdomyosarkoma-Zelllinie (Grell M. et al., 1994)
WEHI-164-S	eine Maus-Fibrosarkoma-Zelllinie (Shih S.-C. und Stutman O., 1996)
CEM-S	eine humane T-Zell-Lymphoma-Zelllinie (Malorni W. et al., 1996)
MCF-7	eine humane Mammakarzinoma-Zelllinie (Pagliacci M.C. et al., 1993)
BHK	eine Hamster-Nieren-Zelllinie
293T	eine humane Nieren-Zelllinie
N20.1	eine Maus-Oligodendrozytenlinie

BHK sowie 293T wurden als Kontrollzelllinien in die Liste mit einbezogen. Bei diesen kann allgemein sehr leicht Apoptose ausgelöst werden, und sie stellen Standardzelllinien in der Apoptoseforschung dar. N20.1 wurde als Oligodendrozytenlinie hinzugezogen (Verity A.N. et al., 1993), da primäre Oligodendrozyten das zu dieser Zeit einzige Zellsystem waren, mit dem sich *in vitro* nach Aktivierung von p75^{NTR} kontrolliert Apoptose auslösen ließ (siehe 5.2).

Zunächst wurde getestet, ob diese Zelllinien endogenes p75^{NTR} exprimieren. Dazu wurden Zelllysate einer WGA-Präzipitation unterzogen, und nach Western Blotting wurde mit einem Anti-p75^{NTR}-Antiserum detektiert. Mit diesem Anreicherungsschritt, wie er für p75^{NTR} schon in 4.1.2 erfolgreich verwendet wurde, sollten auch geringe Mengen dieses Rezeptors nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle diente die Zelllinie PCNA, welche hohe Mengen an p75^{NTR} exprimiert (Radeke M.J. et al., 1997). Die Ergebnisse sind für die einzelnen Linien in Abbildung 10 dargestellt.

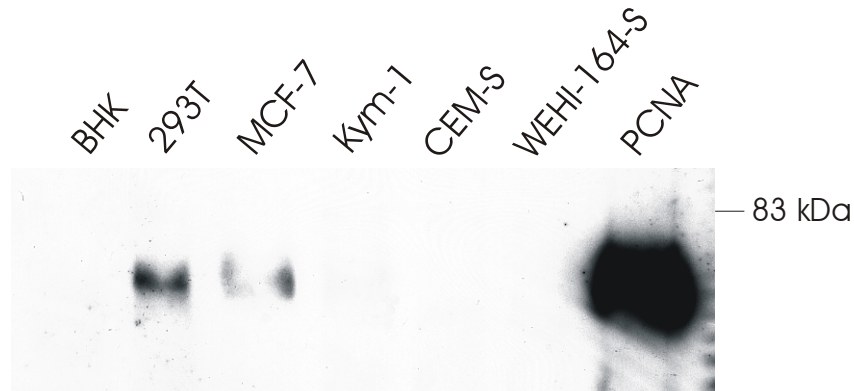


Abb. 10 Detektion von p75^{NTR} in verschiedenen Zelllinien

Extrakte der verschiedenen Zelllinien wurden mit WGA-Sepharose inkubiert, und in Präzipitaten wurde nach Western Blotting p75^{NTR} mit dem in Abbildung 5 beschriebenen Antiserum detektiert. Die Proteinkonzentration wurde vor der WGA-Präzipitation spektralphotometrisch bestimmt, und die Gesamtproteinmenge betrug für BHK 578 µg, für 293T 188 µg, für MCF-7 313.6 µg, für Kym-1 299.2 µg, für CEM-S 262 µg, für WEHI-164-S 281.6 µg und für PCNA Zellen 8.8 µg.

In den Zelllinien 293T sowie MCF-7 wurde ein p75^{NTR}-spezifisches Signal detektiert. In beiden Fällen war die Expression sehr gering im Vergleich zu PCNA Zellen. Zudem wurde für PCNA Zellen viel weniger Ausgangsmaterial für die WGA-Präzipitation verwendet als für die übrigen Zelllinien. Jedoch sind PCNA Zellen mit genomischer p75^{NTR}-Sequenz transfiziert und auf Expression von p75^{NTR} selektioniert worden, wohingegen 293T und MCF-7 Zellen endogenes p75^{NTR} exprimieren.

Die Zelllinien wurden anschließend einem Apoptosetest unterzogen. Als etablierter Test wurde zu diesem Zweck der Propidiumiodid-Assay in Kombination mit einer FACS-Analyse ausgewählt. Bei diesem Test werden fixierte und permeabilisierte Zellen mit DNA-Gehalt unter 2n als apoptotisch definiert. Es wurde mit TNFα und auch mit einem agonistischen Anti-Fas-Antikörper stimuliert. Als Positivkontrolle diente Staurosporin (Jacobson M.D. et al., 1996). Jene Linien, welche endogenes p75^{NTR} exprimieren, wurden zusätzlich noch mit NGF behandelt, ebenso die Oligodendrozytenlinie N20.1. Eine typische Messserie ist in Abbildung 11 am Beispiel von Kym-1 gezeigt.

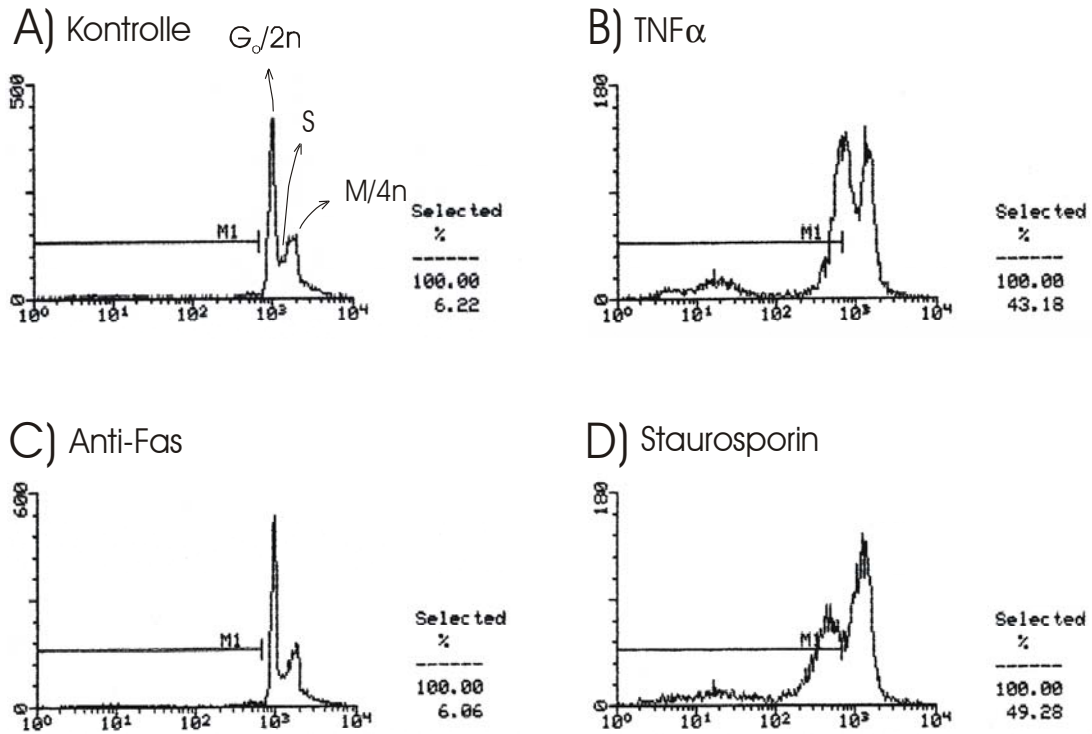


Abb. 11 Messung des Apoptoseindex in Kym-1-Zellen mittels Propidiumiodid-Färbung und FACS-Analyse

Kym-1 Zellen wurden nach Fixierung mit Propidiumiodid gefärbt, und mittels FACS-Analyse wurde ein DNA-Verteilungsprofil erstellt. In unbehandelten Zellen (A) ergab sich ein den jeweiligen Zellteilungsstadien entsprechendes Profil von 2n in der G₀-Phase bis zu 4n in der M-Phase mit zwischen diesen Eckpunkten liegendem DNA-Gehalt in der S-Phase. Die Zellen wurden über jeweils 16 Stunden mit TNF α [20 ng/ml] (B), agonistischem Anti-Fas-Antikörper [500 ng/ml] (C) oder Staurosporin [2 μ M] (D) inkubiert. Alle Zellen, die sich innerhalb der mit unbehandelten Kontrollzellen definierten Region M1 befanden, wurden mit einem DNA-Gehalt von weniger als 2n als apoptotisch klassifiziert.

Der Hintergrund an apoptotischen Zellen wurde mit rund sechs Prozent definiert. Kym-1 Zellen reagierten in spezifischer Weise auf TNF α mit Apoptose: Nur nach Inkubation mit TNF α erhöhte sich der Apoptoseindex (43 Prozent), nicht jedoch nach Behandlung mit agonistischem Anti-Fas-Antikörper (sechs Prozent apoptotische Zellen). Tatsächlich löste TNF α Apoptose in fast gleichem Ausmaß aus wie die Positivkontrolle Staurosporin (49 Prozent apoptotische Zellen).

Die entsprechenden Resultate von allen Zelllinien sind in Abbildung 12 zusammengefasst.

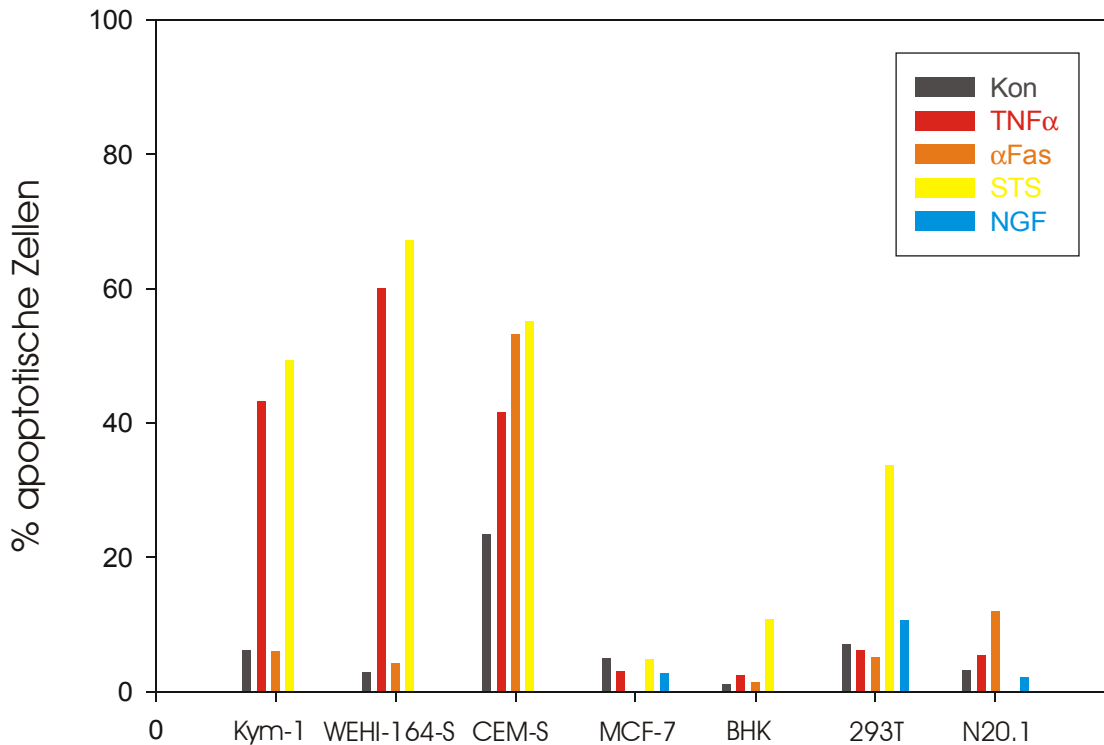


Abb. 12 Apoptoseindizes von Zelllinien, gemessen mit PI-Färbung und FACS-Analyse

Der Apoptoseindex wurde gemäß der in Abbildung 11 gezeigten Methode bei unterschiedlichen Zelllinien bestimmt. Zellen waren entweder unbehandelt (Kon) oder wurden über jeweils 16 Stunden mit TNF α [20 ng/ml], agonistischem Anti-Fas-Antikörper [500 ng/ml], Staurosporin [2 μ M] oder NGF [100 ng/ml] inkubiert.

Wie ersichtlich, induzierte NGF über endogenes p75^{NTR} weder in der Linie 293T noch in MCF-7 Apoptose in detektierbarem Ausmaß. Dieses Ergebnis veranschaulichte den großen Einfluss des zellulären Kontextes auf die Funktionalität von p75^{NTR}. So vermag beispielsweise Fas sowohl in MCF-7 Zellen (Chinnaiyan A.M. et al., 1995) als auch in 293 Zellen (Shikama Y. et al., 2002) programmierten Zelltod auszulösen. Beide Linien wurden nicht weiter analysiert. Die Oligodendrozytenlinie N20.1 wurde zwar nicht auf Expression von p75^{NTR} getestet, aber aufgrund des fehlenden Apoptoseeffektes von NGF ebenfalls nicht weiter berücksichtigt. Auch die zweite Kontrolllinie BHK fiel wegen eines fehlenden TNF α -Effektes aus. Bei drei Zelllinien konnte der postulierte TNF α -Effekt bestätigt werden: Kym-1, WEHI-164-S sowie CEM-S. Letztere erschien jedoch problematisch, da der Hintergrund an apoptotischen Zellen außergewöhnlich hoch war und der Effekt von TNF α im Vergleich dazu gering. Der weitere Fokus lag daher auf den Zelllinien WEHI-164-S und Kym-1.

Diese Zellen galt es transient mit FL-p75^{NTR} cDNA zu transfizieren und mit NGF zu stimulieren, um danach wieder den Apoptoseindex zu messen. Wie sich herausstellte, war eine transiente Transfektion beider Linien, vor allem der Kym-1 Linie, sehr schwierig. Mit Hilfe von EGFP cDNA wurden mehrere Transfektionsprotokolle getestet:

CaPO₄-Präzipitation, SuperFect™ (auf Dendrimerbasis; Qiagen) sowie Effectene™ (auf Lipidbasis; Qiagen). Für Kym-1 war die CaPO₄-Präzipitationsmethode am besten, obwohl auch mit diesem Ansatz die Transfektionseffizienz unter rund einem Prozent blieb. Für die WEHI-164-S Zellen war das Effectene™-Protokoll am geeignetsten mit einer Transfektionseffizienz von rund zehn Prozent. Es wurden diese Zellen für den folgenden Ansatz verwendet.

Apoptose-Assay mit transient transfiziertem FL-p75^{NTR}

WEHI-164-S Zellen wurden nach dem Effectene™-Protokoll mit FL-p75^{NTR} cDNA transfiziert, mit NGF stimuliert und einer FACS-Analyse unterzogen. Letztere wurde für diese Experimente im Ansatz modifiziert. Statt wie bisher die Apoptoserate mit Propidiumiodid zu messen, wurde AnnexinV-Färbung verwendet. Mit Propidiumiodid kann in fixierten und permeabilisierten Zellen der Grad der DNA-Fragmentierung ermittelt werden. DNA-Fragmentierung geschieht aber in bereits sehr fortgeschrittener Apoptose, wenn Zellen kurz vor der physischen Zerstörung stehen. Zelltrümmer oder morphologisch bereits stark veränderte Zellen werden in einem FACS-Experiment jedoch vor der eigentlichen Messung ausgeschieden (im Zuge der FSC/SSC-Spreitung; siehe 3.2.3.8). Mittels AnnexinV-Färbung wird eine Veränderung in der Zusammensetzung der äußeren Zellmembran detektiert (Vermees I. et al., 1995). Da diese Veränderung wesentlich früher im Apoptosevorgang auftritt, erschien diese Methode sensitiver und damit besser geeignet, ein aufgrund der geringen Transfektionsrate schwach erwartetes Apoptosesignal von p75^{NTR} zu dokumentieren. In Abbildung 13 sind eine Messung einer Kontrollsituation und einer apoptotischen Situation exemplarisch dargestellt. In Abbildung 14 sind die entsprechend erzielten Werte bei den übrigen Zelllinien inklusive NGF-Zeitverlaufsstimulation nach transienter Transfektion mit FL-p75^{NTR} cDNA aufgelistet.

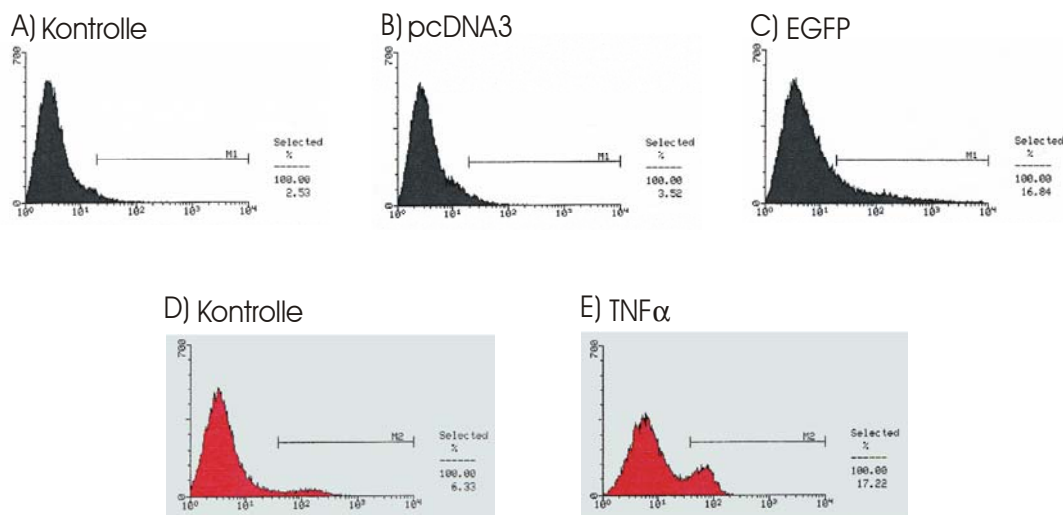


Abb. 13 Messung der Transfektionseffizienz und des Apoptoseindex in WEHI-164-S Zellen mittels FACS-Analyse

Transient transfizierte sowie Kontroll-WEHI-164-S Zellen wurden mit AlexaTM568-markiertem AnnexinV sowie mit einem gegen die extrazelluläre Domäne von p75^{NTR} gerichteten Primär- (Klon 192; Chemicon) plus DTAF-markiertem Sekundärantikörper gefärbt und einer FACS-Analyse unterzogen. AlexaTM568 wurde im FL3-Kanal gemessen, DTAF parallel dazu im FL1-Kanal. Alle Zellen, die sich innerhalb der mit unbehandelten Kontrollzellen definierten Region M1 befanden, wurden als FL1-positiv/transfiziert gewertet, alle Zellen, die sich innerhalb der Region M2 befanden, als FL3-positiv/apoptotisch. Unbehandelte Kontrollzellen sind im FL1- (A) als auch im FL3-Histogramm (D) dargestellt. FL1-Histogramme sind weiters von mit pcDNA3-Vektor (B) sowie von mit EGFP transfizierten Zellen gezeigt (C). Letztere wurden als Kontrolle verwendet, um die Transfektionsrate mit EGFP-Eigenfluoreszenz zu bestimmen. Zellen wurden jeweils 24 Stunden nach Transfektionsbeginn geerntet. In (E) wurden nichttransfizierte Zellen über fünf Stunden mit TNF α [10 ng/ml] behandelt und der Apoptoseindex in einem FL3-Histogramm dargestellt.

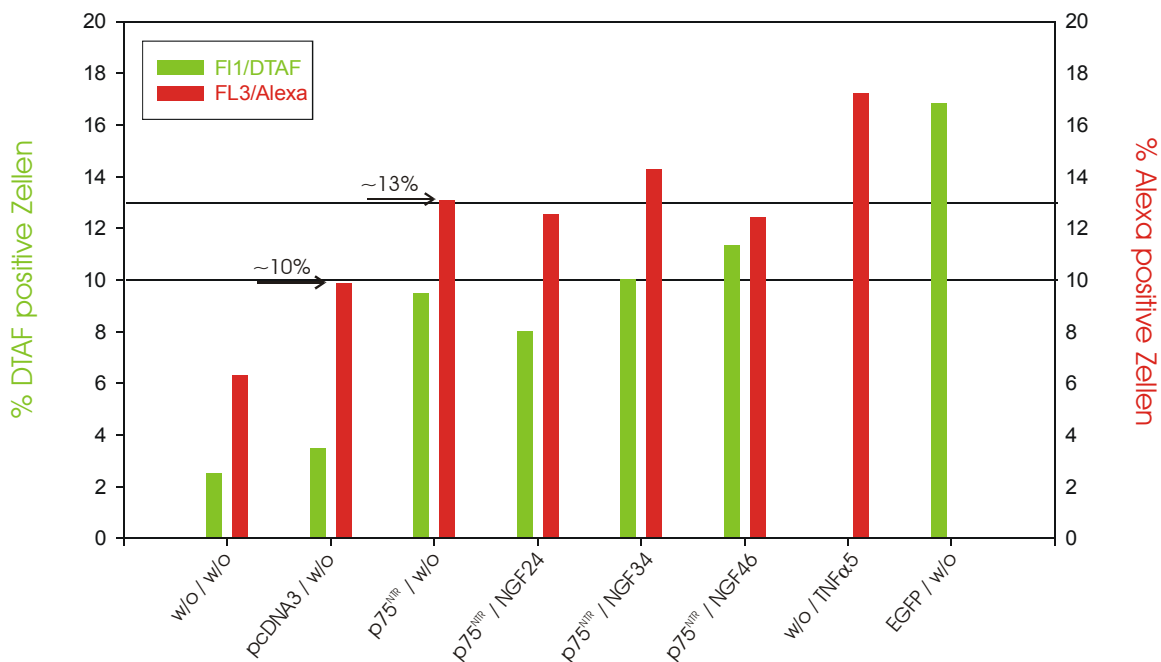


Abb. 14 Apoptose- und Transfektionsindizes von WEHI-164-S Zellen, gemessen mittels FACS-Analyse

Der Apoptose- wie auch der Transfektionsindex von WEHI-164-S Zellen wurden gemäß der in Abbildung 13 gezeigten Methode in verschiedenen Experimenten bestimmt. Nichttransfizierte Zellen waren unbehandelt (w/o / w/o) oder wurden über fünf Stunden mit TNF α [10 ng/ml] stimuliert (w/o / TNF α). Außerdem wurden Zellen mit pcDNA3-Vektor (pcDNA3 / w/o), mit p75^{NTR} (p75^{NTR} / w/o) oder EGFP (EGFP / w/o) transfiziert und 24 Stunden nach Transfektionsbeginn geerntet. Mit p75^{NTR} transfizierte Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektionsbeginn über 24, 34 und 46 Stunden mit NGF [100 ng/ml] stimuliert (p75^{NTR} / NGF24,34,46). Mit pcDNA3 transfizierte Zellen waren zu rund zehn Prozent apoptotisch, mit p75^{NTR} transfizierte zu rund 13 Prozent.

Wie ersichtlich, erhöhte die Transfektion *per se* den Apoptoseindex, gezeigt anhand der Kontrolltransfektion mit leerem Vektor. Transfektion mit FL-p75^{NTR} steigerte diesen Wert in signifikantem Ausmaß, jedoch nicht NGF-Stimulation nach einem der gemessenen Zeitintervalle. Parallel dazu wurde die Transfektionsrate von FL-p75^{NTR} mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers zu rund acht Prozent (abzüglich des transfektionsbedingten Hintergrundes) bestimmt. Als technische Kontrolle dazu wurde eine EGFP-Transfektion vorgenommen und mittels der Eigenfluoreszenz von EGFP eine Transfektionsrate von rund 13 Prozent ermittelt. Das Immunfluoreszenzsignal von p75^{NTR} war deutlich schwächer als das Eigenfluoreszenzsignal von EGFP, was vermutlich am im Vergleich zu EGFP schwachen fluoreszenzmarkierten Antikörper liegt. Dies erklärte die augenscheinlich geringere Transfektionsrate von FL-p75^{NTR} im Vergleich zu EGFP. Auch Zugabe von 0.1 Prozent Natriumazid zu den Zellen (blockiert die Internalisierung von Transmembranrezeptoren) oder Ablösen der Zellen ohne Trypsin, ausschließlich mit EDTA (löst Ca²⁺-abhängige Zell-Matrix-Kontakte), erhöhte das Immunfluoreszenzsignal von p75^{NTR} nicht (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt legen diese Experimente einen FL-p75^{NTR}-bedingten ligandenunabhängigen pro-apoptischen Effekt nahe. Dieser wird in 5.2 näher diskutiert. Grundsätzlich ist eine schlüssige Interpretation jedoch schwierig aufgrund von zwei Gegebenheiten. Zum einen war die erzielte Transfektionsrate sehr gering, zum anderen erhöhte die Transfektion *per se* in Relation dazu sehr stark den Hintergrund im Apoptoseindex.

Induzierte Expression von FL-p75^{NTR} nach stabiler Transfektion

Aufgrund der oben genannten Schwierigkeiten wurde beschlossen, von einem transienten auf einen stabilen Expressionsmodus von FL-p75^{NTR} überzugehen. Da wegen der zuvor erzielten Resultate von einem zytotoxischen Effekt von FL-p75^{NTR} ausgegangen werden musste, wurde entschieden, die Expression von FL-p75^{NTR} unter die Kontrolle eines induzierbaren Promoters zu stellen. Andernfalls, so die Befürchtung, könnten stabil transfizierte Klone nicht erzeugt werden, da sie bereits während des Selektionsprozesses verloren gingen.

Als ein induzierbares System wurde das Tetrazyklin (Tet)-abhängige Regulationssystem, im Speziellen das Tet-OnTM-System, ausgewählt. Bei dieser Variante führt Zugabe von Tetrazyklin zum Anschalten des interessierenden Gens (siehe 5.2). Es war geplant, dieses System in den beiden Zelllinien WEHI-164-S sowie Kym-1 zu etablieren. In einem ersten Schritt mussten dazu jeweils mit rtTA stabil transfizierte Klone erzeugt werden. In einer Serie von transienten Transfektionen mit einer Tet-abhängigen Luziferase sollten Klone mit einem geringen Aktivitätshintergrund und hoher Tet-Induzierbarkeit ermittelt werden. Jene sollten anschließend in einem zweiten Schritt stabil mit Tet-steuerbarem FL-p75^{NTR} transfiziert werden. Für funktionelle Studien galt es schließlich, Klone zu identifizieren, die einen geringen Hintergrund an FL-p75^{NTR}-Expression (geringe 'leakiness') sowie eine hohe Induzierbarkeit mit Tetrazyklin aufweisen.

Der Ansatz mit Kym-1 Zellen scheiterte schon am ersten Transfektionsschritt. Aufgrund der außerordentlich geringen Transfektionsrate verbunden mit dem Unvermögen dieser Zellen, nach erfolgter Selektion von Einzelzellen zu einem Klon hochzuwachsen, gelang es nicht, einen mit rtTA stabil transfizierten Klon zu ziehen. Mit WEHI-164-S Zellen konnten jedoch in einer ersten Runde zehn resistente Klone isoliert und hochgezogen

werden. Um sie auf Expression von rtTA zu testen, wurden sie zunächst einer rtTA-spezifischen RT-PCR unterzogen. Von neun überlebenden Klonen wurden fünf positiv getestet mit leicht unterschiedlicher Expressionsstärke (Abbildung 15).

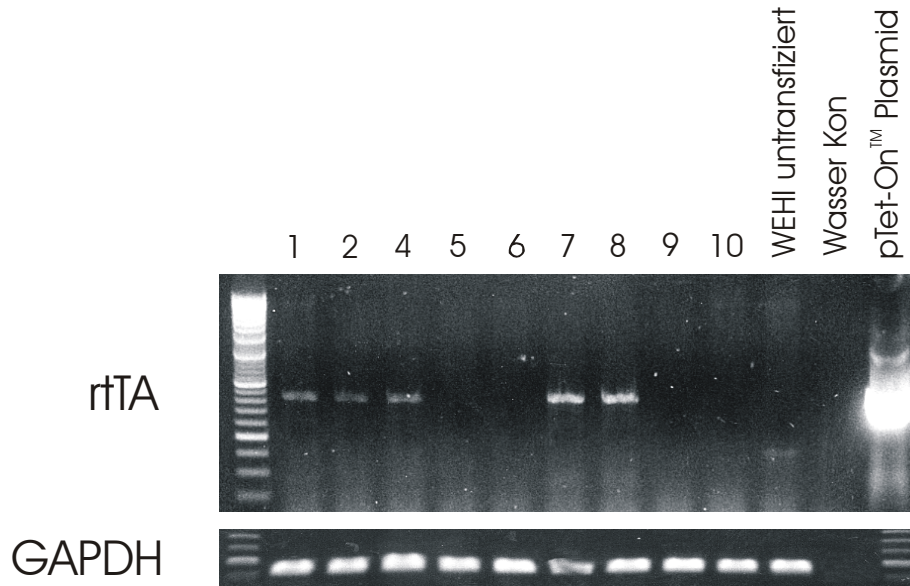


Abb. 15 Überprüfung von resistenten WEHI-164-S Klonen auf Expression von rtTA mittels RT-PCR

WEHI-164-S Zellen wurden für die stabile Transfektion mit rtTA selektioniert. Neun Klone wurden gezogen und RNA isoliert. Mittels RT-PCR wurde die Expression von rtTA getestet. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen sowie ein rtTA-Expressionsplasmid. Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Marker für die Quantifizierung der RNA verwendet. rtTA wurde mit 35 Zyklen, GAPDH mit 18 Zyklen amplifiziert.

Im Anschluss wurde die Expression von rtTA auf Proteinebene untersucht. Als Kontrolle diente eine kommerziell erhältliche CHO-Zelllinie, die stabil mit rtTA transfiziert war. Wie in Abbildung 16 zu erkennen, war kein rtTA-spezifisches Signal in einem der neun Klone zu sehen. Die Anzahl der Klone wurde deshalb erhöht, und in einer zweiten Runde wurden weitere 19 Klone isoliert und hochgezogen. 17 Überlebende wurden direkt einer Proteinanalyse unterzogen. Wiederum wurde bei keinem ein rtTA-spezifisches Signal detektiert. Offensichtlich gelang zwar eine stabile Transfektion von WEHI-164-S Zellen mit rtTA, das Transgen wurde auch transkribiert, aber das Protein schien nicht produziert werden zu können. Potenzielle Gründe hierfür werden in 5.2 erläutert. Das Vorhaben, p75^{NTR} induzierbar in WEHI-164-S Zellen zu exprimieren, wurde aufgrund von dieser Problematik nicht weiter verfolgt.

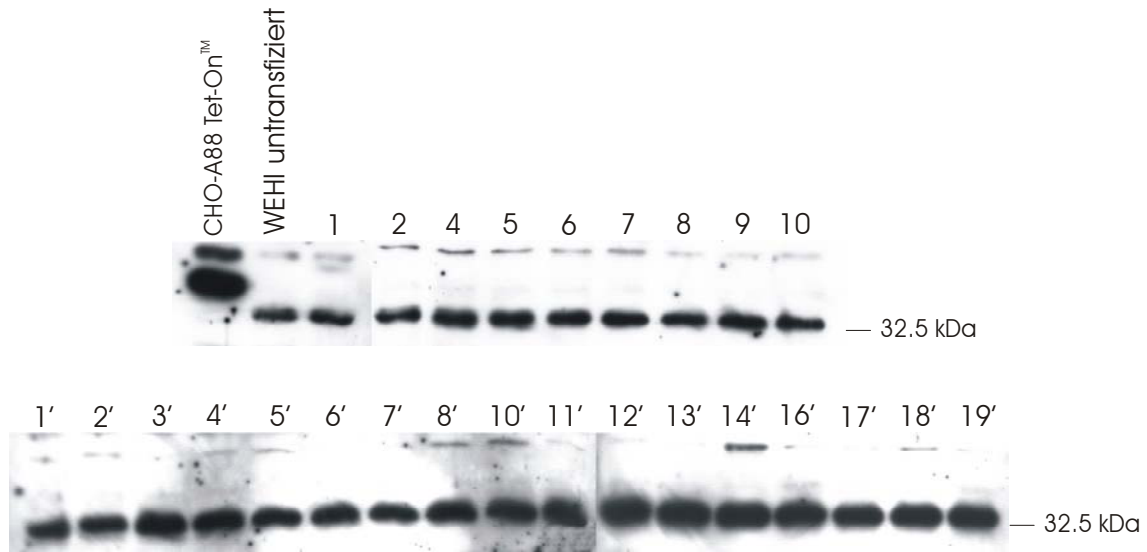


Abb. 16 Überprüfung von resistenten WEHI-164-S Klonen auf Expression von rtTA mittels Western Blotting

WEHI-164-S Zellen wurden für die stabile Transfektion mit rtTA selektioniert und mit Western Blotting auf Expression von rtTA getestet. Insgesamt wurden 26 Klone überprüft, neun davon wurden auch mittels RT-PCR untersucht (Abbildung 15; Klone # 1–10). Als Kontrolle dienten eine mit rtTA stabil transfizierte CHO-Zelllinie sowie untransfizierte WEHI-164-S Zellen. Die Proteinkonzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt, und pro Spur wurden 40 µg Gesamtprotein geladen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in WEHI-164-S Zellen der Ansatz einer pro-apoptischen und ligandenunabhängigen Signaltransduktion von p75^{NTR} gemessen wurde. Technische Schwierigkeiten mit dem verwendeten Zellsystem verhinderten jedoch eine klare Dokumentation und Analyse.

4.2.2 Zellwanderungsassay

NGF wird via p75^{NTR} eine Rolle im Migrationsverhalten von Schwannzellen zugeschrieben (Anton E.S. et al., 1994). Unabhängig davon wurde in unserer Gruppe von Toshihide Yamashita RhoA als intrazellulärer Interaktionspartner von p75^{NTR} identifiziert und darüber hinaus demonstriert, dass die Aktivität dieser GTPase von p75^{NTR} moduliert werden kann (siehe 2.2.2.4). Da die klassische Rolle von Rho-GTPasen in der Modulation des Aktinzytoskeletts gesehen wird und für mehrere Zelltypen eine direkte Rolle von Rho bei der Migration nachgewiesen wurde (siehe 5.3), sollte die potenzielle Bedeutung von Rho und p75^{NTR} für Zellwanderung in einem *In-vitro*-Assay untersucht werden.

Der in Anton E.S. et al., 1994, vorgestellte Migrationsassay erschien aus technischen Gründen nicht geeignet für den hier verfolgten Ansatz (siehe 5.3). Aus diesem Grund wurde ein von Varani J. et al., 1978, erstmals beschriebener Migrationsassay als

Alternative verwendet. Ursprünglich für die *In-vitro*-Untersuchung des Wanderungsverhaltens von malignen Zellen entwickelt, war dieser Assay später für das Studium des Wanderungsverhaltens von Schwannzellen adaptiert worden (Milner R. et al., 1997). Mit ihm kann eine reine Population von Schwannzellen unter variablen experimentellen Bedingungen – zum Beispiel unterschiedliches Medium oder Substrat – auf ihr Wanderungsverhalten getestet werden. Bei dieser Methode werden reine Schwannzellen in hoher Dichte in einem Agarosetropfen auf eine Unterlage gesetzt. Nach Erstarren der Agarose und Einbetten im Medium beginnen die Zellen, radial aus dem kugelförmigen Tropfen zu kriechen. Die Quantifizierung erfolgt hierbei einfach im Messen der pro Zeiteinheit vom Tropfenrand zurückgelegten Distanz. In Abbildung 17 ist ein typisches Experiment dargestellt.

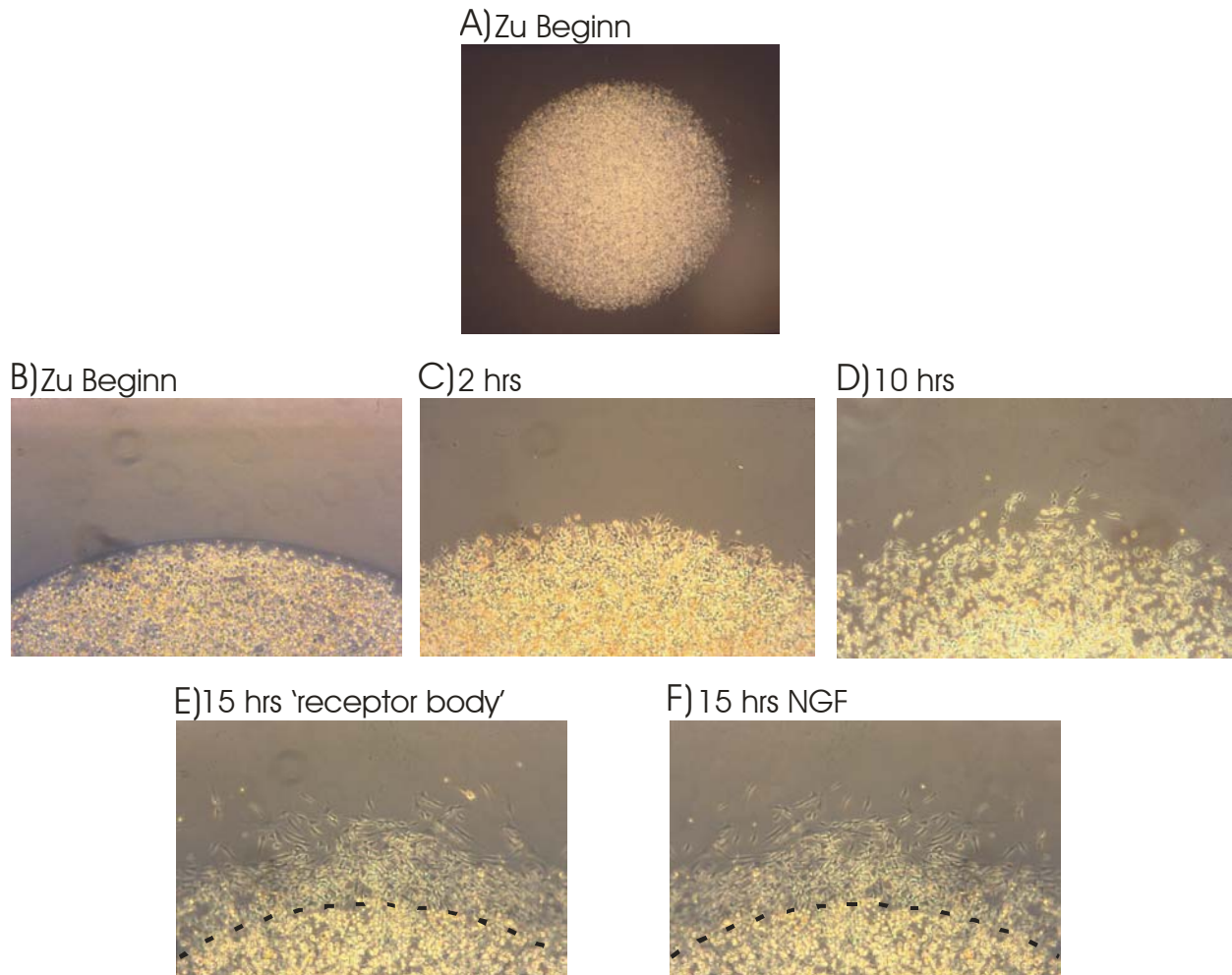


Abb. 17 Migrationsassay mit primären Schwannzellen

Schwannzellen, isoliert aus Nervi ischiatici von p3-Mäusen, wanderten aus einem Agarosetropfen radial in die Kulturschale. Der zeitliche Verlauf wurde über insgesamt 15 Stunden verfolgt: unmittelbar nach dem Absetzen des Tropfens (A und B), nach 2 Stunden (C), nach 10 Stunden (D) und nach 15 Stunden (E und F). Zum Kulturmedium wurde entweder p75^{NTR}-‘receptor body’ [1µg/ml] (A-E) oder NGF [500 ng/ml] (F) zugegeben. Der ursprüngliche Tropfenrand ist in E und F mit einer

gestrichelten Linie hervorgehoben. A: 2.5fache Vergrößerung, B-F: 10fache Vergrößerung

Die Wanderung der Schwannzellen wurde unter den folgenden Bedingungen getestet: nach Zugabe von NGF oder BDNF oder NT3 oder von allen drei Neurotrophinen zusammen. Als Kontrolle wurde ein p75^{NTR}-‘receptor body’ eingesetzt. Dieser besteht aus dem extrazellulären Teil von FL-p75^{NTR}, der mit dem Fc-Teil eines Immunglobulins fusioniert wurde. Er wird wie ein monoklonaler Antikörper produziert und sezerniert. Gleich funktionalem FL-p75^{NTR} bindet er alle Neurotrophine. Die von Schwannzellen in Kultur produzierten Neurotrophine (Nachweis von NGF, BDNF und NT3 mit RT-PCR; Daten nicht gezeigt) werden damit abgefangen und neutralisiert. Auf diese Weise sollte ein möglichst großes Signal/Rausch-Verhältnis erzielt werden. Mit keinem der Neurotrophine konnte jedoch ein klarer Effekt auf das Migrationsverhalten verzeichnet werden: Pro untersuchte Zeiteinheit war kein Unterschied in der zurückgelegten Distanz erkennbar.

Der Assay wurde unter zwei grundlegend unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Zuerst gemäß den Angaben aus Milner R. et al., 1997: auf Substrat, bestehend aus vier verschiedenen Extrazelluläre-Matrix-Proteinen, und in serumfreiem Medium, supplementiert mit Forskolin und GGF-2. Dann unter Standardkulturbedingungen: auf Poly-L-Lysin und in serumhaltigem Medium ohne weitere Zusätze. Unter erstgenannten Bedingungen war die allgemeine Mobilität der Zellen zwar leicht erhöht, sonst aber gab es keine Unterschiede – eben auch nicht nach Neurotrophinzugabe – zwischen den beiden Ansätzen. Die grundsätzliche Relevanz dieser experimentellen Parameter für einen p75^{NTR}-Assay wird in 5.3 näher erörtert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass ein Migrationsassay für Schwannzellen technisch zwar erfolgreich getestet werden konnte, die Zugabe von Neurotrophinen unter den gegebenen Bedingungen aber keinen Einfluss auf das Wanderungsverhalten zeigte.

4.2.3 Rho-Modulationsassay

Der Rho-Affinitätspräzipitations-Assay

p75^{NTR} bindet die kleine GTPase RhoA und moduliert auch deren Aktivität. Dieser Befund von Toshihide Yamashita (siehe 2.2.2.4) bildete die Grundlage für folgende weitere Untersuchungen. Nachdem eine Rho modulierende Funktion von p75^{NTR} in den beiden Standardzelllinien A293 und HN-10 festgestellt worden war, war es das vorrangige Ziel, dieses Ergebnis in einem primären Zellsystem zu validieren. Keine der beiden genannten Linien zeigt einen zellulären Effekt nach Aktivierung von p75^{NTR} und RhoA. Primärzellen hingegen sollten eher einen Hinweis auf die biologische Relevanz dieses Signalschrittes liefern – es wurde vor allem an eine mögliche Regulation des Neuritenwachstums gedacht.

Für die Bestimmung der Rho-Aktivität wurde die Methode der Affinitätspräzipitation nach Ren X.-D. et al., 1999, herangezogen. Hierbei wird Rho-GTP selektiv über das Rho-Effektorprotein Rhotekin an Sepharose gebunden, präzipitiert und mit einem Anti-Rho-Antikörper im Western Blot detektiert. Für die Produktion der mit der Rho bindenden

Domäne von Rhotekin, kurz RBD, beladenen Sepharose wurde *E. coli* mit dem RBD-GST-Fusionsexpressionskonstrukt transformiert. Die Expression des Fusionsproteins wurde mit IPTG induziert, nach Lyse der Zellen wurde das Lysat mit Glutathion-Sepharose inkubiert, und nach sorgfältigen Waschschriften wurde die mit RBD beladene Sepharose aliquotiert und eingefroren. Die Aufreinigung von RBD ist in Abbildung 18 gezeigt. Rhotekin bindet die beiden Isoformen RhoA und RhoB mit ähnlicher Affinität – RhoC ist nicht getestet worden (Reid T. et al., 1996). Es werden also mindestens zwei der drei Isoformen mit diesem Assay gefischt. Da der für die eigentliche Detektion verwendete Antikörper jedoch spezifisch für RhoA ist, gelten die mit diesem Ansatz erhaltenen Ergebnisse immer nur für die A-Isoform. In Körnerzellen des Kleinhirns werden sowohl RhoA als auch RhoB in der frühen postnatalen Entwicklung exprimiert, die Anwesenheit von RhoC ist noch ungeklärt (Olenik C. et al., 1997). Sowohl Rho-GTP als auch RBD sind sehr temperaturlabil. Aufreinigung von RBD wie auch die Präzipitation von Rho-GTP mit RBD-Sepharose wurden deshalb stets bei 4°C durchgeführt (siehe 3.2.2.3 und 3.2.2.4). Die korrekte Faltung von RBD ist auch sehr stark von einem definierten pH-Wert abhängig. Die Verwendung von Tris-gepufferten Lösungen erforderte deshalb unbedingt eine exakte Justierung des pH-Wertes mit Bedacht auf Temperatureffekte beim Titrieren sowie Übereinstimmung der Temperaturen der Pufferlösungen beim Adjustieren des pH-Wertes und beim Experiment.

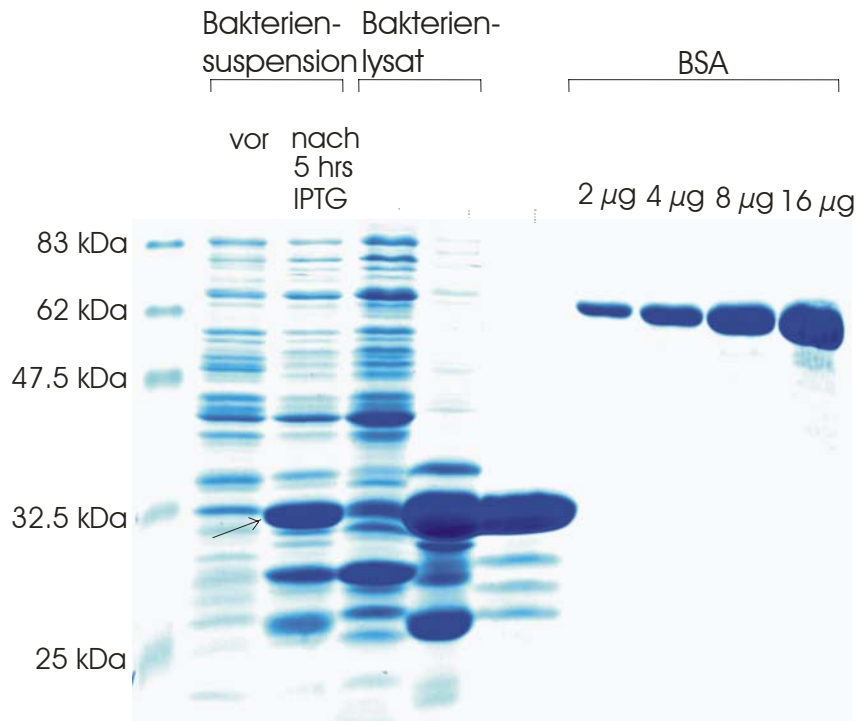


Abb. 18 Aufreinigung der Rho bindenden Domäne (RBD) von Rhotekin

RBD wurde als GST-Fusionsprotein im *E. coli* Stamm DH5 α nach Induktion mit IPTG produziert. Vor und nach der Induktion wurden jeweils 50 μ l Bakteriensuspension entnommen, und das Proteinextrakt wurde analysiert. Nach der

Induktion wurden die Bakterien lysiert [4 ml Lysispuffer/g Pellet-Nassgewicht]. Ein 1 μ l Aliquot an Lysat wurde – nach Volumenerhöhung mit Lysispuffer – pelletiert. Der Überstand wurde mit dem Pellet, das durch Aufkochen in 20 μ l 1x Laemmli-Puffer gelöst wurde, verglichen. Der größere Teil von GST-RBD wurde im Überstand gefunden. Das Lysat wurde mit Glutathion-Sepharose inkubiert. In 100 μ l Sepharose – die typische Menge für eine Rho-GTP-Präzipitation – wurde gebundenes RBD durch Aufkochen in Laemmli-Puffer eluiert. Der Vergleich mit BSA zeigte, dass es sich um ungefähr 20-30 μ g RBD handelte, die Menge, die in Ren X.-D. et al., 1999, empfohlen wird. GST-RBD ist mit einem Pfeil markiert.

Rho-Assay mit dissoziierten hippocampalen Neuronen

Als Primärsystem wurden zunächst dissoziierte hippocampale Neuronen ausgewählt. Es war bekannt, dass Rho-GTPasen in diesem Zelltyp wesentlich an der Gestaltung von dendritischen Strukturen beteiligt sind (Nakayama A.Y. et al., 2000). Darüber hinaus lagen Daten einer benachbarten Arbeitsgruppe an unserem Institut vor, die zeigten, dass $\text{TNF}\alpha$ das Neuritenwachstum in dissoziierten hippocampalen Neuronen verringert. Um die Hypothese, dass dieser Effekt mit einer Änderung der Rho-Aktivität einhergeht, zu testen, wurden hippocampale Neuronen aus E16.5-Embryonen mit $\text{TNF}\alpha$ über einen Zeitverlauf von bis zu 16 Stunden stimuliert und die Aktivität von RhoA gemessen (Abbildung 19).

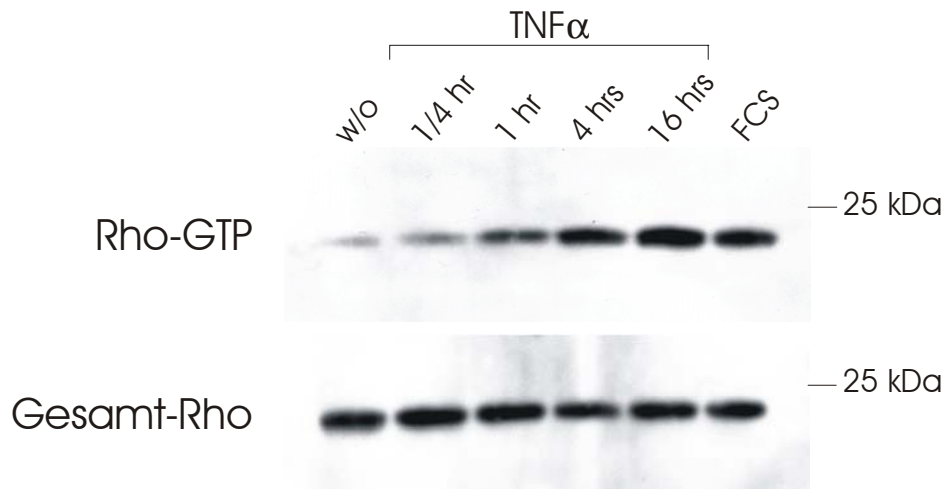


Abb. 19 Aktivierung von RhoA in primären hippocampalen Neuronen mit $\text{TNF}\alpha$

Dissoziierte hippocampale Neuronen aus E16.5-Embryos wurden in einem Zeitverlaufsexperiment mit $\text{TNF}\alpha$ [10 ng/ml] stimuliert und jeweils zum selben Zeitpunkt geerntet. Als Positivkontrolle der RhoA-Aktivierung wurde mit einem Prozent FCS über zehn Minuten stimuliert. Rho-GTP wurde mit RBD-Sepharose präzipitiert, die Gesamtmenge an RhoA wurde direkt im Extrakt detektiert.

Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ führte nach einigen Stunden zu einer nachhaltigen Hochregulation der RhoA-Aktivität. Wie in weiteren Versuchen gezeigt wurde, korreliert diese

Modulation der RhoA-Aktivität nicht nur mit dem verzögerten Neuritenwachstum, sondern liegt ihm tatsächlich kausal zugrunde (siehe 5.4).

Rho-Assays mit Primärneuronen waren sehr stark von den detaillierten Versuchsbedingungen abhängig (siehe auch Versuche mit dissoziierten cerebellären Neuronen weiter unten). Als Beschichtungsmaterial für die Kulturschalen war Laminin ungeeignet. In diesem Fall wurde RhoA nämlich schon vor Stimulation mit NGF stark aktiviert (Daten nicht gezeigt), vermutlich durch Integrine (Renshaw M.W. et al., 1996). Als Kulturmedium erwies sich Neurobasal als besser geeignet als DMEM (Daten nicht gezeigt).

Ein wesentliches Problem aller Rho-Aktivitätsassays wurde bei diesem Zellsystem allerdings evident. Da Rho-GTP nur einen geringen Anteil an Gesamt-Rho ausmacht – typischerweise 0.1 bis 1 Prozent (Ren X.-D. et al., 1999) –, wurden große Mengen an Zellmaterial für einen Versuch benötigt. Die Gesamtzahl der pro Tier erhaltenen hippocampalen Neuronen von rund 4×10^5 war dafür sehr gering. War dieser experimentelle Ansatz für RhoA-Aktivierungsstudien noch praktikabel, wurden für RhoA-Inaktivierungsstudien mit NGF ernste quantitative Schwierigkeiten gesehen, zumal der Basalwert an aktivem RhoA in hippocampalen Neuronen sehr gering ist. Ein in dieser Hinsicht viel besser geeignetes System wurde in Form von cerebellären Körnerzellen gefunden. Der Ertrag an Zellen pro Cerebellum lag mit rund 7×10^6 um mehr als eine Größenordnung über dem aus Hippocampi erzielten.

Rho-Assay mit dissoziierten cerebellären Neuronen

Nicht nur können Körnerzellen in großer Zahl präpariert werden, sie exprimieren p75^{NTR} sehr stark im frühen postnatalen Stadium (Muller Y. et al., 1994), auch wurde in diesem Zelltyp bereits Signalaktivität von p75^{NTR} nachgewiesen (Susen K. et al., 1999). Cerebella von p7-Tieren wurden dissoziiert und in Kultur gebracht. Auf die Anreicherung eines bestimmten Zelltyps wurde verzichtet, da in diesem Alter Körnerzellen die überragende Mehrheit der Zellen darstellen (mehr als 95 Prozent), der Rest teilt sich auf in Korb-, Stern- und Golgizellen (neuronale Zellen) sowie Gliazellen. Purkinjezellen werden im Zuge der Dissoziation zerstört. Die Körnerzellen sind zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung noch nicht vollständig differenziert.

Der Rho-Assay wurde wie bei hippocampalen Neuronen durchgeführt. Tatsächlich führte auch Stimulation mit NGF zu einer Modulation der RhoA-Aktivität, wider Erwarten jedoch nicht zu einer Inaktivierung (wie es die Ergebnisse von T. Yamashita mit Zelllinien nahe legten), sondern zu einer Aktivierung innerhalb von zehn Minuten (siehe Abbildung 20). Das Ausmaß variierte jedoch von Experiment zu Experiment. Um das Signal/Rausch-Verhältnis zu stabilisieren, wurde auf eine in 4.2.2 bereits beschriebene Maßnahme zurückgegriffen. Kontrollzellen wurden vorerst mit p75^{NTR}-‘receptor body’, später mit einem funktionsblockierenden Anti-NGF-Antikörper (Klon 27/21) inkubiert. Speziell von Körnerzellen war bekannt, dass sie *in vitro* signifikante Mengen an NGF sezernieren (Charrasse S. et al., 1992). Mit dieser Maßnahme gelang es in der Tat, die Signalstärke im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erhöhen. Dieses Prinzip wurde in einem nächsten Schritt ausgeweitet, indem nicht nur zu Kontrollzellen Anti-NGF-Antikörper gegeben wurde, sondern unmittelbar nach dem Ausplattieren zu allen Zellen. Vor der

Stimulation mit NGF, typischerweise in einer Über-Nacht-Kultur, wurde das Antikörper enthaltende Medium entfernt und nach zwei umfassenden Waschschritten mit NGF-haltigem Medium ersetzt. Diese Methode stellte sich als die effizienteste für das NGF-Signal heraus und wurde künftig bei allen weiteren Assays mit cerebellären und auch hippocampalen Zellen angewandt (siehe speziell 4.2.5). In Abbildung 20 ist die gemessene RhoA-Aktivität unter verschiedenen Bedingungen gezeigt.

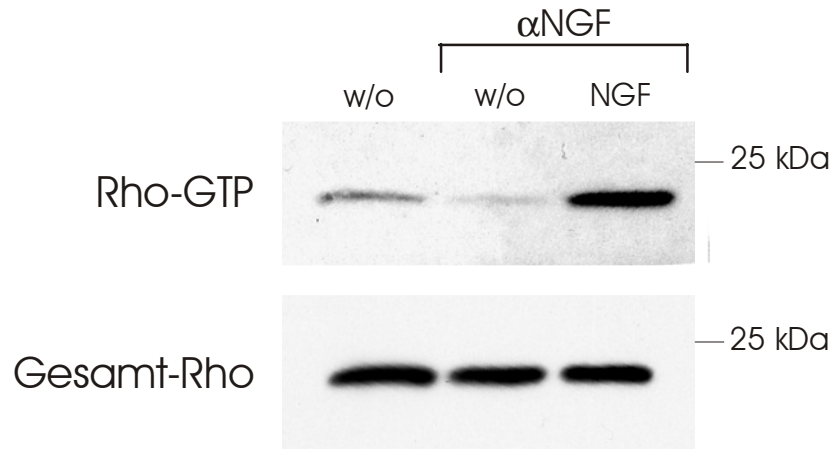


Abb. 20 Aktivierung von RhoA in primären cerebellären Körnerzellen durch NGF

In dissoziierten cerebellären Körnerzellen aus p7-Mäusen wurde die Aktivität von RhoA unter unterschiedlichen Bedingungen gemessen. Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von Anti-NGF-Antikörper [5 µg/ml] über Nacht kultiviert. Nach Prä-Inkubation mit Anti-NGF-Antikörper wurden Zellen vor zehnmütiger Stimulation mit NGF [50 ng/ml] gründlich und sorgfältig gewaschen. Zu Kontrollzellen wurde wieder Anti-NGF-Antikörper zugegeben. Rho-GTP wurde mit RBD-Sepharose präzipitiert, die Gesamtmenge an RhoA wurde direkt im Extrakt detektiert.

In einem Zeitverlaufsexperiment zeigte sich, dass die Aktivierung von RhoA bereits nach zwei Minuten erkennbar war und mindestens neun Stunden anhielt (Abbildung 21). Zeitpunkte darüber oder darunter wurden nicht bestimmt.

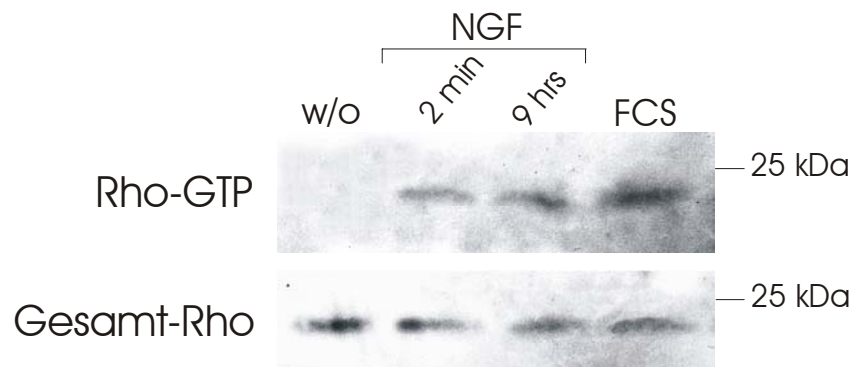


Abb. 21 Aktivierung von RhoA in primären cerebellären Körnerzellen durch NGF im Zeitverlauf

In dissoziierten cerebellären Körnerzellen aus p7-Mäusen wurde die Aktivität von RhoA nach Stimulation mit NGF [50 ng/ml] über zwei Minuten und neun Stunden gemessen. Wie für Abbildung 20 beschrieben, wurden die Zellen mit Anti-NGF-Antikörper [5 µg/ml] über Nacht präinkubiert. Als Positivkontrolle der RhoA-Aktivierung wurde mit einem Prozent FCS über zehn Minuten stimuliert. Rho-GTP wurde mit RBD-Sepharose präzipitiert, die Gesamtmenge an RhoA wurde direkt im Extrakt detektiert.

Die Kinetik der Aktivierung von RhoA unterschied sich hiermit stark bei p75^{NTR} und TNFR. Während der erste Rezeptor RhoA innerhalb weniger Minuten aktivieren konnte, benötigte TNFR dafür mehrere Stunden. Dieser signifikante Unterschied bei den beiden Familienmitgliedern wird in 5.4 näher diskutiert.

Da es sich bei diesen cerebellären Zellen um kein homogenes Kultursystem handelte, wurden für eine klare Interpretation der RhoA-Resultate einige diesbezüglich relevante Aspekte untersucht. Vor allem galt es, zunächst zu klären, ob RhoA auch tatsächlich in der überwiegenden Mehrheit der Zellen, den Körnerzellen, vorhanden ist oder selektiv in einem bestimmten anderen Zelltyp. Zu diesem Zweck wurden gemischte Cerebellumkulturen immunzytochemisch auf RhoA untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt.

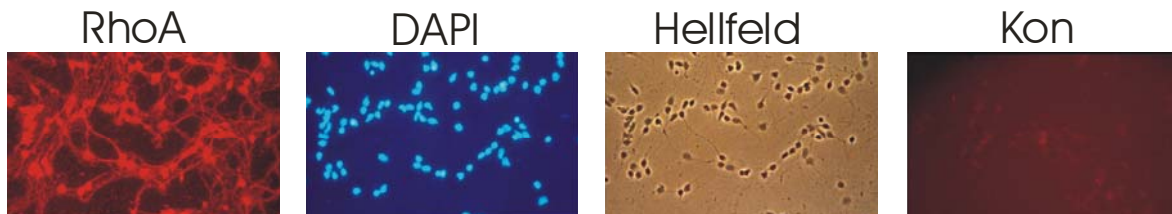


Abb. 22 Immunzytochemische Detektion von RhoA im cerebellären Kultursystem

Dissoziierte cerebelläre Zellen von p7-Mäusen wurden nach einem Tag in Kultur fixiert und gegen RhoA gefärbt. Parallel dazu wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt, um Zellkerne sichtbar zu machen. Für die Kontrollfärbung wurde der Primärantikörper weggelassen.

Alle Zellen des Kultursystems exprimierten RhoA in sehr starker und homogener Weise. Obwohl die anderen Zelltypen nicht explizit auf die Expression von RhoA untersucht worden sind, zeigte die immunzytochemische Analyse, dass durchaus auch Zellen, die morphologisch nicht Körnerzellen entsprechen, zum Teil positiv für RhoA sind (Daten nicht gezeigt). Da einerseits diese Zelltypen jedoch eindeutig in der Minderheit waren, andererseits das RhoA-Signal sehr stark war, erschien es nicht wahrscheinlich, dass gerade diese für die beobachtete RhoA-Modulation verantwortlich waren.

Von entscheidender Bedeutung war weiters die Frage, ob außer p75^{NTR} noch andere Neurotrophinrezeptoren, vor allem TrkA, exprimiert werden. In einer RT-PCR-Serie

wurde dies getestet. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse für die einzelnen Marker präsentiert: FL-p75^{NTR}, s-p75^{NTR}, TrkA, TrkB, TrkC, NGF, BDNF, NT3 sowie NT4.

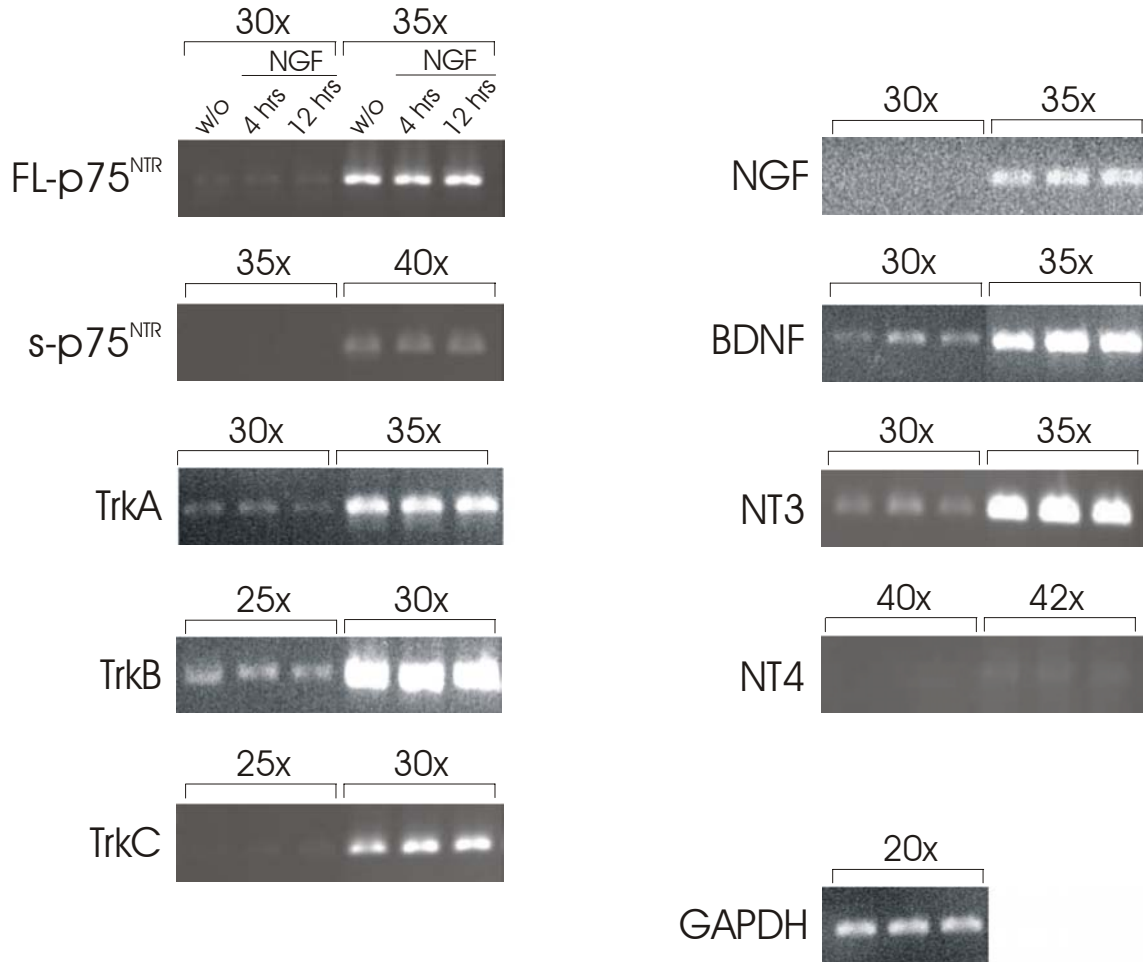


Abb. 23 RT-PCR-Analyse der Expression ausgewählter Markergene im cerebellären Kultursystem

Dissoziierte cerebelläre Zellen von p7-Mäusen wurden wie für Abbildung 20 beschrieben über Nacht mit Anti-NGF-Antikörper [5 µg/ml] präinkubiert und mit NGF [50 ng/ml] über vier und zwölf Stunden stimuliert. Alle Zellen wurden zum selben Zeitpunkt geerntet und RNA wurde isoliert. Marker für Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren wurden mit jeweils drei Zykluszahlen (25x, 30x, 35x oder 30x, 35x, 40x; Ausnahme: NT4) via RT-PCR getestet. Jeweils zwei Zykluszahlen werden gezeigt. GAPDH wurde als Marker für die Quantifizierung der RNA verwendet.

Alle Neurotrophine sowie Neurotrophinrezeptoren wurden positiv detektiert. Allerdings variierte die Signalintensität der einzelnen Marker ganz beträchtlich, was stark

unterschiedliche Expressionsstärken nahe legte. So lieferte TrkB das deutlich stärkste Signal, wohingegen s-p75^{NTR} und vor allem NT4 an der Detektionsgrenze lagen. In beiden Fällen konnte erst nach mindestens 40 Zyklen ein Signal amplifiziert werden, wobei die schwache Expression von s-p75^{NTR} nicht überraschte (siehe 4.1.1). NT4 wurde mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren, die ein jeweils gleich starkes Signal lieferten, nachgewiesen (Daten nicht vergleichend dargestellt).

Ein wesentliches Ergebnis dieser RT-PCR-Serie war der klare Nachweis von TrkA. Nach diesem Ergebnis konnte denn nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Modulation von RhoA mit NGF statt über p75^{NTR} tatsächlich über TrkA vermittelt wurde. Um die konkrete Rolle von p75^{NTR} zu ermitteln, wurde der Rho-Assay mit cerebellären Kulturen aus Exon IV-mutanten Mäusen durchgeführt.

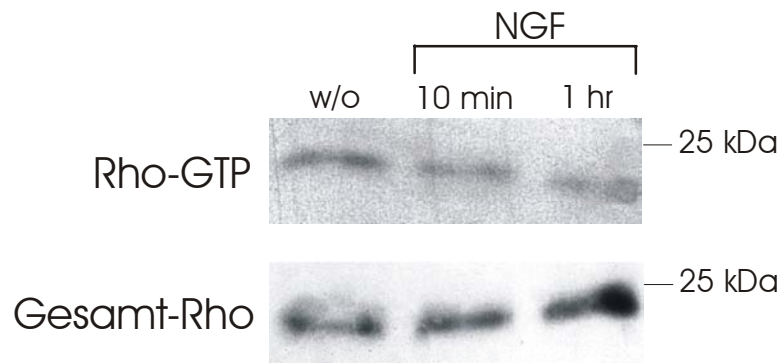


Abb. 24 Messung der RhoA-Aktivität nach Stimulation mit NGF in cerebellären Körnerzellen aus $p75^{ExonIV-/-}$ Tieren

Dissoziierte cerebelläre Zellen von $p75^{ExonIV-/-}$ Mäusen (p7) wurden wie für Abbildung 20 beschrieben über Nacht mit Anti-NGF-Antikörper [5 µg/ml] präinkubiert und mit NGF [50 ng/ml] über zehn Minuten und eine Stunde stimuliert. Rho-GTP wurde mit RBD-Sepharose präzipitiert, die Gesamtmenge an RhoA wurde direkt im Extrakt detektiert.

Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, führte Stimulation mit NGF über einen Zeitraum von zehn Minuten bis zu einer Stunde in diesem Fall nicht zu einer Aktivierung von RhoA. Damit war bewiesen, dass für die Modulation der RhoA-Aktivität im cerebellären Kultursystem p75^{NTR} eine kausale Rolle spielt. Bemerkenswerterweise erschien die Gesamtmenge an Rho-GTP im $p75^{NTR}$ -Knockout signifikant geringer als im Wildtyp (siehe 5.4).

4.2.4 Untersuchung des Aktinzytoskeletts nach RhoA-Aktivierung in primären Neuronen

Die unmittelbare Frage nach Etablierung des Rho-Assays war, welchen Effekt die RhoA-Aktivierung auf zellulärer Ebene hat. Wie in 2.2.2.4 erläutert, wird für Rho eine

Schlüsselfunktion bei der neuronalen Morphogenese postuliert. Es erschien daher nahe liegend, die Auswirkungen von p75^{NTR}-induzierter RhoA-Aktivierung auf das Auswachsen von Neuriten unter *In-vitro*-Bedingungen zu untersuchen. Dazu wurden cerebelläre Neuronen unter Bedingungen, wie sie auch beim Rho-Assay angewendet wurden, kultiviert. Die Dauer der NGF-Stimulation wurde dabei bis auf 72 Stunden ausgedehnt und das Neuritenwachstum mit Kontrollzellen unter Anti-NGF-Antikörper verglichen. Es konnte klar festgestellt werden, dass bei diesem Versuchsaufbau kein Unterschied im Neuritenwachstum zwischen mit Anti-NGF-Antikörper und mit NGF behandelten Zellen sichtbar wurde (Daten nicht gezeigt). Bei diesem Langzeitexperiment wurde jedoch ein Unterschied in der Zahl der abgestorbenen Zellen zwischen mit Anti-NGF-Antikörper und mit NGF behandelten Zellen beobachtet. Behandlung mit Anti-NGF-Antikörper resultierte in mehr schwimmenden, abgestorbenen Zellen als Behandlung mit NGF (Daten nicht gezeigt) (siehe auch Diskussion 5.4).

Parallel zu diesem Langzeitexperiment wurde auch ein möglicher Kurzeiteffekt von NGF auf das Aktinzytoskelett untersucht. Zu diesem Zweck wurden cerebelläre Kulturen aus einer Aktin-EGFP-Maus analysiert. In diesem Mausmodell ist das Gen für ein Aktin-EGFP-Fusionsprotein in den Lokus von *f-aktin* unter Deletion der Wildtypsequenz inseriert (Aktin-EGFP-‘Knock-in’). Das Fusionsprotein wird unter der Promoterkontrolle des Wildtyp-Aktin-Allels produziert. Da ein homozygoter ‘Knock-in’ letal ist, konnten nur heterozygote Mäuse verwendet werden. Mittels Video-Imaging wurden Änderungen in der Aktinfeinstruktur nach Zugabe von NGF in Sekundenauflösung dokumentiert. Auch in diesem Ansatz konnte kein Effekt von NGF auf das Aktinzytoskelett festgestellt werden. Zur Illustration ist eine Serie von Videobildern als Zeitverlauf nach NGF-Applikation in Abbildung 25 wiedergegeben.

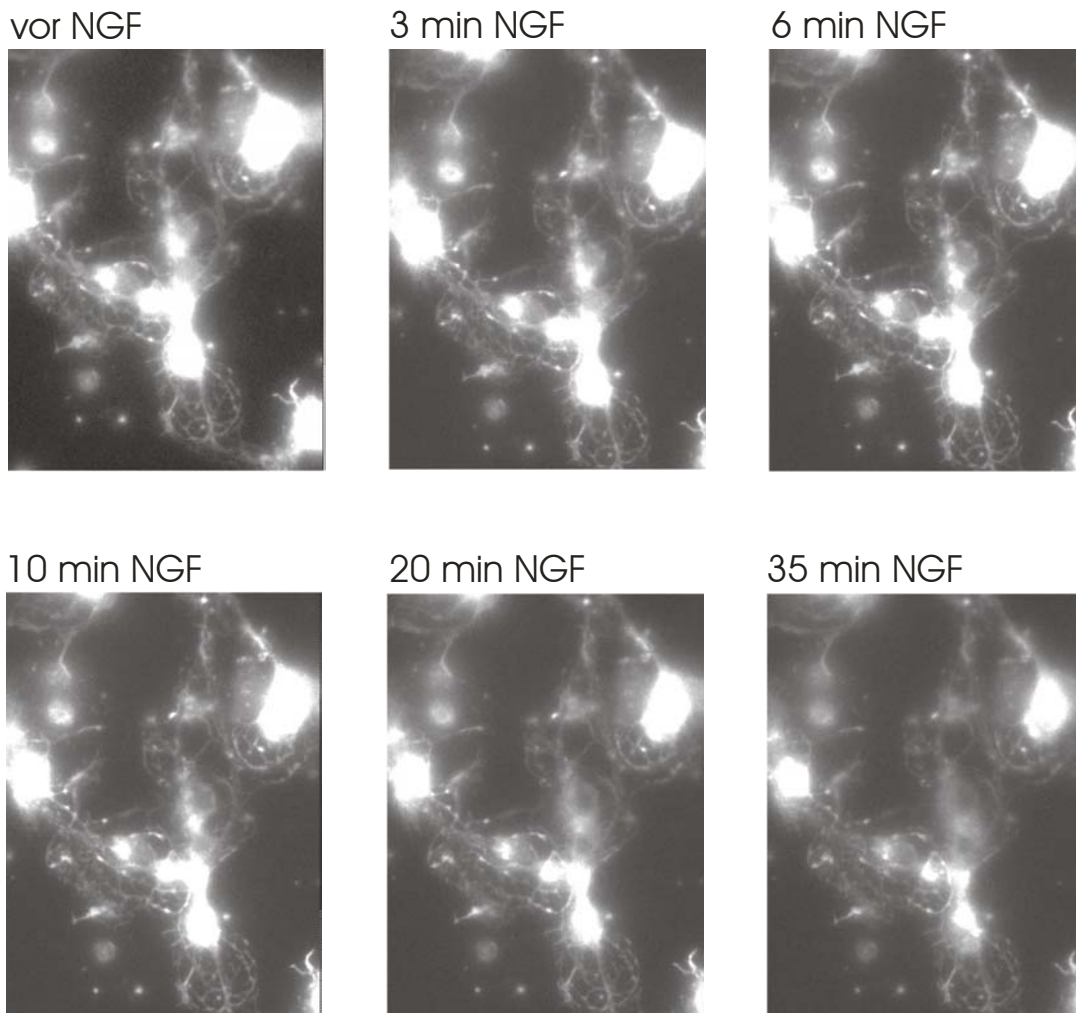


Abb. 25 Das Aktinzytoskelett in cerebellären Körnerzellen aus Aktin-EGFP-‘Knock-in’-Mäusen in hoher zeitlicher Auflösung nach Zugabe von NGF
 Dissoziierte cerebelläre Körnerzellen aus Aktin-EGFP-‘Knock-in’-Mäusen (p7) wurden mittels Video-Imaging in Zehn-Sekunden-Intervallen fotografiert. Das Aktinzytoskelett leuchtet durch die Fusion von Aktin und EGFP, und potenzielle Änderungen in dessen Architektur können zeitlich hochaufgelöst dokumentiert werden. Es wird eine Auswahl an Bildern gezeigt. Das erste wurde unmittelbar vor Zugabe von NGF [50 ng/ml] aufgenommen, die übrigen im Zeitverlauf von drei Minuten bis 35 Minuten nach Zugabe. Die allgemein abnehmende Fluoreszenzintensität im Zeitverlauf lag darin begründet, dass EGFP gebleicht wurde.

Da Aktivierung von p75^{NTR} im cerebellären Kultursystem zwar RhoA aktivierte, aber offenbar nicht auf das Aktinzytoskelett zielte, wurden alternative Effekte dieses Signalschrittes in Betracht gezogen. Tatsächlich ist die Rolle von Rho-GTPasen inklusive RhoA grundsätzlich nicht auf eine Modulation des Aktinzytoskeletts beschränkt. Rho-Proteine sind auch in der Regulation aller drei großen zellulären Programme –

Apoptose/Überleben, Proliferation/Quieszenz, Differenzierung/Pluripotenz – involviert (für eine Übersicht siehe z.B. Ridley A.J., 2000). Im Gegensatz zur Modulation des Zytoskeletts wirkt die Rho-Signalkaskade in diesen Fällen überwiegend über Veränderung des Genexpressionsmusters. Eine der geeignetsten Methoden, solche Veränderungen systematisch und umfassend aufzuspüren, ist das so genannte ‘Gene Expression Profiling’ oder globale Genexpressionsanalyse.

4.2.5 Globale Genexpressionsanalyse in primären Neuronen

Die im vorigen Kapitel präsentierte Aktivierung von RhoA über p75^{NTR} zeigte, dass in cerebellären Körnerzellen Signale über diesen Neurotrophinrezeptor vermittelt wurden. Um Hinweise auf die funktionelle Bedeutung dieser Signalaktivität zu erlangen, wurde das Genexpressionsmuster von mit Anti-NGF-Antikörper und mit NGF behandelten Zellen verglichen. Das Ziel dieses Ansatzes war, potenzielle Zielgene von den von p75^{NTR} in diesem Zellsystem initiierten Signalwegen zu identifizieren. In einem ersten Schritt sollten dabei alle Gene, welche nach NGF-Stimulation in ihrer Expression verändert sind, ermittelt werden. In einem zweiten Schritt sollte untersucht werden, ob diese Veränderung auch tatsächlich über p75^{NTR} herbeigeführt wird.

Das vorliegende Experiment wurde mit der Methode nach Affymetrix, Inc. durchgeführt. Sie basiert auf so genannten ‘High Density Oligonucleotide Arrays’, mit denen die Expressionswerte unterschiedlicher Gene von zwei biologischen Proben verglichen werden können. Tatsächlich erlaubt dieser Ansatz, die bis dato größtmögliche Anzahl an unterschiedlichen Genen parallel zu analysieren. Im konkreten Fall waren dies knapp 12500 Gene, deren Expressionsstärke bei mit Anti-NGF-Antikörper und mit NGF behandelten Zellen verglichen wurde.

Änderung des Genexpressionsprofils im cerebellären Kultursystem nach Stimulation mit NGF

Das Experiment wurde wie für den Rho-Assay beschrieben angesetzt. Unmittelbar nach dem Ausplattieren wurde allen Zellen Anti-NGF-Antikörper zugegeben. Nach Über-Nacht-Inkubation wurden die Zellen gründlich gewaschen und die NGF-Stimulation gestartet. Um Trends in der Genexpression zu erkennen und um ‘immediate early genes’ von ‘late genes’ unterscheiden zu können, wurde über zwei Zeitintervalle stimuliert: über vier und zwölf Stunden. Der Beginn der Stimulation erfolgte dabei zeitlich derart versetzt, dass alle Zellen zum selben Zeitpunkt geerntet werden konnten. Trotz unterschiedlich langer Stimulationsdauer waren alle Zellen hiermit gleich lange in Kultur (siehe Zeitverlaufsplan in Abbildung 26). Es wurde bewusst diese Variante gewählt, da von noch nicht terminal differenzierten Körnerzellen (siehe 4.2.3) bekannt ist, dass sie *in vitro* mit fortschreitender Kulturdauer das Differenzierungsprogramm wie *in vivo* implementieren (Blaess S., persönliche Mitteilung). Dies geht mit bedeutenden Änderungen des Genexpressionsprofils einher, und die Analyse des NGF-Effektes mit Zellen, die unterschiedlich lange in Kultur waren, erschien aus diesem Grund weniger sinnvoll.

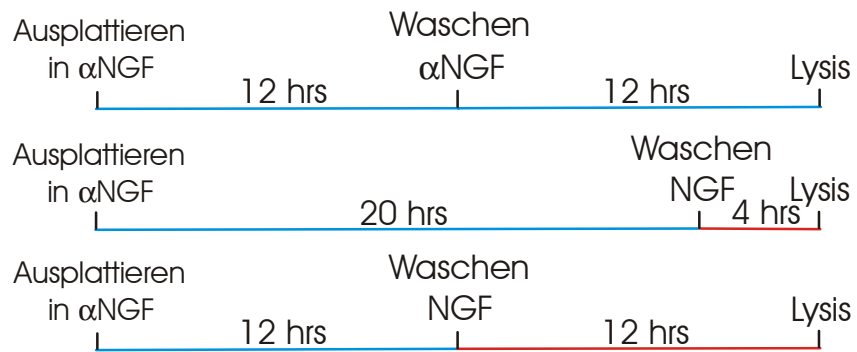


Abb. 26 Zeitschema der Behandlung von primären cerebellären Körnerzellen für das 'Gene Profiling'-Experiment

Mit dissoziierten cerebellären Körnerzellen wurde wie für das Rho-Experiment in Abbildung 20 verfahren. Alle Zellen wurden zum selben Zeitpunkt geerntet. Die Konzentration von Anti-NGF-Antikörper betrug 5 μ g/ml, die von NGF 50 ng/ml.

Um die Signifikanz der erhaltenen Expressionsdaten zu erhöhen, wurde das Experiment im Duplikat, in zwei voneinander komplett unabhängigen Ansätzen, durchgeführt. Die erhaltenen sechs Datensätze wurden wie in Abbildung 27 gezeigt ausgewertet. Dieser kreuzweise Vergleich von Expressionswerten unabhängiger Experimente ist die selektivste Methode, Gene mit geänderter Expression im starken Hintergrundrauschen zu identifizieren. Nun handelt es sich bei einem „Expressionswert“ tatsächlich nicht um die direkt gemessene Konzentration einer mRNA, sondern um den gemittelten Hybridisierungswert der entsprechenden cRNA (siehe 3.2.1.4) an 11 bis 16 unterschiedliche komplementäre Sonden auf dem GeneChip[®]. Da ein solcher gemittelter Hybridisierungswert jedoch meist der tatsächlichen Konzentration der mRNA direkt proportional ist, wird in diesem Zusammenhang stets von „Expressionswert“ gesprochen.

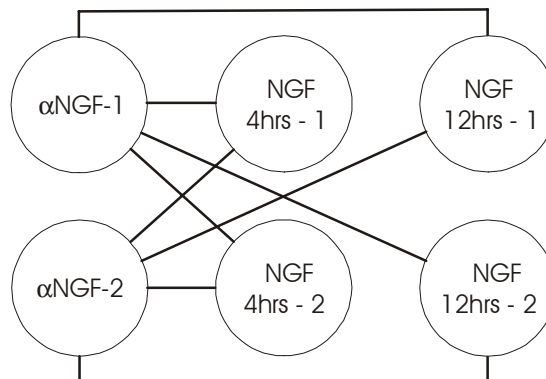


Abb. 27 Schema der Auswertung der aus dem 'Gene Profiling'-Experiment erhaltenen sechs Genexpressionsdatensätze

Die unmittelbar aus dem ‘Gene Profiling’-Experiment erhaltenen sechs Genexpressionsdatensätze von den zwei voneinander unabhängig durchgeführten Ansätzen wurden in kreuzartiger Weise miteinander verglichen. Jeder Satz von Expressionswerten von mit Antikörper behandelten Zellen wurde mit allen vier Sätzen von Expressionswerten von mit NGF behandelten Zellen verglichen. Nur Gene, deren Expressionswerte sich in den beiden mit Antikörper behandelten Proben und in den beiden Proben eines NGF-Stimulationsintervalles in jeweils statistisch signifikantem Ausmaß (p-Wert; siehe 3.2.1.4) in die gleiche Richtung änderten, wurden als Kandidaten ausgewählt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis dieses Vergleichsmodus in Form zweier Genlisten wiedergegeben. Es sind dies alle Gene, deren Expression sich bei Anti-NGF-Antikörper- und NGF-Behandlung über vier oder zwölf Stunden um mindestens den Faktor 2.00 erhöht oder verringert hat. Befand sich ein Expressionswert zu einem bestimmten Zeitpunkt unter dem Schwellenwert von 50 – das entsprechende Gen wurde dann *per definitionem* als nicht exprimiert angesehen –, wurde die Änderung in der Expressionsstärke von diesem oder zu diesem Zeitpunkt mit „an-“ oder „abgeschaltet“ bezeichnet.

Affymatrix- Nummer	α NGF-1 Expressionswert	α NGF-2 Expressionswert	4hrs NGF-1 Expressionswert	4hrs NGF-2 Expressionswert	Durchschnitt α NGF	Durchschnitt 4hrs NGF	nderung α NGF - 4hrs NGF	DChip-Annotations
92247_at	14.2	26.8	179.8	139.6	0	159.7	angeschaltet	rho GTPase activating protein 5 (GAP-5)
103710_at	157.8	53.8	827.1	497.4	105.8	662.25		6.26 AI037032:ue17d02.x1 Mus musculus cDNA; homology to mu transcription regulator NT fin12
99457_at	623.2	744.5	3145.3	1575.1	683.85	2360.2		3.45 antigen identified by monoclonal antibody Ki 67
93464_at	211.7	223.7	878.5	575.1	217.7	726.8		3.34 AI561567:vw82e12.x1 Mus musculus cDNA; homology to hu NMDAR binding protein yotiao
102853_at	449.5	905.2	2345.7	1677.4	677.35	2011.55		2.97 chondroitin sulfate proteoglycan 6
92946_f_at	411.8	551.5	1337.6	1274.9	481.65	1306.25		2.71 L32372:Glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2) (GluR2/B)
103457_at	688.1	1055.2	2742.6	1813.6	861.65	2278.1		2.64 REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta RAD54 like (S. cerevisiae)
99999_at	622.8	1072.2	2645.8	1805.4	847.5	2225.6		2.63 nuclear protein 220
103063_at	254.9	420.9	986	660.4	337.9	823.2		2.44 zinc finger protein 62
98504_at	221.8	220.4	609.7	423	221.1	516.35		2.34 Rho-associated coiled-coil forming kinase 2 (ROCK2)
92974_at	439.5	889.1	1413.8	1613.3	664.3	1513.55		2.28 zinc finger protein 37
160725_at	239	217	618	384.6	228	501.3		2.2 RIKEN cDNA 4930432021 gene; homology to hu zinc finger protein 195
160316_at	845.5	1055	2155.5	2030.6	950.25	2093.05		2.2 RIKEN cDNA 2310005N03 gene
104221_at	4502.5	4399.8	8560.7	10484	4451.15	9522.35		2.14 solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5
101906_at	1376.4	1381.5	3518.9	2347.2	1378.95	2933.05		2.13 zinc finger protein 36 (TTP/TIS11D)
98134_at	281.9	402.8	794	650.7	342.35	722.35		2.11 AW048639:UH-M-BH1-amd-q-03-Q-U1.s1 Mus musculus cDNA; high homology to hu KIAA0332
102645_at	129.7	274.1	484.6	356.2	201.9	420.4		2.08 AI155285:ud84b11.r1 Mus musculus cDNA
102895_at	691	666.7	1618.6	1092.6	678.85	1355.6		2 RIKEN cDNA 4921518A06 gene; high homology to hu IDN3 protein (unknown function)
95911_at	388.2	357.6	183.7	185.7	372.9	184.7		-2.02 AI565872:vs3e08.x1 Mus musculus cDNA
98772_at	848.1	1400.7	491.8	533.8	1124.4	512.8		-2.19 small inducible cytokine B subfamily, member 5 (GARG-8/LIX)
96188_at	927.2	950	371.9	475.4	938.6	423.65		-2.22 adenosine deaminase, RNA-specific
102736_at	3326.4	3890.5	1839.7	1275.7	3608.45	1557.7		-2.32 small inducible cytokine A2 (IE)
92250_s_at	254.5	326.4	140.6	103	290.45	121.8		-2.38 mouse ortholog of hu PRCC (papillary renal cell carcinoma)
104177_at	135.2	511.4	214.7	55.4	323.3	135.05		-2.41 small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys) (IP-10)
93859_at	285.5	412	187.8	93.2	338.75	140.5		-2.48 thoredoxin interacting protein (THIF/VDUP1), upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3
160547_s_at	1277.2	870.2	364.3	501.3	1073.7	432.8		-3.11 KC; hu ortholog is GRO α
95348_at	2072.4	3044	831.6	814	2558.2	822.8		-3.13 interferon gamma induced GTPase (GTP)
98410_at	1096.7	1007.6	262.8	410.3	1052.15	336.55		-3.23 interferon gamma induced GTPase (GTP)
160933_at	897	601.7	189.3	274.3	749.35	231.8		-3.35 interferon inducible protein 1 (LRG-47)
97409_at	2030.9	1774.7	460.1	676.6	1902.8	568.35		-3.43 interferon dependent positive acting transcription factor 3 gamma (ISGF3)
103634_at	5198	4946.8	1449.6	1510.9	5072.4	1480.25		-3.46 peptidylprolyl isomerase C-associated protein
97507_at	549.8	347.4	334.1	-74.9	448.6	129.6		-3.54 signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1)
101465_at	1929.7	2062.4	676.1	450.9	1996.05	563.5		-5.64 KC; hu ortholog is GRO α
98822_at	1825.9	1274.9	381.3	398.4	1550.4	389.85		-7.36 ubiquitin specific protease 18 (USP18/UBP43); induced by interferon alpha, beta
95349_g_at	2469.9	2320.8	517.9	2395.35	424.65	424.65		-7.68 interferon-induced protein with tetrapeptide repeats 3 (GARG-49/IRG2)
93956_at	7608.2	6516.2	1088.3	829.9	7062.2	959.1		-15.71 interferon-induced protein with tetrapeptide repeats 1 (GARG-16)
100991_at	520.9	386.3	116.4	1.8	453.6	59.1		abgeschaltet
100013_at	818.5	1083.9	43.4	77.7	951.2	60.55		mouse ortholog of hu IFP-35
100013_at	573.7	578.9	55.7	-143.6	576.3	0		

Tab.1A

Affymetrix-Nummer	α NGF-1 Expressionswert	α NGF-2 Expressionswert	12hrs NGF-1 Expressionswert	12hrs NGF-2 Expressionswert	Durchschnitt α NGF	Durchschnitt 12hrs	Durchschnitt α NGF - 12hrs	nderung α NGF - 12hrs	DChip Annotations
92247_at	14.2	26.8	92.5	311.4	0	201.95	angeschaltet		rho GTPase activating protein 5 (GAP-5)
161763_f_at	17	-98	107.3	222.5	0	164.9	angeschaltet		phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type II, gamma (Pip5k2c)
103710_at	157.8	53.8	221.9	906.4	105.8	564.15			5.33 AI037032:ue17402.x1 Mus musculus cDNA; homology to mu transcription regulator NT fn12
106000_at	159.9	54.1	51.3	384.7	107	448.85			4.19 RIKEN cDNA 170009P03 gene; high homology to hu cutaneous T-cell lymphoma antigen sc70-2
99828_at	119.5	81.6	278.2	451.9	100.55	365.05			3.63 AA673252:vp49c07.r1 Mus musculus cDNA
99457_at	623.2	744.5	1478.8	3225	683.85	2351.9			3.44 antigen identified by monoclonal antibody Ki 67
93464_f_at	211.7	223.7	430.4	1042.8	217.7	736.6			3.38 AI561567:wb82e12.x1 Mus musculus cDNA; homology to hu NMDAR binding protein yotiao
95007_at	149.9	186.1	357	669	168	513			3.05 proteoglycan 3 (megakaryocyte stimulating factor, articular superficial zone protein)
102645_at	129.7	274.1	401.4	829.5	201.9	615.45			3.05 AI155285:ud84b11.r1 Mus musculus cDNA
92946_f_at	411.8	551.5	800	1798.5	481.65	1299.25			2.7 L32372:Glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2) (GluR2/B)
104290_at	473.4	532.4	902	1698.6	502.9	1300.3			2.59 caspase 8 associated protein 2
101906_at	1376.4	1381.5	2451.6	4438.1	1378.95	3444.85			2.58 estrogen receptor 1 (alpha)
100887_at	302.3	327.6	573.7	985.1	314.95	779.4			2.5 zinc finger protein 36 (TTP/TIS11D)
98504_at	221.8	220.4	431.7	563	221.1	497.35			2.47 RIKEN cDNA 3830418C19 gene; high homology to hu FLJ22116 (unknown function)
102895_at	691	666.7	1152.1	1747.7	678.85	1449.9			2.25 Rho-associated coiled-coil forming kinase 2 (ROCK2)
100980_at	432.3	498.9	763.1	1167.1	465.6	965.1			2.14 RIKEN cDNA 4921518A06 gene; high homology to hu IDN3 protein (unknown function)
92558_at	1056	1148.7	550.2	541.8	1102.35	546			2.07 Rho-associated coiled-coil forming kinase 1 (ROCK1)
103550_at	304.9	307.1	192	111.7	306	151.85			-2.02 vascular cell adhesion molecule 1
103035_at	1750.1	1732.1	720.9	991.1	1741.1	856			-2.03 ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 2
92654_at	431.2	672	387.2	154.2	551.6	270.7			-2.04 AI836802:Mus musculus cDNA, high homology to hu RNA polymerase III largest subunit (RPC155)
99979_at	918.8	6315.3	3111.7	6384.75	3053.3	3082.5			-2.07 serum amyloid A3
161147_f_at	1207.4	836.4	402	445.7	877.6	423.85			-2.07 cytochrome P450, 1b1, benz[<i>a</i>]anthracene inducible
104669_at	1786.2	1286.2	743.3	295.7	1272.85	605.85			-2.1 RIKEN cDNA 1110046L09 gene
102405_at	684.5	475.3	407.8	133.6	537.2	270.75			-2.11 interferon regulatory factor 7 (IRF7)
92614_at	635.5	659.7	368.6	198.3	647.6	283.45			-2.14 myelin-associated glycoprotein (MAG)
161511_f_at	200.2	240.6	120.3	66.5	220.4	93.4			-2.28 inhibitor of DNA binding 3 (Id-3)
97409_at	2030.9	1774.7	837.5	717.3	1902.8	777.4			-2.36 interferon-stimulated protein 1 (LRG-47)
160547_s_at	1277.2	870.2	511.8	361	1073.7	436.4			-2.45 interferon inducible protein 1 (LRG-15)
103634_at	5198	4946.8	2195.3	1827.1	5072.4	2011.2			-2.46 thiodoxin interacting protein (THIF/VDUP1), upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D-3
93481_at	548.9	788.1	211.7	317.5	668.5	264.6			-2.52 interferon dependent positive acting transcription factor 3 gamma (ISGF3)
102791_at	1176.7	1286.9	458.8	419.8	1231.8	439.3			-2.53 RIKEN cDNA; homology to hu melanoma differentiation associated gene-5 (mda-5), ind.by interferon
104597_at	1136.1	1024.7	412.8	344	1080.4	378.4			-2.8 proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional protease 7) (Lmp-7)
161610_at	225.7	267.5	79.4	89.6	246.6	84.5			-2.86 guanylate nucleotide binding protein 2 (GBP-2), interferon gamma induced
101424_at	145.4	215	97.4	17.6	180.2	57.5			-2.92 N-myc downstream regulated 2 (Ndr2)
103335_at	4321.1	3701.4	1142.4	1347.3	4011.25	1244.85			-3.13 N-myc (and STAT) interactor (Nmi)
103446_at	212.7	254.6	54.6	90	233.65	72.3			-3.22 lectin, galactose binding, soluble 9 (Galectin-9/L-gal9 Lectin)
103594_at	364.5	309.5	136	72.1	337	104.05			-3.23 RIKEN cDNA; homology to hu melanoma differentiation associated gene-5 (mda-5), ind.by interferon
93672_at	255.2	429.2	49.8	160.7	342.2	105.25			-3.24 RIKEN cDNA 0710008C12 gene; high homology to hu MGC11279 (unknown function)
101465_at	1929.7	2062.4	693.9	454.4	1996.05	574.15			-3.25 U09928:Protein kinase, interferon inducible double stranded RNA dependent
95024_at	7608.2	6516.2	2163.5	1560.9	7062.2	1862.2			-3.48 signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1)
93775_at	3535.2	3114.9	962.5	709	3325.05	835.75			-3.79 ubiquitin specific protease 18 (USP18/UBP43); induced by interferon alpha, beta
103202_at	1573.1	2113.1	559.1	333.7	1843.1	446.4			-3.98 RIKEN cDNA 1110013J02 gene; homology to hu interferon-alpha induced 11.5kDa protein (p27)
97173_f_at	199.4	301.5	3	97.2	250.45	50.1			-4.13 guanylate nucleotide binding protein 3 (GBP-3)
93858_at	265.5	412	83.1	37.7	338.75	60.4			-5 histocompatibility 2, K region locus 2 (Mouse MHC class I H-2K1-k pseudogene)
100981_at	818.5	1083.9	135.3	63.4	951.2	99.35			-5.61 small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 10 (IP-10)
98562_at	581.4	496.5	123.7	-14.3	538.95	54.7			-5.67 interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (GARG-16)
100435_at	172.9	124.7	56.3	-19.7	148.8	0			-9.85 complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide
93085_at	338.4	238.1	-388.2	-98	288.25	0			endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2
93956_at	520.9	386.3	-46.1	-85.4	453.6	0			proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional protease 2) (Lmp-2)
100013_at	573.7	578.9	-75.7	-152.2	576.3	0			interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (GARG-49/IRG2)
98822_at	1825.9	1274.9	81.6	-180	1550.4	0			mouse ortholog of hu IFP-35
									interferon-stimulated protein (15 kDa) (ISG-15)

Tab.1B

Tab. 1 Listen der nach der in Abbildung 27 beschriebenen Methode selektionierten Gene

Auflistung aller Gene, welche nach Auswertung gemäß dem in Abbildung 27 geschilderten Verfahren durch Stimulation mit NGF entweder über vier (A) oder zwölf (B) Stunden in ihrer Expression um mindestens den Faktor 2.00 verändert wurden. Gene, deren Expressionswerte zum Teil unter einem Schwellenwert lagen, wurden als „an-“ oder „abgeschaltet“ klassifiziert. Die individuellen Genexpressionswerte der beiden unabhängig voneinander durchgeführten Ansätze sind vergleichend dargestellt (1 und 2). Rot markierte Gene gehören zum Cluster der Rho-Signalwegmarker, grüne zum Cluster der Endothelzell-/Vaskulogenesemarker, blaue zum Cluster der Interferon-induzierbaren Gene. Schraffierte Marker sind nur als EST bekannt.

Zur graphischen Veranschaulichung wurden die Gene aus dem Vier- und Zwölfstundenvergleich zusammengefasst und gemäß den nach vier Stunden NGF-Stimulation gemessenen Expressionswertänderungen aufgelistet. Die jeweils zu den drei Zeitpunkten gemessenen absoluten Expressionswerte eines Gens sind farbkodiert wiedergegeben – je stärker die Expression, desto intensiver die Farbe (Abbildung 28). Insgesamt wurden 24 Gene hoch- und 45 hinunterreguliert. Knapp 25 Prozent dieser Gene sind bisher nur als EST identifiziert (in Abbildung 28 schraffiert). Auch wenn sie zum Teil starke Homologie zu annotierten Genen in anderen Spezies aufweisen (vermutlich die entsprechenden Orthologe), so wurde das betreffende Gen in der Maus bisher nicht kloniert. Die Analyse der übrigen annotierten Gene ergab folgendes Bild. Knapp die Hälfte aller hinunterregulierten Gene (21 von 45) konnte zu einer funktionell charakterisierten Gruppe (einem so genannten ‘cluster’) zusammengefasst werden. Es handelte sich dabei um Gene, die von Interferonen, speziell IFN γ , oder LPS aktiviert werden (in Abbildung 28 sowie Tabelle 1 blau markiert). Einen weiteren ‘cluster’ ergaben drei ebenfalls hinunterregulierte Gene, die eine Rolle in der Vaskulogenese und Endothelzelldifferenzierung gemein haben (in Abbildung 28 sowie Tabelle 1 grün markiert). Hochregulierte Gene erschienen heterogener und ließen mit einer Ausnahme keine Gruppierung erkennen. Diese eine Gruppe umfasste drei Gene, die in einem funktionellen Zusammenhang mit Rho stehen: die Rho-Kinasen ROCK1 und ROCK2 sowie das Rho-spezifische GAP-5 (in Abbildung 28 sowie Tabelle 1 rot markiert).



Abb. 28 Graphische Darstellung der Expressionswerte der Kandidatengene über die gesamte NGF-Stimulationsperiode

Die Gene aus den beiden Listen in Tabelle 1 wurden in nichtredundanter Weise kombiniert und ihre Expressionswerte aus den drei Datensätzen „Anti-NGF-

Antikörper-behandelt“, „Vier Stunden NGF-Stimulation“ sowie „Zwölf Stunden NGF-Stimulation“ farbkodiert wiedergegeben. Die Auflistung erfolgte gemäß den nach vier Stunden NGF-Stimulation gemessenen Expressionswertänderungen von den hoch- zu den hinunterregulierten Genen. Cluster von funktionell gekoppelten Genen sind gleich wie in Tab.1 farbmarkiert, Gene, welche nur als EST bekannt sind, sind schraffiert.

Überprüfung der Microarray-Daten mittels RT-PCR und Western Blotting

Im nächsten Schritt wurde versucht, einige der erhaltenen Daten mit RT-PCR und Western Blotting zu verifizieren. Dafür wurde sowohl aus den hoch- als auch aus den hinunterregulierten Genen eine repräsentative Anzahl gewählt.

RT-PCR

Für die ausgewählten Gene wurden bereits erfolgreich verwendete Primerpaare verwendet. Im Einzelnen wurden folgende Marker getestet: IP-10, KC, Stat1, JE, GARG-8/LIX sowie GluR2, GAP-5.

Der experimentelle Ansatz war mit dem für das Microarray-Experiment identisch. Zusätzlich wurden jedoch nicht nur cerebelläre Kulturen aus Wildtyp-Mäusen getestet, sondern auch aus Exon IV-Deletionsmutanten.

Die Ergebnisse der einzelnen RT-PCRs sind in Abbildung 29 gezeigt. Bei allen Markern wurde das Regulationsmuster aus dem Microarray-Experiment qualitativ, wenn auch nicht in jedem Fall quantitativ, reproduziert. Die NGF-vermittelte Hinunterregulation der IFN-induzierbaren Gene auch in Zellen aus der Exon IV-Mutante machte deutlich, dass dieser Effekt nicht von p75^{NTR} vermittelt sein konnte. Da der Fokus der Arbeit jedoch auf diesem Neurotrophinrezeptor lag, wurde die Regulation dieser Gengruppe vorerst nicht weiterverfolgt. p75^{NTR} spielte aber offenbar eine kausale Rolle bei der Hochregulation von GluR2 und GAP-5, da kein Effekt in Zellen aus Exon IV-Mutanten gesehen wurde. Damit waren zwei Zielgene von p75^{NTR} identifiziert.

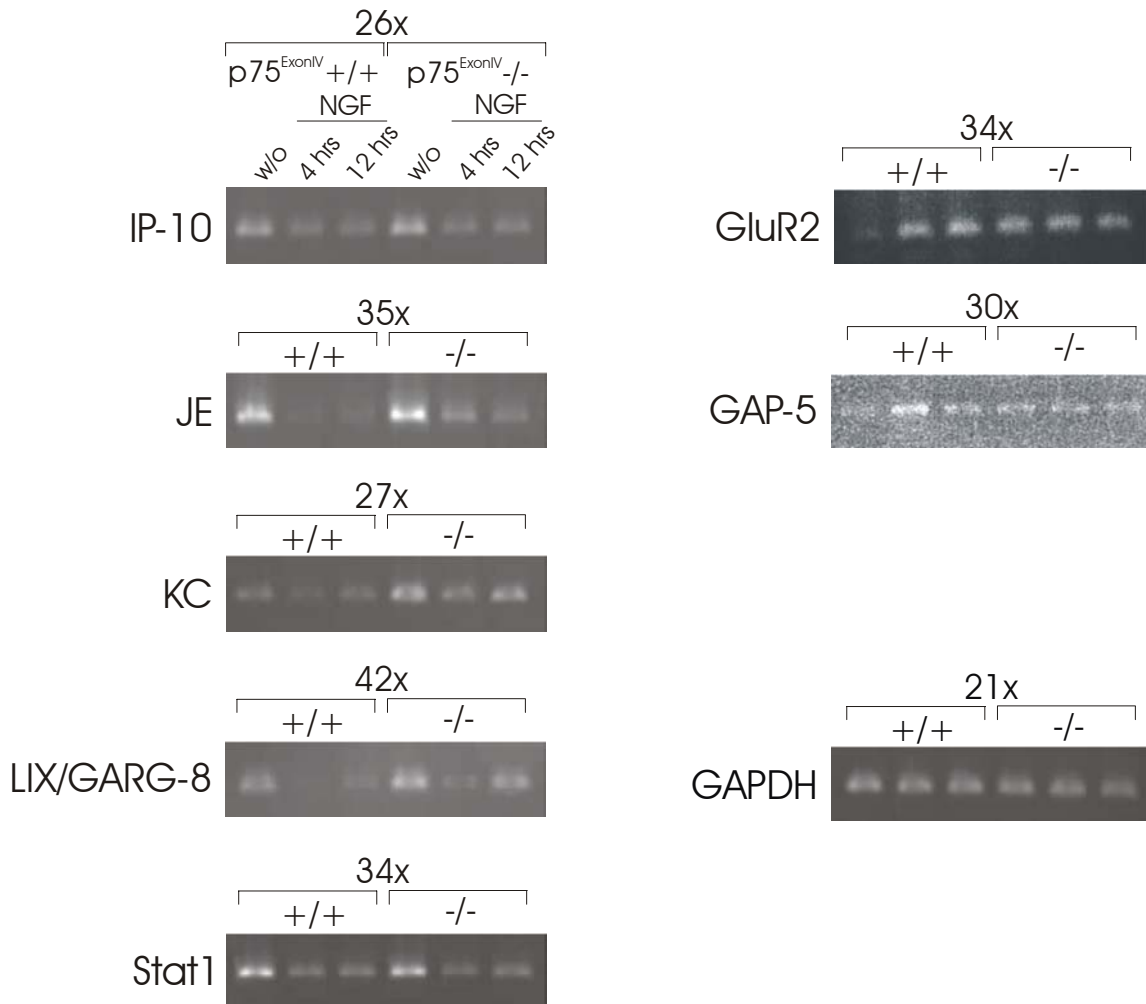


Abb. 29 Analyse der Expression ausgewählter Kandidatengene im cerebellären Kultursystem mittels RT-PCR

Dissoziierte cerebelläre Körnerzellen aus Wildtyp und $p75^{ExonIV-/-}$ Mäusen (p7) wurden wie in Abbildung 26 beschrieben mit Anti-NGF-Antikörper [5 $\mu\text{g/ml}$] und NGF [50 ng/ml] behandelt und RNA wurde isoliert. Das Expressionsmuster von einigen aus Tabelle 1 ausgewählten Kandidatengenen wurde mittels RT-PCR mit jeweils optimierten Zykluszahlen getestet. GAPDH wurde als Marker für die Quantifizierung der RNA verwendet.

Western Blot

Bei folgenden Markern wurde das Regulationsmuster auf Proteinebene untersucht: KC, Stat1 sowie ROCK1, ROCK2 und GluR2.

Der experimentelle Ansatz war wieder identisch mit dem des Microarray-Experimentes. Die Exon IV-Mutante wurde hier ebenfalls parallel zum Wildtyp getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 zusammengefasst. Für die Gruppe der IFN-induzierbaren Gene bestätigte sich erwartungsgemäß, was mittels RT-PCR festgestellt wurde: Die Hinunterregulation nach NGF-Zugabe fand auch in der Exon IV-Mutante statt. Im Falle

der hochregulierten Gene konnte das Ergebnis aus dem Microarray-Experiment vorerst nur für GluR2 bestätigt werden. Die Stimulationsdauer mit NGF wurde hierfür jedoch bis auf 96 Stunden erhöht, während bei ROCK1 und 2 nur bis zu zwölf Stunden mit NGF stimuliert wurde. Offensichtlich übertrug sich bei diesen Markern die Regulation von der RNA-Ebene nur verzögert auf die Proteinebene. Mögliche Gründe dafür werden in 5.5 erörtert.

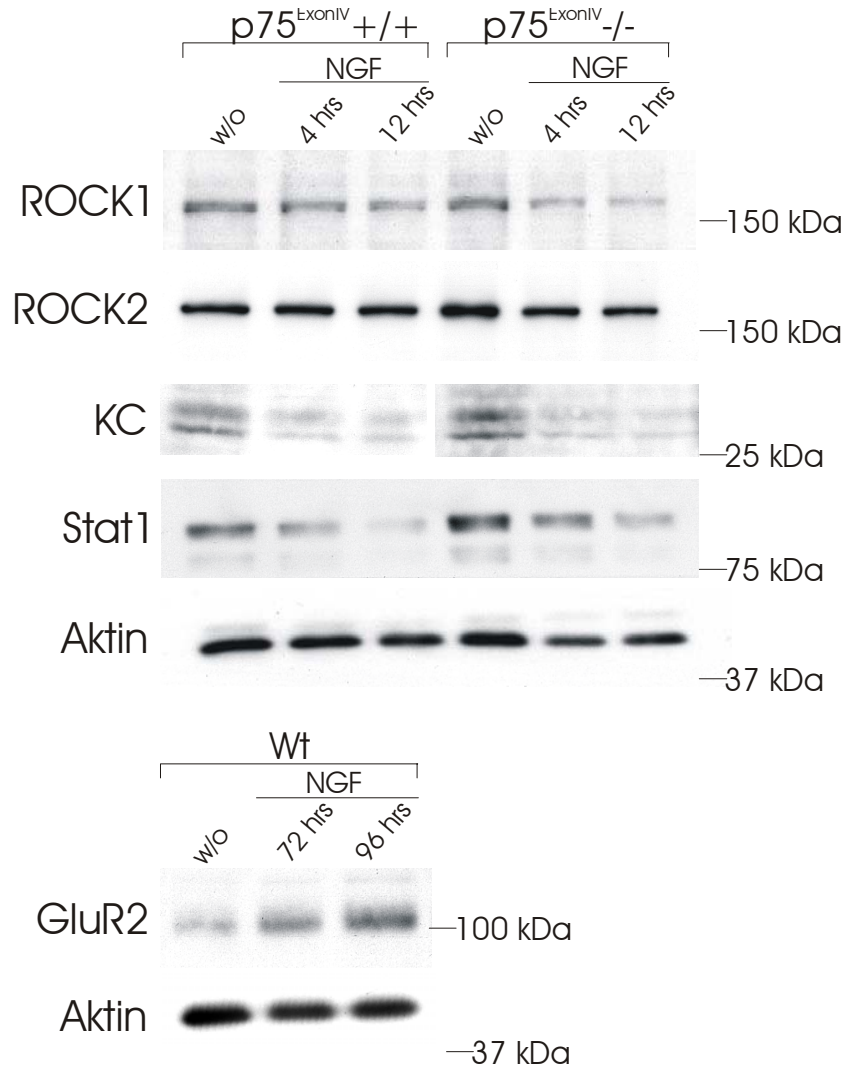


Abb. 30 Analyse der Expression ausgewählter Kandidatengene im cerebellären Kultursystem mittels Western Blotting

Dissoziierte cerebelläre Körnerzellen aus Wildtyp und *p75^{ExonIV}-/-* Mäusen (p7) wurden wie in Abbildung 26 beschrieben mit Anti-NGF-Antikörper [5 µg/ml] und NGF [50 ng/ml] behandelt und Gesamtprotein wurde isoliert. Das Expressionsmuster von einigen aus Tabelle 1 ausgewählten Kandidatengenen wurde mittels Western Blotting getestet. Im Fall von GluR2 wurde das NGF-Stimulationsintervall auf bis zu

96 Stunden erhöht. Aktin wurde als Marker für die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge verwendet.

Der weitere Schwerpunkt der Untersuchung wurde auf die Rolle der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR2 gelegt.

4.2.6 Regulation von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten durch NGF und $p75^{NTR}$ in primären Neuronen

GluR2 ist eine der vier Untereinheiten GluR1-4 der heteromeren AMPA-Glutamatrezeptoren. Sie unterscheidet sich von den anderen drei Untereinheiten durch eine distinkte Eigenschaft: Im Gegensatz zu GluR1/3/4 macht sie AMPA-Rezeptoren impermeabel für Ca^{2+} -Ionen. Dies hat weitreichende Konsequenzen für die physiologische Bedeutung von AMPA-Rezeptoren im Allgemeinen und GluR2 im Speziellen (siehe 5.6). Darüber hinaus wird GluR2 eine zentrale Rolle bei der Membranlokalisierung von AMPA-Rezeptoren zugesprochen. Die Steuerung der postsynaptischen Membranständigkeit von AMPA-Rezeptoren wiederum scheint dem Konzept der synaptischen Plastizität zugrunde zu liegen. Speziell für die Ausprägung von 'long-term depression' (LTD), einer Form der synaptischen Plastizität, wird GluR2 als zentrale Komponente diskutiert (siehe 5.6). Möglichkeiten, die effektive Konzentration von GluR2 zu modulieren, sind in diesem Kontext deshalb von hoher Relevanz.

In der Tat wurde bereits eine Auswirkung der kompletten Deletion von $p75^{NTR}$ auf synaptische Plastizität nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe um Martin Korte am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried/München konnte zeigen, dass hippocampales LTD in Exon IV-mutanten Mäusen signifikant verringert ist (Martin Korte; unpublizierte Ergebnisse). Vor diesem Hintergrund erschien es deshalb von großer Relevanz, ob die in cerebellären Zellen gefundene, durch $p75^{NTR}$ vermittelte Hochregulation von GluR2 auch für den Hippocampus Gültigkeit hat. Um dies zu testen, wurden hippocampale Neuronen von E16.5-Mäusen in Kultur gebracht und analog dem cerebellären Kultursystem mit Anti-NGF-Antikörper und NGF behandelt. Wie in Abbildung 31 gezeigt, bewirkte Stimulation mit NGF auch in diesen Neuronen eine Hochregulation von GluR2. Im Vergleich zur cerebellären Kultur war die Kinetik deutlich erhöht, bereits nach 48 Stunden Stimulation war ein Anstieg von GluR2 feststellbar.

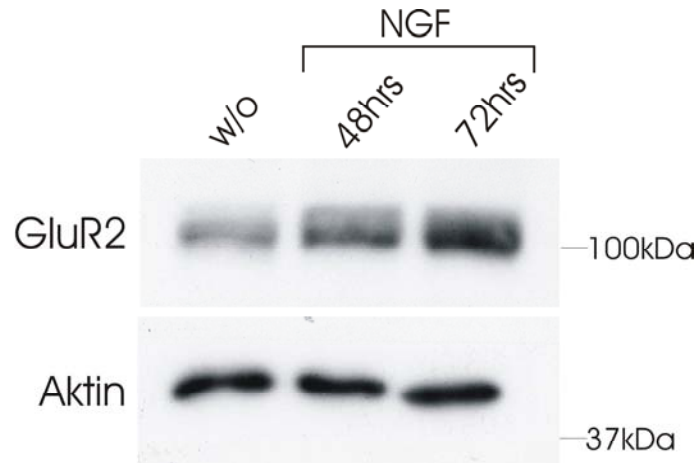


Abb. 31 Regulation von GluR2 in primären hippocampalen Neuronen mit NGF

Dissoziierte hippocampale Neuronen aus E16.5-Mausembryos wurden mit Anti-NGF-Antikörper [5 µg/ml] über Nacht inkubiert, sorgfältig und gründlich gewaschen und über 48 und 72 Stunden mit NGF [50 ng/ml] oder wieder mit Anti-NGF-Antikörper [5 µg/ml] inkubiert. Nach Western Blotting wurde GluR2 detektiert. Aktin wurde als Marker für die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge verwendet.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob $p75^{\text{NTR}}$ auch *in vivo* einen Effekt auf GluR2 hat, speziell im Alter von p16, da zu diesem Entwicklungszeitpunkt die oben genannten LTD-Experimente gemacht worden sind. Dazu wurde die Expression von GluR2 in den Hippocampi von hetero- und homozygoten Exon IV-mutanten Tieren via Western Blotting verglichen. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden für diesen Test nur Tiere eines Wurfes verwendet. Es zeigte sich, dass in Hippocampi von heterozygoten Tieren die GluR2-Proteinkonzentration signifikant höher ist als in Hippocampi von homozygoten Exon IV-Mutanten (Abbildung 32).

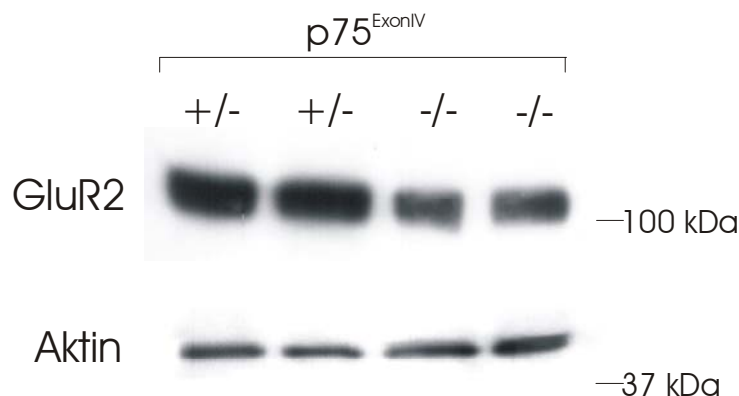


Abb. 32 Vergleich der Expressionsstärke von GluR2 in Hippocampi von $p75^{\text{ExonIV}}$ +/- und $p75^{\text{ExonIV}}$ -/- Mäusen

Aus $p75^{ExonIV} +/-$ und $p75^{ExonIV} -/-$ Mäusen eines Wurfes wurden vollständige Hippocampi präpariert und mittels Western Blotting auf Expression von GluR2 getestet. Aktin wurde als Marker für die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge verwendet.

Dieses Resultat war mit der *in vitro* beobachteten Hochregulation von GluR2 über $p75^{NTR}$ konsistent; trägt nämlich $p75^{NTR}$ zur Expression von GluR2 bei, so war in dessen Abwesenheit auch weniger GluR2 zu erwarten.

Um die kausale Rolle von $p75^{NTR}$ bei diesem Regulationsschritt eindeutig zu dokumentieren, wurde der Effekt von NGF auf GluR2 im hippocampalen System in Abwesenheit von $p75^{NTR}$ getestet. Hierzu wurde eine hippocampale Kultur aus Exon IV-Mutanten angelegt und mit NGF stimuliert, analog zum Experiment mit Wildtyp-Zellen (Abbildung 33).

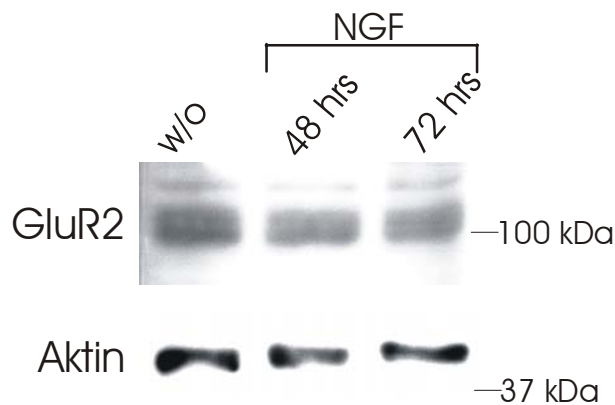


Abb. 33 Analyse von NGF-induzierter GluR2-Regulation in primären hippocampalen Neuronen aus $p75^{ExonIV} -/-$ Mäusen

Dissoziierte hippocampale Neuronen aus E16.5- $p75^{ExonIV} -/-$ Embryos wurden wie in Abbildung 31 beschrieben behandelt. Nach Western Blotting wurde GluR2 detektiert. Aktin wurde als Marker für die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge verwendet.

Dieses Experiment zeigte klar, dass in Abwesenheit von $p75^{NTR}$ NGF nicht zu einer Hochregulation von GluR2 führte, und bewies, dass die Signalkaskade zu GluR2 über $p75^{NTR}$ vermittelt ist.

Anschließend wurde getestet, ob außer GluR2 noch andere AMPAR-Untereinheiten in ihrem Expressionsniveau im $p75^{NTR}$ -Knockout verändert sind. Dazu wurden gleich wie für GluR2 Hippocampi von $p75^{ExonIV} +/-$ und $p75^{ExonIV} -/-$ Mäusen eines Wurfes präpariert und mittels Western Blotting auf die Expression von GluR1, GluR3 sowie GluR4 untersucht (Abbildung 34).

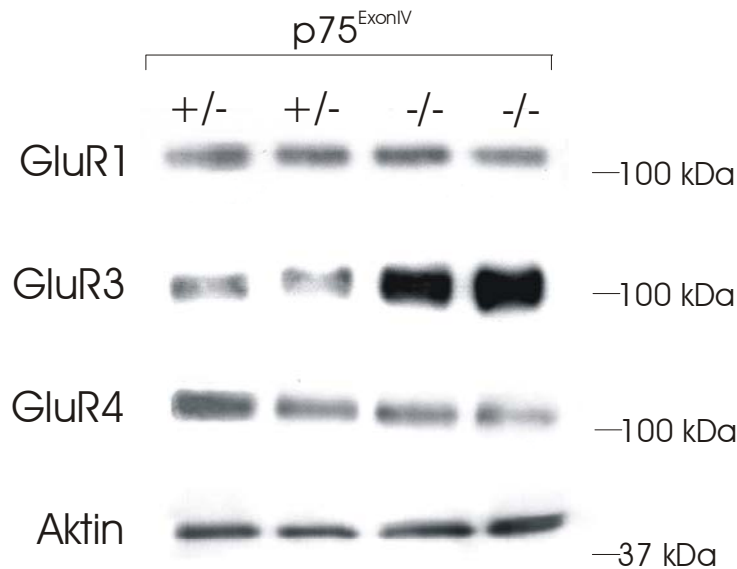


Abb. 34 Vergleich der Expressionsstärke von GluR1, GluR3 und GluR4 in Hippocampi von $p75^{ExonIV} +/-$ und $p75^{ExonIV} -/-$ Mäusen

Aus $p75^{ExonIV} +/-$ und $p75^{ExonIV} -/-$ Mäusen eines Wurfes wurden vollständige Hippocampi präpariert und mittels Western Blotting auf Expression von GluR1, GluR3 sowie GluR4 getestet. Aktin wurde als Marker für die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge verwendet.

Das Ergebnis dieses Experimentes zeigte, dass sowohl GluR1 als auch GluR4 in ihrer Expression in Abwesenheit von $p75^{NTR}$ unverändert sind. Ein deutlicher Unterschied wurde jedoch bei GluR3 festgestellt. In Hippocampi von homozygoten $p75^{NTR}$ -Knockout-Tieren war das Expressionsniveau dieser Untereinheit signifikant erhöht im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Dies warf unmittelbar die Frage auf, ob dieser Effekt mechanistisch direkt an $p75^{NTR}$ gekoppelt ist, oder ob es sich vielmehr um eine indirekte Kompensation der verringerten GluR2-Expression handelte, zumal diese beiden Untereinheiten von allen AMPAR-Untereinheiten zueinander am stärksten homolog sind (siehe 5.6). Um diese Hypothesen zu testen, wurden dissoziierte hippocampale Neuronen analog zum GluR2-Experiment mit NGF stimuliert und die Expression von GluR3 gemessen. War obiger *in vivo* beobachteter Effekt durch einen von $p75^{NTR}$ unabhängigen, kompensatorischen Wirkmechanismus verursacht, sollte die Aktivierung von $p75^{NTR}$ *in vitro* keinen Einfluss auf die Expressionsstärke von GluR3 haben. Sollte der *In-vivo*-Effekt jedoch direkt auf die Funktion von $p75^{NTR}$ zurückzuführen sein, müsste sich dies *in vitro* in einer veränderten Expressionsstärke von GluR3 nach Aktivierung von $p75^{NTR}$ äußern. Wie in Abbildung 35 zu sehen, regulierte NGF GluR3 in hippocampalen Neuronen aus Wildtyp-, jedoch nicht aus $p75^{NTR}$ -Knockout-Tieren hoch.

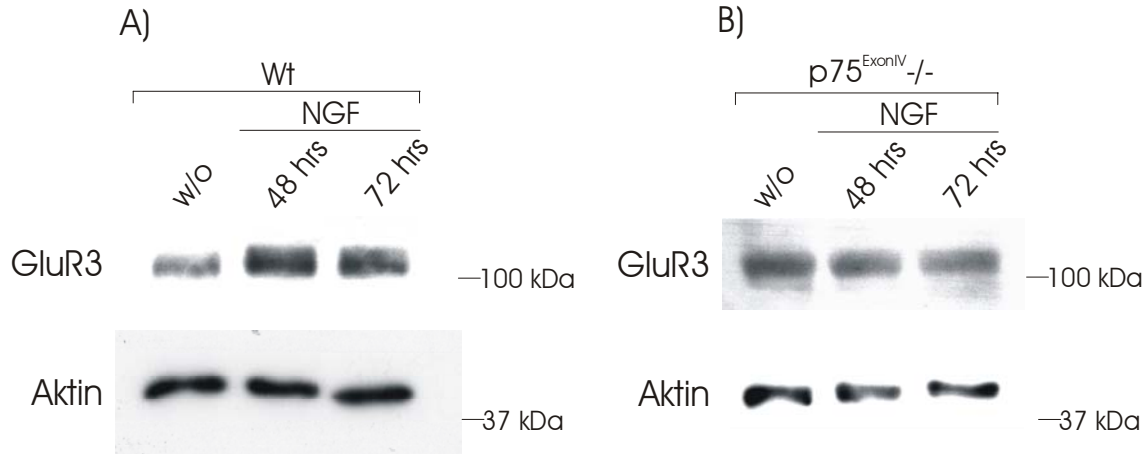


Abb. 35 Regulation von GluR3 in primären hippocampalen Neuronen aus Wildtyp- und $p75^{NTR}$ -Knockout-Tieren mit NGF

Dissoziierte hippocampale Neuronen aus E16.5-Embryos von Wildtyp- (A) und $p75^{ExonIV-/-}$ Tieren (B) wurden mit Anti-NGF-Antikörper [5 $\mu\text{g/ml}$] über Nacht inkubiert, sorgfältig und gründlich gewaschen und über 48 und 72 Stunden mit NGF [50 ng/ml] oder wieder mit Anti-NGF-Antikörper [5 $\mu\text{g/ml}$] inkubiert. Nach Western Blotting wurde GluR3 detektiert. Aktin wurde als Marker für die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge verwendet.

Dieses Experiment identifizierte GluR3 als weiteres Zielgen von $p75^{NTR}$. Interessanterweise wurde auch diese AMPAR-Untereinheit hochreguliert. In Abwesenheit von $p75^{NTR}$ wäre dann analog zu GluR2 eine reduzierte Menge von GluR3 zu erwarten gewesen. Wie in Abbildung 34 gezeigt, war jedoch das Gegenteil der Fall. Obwohl GluR3 direkt von $p75^{NTR}$ reguliert wurde, ist sein Expressionsniveau *in vivo* vermutlich durch einen indirekten, kompensatorischen Wirkmechanismus definiert (siehe 5.6).

Zusammenfassend wird festgestellt, dass die beiden AMPA-Rezeptor-Untereinheiten GluR2 und GluR3 als neue Zielgene des Neurotrophinrezeptors $p75^{NTR}$ beschrieben wurden. Aktivierung von $p75^{NTR}$ mit NGF führte zu anhaltender Hochregulation von GluR2 und GluR3 in einem cerebellären/hippocampalen beziehungsweise hippocampalen Kultursystem. In Neuronen aus $p75^{NTR}$ -Knockout-Tieren fand diese Hochregulation jeweils nicht statt. *In vivo* waren die Expressionswerte dieser beiden Untereinheiten in Hippocampi von $p75^{NTR}$ -Knockout-Tieren im Vergleich zu Hippocampi aus Wildtyp-Tieren stark verändert; während die Menge an GluR2 signifikant verringert war, wurde GluR3 vermehrt produziert. Mit den veränderten Expressionswerten dieser beiden AMPA-Rezeptor-Untereinheiten war zugleich ein molekularer Erklärungsansatz für einen Phänotyp in der synaptischen Plastizität der Exon IV-Mutante gegeben (siehe 5.6).

5 DISKUSSION

Im Folgenden werden die einzelnen experimentellen Ansätze dieser Doktorarbeit diskutiert. Das erste Projekt, die Identifizierung und Charakterisierung der Rezeptorisoform s-p75^{NTR}, konnte erfolgreich abgeschlossen werden (siehe 5.1). Für die Etablierung eines *In-vitro*-Assays für p75^{NTR} – das Hauptziel dieser Doktorarbeit – wurden mehrere Ansätze verfolgt. Dabei wurde klar, dass p75^{NTR}, im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TNFR-Überfamilie wie beispielsweise Fas, in seiner Funktionalität sehr stark von einem definierten zellulären Kontext abhängig ist. Dies könnte ein Grund für das Scheitern von zwei Ansätzen sein (siehe 5.2 und 5.3). In primären cerebellären Neuronen konnte ein *In-vitro*-Assay für p75^{NTR} etabliert werden (siehe 5.4). Ausgehend von diesem Assay wurde der Einfluss dieses Rezeptors auf die Genexpression analysiert sowie ein neu entdecktes Zielgen näher untersucht. Die potenziellen funktionellen Implikationen dieser Befunde werden erörtert (siehe 5.5 und 5.6).

5.1 Charakterisierung der Rezeptorisoform s-p75^{NTR}

Die durch einen alternativen Spleißvorgang gebildete Isoform s-p75^{NTR} wurde ursprünglich als cDNA in Gesamthirn- und Rückenmarklysaten von sowohl Wildtyp- als auch Exon III-Mäusen identifiziert (Doktorarbeit von David von Schack). Alternative Spleißvorgänge finden sich bei den meisten Genen, und nicht immer wird die entstandene mRNA translatiert. Physiologische Relevanz setzt jedoch meist die Existenz der Spleißvariante als Protein voraus. Tatsächlich sprach ein Vergleich des Phänotyps der beiden p75^{NTR}-Knockout-Linien, der Exon III- und Exon IV-Mutante, für eine Funktionalität der s-p75^{NTR}-Isoform. Deletion von sowohl FL- als auch s-p75^{NTR} in der Exon IV-Mutante führte zu einem schwereren Phänotyp als die Deletion von FL-p75^{NTR} bei Erhalt von s-p75^{NTR} in der Exon III-Mutante (siehe unten). Letztere stellt mithin einen hypomorphen Phänotyp dar. Da beide Linien über mindestens sechs Generationen in den genetischen Hintergrund C57Bl/6 rückgekreuzt worden waren, ist der wesentliche Unterschied zwischen beiden auf molekularer Ebene die Anwesenheit der Spleißvariante s-p75^{NTR} und nicht der genetische Hintergrund.

Identifizierung und Charakterisierung der Rezeptorisoform s-p75^{NTR}

Im Zuge dieses Projektes konnte zum ersten Mal endogenes s-p75^{NTR} als Protein in Primärzellen der Exon III-Mutante nachgewiesen werden. Mit drei gegen die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} gerichteten Antisera wurde das Protein zwar in der Exon III-Mutante, jedoch nicht in der neuen Exon IV-Mutante detektiert. Die grundlegende Schwierigkeit dabei war die niedere Syntheserate der trunkierten Rezeptorisoform im Vergleich zu FL-p75^{NTR}. Nachdem eine Reihe von Gewebsextrakten auf s-p75^{NTR} untersucht worden war, gelang in primären Schwanzzellen ihr Nachweis. Aus der Literatur war bekannt, dass dissoziierte Schwanzzellen in Kultur FL-p75^{NTR} massiv hochregulieren (DiStefano P.S. und Johnson E.M. Jr., 1988). Mit diesem Ansatz konnte ein zwischen Exon III- und Exon IV-Mutante differenziell gebildetes Protein mit

einem Molekulargewicht von rund 62 kDa identifiziert werden. Dies ist ein überraschend großes Protein; unter der Annahme, dass alle für FL-p75^{NTR} postulierten Glykosilierungsstellen in s-p75^{NTR} erhalten sind, entspricht dieses Molekulargewicht jedoch exakt dem für s-p75^{NTR} theoretisch ermittelten von 62 kDa (siehe 4.1.2). Zur besseren Darstellung musste die Menge an Extrakt aus der Exon III-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Extrakt erhöht werden – auch in kultivierten Schwanzzellen ist s-p75^{NTR} nicht sehr abundant. Dies ist sicherlich mit ein Grund, weshalb diese Spleißvariante erst 16 Jahre nach der Klonierung von FL-p75^{NTR} entdeckt wurde.

Als Inkonsistenz blieb eine starke Diskrepanz im Molekulargewicht zwischen der eben beschriebenen endogenen und der bereits zuvor charakterisierten, heterolog produzierten s-p75^{NTR}-Isoform. Nach transienter Transfektion von 293 Zellen mit s-p75^{NTR} cDNA konnte bisher nämlich nur ein Signal bei rund 38 kDa detektiert werden (Dissertation von David von Schack). Die Vermutung, dass es sich dabei um eine unvollständig glykosilierte Form von s-p75^{NTR} handelte, wurde mit Hilfe des Lektins WGA getestet. WGA erkennt spezifisch N-Azetyl-D-Glukosamin, ein sowohl in N- als auch O-Glykanen häufig vorkommender Zuckerrest. Nach WGA-Präzipitation von Lysaten von mit s-p75^{NTR} cDNA transfizierten 293 Zellen konnte auch tatsächlich ein starkes distinktes Signal bei rund 62 kDa detektiert werden. Demnach wird der größte Teil von s-p75^{NTR} nach Transfektion in 293 Zellen nur unvollständig glykosiliert. Die vollständig glykosilierte s-Isoform ist ebenfalls vorhanden, sie muss jedoch für eine klare Detektion zuvor angereichert werden. Von der unvollständig glykosilierten s-p75^{NTR}-Isoform werden im Rohlysate drei Banden mit sehr ähnlichem Molekulargewicht gesehen, was auf eine Blockade bestimmter Glykosilierungsschritte hinweist. Ursächlich könnte dies mit einer Überladung des Endoplasmatischen Retikulums begründet sein ('ER overload'). Von überproduzierten Membranproteinen ist nämlich bekannt, dass sie sich, statt durch das ER und den Golgi-Apparat geschleust und dabei glykosiliert zu werden, im ER akkumulieren können (Pahl H.L. et al., 1995). Dies betrifft vor allem mutierte oder virale Proteine (Pahl H.L. et al., 1997), also Proteine, die normalerweise nicht, oder zumindest nicht in großen Mengen, in der Zelle synthetisiert werden. Analog dazu könnte auch heterolog überproduziertes s-p75^{NTR} im ER hängenbleiben, zumal endogenes s-p75^{NTR} in sehr geringen Mengen gebildet wird. Dieser Erklärungsansatz wird gestützt durch die Beobachtung, dass im Gegensatz zu s-p75^{NTR} alles in 293 Zellen überproduzierte FL-p75^{NTR} vollständig glykosiliert wird.

Funktionalität der Rezeptorisoform s-p75^{NTR}

Die Identifizierung von endogenem s-p75^{NTR}-Protein rückte die Frage nach dessen potenzieller Funktionalität in den Vordergrund. Hinweise für eine Funktion der Rezeptorisoform s-p75^{NTR} ergeben sich aus dem Vergleich der Exon III- mit der Exon IV-Mutante. Deletion von sowohl FL-p75^{NTR} als auch s-p75^{NTR} führt einerseits zu Defekten, wie sie auch bei alleiniger Eliminierung von FL-p75^{NTR} auftreten, jedoch in verschärfter Form. So ist die Zahl der sensorischen Neuronen in Spinalganglien wie auch die Zahl der Schwanzzellen in Nervi ischiatici – wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte – in der Exon IV-Mutante im Vergleich zum Wildtyp jeweils stärker reduziert als in der Exon III-Mutante (von Schack D. et al., 2001). Nervi ischiatici aus Exon IV-mutanten Mäusen sind dabei deutlich dünner als N. ischiatici aus Exon III-Mutanten oder Wildtyp-Tieren. Dieser Befund ist erstaunlich angesichts einer dokumentierten pro-

apoptotischen Funktion von $p75^{NTR}$ in Schwanzzellen *in vitro* wie auch *in vivo* nach Axotomie (Soilu-Hanninen M. et al., 1999, respektive Syroid D.E. et al., 2000). Allerdings wurde auch ein anti-apoptotischer Effekt von $p75^{NTR}$ für dissoziierte Schwanzzellen durch Signaltransduktion via TRAF2 und NF κ B postuliert (Khursigara C. et al., 2001). Ein solches bifunktionales Signalmuster scheint vom zellulären Kontext abhängig zu sein und ist offensichtlich ein Charakteristikum von $p75^{NTR}$ -vermittelter Signalaktivität (siehe auch 5.4). Angesichts der verringerten Zahl an sensorischen Neuronen im $p75^{NTR}$ -Knockout ist jedoch nicht klar, ob der Verlust an Schwanzzellen ein primärer oder sekundärer Defekt ist. Im ZNS wurde ebenfalls ein zwischen Exon III- und Exon IV-Mutante unterschiedlich stark ausgeprägter Phänotyp gefunden. Die Anzahl an cholinergen Vorderhirnneuronen ist in der Exon IV-Mutante im Vergleich zum Wildtyp wesentlich stärker erhöht als in der Exon III-Mutante (Naumann T. et al., 2002). Der Unterschied zwischen Exon III-Mutante und Wildtyp ist dabei in einem praktisch reinen C57Bl/6 Hintergrund signifikant größer als in einem gemischten C57Bl/6-SV129 Hintergrund. Bemerkenswerterweise korreliert dieses Ergebnis mit dem Expressionsniveau von s- $p75^{NTR}$ in den einzelnen Mausstämmen. Im Gehirn des C57Bl/6-Stammes wurde drastisch weniger s- $p75^{NTR}$ cDNA detektiert als im Gehirn des SV129-Stammes. Diese Befunde legen eine partielle Kompensation des Verlustes von FL- $p75^{NTR}$ durch erhöhte Expression von s- $p75^{NTR}$ nahe.

Neben diesen mit der Exon III-Mutante gemeinsamen Phänotypen treten im vollständigen $p75^{NTR}$ -Knockout auch qualitativ neuartige Defekte auf. Vordergründiges Merkmal ist eine perinatale Letalitätsrate von rund 40 Prozent (von Schack et al., 2001). Als Ursache wird ein Defekt in der Vaskulogenese vermutet. Neugeborene Tiere zeigen häufig zum Teil massive Hämorrhagien. Immunzytochemische Untersuchungen ergaben, dass Blutgefäße in der Exon IV-Mutante oft dilatiert sind und die Gefäßwandung selbst viel dünner ist als in Wildtyp-Tieren. Charakteristisch für Exon IV-Mutanten ist auch eine ausgeprägte Ataxie der Hintergliedmaßen. Diese Bewegungsstörung ist am auffälligsten bei Jungtieren und wird mit zunehmendem Alter gemildert. Die Ursache hierfür ist noch nicht bekannt. Mögliche Erklärungsansätze reichen von Defekten in der Motorik über solche der Sensorik bis hin zu einem gestörten spinalen Mustergenerator ('central spinal pattern generator', CSPG), einem neuronalen Schaltkreis, welcher die für geordnete Bewegungsabläufe notwendigen Aktivitätsmuster generiert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine Reihe von sowohl quantitativen als auch qualitativen Unterschieden zwischen Exon III- und Exon IV-Mutante für eine Funktionalität der Rezeptorvariante s- $p75^{NTR}$ spricht.

Molekulare Wirkungsmechanismen der Rezeptorisoform s- $p75^{NTR}$

Unmittelbar mit der Funktionalität ist die Frage nach möglichen molekularen Mechanismen verknüpft. Wie in 2.2.2.2 erwähnt, fehlt s- $p75^{NTR}$ durch Wegspießen von Exon III ein wesentlicher Teil der extrazellulären Domäne von FL- $p75^{NTR}$, was wiederum zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit von Neurotrophen führt. Allerdings binden neben Neurotrophen noch eine Vielzahl anderer Liganden an die extrazelluläre Domäne von FL- $p75^{NTR}$ (siehe 2.2.2.1), von denen bisher keiner auf eine mögliche Interaktion mit dem trunkierten Rezeptor untersucht wurde. Interessanterweise wurde vor kurzem gezeigt, dass das Glykoprotein des Tollwutvirus (rabies virus glycoprotein – RVG) an

p75^{NTR} über dessen N-terminale Cystein-reiche Domäne – die in s-p75^{NTR} bewahrt ist – bindet (Langevin C. et al., 2002). Darüber hinaus ist die gesamte Transmembran- wie auch intrazelluläre Domäne von s-p75^{NTR} intakt. Tatsächlich wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass s-p75^{NTR} gleich wie FL-p75^{NTR} an Trk-Rezeptoren bindet (von Schack et al., 2001). Auch alle intrazellulären Interaktoren von FL-p75^{NTR} sollten an s-p75^{NTR} binden können, vorausgesetzt, eine Oligomerisierung der s-Isoform ist möglich beziehungsweise für eine Interaktion nicht erforderlich. Speziell der letzte Punkt lässt die Möglichkeit, durch s-p75^{NTR} Signalkaskaden zu initiieren, offen. Diese Möglichkeit mit Hilfe der Exon III-Mutante zu testen, wird ein zentraler Aspekt der weiteren molekularen Charakterisierung von s-p75^{NTR} sein.

Rezeptorisoformen – ein allgemeines Prinzip

Als Rezeptorspleißvariante steht s-p75^{NTR} nicht isoliert. Innerhalb der TNFR-Überfamilie wurde beispielsweise eine Spleißvariante von Fas identifiziert (Nakajima T. et al., 1996). Gleich wie bei s-p75^{NTR} ist die extrazelluläre Domäne trunziert. Auch von Trk-Rezeptoren ist eine Vielzahl von Spleißisoformen bekannt (siehe auch 2.2.1). Diese haben entweder Deletionen in der extrazellulären Domäne oder sind intrazellulär trunziert. Fungieren Varianten der intrazellulären Domäne hauptsächlich als dominant negative Mutanten – sie können zwar Liganden binden, aber keine Signalweiterleitung auslösen – wurde für Varianten der extrazellulären Domäne eine geänderte Ligandenspezifität festgestellt. So hat eine TrkB-Variante mit Deletion von Exon IX in der extrazellulären Domäne eine verringerte Affinität zu NT4/5 und NT3 bei unveränderter Affinität zu BDNF, was in insgesamt erhöhter Selektivität für BDNF resultiert (Strohmaier C. et al., 1996).

s-p75^{NTR} ist die erste beschriebene Spleißvariante von p75^{NTR}. Ihre Entdeckung und die Erkenntnis, dass sie nicht nur für eine endogene Rezeptorisoform kodiert, sondern auch im ersten Knockout von p75^{NTR} weiterhin produziert wird, eröffneten die Möglichkeit, einen vollständigen Knockout von p75^{NTR} zu generieren. Für eine gründliche Analyse der Funktion von p75^{NTR} ist ein solcher unerlässlich.

5.2 Apoptose-Assay

p75^{NTR} ist das Gründungsmitglied der TNFR-Überfamilie, in der sich einige der am besten charakterisierten Zelltod auslösenden Rezeptoren wie Fas oder TNFR befinden. Speziell zu TNFR hat p75^{NTR} eine ausgeprägte funktionelle Homologie. Neben der Fähigkeit, den Transkriptionsfaktor NFκB zu aktivieren, kann p75^{NTR} wie TNFR programmierten Zelltod auslösen. Zu Beginn des Projektes lagen diesbezüglich sowohl *In-vivo*- (Frade J.M. et al., 1996) als auch *In-vitro*-Befunde (Casaccia-Bonnet P. et al., 1996) vor. Als *In-vitro*-System erschienen Langzeitkulturen von in Kultur differenzierten Oligodendrozyten, welche nach Aktivierung von p75^{NTR} durch Apoptose absterben, für biochemisch/molekularbiologische Untersuchungen jedoch nicht praktikabel. Im Gegensatz dazu war eine Reihe von Primärzellen wie auch Zelllinien beschrieben, in denen Stimulation mit TNFα Apoptose induziert, darunter primäre Oligodendrozyten

(Selmaj K. et al., 1991), glatte Gefäßmuskelzellen (Geng Y.J. et al., 1996) und Thymozyten (Hernandez-Caselles T. et al., 1993).

p75^{NTR}-induzierte Apoptose in einer Zelllinie

Die grundlegende Überlegung dieses Projektes war, dass eine Zelllinie mit hoher Sensitivität gegenüber TNF α aufgrund der Homologie zwischen p75^{NTR} und TNFR auch permissiv für NGF-vermittelten Zelltod sein sollte. Idealerweise sollte diese Zelllinie kein endogenes p75^{NTR} exprimieren, damit auch Mutanten dieses Rezeptors getestet werden können.

Aufgrund einer Reihe von technischen Schwierigkeiten konnte jedoch kein eindeutig pro-apoptisches Verhalten von p75^{NTR} dokumentiert werden.

Zunächst wurde eine Serie von Zelllinien mit postulierter hoher Sensitivität gegenüber TNF α auf Expression von p75^{NTR} und anschließend auf TNF α - und – sofern p75^{NTR} exprimiert wurde – NGF-induzierte Apoptose getestet. Die angewandten Apoptose-Assays – Propidiumiodid- sowie AnnexinV-Färbung – waren in Kombination mit einer FACS-Messung vergleichsweise sensitiv und gut quantifizierbar. NGF löste in keiner der getesteten Linien Apoptose aus, TNF α jedoch bestätigte in den meisten Fällen die postulierte apoptotische Wirkung. Für die weiteren Versuche wurden die Zelllinien Kym-1 und WEHI-164-S ausgewählt. Bei beiden wurde eine stark erhöhte Apoptoserate nach Zugabe von TNF α gemessen und kein endogenes p75^{NTR} detektiert.

In einem nächsten Schritt sollten die Zelllinien mit FL-p75^{NTR} cDNA transient transfiziert und der Apoptoseindex nach Stimulation mit NGF ermittelt werden. Die Transfektion von beiden Zelllinien, vor allem von Kym-1 Zellen, gestaltete sich jedoch problematisch. Es wurden mehrere Transfektionsprotokolle getestet, mit keinem wurde jedoch eine Transfektionsrate von mehr als zehn Prozent erzielt. Kym-1 Zellen konnten überhaupt nur mit höchstens einem Prozent Effizienz transfiziert werden und waren deshalb für diesen Ansatz unbrauchbar. Bei einem derart geringen Anteil an p75^{NTR}-transfizierten Zellen ist es sehr schwierig, durch Messung der Gesamtzellpopulation eine an sich signifikante Veränderung im Apoptoseindex in dieser bestimmten Zellfraktion nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde geplant, den Apoptoseindex ausschließlich in transfizierten Zellen zu messen. Dies ist grundsätzlich möglich, indem Zellen in einem Kanal mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Anti-p75^{NTR}-Antikörpers auf Transfektion getestet werden und positiv getestete in einem anderen Kanal mit fluoreszenzmarkiertem AnnexinV auf Apoptose untersucht werden ('gating'). Praktisch war dieser Ansatz jedoch nicht durchführbar. Erstens war das von transfiziertem p75^{NTR} generierte FACS-Signal sehr schwach im Vergleich zu der in einer Kontrolltransfektion bestimmten EGFP-Eigenfluoreszenz. Vermutlich lag dies an der vergleichsweise geringen Intensität des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers. Weder Zugabe von Natriumazid zur Zellsuspension, um eine mögliche Internalisierung von p75^{NTR} zu blockieren, noch Ablösen der Zellen von der Unterlage ausschließlich mit EDTA (löst Ca²⁺-abhängige Zell-Matrix-Verbindungen) und ohne Trypsin, um eine mögliche Abspaltung von p75^{NTR} zu verhindern, stärkten nämlich das Fluoreszenzsignal. Zweitens erhöhte die Transfektion *per se* den Anteil an apoptotischen Zellen in beträchtlichem Ausmaß, wie mit Transfektion von leerem Plasmid festgestellt wurde. Drittens, und vor allem, band dieser Hintergrund an apoptotischen Zellen unspezifisch den Sekundärantikörper, wodurch

sowohl die Messung von p75^{NTR}-positiven als auch das Verhältnis zwischen apoptotischen und p75^{NTR}-positiven Zellen völlig verfälscht wurde. Aus diesen Gründen wurde versucht, eine Änderung im Apoptoseindex nach p75^{NTR}-Transfektion bei Messung der Gesamtzellpopulation zu detektieren. Mit diesem Ansatz konnte in WEHI-164-S Zellen tatsächlich eine Tendenz zu einem erhöhten Apoptoseindex nach Transfektion von FL-p75^{NTR} cDNA beobachtet werden (rund 13 Prozent apoptotische Zellen im Vergleich zu rund zehn Prozent Hintergrund). Interessanterweise erhöhte Stimulation mit NGF über bis zu 46 Stunden die gemessene Apoptoserate nicht weiter. Diese Daten sprechen mithin für ein ligandenunabhängiges Auslösen von Apoptose durch p75^{NTR} und stehen im Einklang mit unabhängigen erzielten Ergebnissen (siehe unten).

Da das Signal/Rausch-Verhältnis in diesem transienten Ansatz jedoch relativ klein war, wurde beschlossen, von einem transienten zu einem stabilen Transfektionsmodus zu wechseln. Ein Klon von p75^{NTR} stabil exprimierenden Zellen sollte die oben angeführten Probleme umgehen. Die Überlegung war weiter, p75^{NTR} konditionell statt konstitutiv zu exprimieren. Andernfalls, so die Befürchtung, könnten stabil transfizierte Klone nicht erzeugt werden, da sie aufgrund des potenziell zytotoxischen Effektes von p75^{NTR} bereits während des Selektionsprozesses verloren gingen. Für eine induzierte Expression wurde das Tet-OnTM-System, auch reverses Tet-System genannt, ausgewählt (Gossen M. et al., 1995). Bei dieser Variante der Tetrazyklin (Tet)-abhängigen Genexpression schaltet Zugabe von Tet oder Doxyzyklin (Dc), einem Derivat von Tet, die Expression eines von einem TRE ('tetracyclin response element') gesteuerten Gens an. Die Vorteile gegenüber der Tet-OffTM-Variante (Gossen M. und Bujard H., 1992), bei der das Gen durch Entfernen von Tet/Dc angeschaltet wird, wurden in der günstigeren Anschließkinetik gesehen. Sowohl Tet als auch Dc haben eine relativ lange Halbwertszeit (48 beziehungsweise 24 Stunden), der Schalter wird also nicht zeitlich punktuell umgelegt wie bei Zugabe der Reagenzien, sondern graduell über einen Zeitraum von mehr als einem Tag verteilt. Außerdem werden die Zellen beim Tet-OnTM-System nur während der zeitlich limitierten Expressionsphase dem Antibiotikum exponiert.

Der experimentelle Ansatz sah die Generierung eines doppelt stabil transfizierten Klons vor. In einem ersten Schritt war geplant, Klone mit konstitutiv exprimierendem rtTA, dem 'reversen' Transaktivator, dessen DNA-Bindung an TRE durch Binden von Tet/Dc induziert wird, zu ziehen. In einem zweiten Schritt sollte ein solcher Klon mit dem TRE-p75^{NTR} Expressionsplasmid stabil transfiziert werden. Daraus gewonnene Klone würden auf basale Promoteraktivität ('leakiness'), Induzierbarkeit und absolutes Expressionsniveau untersucht werden. Die zuvor erwähnte ineffiziente Transfektionsmöglichkeit der beiden Zelllinien Kym-1 und WEHI-164-S sollte in diesem Fall kein wesentliches Hindernis darstellen, da sie durch die Verwendung einer entsprechend großen Ausgangszellzahl kompensiert werden würde. Tatsächlich gelang es, von beiden Linien stabil transfizierte Zellen zu erhalten. Einzelne Kym-1 Zellen wuchsen jedoch in keinem einzigen Fall zu einem expansionsfähigen Klon heran, sondern starben nach einiger Zeit ab. Auch die Verwendung von konditioniertem Medium (Medium von normal kultivierten Kym-1 Zellen) führte nicht zum Erfolg. Offensichtlich sind diese Zellen für Wachstum auf eine kritische Mindestdichte angewiesen. Der Ansatz mit WEHI-164-S Zellen war zunächst erfolgreicher. Es konnte eine ausreichend große Zahl an Klonen gezogen werden. Jedoch wurde bei der

Überprüfung der Klone auf rtTA-Expression zwar die mRNA, aber nicht das Protein nachgewiesen. In keinem einzigen von insgesamt 26 untersuchten Klonen konnte das Protein detektiert werden, auch wenn die mRNA klar vorhanden war. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die beobachtete Instabilität des rtTA-Proteins in einigen Zelltypen, unter anderem Hela Zellen, sein (Urlinger S. et al., 2000). Die Ursache für die erhöhte Degradation dürfte in der in rtTA verwendeten Transaktivator-domäne aus dem VP16 Protein des Herpes Simplex Virus liegen, da eine Modifikation dieser Domäne die intrazelluläre Stabilität signifikant erhöht (Baron U. et al., 1997). Auch neuartige, durch ungezielte Mutagenese und *in vivo* auf verbesserte Eigenschaften selektierte Varianten von rtTA zeichnen sich unter anderem durch deutlich reduzierte Degradation aus (Urlinger S. et al., 2000). Im Unterschied zu einigen anderen Zelllinien, in denen rtTA bereits erfolgreich etabliert wurde, unter anderem COS Zellen (Lindeberg J. et al., 1999) oder Tumorzelllinien (Chiba H. et al., 2000), scheinen WEHI-164-S Zellen für die Synthese von rtTA nicht geeignet zu sein. Die Verwendung von verbesserten rtTA-Varianten könnte dieses Problem lösen.

Vergleich mit unabhängig etablierten In-vitro-Apoptose-Assays für p75^{NTR}

Obwohl das Projekt nicht zur Etablierung eines eindeutigen p75^{NTR}-Apoptose-Assays geführt hat, bestätigen unabhängig durchgeführte Studien grundsätzlich den hier beschriebenen Ansatz und die erzielten Teilergebnisse. So wurde p75^{NTR} in konditional immortalisierten striatalen Neuronen unter der Kontrolle des Ecdyson-Rezeptors induzierbar exprimiert (Wang X. et al., 2001). Wie WEHI-164-S Zellen wurde dieses neuronale System wegen seiner Empfindlichkeit gegenüber TNF α ausgewählt. Wie in WEHI-164-S Zellen löst p75^{NTR} in diesem System Apoptose in einer ligandenunabhängigen Weise aus, und wie in WEHI-164-S Zellen verstärkt exogenes NGF diesen Effekt nicht. Interessanterweise findet sich dieses Muster der ligandenunabhängigen Induktion von Zelltod auch in einigen anderen mit p75^{NTR} cDNA transfizierten Zelllinien (Bunone G. et al., 1997, oder Eggert A. et al., 2000), jedoch niemals in Primärzellen (beispielsweise hippocampalen Neuronen [Friedman W.J., 2000] oder Schwannzellen [Soilu-Hanninen M. et al., 1999]). Ein möglicher Erklärungsansatz könnte sein, dass überproduziertes p75^{NTR} ohne Liganden oligomerisiert und in einem geeigneten zellulären Kontext einen apoptotischen Signalweg initiiert, wohingegen endogenes p75^{NTR} auf einem physiologischen Expressionsniveau für eine Oligomerisierung und Aktivierung auf Ligandenbindung angewiesen ist.

Der Grund, weshalb ein *In-vitro*-Apoptose-Assay für p75^{NTR} in oben genannten Ansätzen im Gegensatz zu den WEHI-164-S Zellen erfolgreich etabliert werden konnte, liegt vermutlich in der guten Transfizierbarkeit der Zellen begründet (Wang X. et al., 2001, Bunone G. et al., 1997, und Eggert A. et al., 2000). Im Fall der induzierbaren Expression von p75^{NTR} wird zudem der Ecdyson-Rezeptor im Gegensatz zu rtTA als stabiles Protein produziert (Wang X. et al., 2001).

Molekulare Mechanismen von p75^{NTR}-induzierter Apoptose

Wie erwartet, führte die *In-vitro*-Etablierung von p75^{NTR}-Apoptose-Assays zu ersten Erkenntnissen über die zugrunde liegende molekulare Maschinerie. Während der exekutive Teil aus Caspasen besteht und großteils mit der für TNFR und Fas beschriebenen Situation übereinstimmt (Wang X. et al., 2001, und Troy C.M. et al.,

2002), ist im Gegensatz zu Letzteren bis dato noch völlig unklar, wie p75^{NTR} die Caspasen aktiviert. Adaptorproteine, wie TRADD, FADD oder FLICE (Procaspase 8), die TNFR oder Fas an die Apoptosemaschinerie koppeln (Nagata S., 1997; Ashkenazi A. und Dixit V.M., 1998), spielen für p75^{NTR}-vermittelten Zelltod keine Rolle (Wang X. et al., 2001) und interagieren auch nicht mit diesem Rezeptor (Barrett G.L., 2000). Stattdessen existiert eine Reihe von zum Teil nur für p75^{NTR} beschriebenen Interaktionspartnern, wie NRIF1/2, mit pro-apoptotischer Funktion. Eine zentrale Rolle scheinen überdies Ceramid und die MAP-Kinase JNK zu spielen (siehe 2.2.2.4).

Ein komplett neuer Aspekt von p75^{NTR}-vermitteltem Zelltod wurde in Lee R. et al., 2001, aufgezeigt. Wie bereits in 2.1.2 angeführt, sprechen die präsentierten Daten für eine physiologische Funktion von Pro-Neurotrophinen, die überdies derjenigen von prozessierten Neurotrophinen entgegengerichtet ist. Während Pro-NGF bevorzugt an p75^{NTR} bindet und kaum oder gar nicht an TrkA, hat prozessiertes NGF eine höhere Affinität zu TrkA. Anhand von primären Neuronen wurde demonstriert, dass Pro-NGF durch Binden an p75^{NTR} Zelltod auslöst, während NGF durch Binden an TrkA das Überleben fördert.

Ähnlich wie die Neurotrophine nicht zur TNF-Ligandenfamilie gehören, weicht p75^{NTR} auch bei Zelltod auslösenden Signalwegen offensichtlich stark von den übrigen Mitgliedern der TNFR-Überfamilie ab. Die detaillierte molekulare Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen ist eine bedeutende Herausforderung, da nur eingeschränkt auf bereits bekannte Prinzipien zurückgegriffen werden kann.

5.3 Zellwanderungsassay

Einer der ersten direkten Hinweise überhaupt auf eine von Trk-Rezeptoren unabhängige Funktion von p75^{NTR} stammte von Untersuchungen an Schwannzellen in einem *In-vitro*-Migrationsassay (Anton E.S. et al., 1994). Aus explantierten Spinalganglien wandern Schwannzellen nach Zugabe von NGF deutlich schneller aus als Kontrollzellen. Die Inhibition dieses Effektes durch einen funktionsblockierenden Anti-p75^{NTR}-Antikörper führte zum Schluss, dass p75^{NTR} die Beweglichkeit von Schwannzellen *in vitro* modulieren kann. Dieser Befund wurde später mit Hilfe einer p75^{NTR}-Deletionsmutante bestätigt (Bentley C.A. et al., 2000). Darüber hinaus war zu Beginn dieses Projektes gezeigt worden, dass p75^{NTR} die kleine GTPase RhoA nicht nur bindet, sondern auch in ihrer Aktivität moduliert (Yamashita T. et al., 1999). Damit lag ein potenzieller molekularer Mechanismus für die Effekte auf das Wanderungsverhalten von Schwannzellen vor. Zellwanderung basiert nämlich auf koordinierten und dynamischen Änderungen des (Aktin-)Zytoskeletts und der Zelladhäsion. Rho-GTPasen wiederum sind Schlüsselfaktoren bei der Steuerung der Dynamik des Aktinzytoskeletts (Ridley A.J., 2000). Tatsächlich war bereits bekannt, dass Rho-GTPasen für die Migration unterschiedlicher Zellen eine unmittelbare Rolle spielen, beispielsweise bei Lymphozyten (Adamson P. et al., 1999) oder Fibroblasten (Sander E.E. et al., 1999).

Ein In-vitro-Migrationsassay für primäre Schwannzellen

Das Ziel dieses Projektes war die Etablierung eines Migrationsassays, mit dem die Rolle von p75^{NTR} dokumentiert und parallel dazu mögliche molekulare Mechanismen, vor allem eine potenzielle Funktion von Rho, untersucht werden können. Der in Anton E.S. et al., 1994, vorgestellte Migrationsassay basiert auf Kryoschnitten der distalen Strünke von sieben Tage zuvor denervierten Nervi ischiatici; sie dienen als Substrat für die wandernden Schwannzellen. Diese Versuchsanordnung erschien jedoch zu anfällig für Schwankungen, zudem waren biochemische und molekularbiologische Analysen der Schwannzellen geplant. Die Verwendung von ganzen explantierten Spinalganglien als Quelle für Schwannzellen machte jedoch eine selektive Untersuchung eines bestimmten Zelltyps unmöglich. Aus diesem Grund wurde auf den von Varani J. et al., 1978, erstmals beschriebenen und für Schwannzellen bereits verwendeten (Milner R. et al., 1997) Migrationsassay zurückgegriffen. Der Assay wurde über rund 15 Stunden durchgeführt, danach wurden die von den Zellen unter den unterschiedlichen Bedingungen vom Tropfenrand zurückgelegten Entfernungen miteinander verglichen. Getestet wurden jeweils NGF, BDNF, NT3 oder alle drei Neurotrophine zusammen. Kontrollzellen wurden stets mit p75^{NTR}-‘receptor body’ inkubiert, um von Schwannzellen sezernierte Neurotrophine zu blockieren.

Obwohl der Assay technisch erfolgreich etabliert werden konnte, wurde mit Neurotrophinen kein Effekt auf die Wanderungsgeschwindigkeit registriert.

Zwei unterschiedliche experimentelle Bedingungen für den Migrationsassay

Der Assay wurde unter zwei grundlegend unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Zum einen gemäß den Angaben aus Milner R. et al., 1997: die Zellen wurden dabei in chemisch definiertem SATO-Medium, supplementiert mit 8.7 ng/ml GGF-2 und 10⁻⁵ M Forskolin, auf einer Oberfläche, beschichtet mit einem Cocktail aus vier verschiedenen Extrazelluläre-Matrix-Proteinen (Laminin-1, Laminin-2, Fibronectin sowie Vitronectin), beobachtet. Zum anderen gemäß den in diesem Labor üblichen Standard-Kulturbedingungen für Schwannzellen: in DMEM, supplementiert mit zehn Prozent FCS, auf einer Oberfläche, beschichtet mit Poly-D-Lysin. Die Bedeutung dieser unterschiedlichen Assay-Bedingungen liegt in der Relevanz für die Expression von p75^{NTR} sowie in der basalen Wanderungsrate der Schwannzellen begründet.

Unter „Standardbedingungen“ in Abwesenheit eines spezifischen Wachstumsfaktors sind Schwannzellen postmitotisch, exprimieren dabei große Mengen an p75^{NTR} (siehe zum Beispiel Abbildung 5), und zeigen eine basale Wanderungsgeschwindigkeit (Anton E.S. et al., 1994).

Die Bedingungen gemäß Milner R. et al., 1997, sind komplexer. In Abwesenheit von Serum und nach Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration (durch Zugabe von Forskolin) starten Schwannzellen *in vitro* das Myelinisierungsprogramm (Morgan L. et al., 1991). Sie schalten Differenzierungsmarker wie das Myelinprotein P₀ an und Marker für Vorläuferstadien wie p75^{NTR} ab. Ein zweiter Stimulus, wie etwa in Form des Mitogens GGF-2, ändert die Situation wieder drastisch. Statt zu differenzieren, beginnen Schwannzellen massiv zu proliferieren (Morgan L. et al., 1991). Für die genaue Wirkung von GGF-2 spielt dabei sowohl dessen Konzentration als auch die Dauer des Stimulationsintervalls eine zentrale Rolle. 2.5 ng/ml GGF-2 haben nur einen sehr mäßigen Effekt auf die Proliferationsrate, steigern jedoch die

Wanderungsgeschwindigkeit um den Faktor von rund 60 Prozent (Mahanthappa N.K. et al., 1996). Erhöhung der GGF-2 Konzentration auf bis zu 18 ng/ml steigert die Wanderungsgeschwindigkeit nicht weiter, induziert jedoch DNA-Synthese in fast allen Schwanzzellen, jedoch nur nach längerer Inkubationszeit (typischerweise 40 Stunden). Bei kürzeren Stimulationszeiten (typischerweise 15 Stunden) ist auch bei dieser Konzentration nur ein Effekt auf die Wanderungsgeschwindigkeit zu beobachten (Mahanthappa N.K. et al., 1996). Eine wie für das vorliegende Projekt verwendete GGF-2 Konzentration von 8.7 ng/ml führt bereits zu einer deutlichen Steigerung der Proliferationsrate (Mahanthappa N.K. et al., 1996). Da der Migrationsassay jedoch nicht länger als über rund 15 Stunden durchgeführt wurde, kann angenommen werden, dass sich der Effekt von GGF-2 unter diesen Bedingungen tatsächlich auf die Wanderungsgeschwindigkeit beschränkt. Wie in 4.2.2 angeführt, wurde jedoch kein nennenswerter Unterschied in der Migrationsrate zwischen plus und minus GGF-2 beobachtet. Dies könnte auf die Verwendung von Serum im Ansatz von Mahanthappa N.K. et al., 1996, einerseits und von chemisch definiertem Medium im vorliegenden Projekt andererseits zurückzuführen sein. Der Effekt von GGF-2 in Gegenwart von Serum wurde in diesem Projekt nicht getestet. Tatsächlich gibt es neben GGF-2 noch weitere für noch nicht terminal differenzierte Schwanzzellen relevante Wachstumsfaktoren, unter anderem TGF β oder FGF2 (Morgan L. et al., 1994), die vermutlich im Serum enthalten sind.

Um den fehlenden Effekt von Neurotrophinen auf die Migrationsrate im Ansatz nach Milner R. et al., 1997, zu bewerten, müsste zunächst die Expressionsstärke von p75^{NTR} unter diesen spezifischen Bedingungen bestimmt werden. Obwohl bekannt ist, dass p75^{NTR} nach Serumentzug und Erhöhung von intrazellulärem cAMP hinunterreguliert wird, ist noch unklar, wie sich die gleichzeitige Zugabe von GGF-2 auf dessen Expression auswirkt. Neurotrophine und ihre Rezeptoren spielten in der Arbeit von Milner R. et al., 1997, keine Rolle. Beim zweiten Ansatz schließlich, bei dem Schwanzzellen in DMEM mit zehn Prozent Serum ohne weitere Zusätze beobachtet wurden, ist nicht klar, inwieweit Poly-D-Lysin als Substrat der Wanderung der Schwanzzellen grundsätzlich hinderlich war. Unter ansonsten identischen Bedingungen jedenfalls retardiert Poly-D-Lysin die Migration von Schwanzzellen im Vergleich zu Laminin in beträchtlichem Ausmaß (Milner R. et al., 1997).

Für beide in diesem Projekt getesteten Assaybedingungen gibt es Erklärungsansätze dafür, dass kein Effekt von Neurotrophinen auf die Wanderungsgeschwindigkeit beobachtet wurde. Unter Vermeidung von potenziell ungünstigen Parametern wäre es beispielsweise interessant, das Wanderungsverhalten von primären Schwanzzellen in DMEM, supplementiert mit zehn Prozent FCS, auf einer Oberfläche, beschichtet mit Laminin oder Extrazelluläre-Matrix-Proteinen, in Abhängigkeit von Neurotrophinen zu studieren. Dieser Ansatz wäre auch den ursprünglichen, von Anton E.S. et al., 1994, beschriebenen, Bedingungen angenähert.

5.4 Rho-Modulationsassay und Neuritenwachstum

Dieses Projekt basierte auf dem bereits genannten Befund unseres Labors, dass p75^{NTR} RhoA nicht nur bindet, sondern auch dessen Aktivität moduliert (Yamashita T. et al., 1999). Im Speziellen wurde gezeigt, dass p75^{NTR} RhoA konstitutiv aktiviert und Ligandenbindung zu einer raschen Inaktivierung von RhoA führt. Wurden diese Experimente noch in Standardzelllinien – 293 und HN10 Zellen – mit jeweils transfiziertem p75^{NTR} und/oder RhoA durchgeführt, war es das vordergründige Ziel dieses Projektes, die dort gewonnenen Erkenntnisse in einem primären neuronalen Zellsystem zu evaluieren. Dies vor allem deshalb, weil in oben genannten Zelllinien kein unmittelbarer zellulärer Effekt der durch p75^{NTR} vermittelten RhoA-Modulation sichtbar wurde. Modulation von endogenem RhoA durch endogenes p75^{NTR} in primären Neuronen sollte hingegen eher einen Hinweis auf die physiologische Relevanz dieser Signalaktivität liefern.

Im Zuge dieses Projektes wurde Modulation von RhoA-Aktivität in primären Neuronen sowohl nach Aktivierung von p75^{NTR} als auch TNFR beobachtet. Damit war ein *In-vitro*-System für p75^{NTR} etabliert, das für eine funktionelle Analyse dieses Rezeptors benutzt werden konnte.

Der Assay für die Messung der Rho-Aktivität

Im Zentrum dieses Projektes stand die Messung des intrazellulären Aktivitätszustandes von RhoA. Das Hauptproblem dieses Unterfangens ist die große Instabilität des aktiven, also GTP gebundenen, Zustandes aufgrund einer hohen intrinsischen GTPase-Aktivität. Bei der in diesem Projekt benutzten Methode der Affinitätspräzipitation wird die sehr selektive und hochaffine Bindung von Rho-GTP an das Effektormolekül Rhotekin ausgenutzt (Ren X.-D. et al., 1999). Die Rho bindende Domäne von Rhotekin ist zu diesem Zweck mit Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert und kann dadurch an Glutathion-Sepharose gekoppelt werden. Die Sepharose wird mit dem Zelllysats versetzt, und wie *in vivo* bindet aktives Rho an das hier immobilisierte Effektorprotein. Nach Ablösung von der Sepharose kann Rho-GTP einfach mittels Western Blotting detektiert und quantifiziert werden. Rhotekin hat überdies den Vorteil, dass es die hohe intrinsische Hydrolyserate von Rho-GTP signifikant senkt und die aktive Form so stabilisiert.

Modulation der Rho-Aktivität über p75^{NTR} und TNFR

Gleich wie p75^{NTR} vermag auch TNFR in bestimmten Zelltypen, wie Epithelzellen (Wojciak-Stothard B. et al., 1998) oder Fibroblasten (Puls A. et al., 1999), die Aktivität von Rho zu modulieren und auf diese Weise zudem das Aktinzytoskelett zu reorganisieren. Eine unserem Labor benachbarte Arbeitsgruppe fand heraus, dass TNF α das Auswachsen und Verzweigen von Neuriten in hippocampalen Neuronen hemmt. Da Rho-GTPasen auch in Neuronen eine Schlüsselrolle bei der Organisation des Aktinzytoskeletts spielen, insbesondere für neuronenspezifische Strukturen wie Axone und Dendriten (Luo L., 2000), erschien es interessant, die Hypothese, dass TNF α den beobachteten Effekt auf die Neuriten über Modulation von Rho bewirkt, zu überprüfen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Stimulation von hippocampalen Neuronen mit TNF α zu einer Steigerung der RhoA-Aktivität führt. Dass dies nicht nur ein korrelatives Ergebnis, sondern ein der Inhibition des Neuritenwachstums kausal zugrunde liegender

Vorgang ist, wurde im Anschluss mit Hilfe des Rho-Inhibitors C3-Transferase gezeigt. Dieses bakterielle Toxin aus *Clostridium botulinum* ADP-ribosyliert spezifisch Rho und inaktiviert es dadurch (Narumiya S. et al., 1988). Behandlung von Neuronen mit C3-Transferase vor Stimulation mit TNF α blockierte die hemmende Wirkung von Rho auf das Neuritenwachstum (Neumann H. et al., 2002).

Insgesamt steht dieses Ergebnis im Einklang mit dem bestehenden Modell, wie Rho die Aktindynamik beeinflusst (für eine Übersicht siehe z.B. Kuhn T.B., 2000). Zwei der Effektormoleküle von aktivem Rho sind die beiden Kinasen ROCK1 und ROCK2. Diese phosphorylieren eine Isoform der LIM-Kinase, LIMK2, welche wiederum die beiden Aktinregulatoren Cofilin und ADF (Aktin-Depolymerisierungsfaktor) phosphoryliert und damit inaktiviert. Cofilin und ADF sind in Sequenz und Funktion einander sehr ähnlich. Im dephosphorylierten Zustand haben sie jeweils eine hohe Affinität zu Aktinmonomeren und induzieren Depolymerisation am (-) Ende von Aktinsträngen. Aktives Cofilin/ADF gewährleistet dadurch eine kontinuierliche Flexibilität des Aktinnetzwerkes, indem es lokal Aktinstränge destabilisiert und einen Umbau ermöglicht. Aktivierung von Rho führt zu Inaktivierung von Cofilin/ADF und damit zu einem Erstarren des Aktinnetzwerkes. Da Neuritenwachstum jedoch ein Gleichgewicht an Aktinpolymerisation/-depolymerisation voraussetzt, sollte es durch Aktivierung von Rho oder Inaktivierung von Cofilin/ADF gehemmt werden. Dies entspricht genau den experimentellen Befunden (Jalink K. et al., 1994, beziehungsweise Kuhn T.B., 2000).

Eine grundsätzliche Schwierigkeit bei allen Rho-Aktivitätsassays ist der geringe Anteil von aktivem Rho an Gesamt-Rho – typischerweise nur 0.1 bis 1 Prozent von Gesamt-Rho liegt als Rho-GTP vor (Ren X.-D. et al., 1999). Der Assay muss dementsprechend mit einer großen Zahl von Zellen durchgeführt werden. Da aus Hippocampi von E16.5-Mäusen nur rund 4×10^5 Zellen pro Tier gewonnen werden können, wurde auf cerebelläre Kulturen von p7-Tieren gewechselt, die mit rund 7×10^6 Zellen pro Tier wesentlich ertragreicher sind. Darüber hinaus erschienen hippocampale Neuronen für p75^{NTR}-vermittelte RhoA-Inaktivierungsstudien nicht sinnvoll, da der Basalwert an RhoA kaum detektierbar ist. Cerebelläre Kulturen, die zum größten Teil aus Körnerzellen bestehen, exprimieren nicht nur große Mengen an p75^{NTR} (Muller Y. et al., 1994), sondern zeigen auch p75^{NTR}-vermittelte Signalaktivität (Susen K. et al., 1999). Wie in hippocampalen Neuronen mit TNF α , wurde in cerebellären Körnerzellen mit NGF Aktivierung von RhoA beobachtet. Dass die Aktivierung von RhoA in Körnerzellen auch tatsächlich über p75^{NTR} vermittelt wird, wurde durch die Verwendung von Zellen aus p75^{ExonIV}^{-/-} Tieren gezeigt. In diesen Zellen ist die Regulation nicht zu sehen. Dieser Nachweis war besonders wichtig, da in cerebellären Körnerzellen mit RT-PCR auch TrkA nachgewiesen wurde. Obwohl Extrakte aus Wildtyp-Mäusen noch nicht innerhalb eines Wurfes direkt mit Extrakten aus p75^{ExonIV}^{-/-} Mäusen verglichen worden sind, erscheint die Gesamtmenge an Rho-GTP in Körnerzellen aus p75^{ExonIV}^{-/-} Mäusen signifikant verringert im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Tatsächlich ist dies ein erwartetes Ergebnis; trägt nämlich p75^{NTR} zur Aktivierung von RhoA bei, würde man in Abwesenheit von p75^{NTR} auch weniger aktives RhoA erwarten.

Da cerebelläre Körnerzellen *in vitro* NGF sezernieren (Charrasse S. et al., 1992), ist p75^{NTR} vermutlich autoaktiviert. Um das Zellsystem für NGF zu sensitivieren, wurden die Kulturen vor NGF-Stimulation mit funktionsblockierendem Anti-NGF-Antikörper

inkubiert. Diese Maßnahme verbesserte in der Tat das Signal/Rausch-Verhältnis der RhoA-Aktivierung deutlich, indem sowohl der Basalwert an aktivem RhoA gesenkt als auch das NGF-Signal erhöht werden konnten.

Der Befund, dass p75^{NTR} RhoA in diesem Kultursystem aktiviert, war sehr überraschend angesichts der Befunde von Yamashita T. et al., 1999. Wie bereits erwähnt, induziert Ligandenbindung von p75^{NTR} in 293 und HN10 Zellen eine rasche Verringerung der RhoA-Aktivität. Bemerkenswerterweise zeigt dabei die neuronale Linie HN10 über endogenes p75^{NTR} die entgegengesetzt gerichtete Signalaktivität von primären Neuronen, ebenfalls über endogenes p75^{NTR}. Der zugrunde liegende Mechanismus dieses bidirektionalen Signalmusters ist zurzeit noch unklar. Im Prinzip erinnert es jedoch an die Eigenschaft von p75^{NTR}, sowohl Überleben als auch Zelltod induzieren zu können, sogar innerhalb des gleichen Zelltyps (siehe beispielsweise Schwanzzellen, 5.1). Diese diametral entgegengesetzte Funktionalität scheint durch das Binden unterschiedlicher Interaktionspartner, verbunden mit dem Auslösen unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden, ermöglicht zu werden. Wird Überleben durch die Interaktion mit Proteinen wie RIP2 oder TRAF6 und Aktivierung von NFκB induziert, führen Binden unter anderem von NRAGE/MAGE-D1 oder NRIF1/2 und Aktivierung von JNK zu Zelltod (siehe 2.2.2.3 und 2.2.2.4). Die entgegengesetzt gerichtete RhoA-Modulation könnte durch Interaktion mit und Steuerung von Rho-Regulatoren zustande kommen. Rho-GTPasen werden durch GEFs (GDP/GTP exchange factors) positiv, durch GAPs (GTPase activating proteins) sowie GDIs (GDP dissociation inhibitors) negativ reguliert (für eine Übersicht siehe z.B. Ridley A., 2000). Für die durch p75^{NTR} induzierte Aktivierung von RhoA müsste entweder eine rezeptorinhärente GEF-Aktivität oder die Regulation eines unabhängigen GEF postuliert werden. In diesem Zusammenhang erscheint es von großem Interesse, dass p75^{NTR} in seiner intrazellulären Domäne einen Sequenzabschnitt mit hoher struktureller Homologie zu Mastoparan, einem Tetradekapeptid aus Wespengift, hat (Dostaler S.M. et al., 1996). Mastoparan bindet an GTP bindende Proteine wie α-Untereinheiten von trimeren G-Proteinen (Higashijima T. et al., 1988) und Rho-GTPasen (Koch G. et al., 1991) und erhöht deren Aktivität. Grundlage der physischen Wechselwirkung von Mastoparan mit α-Untereinheiten von G-Proteinen ist dessen hohe strukturelle Homologie zu einem konservierten Sequenzabschnitt in G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) (Higashijima T. et al., 1991). Mastoparan scheint somit die Funktion von GPCRs zu simulieren und die Aktivität von G-Proteinen (im Speziellen von α-Untereinheiten) zu modulieren. Die lokale strukturelle Ähnlichkeit von p75^{NTR} mit Mastoparan und damit mit GPCRs spricht für eine inhärente GEF-Aktivität von p75^{NTR}. Darüber hinaus würde dies die bevorzugte Interaktion von p75^{NTR} mit inaktivem RhoA anschaulich machen (Yamashita T. et al., 1999), zumal auch GPCRs eine signifikant höhere Affinität zu inaktiven α-Untereinheiten zeigen (Strader C.D. et al., 1994). Alternativ könnte p75^{NTR} auch die Aktivität eines unabhängigen GEF kontrollieren. Kürzlich konnte das erste auf einem NGF-Signalweg liegende Rho-GEF – Trio – identifiziert werden. Es vermittelt in PC12 Zellen das durch NGF ausgelöste Auswachsen von Neuriten (Estrach S. et al., 2002). Für die durch p75^{NTR} induzierte Inaktivierung der RhoA-Aktivität müsste entweder eine rezeptorinhärente GAP- oder GDI-Aktivität oder die Regulation eines unabhängigen GAP oder GDI postuliert werden. Zurzeit gibt es weder für das eine noch das andere Konzept Hinweise. Inaktivierung von RhoA über GDI-Aktivität erscheint jedoch

angesichts der raschen Kinetik der Inaktivierung weniger wahrscheinlich, da GDIs GTPasen in einem inaktiven, GDP gebundenen, Zustand halten und nicht wie GAPs einen solchen aktiv herbeiführen können.

Interessanterweise unterscheidet sich die Kinetik der durch p75^{NTR} vermittelten RhoA-Aktivierung signifikant von der Kinetik der durch TNFR vermittelten RhoA-Aktivierung. Während NGF-induzierte RhoA-Aktivierung bereits nach spätestens zwei Minuten maximal ist, steigt die Aktivität von RhoA nach Stimulation mit TNF α über mehrere Stunden an und erreicht erst nach rund 16 Stunden das Maximum. Dies spricht für zwei grundlegend unterschiedliche Aktivierungsmechanismen bei den beiden Mitgliedern derselben Familie, p75^{NTR} und TNFR. Während im Fall von p75^{NTR} die Aktivierung von RhoA vermutlich direkt am gebundenen Rezeptor erfolgt, erscheint für TNFR eine indirekte Aktivierung von RhoA eher wahrscheinlich. Tatsächlich wurde in nichtneuronalen Zellen mit TNF α eine Aktivierungskaskade von Cdc42 über Rac hin zu Rho dokumentiert (Puls A. et al., 1999).

Aktivierung von RhoA und Neuritenwachstum

Rho-GTPasen sind weit verbreitete Signal-Relay-Proteine. Als unmittelbare zelluläre Konsequenz ihrer Modulation sind in erster Linie Effekte auf das Aktinzytoskelett beschrieben, in Neuronen im Speziellen Effekte auf das Auswachsen und Verzweigen von Neuriten (Luo L., 2000). Während dieses Konzept für hippocampale Neuronen bestätigt werden konnte – Aktivierung von RhoA mit TNF α inhibiert das Neuritenwachstum und verringert die Anzahl an neuritischen Verzweigungen – ergab sich im Fall der cerebellären Körnerzellen kein Hinweis auf eine Rho-bedingte zytoskeletäre Veränderung. Weder in Langzeit- noch Kurzzeitexperimenten (bis zu drei Tage respektive innerhalb weniger Minuten) konnte eine sichtbare Auswirkung von NGF auf die Morphologie oder Wachstumsrate von Neuriten festgestellt werden. Für Langzeitexperimente wurden Neuronen unter den exakt gleichen Bedingungen wie für Rho-Assays kultiviert, und die Wachstumsrate der Neuriten von mit NGF und mit Anti-NGF-Antikörper behandelten Zellen wurde über mehrere Tage miteinander verglichen. Dieser Befund eines fehlenden NGF-Effektes auf die Neuritenlänge von cerebellären Körnerzellen deckt sich mit einer unabhängig durchgeführten Studie (Tanaka S. et al., 2000). Interessanterweise wurde im vorliegenden experimentellen Ansatz jedoch ein anti-apoptotischer Effekt von NGF festgestellt. Stimulation des cerebellären Kultursystems mit NGF führte nach mehreren Tagen zu deutlich weniger abgestorbenen, schwimmenden Zellen als Behandlung mit Anti-NGF-Antikörper. Dieser Effekt tritt in Zellen aus p75^{ExonIV}^{-/-} Tieren nicht auf. Die Beobachtung eines anti-apoptotischen Effektes von p75^{NTR} im cerebellären Kultursystem stimmt mit unabhängig ermittelten Ergebnissen überein (Muller Y. et al., 1997). Es wäre interessant, zu testen, ob in diesem Kultursystem die anti-apoptotische Wirkung von p75^{NTR} von einer Aktivierung von NF κ B begleitet ist.

In Kurzzeitexperimenten wurde der Effekt von NGF auf das Aktinzytoskelett in hoher zeitlicher Auflösung dokumentiert. Zu diesem Zweck wurden Neuronen aus EGFP-Aktin-‘Knock-in’-Mäusen kultiviert. In diesem transgenen Mausmodell ist ein Wildtyp-Aktin-Allel mittels homologer Rekombination durch ein EGFP-Aktin-Fusionsprotein-Allel ersetzt. Das Aktinzytoskelett von lebenden Zellen aus diesen Tieren kann in zeitaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Neuronen wurden zunächst

auf Glasplättchen kultiviert und vor NGF-Zugabe in eine spezielle Beobachtungskammer transferiert. Die Zugabe von NGF wurde anschließend in Form eines Zeitverlaufsexperimentes fotografisch verfolgt. Eine an ein Fluoreszenzmikroskop gekoppelte Kamera machte in Zehn-Sekunden-Intervallen Aufnahmen, die als Filmsequenz betrachtet werden können. Die Beobachtungszeit nach NGF-Zugabe wurde bis auf 30 Minuten ausgedehnt. Innerhalb dieses Zeitfensters wurde kein Effekt von NGF auf die Aktindynamik (das „Zittern“ von aktinhaltigen Strukturen von Aufnahme zu Aufnahme in der Filmsequenz; vermutlich ein Indiz für die Umbaurate von Aktin im zeitlichen Mittel) noch auf die Gestalt von aktinhaltigen Strukturen beobachtet. Gemäß dem Protokoll für Rho-Assays waren die Neuronen zuvor mit Anti-NGF-Antikörper inkubiert worden. Obwohl die Temperatur in der Beobachtungskammer auf 37°C gehalten wurde, können nachteilige Effekte der äußeren Bedingungen auf den experimentellen Verlauf nicht ausgeschlossen werden. Des besseren GFP-Kontrastes wegen wurden die Zellen während des Experimentes nicht in Medium, sondern in Tyrode's Pufferlösung gehalten. Am Ende der Beobachtungsintervalle wurden bei einzelnen Zellen eindeutige degenerative Erscheinungen beobachtet. Als Positivkontrolle der RhoA-Aktivierung wurde Serum zugegeben. Überraschenderweise führte auch dies nicht zu einer merklichen Veränderung der Aktindynamik oder von aktinhaltigen Strukturen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass diese Ergebnisse die Modulation des Zytoskeletts durch p75^{NTR}-vermittelte Aktivierung von RhoA in cerebellären Körnerzellen als unwahrscheinlich erscheinen lassen. Offensichtlich resultiert ein veränderter Aktivitätsstatus von RhoA nicht automatisch in einem Rearrangement des Zytoskeletts. Weitere Parameter könnten dafür eine Rolle spielen, beispielsweise die subzelluläre Lokalisierung von aktivem RhoA (das Gesamt-RhoA ist gleichmäßig über das Zellsoma und die Fortsätze verteilt, wie mit immunzytochemischer Färbung im Zuge dieses Projektes gezeigt wurde) (Lang P. et al., 1996).

Mit der Etablierung des Rho-Assays im cerebellären Kultursystem wurde nicht nur die Flexibilität von p75^{NTR}-vermittelten Signalvorgängen aufgezeigt, es stand hiermit auch ein neuartiger *In-vitro*-Assay für p75^{NTR} zur Verfügung. Dieser bildete die Basis für die folgenden Experimente, die zu neuen Erkenntnissen über die Funktion von p75^{NTR} führten.

5.5 Globale Genexpressionsanalyse in primären Neuronen

Die Aktivierung von RhoA über NGF und p75^{NTR} in Primärkulturen von cerebellären Körnerzellen zeigte klar, dass der Neurotrophinrezeptor in diesem Zellsystem aktiv ist. Tatsächlich ist Modulation von RhoA nicht der einzige Hinweis auf eine Funktionalität von p75^{NTR} in diesen Zellen, auch die MAP-Kinasen ERK1/2 werden durch ihn aktiviert (Susen K. et al., 1999). Angesichts dieser Signalaktivität stellte sich die Frage, was die zelluläre Konsequenz, die physiologische Bedeutung, dieser Regulationen ist. Wie im vorigen Kapitel dargelegt, waren keine Veränderungen des Zytoskeletts erkennbar. Der oben erwähnte anti-apoptotische Effekt von p75^{NTR} wird erst nach mehreren Tagen NGF-

Stimulation sichtbar. Es ist völlig unklar, ob es sich dabei um einen direkten oder indirekten Effekt handelt und was die molekularen Mechanismen sind. Von vielen Signaltransduktionsschritten ist bekannt, dass sie auf die Genexpression einwirken, so auch Rho (Ridley A.J., 2000) und MAPK ERK1/2 (Volmat V. und Pouyssegur J., 2001).

Die Überlegung war, dass eine umfassende, unvoreingenommene Suche nach Änderungen in der Genexpression nach Stimulation mit NGF in Form einer globalen Genexpressionsanalyse Zielgene von p75^{NTR} identifizieren sollte. Diese wiederum könnten Hinweise auf eine mögliche Funktion dieses Rezeptors im vorliegenden Zellsystem liefern. In der Tat konnten mit diesem Konzept neue Zielgene von p75^{NTR} identifiziert werden, die zu einer Erweiterung des bisher bekannten funktionellen Rahmens von p75^{NTR} führten.

Vergleich der Genexpression im cerebellären Kultursystem mit/ohne NGF

Der zurzeit kompletteste, das heißt die meisten Gene umfassende, Ansatz, Änderungen in der Genexpression aufzuspüren, ist jener von Affymetrix, Inc. Er basiert auf so genannten 'High Density Oligonucleotide Arrays' oder GeneChips[®], kleinen Quartzplättchen, die in regelmäßigen Abständen mit definierten Oligonukleotiden beschichtet sind (ein 'array' von Oligonukleotiden). Jedes Oligonukleotid besteht aus 25 Nukleotiden und entspricht einem Sequenzabschnitt auf einem Gen (oder EST). Jedes Gen (oder EST) ist durch 11 bis 16 Oligonukleotide repräsentiert. Die Detektion einer gegebenen mRNA in einer Probe erfolgt durch Messung der Hybridisierungsintensität mit den entsprechenden Oligonukleotiden auf dem Chip. Der für das vorliegende Experiment verwendete Chip umfasst 12488 annotierte Gene und ESTs. Ein mögliches Hindernis für eine solche Analyse ist der große Bedarf an Gesamt-RNA pro Probe – rund 15 µg. Wie bereits für den Rho-Assay erwies sich die große Anzahl an Körnerzellen pro Tier auch für diesen experimentellen Ansatz als sehr vorteilhaft für die technische Durchführbarkeit.

Das Experiment wurde unter den gleichen Bedingungen wie ein Rho-Assay durchgeführt. Cerebelläre Körnerzellen wurden nach dem Plattieren zunächst über Nacht mit Anti-NGF-Antikörper sensitiviert, bevor mit NGF über vier und zwölf Stunden stimuliert wurde. Ein früher und ein später Zeitpunkt sollten Trends in der Expressionsregulation erkennen lassen. Beispielsweise könnten dadurch 'immediate early genes' von 'late genes' unterschieden werden. Um die statistische Signifikanz der zu erhaltenden Expressionsdaten zu erhöhen, wurde das Experiment im Duplikat durchgeführt. Die Auswertung ergab eine überschaubare Liste von 69 Genen/ESTs, die im Vergleich zu mit Anti-NGF-Antikörper behandelten Zellen nach vier oder zwölf Stunden NGF-Stimulation um mindestens den Faktor 2.00 hoch- oder hinunterreguliert werden. Der größere Teil von 45 Genen wird hinunterreguliert, 24 werden in ihrer Expression verstärkt. Interessanterweise wurden keine typischen 'immediate early genes' wie *c-fos* gefunden. Vermutlich war das „kurze“ Stimulationsintervall von vier Stunden dafür bereits zu lang. Die meisten Gene waren zu beiden Zeitpunkten in gleichartiger Weise reguliert, das heißt, sowohl nach vier als auch nach zwölf Stunden hoch- oder hinunterreguliert. Zudem wurden nur selten wesentliche Unterschiede im Expressionswert dieser beiden Zeitwerte gefunden – die maximale Veränderung der Expression durch NGF-Stimulation ist bereits nach spätestens vier Stunden erreicht und bleibt bis nach zwölf Stunden unverändert. Bei der Gruppe der Interferon-induzierbaren Gene (siehe unten) hingegen war nach vier

Stunden ein maximaler Effekt von NGF auf die Expression zu sehen, danach näherten sich die Werte meist wieder dem Basalwert an.

Da die cerebellären Körnerzellen vermutlich auch TrkA exprimieren (siehe RT-PCR-Ergebnisse in 4.2.5), konnte zunächst nur von NGF-regulierten Genen gesprochen werden. Um p75^{NTR} als ursächlichen Rezeptor zu identifizieren, wurde die Regulation von ausgewählten Kandidatengenen mittels RT-PCR und/oder Western Blotting in cerebellären Zellen sowohl aus Wildtyp- als auch p75^{ExonIV}^{-/-} Mäusen evaluiert. Die Auswahl dieser Kandidatengene wurde erleichtert durch den Umstand, dass viele der mit den GeneChips[®] gefundenen Gene zu Gruppen von Genen zusammengefasst werden können, die nach dem gleichen Muster reguliert sind und funktionelle Charakteristika gemeinsam haben – so genannte Cluster oder Synexpressionsgruppen.

Gen-Cluster

Insgesamt wurden drei Cluster identifiziert. Erstens ein Cluster aus Genen, die durch Interferon-Stimulierbarkeit charakterisiert sind, zweitens Gene, die für Elemente des Rho-Signalweges kodieren, und drittens Gene, die für Endothelzell- und Vaskulogenesemarker kodieren.

Interferon-induzierbare Gene

Diese Gene bilden den größten Cluster: 21 der 45 durch NGF hinunterregulierten Gene (über ESTs kann diesbezüglich naturgemäß keine Aussage gemacht werden) werden durch Interferone, vor allem IFN γ , oder LPS aktiviert. Diese Gene kodieren für mehrere Proteintypen wie Zytokine (z.B. GRO α oder JE), Signaltransduktionskomponenten (z.B. GTPI oder IGTP) sowie Transkriptionsfaktoren (z.B. Stat1 oder ISGF3 γ /p48). Diese Befunde sind sehr interessant im Hinblick auf beschriebene Interferon-antagonistische Effekte von NGF. NGF blockiert die durch IFN γ induzierte Hochregulation von MHC-Klasse-II-Molekülen sowohl in dissoziierten Mikrogliazellen (Neumann H. et al., 1998) als auch in primären Schwannzellen (Doktorarbeit von Matthias Zink). In beiden Fällen ist der IFN-antagonistische Effekt von NGF über p75^{NTR} vermittelt. Im ersteren Fall wurde dies mit Hilfe eines funktionsblockierenden Anti-p75^{NTR}-Antikörpers belegt, im zweiten Fall durch Verwendung von Schwannzellen aus p75^{NTR}-Knockout-Mäusen. Erstaunlicherweise konnte im vorliegenden Fall klar gezeigt werden, dass p75^{NTR} keine kausale Rolle spielt, da das Regulationsmuster in Neuronen aus p75^{ExonIV}^{-/-} Mäusen bestehen bleibt. In einem nächsten Schritt wird daher eine mögliche Rolle von TrkA bei dieser Regulation durch Verwendung von *trkA*^{-/-} Mäusen getestet werden.

Darüber hinaus stellt sich auch die Frage nach einer potenziell physiologischen Relevanz dieser Interferon-antagonistischen Regulation von NGF in ZNS-Neuronen. Die klassische Rolle von Interferonen wird in Entzündungs- und Antivirusreaktionen gesehen (für eine Übersicht siehe z.B. Stark G.R. et al., 1998). Doch wurden gerade im Kleinhirn Funktionen von IFN-regulierten Genen in nichtpathologischen Situationen gefunden. Das Chemokin GRO α moduliert die synaptische Transmission in Purkinjezellen (Giovannelli A. et al., 1998), GRO β wirkt neurotroph für dissoziierte Körnerzellen (Limatola C. et al., 2000). Überexpression von IFN γ im ZNS führt unter anderem zu Defekten in der Wanderung der Körnerzellen während der Entwicklung des Kleinhirns (Corbin J.G. et al., 1996). Diese Befunde legen nahe, dass der Interferon-antagonistische Effekt von NGF

nicht oder nicht nur eine anti-inflammatorische Funktion besitzt, sondern auch eine Rolle für die physiologische Entwicklung und Funktionalität des ZNS spielt.

Rho-Signalweg-Marker

Dieser Cluster setzt sich aus drei hochregulierten Genen zusammen: den beiden Rho-Kinasen ROCK1 und ROCK2 sowie dem Rho-spezifischen GTPase aktivierenden Protein GAP-5. Während erstgenannte direkte Effektormoleküle von aktivem Rho sind (siehe 5.4), ist GAP-5 ein Inhibitor von aktivem Rho. Die Regulation von ROCK1 und 2 wurde mit Western Blotting getestet. Das mit GeneChips[®] festgestellte Regulationsmuster konnte dabei nicht bestätigt werden, jedoch ist anzumerken, dass bisher nur für maximal zwölf Stunden mit NGF stimuliert wurde, eine Zeitspanne, die für die Regulation auf Proteinebene zu kurz sein könnte (siehe 5.6). Die Regulation von GAP-5 konnte mangels Antikörper nur mit RT-PCR getestet werden. Dabei wurde das von den GeneChips[®] postulierte Expressionsmuster bestätigt: GAP-5 wird von NGF transient hochreguliert, und zwar über $p75^{\text{NTR}}$, da in Neuronen aus $p75^{\text{ExonIV}}/-$ Mäusen die Regulation nicht beobachtet wird. Damit war das erste Zielgen von $p75^{\text{NTR}}$ in diesem Projekt identifiziert. Die Relevanz dieses Befundes liegt in der im vorigen Kapitel diskutierten Aktivierung von RhoA über $p75^{\text{NTR}}$ begründet. Demgemäß scheint $p75^{\text{NTR}}$ einen Inaktivator für ein von ihm selbst posttranslational aktiviertes Signalelement auf transkriptioneller Ebene hochzuregulieren. Es wird interessant sein, zu testen, ob dieser Signalweg über RhoA läuft, zumal es sich in diesem Fall um einen negativen Feedback-Loop handeln würde. Die Hochregulation von ROCK1 und 2 könnte hingegen einen positiven Feedback-Loop darstellen, zumal beide Kinasen in der Signalkaskade unmittelbar unterhalb von aktivem Rho liegen und das Rho-Signal in verstärkter Form weiterleiten.

Endothelzell-/Vaskulogenesemarker

Dieser Cluster, der aus drei hinunterregulierten Genen zusammengesetzt ist, wurde erst bei einer nachträglichen Re-Analyse der GeneChip[®]-Rohdaten entdeckt und aus diesem Grund noch nicht näher analysiert. Angesichts des in der Exon IV-Mutante diagnostizierten Vaskulogenesedefektes (siehe 5.1) erscheint die Regulation dieser Gene hochinteressant. Die Verifizierung dieser Marker als Zielgene von $p75^{\text{NTR}}$ könnte helfen, die molekularen Mechanismen der Rolle von $p75^{\text{NTR}}$ bei der Gefäßbildung aufzuklären.

Weitere interessante Kandidatengene

Abgesehen von den Clustern fanden sich einzelne Gene, die im Kontext von einigen für $p75^{\text{NTR}}$ gezeigte Funktionen von großer Relevanz sein könnten. Darunter befindet sich FLASH/Caspase 8-assoziiertes Protein 2. FLASH ist ein Apaf-1-analoger proapoptotischer Faktor, der mit Caspase 8 interagiert und am Auslösen von Apoptose beteiligt ist (Imai Y. et al., 1999). Vermutlich abhängig vom gegebenen zellulären Kontext koordiniert er darüber hinaus die Aktivierung von NF κ B durch Interaktion mit TRAF2 (Choi Y.H. et al., 2001). Im vorliegenden Fall wird FLASH durch NGF hochreguliert. Es wird interessant sein, zu erfahren, ob diese Regulation über $p75^{\text{NTR}}$ vermittelt ist und ob dieser Faktor für $p75^{\text{NTR}}$ -induzierten Zelltod oder $p75^{\text{NTR}}$ -vermittelte Aktivierung von NF κ B eine Rolle spielt.

Ein weiteres interessantes Kandidatengen war die AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR2. Da von der Arbeitsgruppe um Martin Korte am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried/München Defekte in der synaptischen Plastizität in der Exon IV-Mutante festgestellt worden waren, lag der Fokus der weiteren Arbeit auf der Analyse von GluR2 als potenziellem Zielgen von p75^{NTR} und seiner möglichen Rolle im synaptischen Phänotyp.

5.6 Regulation von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten durch NGF und p75^{NTR} in primären Neuronen

Struktur und Funktion von AMPA-Rezeptoren

Neben NMDA- und Kainat-Rezeptoren bilden AMPA-Rezeptoren die dritte Gruppe der ionotropen Glutamaterezeptoren (für eine Übersicht siehe z.B. Zigmond M.J. et al., 1999, Seite 247 ff.). Funktionelle AMPA-Rezeptoren sind Tetramere aus vier Untereinheiten, GluR1-4, die von separaten Genen kodiert werden. Die Zusammensetzung ist räumlich und zeitlich reguliert. GluR2 kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Es macht AMPA-Rezeptoren impermeabel für Ca²⁺-Ionen. Im adulten ZNS unter physiologischen Bedingungen synthetisiert der weitaus größte Teil der Neuronen GluR2-haltige, Ca²⁺-impermeable AMPA-Rezeptoren. Hinunterregulation von GluR2 unter pathologischen Bedingungen, beispielsweise Ischämie, führt zu übermäßigem Einstrom von Ca²⁺-Ionen und trägt zu Glutamat-induziertem neuronalem Zelltod bei (Tanaka H. et al., 2000).

Neben dieser potenziell neurotoxischen Wirkung sind AMPA-Rezeptoren wesentlich an der exzitatorischen schnellen synaptischen Transmission im ZNS beteiligt. Da NMDA-Rezeptoren im Ruhepotenzial durch einen spannungsabhängigen Magnesiumblock inaktiv sind, zeichnen hauptsächlich AMPA-Rezeptoren für die Generierung von exzitatorischen postsynaptischen Potenzialen (EPSPs) verantwortlich.

Darüber hinaus wird ihnen eine Hauptrolle bei der Modulation der synaptischen Plastizität zugeschrieben (für eine Übersicht siehe z.B. Malinow R. und Malenka R.C., 2002). Lang anhaltende Verstärkung wie auch Verringerung der synaptischen Signalübertragung (LTP und LTD), beide Grundvoraussetzung für Lernen und Gedächtnis, werden dabei als verwandte, jedoch entgegengesetzt gerichtete Phänomene aufgefasst. Die grundlegende Hypothese ist, dass AMPA-Rezeptoren der Expression beider Phänomene zugrunde liegen. Im Fall von LTP werden zusätzliche AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran eingeschleust, wodurch sich die synaptische Transmission verstärkt. Im Fall von LTD hingegen werden AMPA-Rezeptoren aus der postsynaptischen Membran internalisiert, wodurch die synaptische Transmission verringert wird. Beide Vorgänge werden über spezifische Untereinheiten gesteuert. GluR2 und auch GluR3 kommt dabei eine besondere Bedeutung für die aktivitätsabhängige Internalisierung der AMPA-Rezeptoren zu. Diese beiden Untereinheiten binden an einzelne Komponenten der Internalisierungsmaschinerie wie GRIP oder PICK1, wodurch der gesamte Rezeptorkomplex von der Membran gezogen wird. Störung dieser Interaktionen verhindert die Etablierung von LTD. Eine geänderte Expression dieser Untereinheiten sollte sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die synaptische Plastizität auswirken. Tatsächlich hatte zuvor bereits die Arbeitsgruppe um Martin Korte gezeigt, dass hippocampales LTD in der Exon IV-Mutante signifikant

schwächer ausgeprägt ist, LTP jedoch unverändert ist. Aus diesem Grund wurde das Kandidatengen GluR2 für eine nähere Untersuchung ausgewählt. Dabei konnte in der Tat ein molekularer Erklärungsansatz für den Defekt im hippocampalen LTD in der Exon IV-Mutante geliefert werden.

GluR2 ist ein Zielgen von p75^{NTR}

Zunächst wurde das von den GeneChips[®] angezeigte Expressionsmuster über RT-PCR in dissoziierten cerebellären Neuronen überprüft. Wie auf den GeneChips[®] wurde ein steiler Anstieg der mRNA-Konzentration nach bereits vier Stunden NGF-Stimulation festgestellt. Da in Neuronen aus *p75^{ExonIV}*^{-/-} Mäusen keine von NGF abhängige Regulation beobachtet wurde, war GluR2 als weiteres Zielgen von *p75^{NTR}* identifiziert. Interessanterweise war die Menge an GluR2 mRNA in Zellen aus *p75^{ExonIV}*^{-/-} Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu Zellen aus Wildtyp-Mäusen. Diese Beobachtung steht im krassen Gegensatz zur Proteinmenge in der *In-vivo*-Situation (siehe unten). Bei der Überprüfung der Regulation auf Proteinebene stellte sich heraus, dass über mindestens drei Tage mit NGF stimuliert werden muss, um eine Hochregulation zu sehen. Mithin gibt es eine starke Verzögerung zwischen der NGF-induzierten Hochregulation der GluR2 mRNA und dem Hochfahren der Proteinsynthese. Ein ähnliches Ergebnis wurde unabhängig mit der Neuroblastozelllinie SH-SY5Y erreicht. Stimulation mit BDNF über zwei Tage resultiert in einer moderaten Hochregulation von GluR2 Protein (Brené S. et al., 2000). Wesentlich dabei ist, dass die Zellen zuvor mit Retinsäure differenziert werden. Dies weist auf eine potenzielle Bedeutung der *In-vitro*-Differenzierung hin. Wie in 4.2.3 angeführt, handelt es sich bei cerebellären Neuronen aus *p7*-Mäusen nicht um terminal differenzierte Neuronen, sondern um Vorläuferstadien, die ihr Differenzierungsprogramm *in vitro* zellautonom umsetzen (Blaess S., persönliche Mitteilung). Möglicherweise müssen Körnerzellen erst ein bestimmtes Differenzierungsstadium erreichen, bevor sie die Regulation der GluR2 mRNA auf Proteinebene übertragen können.

Der Arbeit von Brené S. et al., 2000, ist ein weiterer interessanter Aspekt zu entnehmen. Der aktivierende Effekt von BDNF auf die GluR2-Expression wird über ein NRSE (neuron-restrictive silencer element) vermittelt, ein Steuerelement im Promoter von GluR2, das eine Bindungsstelle für REST/NRSF (RE-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor) darstellt (Myers S.J. et al., 1998). NRSF ist ein Transkriptionsrepressor, der über ein NRSE zahlreiche neuronale Gene in nichtneuronalen Zellen abgeschaltet hält (Schoenherr C.J. et al., 1995). Allerdings wirkt er auch auf nichtneuronale Gene. Im Speziellen reprimiert NRSF als XBR (X2 box repressor) die Expression eines MHC-Klasse-II-Gens (Scholl T. et al., 1996). Dies könnte eine interessante Verbindung zur Regulation von MHC-Klasse-II-Genen über Neurotrophine sein (Neumann H. et al., 1998). Jedoch gilt es zu bedenken, dass im letztgenannten Fall NGF repressiv auf die Expression wirkt, NRSF folglich aktivierend wirken müsste, wohingegen im vorliegenden Fall NGF stimulierend auf die Expression von GluR2 einwirkt, NRSF gegebenenfalls inhibierend wirken müsste. Zudem ist nicht geklärt, über welchen Rezeptor BDNF in den SH-SY5Y Zellen wirkt – exprimiert werden sowohl *p75^{NTR}* als auch TrkB (Ehrhard P.B. et al., 1993). Interessanterweise wird nach Behandlung mit Retinsäure *p75^{NTR}* verstärkt, TrkB jedoch geringer exprimiert.

Aufgrund der eingangs angeführten potenziellen Verbindung zum LTD-Phänotyp im Hippocampus der Exon IV-Mutante wurde getestet, ob die im cerebellären Kultursystem gefundene Regulation von GluR2 auch für hippocampale Neuronen gilt. In einem analogen Experiment mit hippocampalen Neuronen aus E16.5-Mausembryos konnte klar gezeigt werden, dass NGF über $p75^{NTR}$ auch in dissoziierten hippocampalen Neuronen GluR2 Protein hochreguliert, zudem mit einer schnelleren Kinetik als in cerebellären Zellen.

AMPA-Rezeptor-Untereinheiten werden von $p75^{NTR}$ reguliert

Die physiologische Relevanz dieser *In-vitro*-Befunde wurde anschließend für die *In-vivo*-Situation untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Expressionsniveau von GluR2 in Hippocampi von $p75^{ExonIV} +/-$ und $p75^{ExonIV} -/-$ Mäusen im Alter von p16 verglichen. Mit Tieren im Alter von p16 wurden auch die oben erwähnten LTD-Experimente gemacht. In Hippocampi aus $p75^{ExonIV} -/-$ Mäusen wurde dabei nur rund halb so viel GluR2 wie in Hippocampi aus $p75^{ExonIV} +/-$ Tieren detektiert. Dies konnte man grundsätzlich erwarten, denn trägt aktiviertes $p75^{NTR}$ zur Hochregulation von GluR2 bei, sollte in Abwesenheit von $p75^{NTR}$ auch weniger GluR2 produziert werden. Die nachfolgende Überprüfung der anderen drei AMPA-Rezeptor-Untereinheiten ergab, dass neben GluR2 auch GluR3, nicht jedoch GluR1 und GluR4, in Hippocampi von $p75^{ExonIV} +/-$ und $p75^{ExonIV} -/-$ Mäusen ein unterschiedliches *In-vivo*-Expressionsniveau zeigt. Anders als bei GluR2 ist der Expressionswert von GluR3 jedoch signifikant erhöht. Dies warf die Frage auf, ob auch GluR3 ein Zielgen von $p75^{NTR}$ ist. Tatsächlich wurde auch für GluR3 eine über $p75^{NTR}$ vermittelte NGF-induzierte Hochregulation in hippocampalen Neuronen festgestellt. Interessanterweise unterscheidet sich die Kinetik der GluR3- von der GluR2-Regulation. Während das Expressionsniveau von GluR2 über drei Tage NGF-Stimulation kontinuierlich ansteigt, fällt GluR3 nach einem maximalen Expressionswert nach rund zwei Tagen NGF-Stimulation wieder ab. Im Gegensatz zu GluR1 und GluR2 ist der Promoter von GluR3 noch nicht charakterisiert, sodass keine Vergleiche zwischen GluR2 und GluR3 hinsichtlich der Regulation der Expression angestellt werden können.

Insgesamt ist die Hochregulation von GluR3 in dissoziierten Neuronen ein überraschendes Ergebnis. Analog zum *In-vivo*- und *In-vitro*-Regulationsmuster von GluR2 war eine Hinunterregulation von GluR3 nach Aktivierung von $p75^{NTR}$ erwartet worden, zumal in Abwesenheit von $p75^{NTR}$ *in vivo* ein starker Anstieg der GluR3-Expression gemessen wurde. Der Grund für diese widersprüchlichen Resultate ist zurzeit nicht klar. Es könnte sich um einen von $p75^{NTR}$ unabhängigen kompensatorischen Mechanismus handeln. Bemerkenswerterweise unterscheiden sich die Untereinheiten GluR2 und GluR3 in ihren zytoplasmatischen Domänen signifikant von den Untereinheiten GluR1 und GluR4. Das erklärt auch die eingangs erwähnten funktionellen Gemeinsamkeiten von GluR2 mit GluR3 (Malinow R. und Malenka R.C., 2002). Insgesamt sind GluR2 und GluR3 zueinander wesentlich stärker homolog als jeweils zu GluR1 und GluR4. Die verringerte Expression von GluR2 in der Exon IV-Mutante könnte deshalb zu einer kompensatorischen Hochregulation der ihr strukturell und funktionell nächststehenden Untereinheit GluR3 führen, so wie beispielsweise innerhalb der CREB/ATF-Familie von Transkriptionsfaktoren CREM bei fehlender Expression von CREB hochreguliert wird und den Verlust an CREB funktionell kompensieren kann (Hummler E. et al., 1994). Es ist allerdings zu bedenken, dass verstärkte Expression von

GluR3 die verringerte Menge an GluR2 in der Exon IV-Mutante nicht vollständig ausgleichen kann, da die beiden Untereinheiten nicht völlig redundant sind. So bindet beispielsweise GluR2, aber nicht GluR3, NSF (NEM sensitive factor). Interaktion mit dieser für Membranfusionen essenziellen ATPase ist für Exozytose von AMPA-Rezeptoren im Zuge des konstitutiven Membrankreislaufes dieser Rezeptoren notwendig. Störung der GluR2-NSF-Interaktion resultiert in verminderter Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren (Noel J. et al., 1999) und überdeckt LTD (weil bereits zu Beginn des Stimulationsprotokolls weniger AMPA-Rezeptoren in der Membran lokalisiert sind) (Lüthi A. et al., 1999).

Zusammengefasst: Es erscheint schwierig, vorauszusagen, wie sich die gleichzeitige und entgegengesetzt gerichtete Expressionswertänderung von zwei AMPA-Rezeptoruntereinheiten, die einerseits identische Funktionen haben (aktivitätsinduzierte Internalisierung von AMPA-Rezeptoren durch Interaktion mit GRIP und PICK1), andererseits jedoch auch getrennte Aufgaben wahrnehmen (Exozytose im Zuge des konstitutiven Membrankreislaufes von AMPA-Rezeptoren durch GluR2 über Interaktion mit NSF), letztlich auf die synaptische Plastizität auswirkt.

Ein wesentliches Experiment wird deshalb sein, zu testen, ob die Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren in $p75^{NTR}$ -Knockout-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren verändert ist.

Ausblick

Die in dieser Doktorarbeit vor allem durch die Transkriptionsanalyse erhaltenen Ergebnisse werfen neue Fragen auf und eröffnen neue Perspektiven.

1. Ein Interferon-antagonistischer Effekt von NGF im Cerebellum

Ein wesentlicher Befund dieser Arbeit ist, dass NGF *in vitro* in cerebellären Körnerzellen die Expression von über 20 durch Interferon aktivierbaren Genen hinunterreguliert. Zunächst stellt sich die Frage nach der biologischen Bedeutung des über NGF vermittelten IFN-antagonistischen Effektes im Cerebellum. Über die klassische Funktion der Interferone in der Immunmodulation hinaus gibt es Befunde, die auch auf eine physiologische Rolle von Interferonen während der Entwicklung des Gehirns hinweisen (siehe Diskussion 5.5). Die hier aufgezeigten Befunde könnten deshalb nicht nur die funktionelle Relevanz von Interferonen, sondern auch von Neurotrophinen – von NGF im Speziellen – grundsätzlich erweitern. Darüber hinaus ist noch unklar, über welchen Rezeptor dieser Effekt vermittelt ist. $p75^{NTR}$ kommt als verantwortlicher Rezeptor nicht in Frage, da das Regulationsmuster in der vollständigen $p75^{NTR}$ -Deletionsmutante unverändert ist. Die Rolle von TrkA kann mit dem entsprechenden Knockout getestet werden. Sollte die Regulation auch in dieser Mutante bestehen bleiben, so wäre dies ein Hinweis auf die Existenz eines bisher noch unbekanntem NGF-Rezeptors.

2. $p75^{NTR}$ moduliert die Zusammensetzung des AMPA-Rezeptors

Die hier präsentierten Daten legen nahe, dass $p75^{NTR}$ die Stöchiometrie von AMPA-Rezeptoren durch Regulation von einzelnen Untereinheiten beeinflusst. Auf dem Hintergrund des gegenwärtigen Wissens um die Bedeutung von spezifischen Untereinheiten für die Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren einerseits und die Bedeutung der Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren für das Konzept der synaptischen Plastizität andererseits ist eine veränderte synaptische Plastizität im $p75^{NTR}$ -Knockout auch zu erwarten. Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist, ob die geänderte Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren im Hippocampus von $p75^{NTR}$ -Knockout-Tieren auch tatsächlich zu einer derart veränderten Oberflächenexpression der AMPA-Rezeptoren führt, dass verringertes LTD die Folge ist. In diesem Fall wäre erwiesen, dass $p75^{NTR}$ über Modulation der Genexpression von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten LTD im Hippocampus beeinflusst. LTD ist überdies nicht auf den Hippocampus beschränkt. Für cerebelläres LTD werden ganz ähnliche Mechanismen postuliert (Carroll R.C. et al., 2001). Da die Regulationsdaten von GluR2 ursprünglich aus cerebellären Neuronen stammen, könnte das hier für den Hippocampus aufgestellte Konzept einer über $p75^{NTR}$ modulierten synaptischen Plastizität von allgemeiner Gültigkeit sein. Darüber hinaus bestärken diese Befunde das Muster der antagonistischen Wirkungsweise von Neurotrophinen das durch das Zwei-Rezeptor-System ermöglicht wird. Gleich wie Neurotrophine sowohl das Überleben als auch das Absterben von Neuronen durch Aktivierung von entweder Trk-Rezeptoren oder $p75^{NTR}$ induzieren, können sie die synaptische Transmission entweder über Trk-Rezeptoren stärken (siehe Diskussion 5.6) oder über $p75^{NTR}$ schwächen.

6 ABKÜRZUNGEN

Aminosäuren werden mit dem Einbuchstabencode benannt. Darüber hinaus werden in dieser Arbeit folgende Abkürzungen verwendet:

% (v/v)	Prozent auf das Volumen bezogen
% (w/v)	Prozent auf das Gewicht bezogen
A	Ampere
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
a.d.	aqua destillata
ADF	Aktin-Depolymerisierungsfaktor
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPA	(R,S)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPAR	AMPA-Rezeptor
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
APP	amyloid precursor protein
ARMS	ankyrin repeat- rich membrane spanning (protein)
ATP	Adenosintriphosphat
BBS	2x BES gepufferte Lösung
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BES	N,N-Bis(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
BHK	baby hamster kidney (cells)
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
c	centi
C	Cytosin
<i>C.</i>	<i>Caenorhabditis</i>
cAMP	cyclic AMP
CCD	charge coupled device
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinese hamster ovary (cells)
CRD	cysteine-rich domain
CREB	cAMP-responsive element binding (protein)
CREM	cAMP-responsive element modulator
cRNA	complementary RNA
CRNF	cysteine-rich neurotrophic factor
CSPG	central spinal pattern generator
d	desoxy
<i>D.</i>	<i>Drosophila</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid
Dc	Doxyzyklin
DD	death domain

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dpc	days post coitum
DTAF	(4,6-Dichlorotriazinyl)aminofluorescein
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Embryonaltag
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular response kinase
EST	expressed sequence tag
et al.	et alii
FACS	fluorescence activated cell sorting/scanning
FADD	Fas-associating protein with death domain
FAP	Fas-associated phosphatase
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
FLASH	FLICE-associated huge (protein)
FLICE	FADD-like ICE
FSC	forward scatter
g	Gramm
G	Guanosin
GAP	GTPase activating protein
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GARG	glucocorticoid-attenuated response gene
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GDP/GTP exchange factor
GGF	glial growth factor
GluR	Glutamatrezeptor
GPCR	G protein coupled receptor
GRIP	glutamate receptor-interacting protein
GRO	growth-regulated oncogene
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
hr(s)	Stunde(n)
HRP	horse radish peroxidase
ICE	IL-1 β converting enzyme
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IP-10	interferon- γ -inducible protein 10
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRAK	IL-1- associated kinase
ISGF	IFN α -stimulated gene response factor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
k	kilo
Kon	Kontrolle
l	Liter
<i>L.</i>	<i>Lymnaea</i>
LB	Luria-Bertani
LIM	Lin-11, Islet-1, Mec-3
LIX	LPS-induced CXC chemokine
LGA	low gelling temperature agarose
LPS	Lipopolysaccharid
LTD	long term depression
LTP	long term potentiation
m	Meter
m	milli
M	molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MHC	major histocompatibility complex
μ	mikro
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
MW	molecular weight
n	nano
N.	Nervus
NADE	neurotrophin receptor-associated cell death executor
NEM	N-ethylmaleimide-sensitive factor
<i>neo</i>	Resistenzgen gegen Neomycin
NF κ B	nuclear factor kappa B
NGF	nerve growth factor
NGS	normal goat serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRAGE	neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog
NRIF	neurotrophin receptor-interacting factor
NRH	neurotrophin receptor homologue
NRSE	neuron-restrictive silencer element
NRSF	neuron-restrictive silencer factor
NSF	NEM sensitive factor
NT	Neurotrophin
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
p	post (Tag nach der Geburt)
PA	Polyacrylamid

PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PDZ	PSD-95, Discs large, zona occludens-1
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PI3K	phosphatidylinositol-3-OH kinase
PICK	protein interacting with C kinase
PKC	protein kinase C
PLC γ	phospholipase C gamma
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PrP	prion protein
P-S	Penicillin-Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBD	Rho binding domain
REST	RE-1 silencing transcription factor
RIP	receptor interacting protein
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
ROCK	Rho-Kinase
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverse tetracycline transactivator
RV	rabies virus
s	Sekunde(n)
SC	Schwann cell
SDS	sodium dodecyl sulphate
SSC	side scatter
Stat	signal transducer and activator of transcription
SV40	simian virus 40
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TGF β	transforming growth factor-beta
TNF α	tumor necrosis factor-alpha
TNFR	TNF receptor
TRAF	TNFR-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL receptor
TRADD	TNFR-associated death domain protein

TRBD	Rhotekin Rho binding domain
TRE	tetracycline response element
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
Trk	tropomyosin related kinase
u	unit(s)
U	Uracil
u.a.	unter anderem
ü/n	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vol	Volumen
W	Watt
WGA	wheat germ agglutinin
w/o	without
Wt	Wildtyp
x	mal
X.	<i>Xenopus</i>
XBR	X box repressor
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adamson P, Etienne S, Couraud PO, Calder V, Greenwood J. 1999. Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway. *J Immunol.* 162: 2964-73.
- Akiba H, Nakano H, Nishinaka S, Shindo M, Kobata T, Atsuta M, Morimoto C, Ware CF, Malinin NL, Wallach D, Yagita H, Okumura K. 1998. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem.* 273: 13353-8.
- Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD, Toma JG, Atwal J, Kaplan DR, Miller FD. 1998. p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol.* 143: 1691-703.
- Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. 2000. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res.* 261: 44-51.
- Anton ES, Weskamp G, Reichardt LF, Matthew WD. 1994. Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 2795-9.
- Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 28: 1305-8.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Struhl K. *Curent Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons Inc, 1993
- Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, Causing CG, Miller FD. 1998. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol.* 140: 911-23.
- Barbacid M. 1994. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol.* 25: 1386-403.
- Barde YA. 1994. Neurotrophic factors: an evolutionary perspective. *J Neurobiol.* 25: 1329-33.
- Barde YA. 1990. The nerve growth factor family. *Prog Growth Factor Res.* 2: 237-48.
- Baron U, Gossen M, Bujard H. 1997. Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res.* 25: 2723-9.
- Barrett GL, Bartlett PF. 1994. The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 6501-5.
- Barrett GL. 2000. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol.* 61: 205-29.
- Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M. 1999. Signaling by proinflammatory

cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev.* 13: 1297-308.

- Belliveau DJ, Krivko I, Kohn J, Lachance C, Pozniak C, Rusakov D, Kaplan D, Miller FD. 1997. NGF and neurotrophin-3 both activate TrkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neuritogenesis. *J Cell Biol.* 136: 375-88.
- Benedetti M, Levi A, Chao MV. 1993. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 7859-63.
- Bentley CA, Lee KF. 2000. p75 is important for axon growth and Schwann cell migration during development. *J Neurosci.* 20: 7706-15.
- Bentley KL, Bradshaw MS, Ruddle FH. 1995. Human HOXB cluster and the nerve growth factor receptor gene: comparison with an orthologous chromosomal domain in mouse. *Genomics* 30: 18-24.
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA. 1999. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.* 18: 616-22.
- Bibel M., Barde Y.-A. 2000. Neurophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 14: 2919-37.
- Bilderback TR, Grigsby RJ, Dobrowsky RT. 1997. Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae. *J Biol Chem.* 272: 10922-7.
- Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci.* 27: 19-26.
- Brann AB, Scott R, Neuberger Y, Abulafia D, Boldin S, Fainzilber M, Futerman AH. 1999. Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 19: 8199-206.
- Brann AB, Tcherpakov M, Williams IM, Futerman AH, Fainzilber M. 2002. Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem.* 277: 9812-8.
- Brene S, Messer C, Okado H, Hartley M, Heinemann SF, Nestler EJ. 2000. Regulation of GluR2 promoter activity by neurotrophic factors via a neuron-restrictive silencer element. *Eur J Neurosci.* 12: 1525-33.
- Bunone G, Mariotti A, Compagni A, Morandi E, Della Valle G. 1997. Induction of apoptosis by p75 neurotrophin receptor in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 14: 1463-70.
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. 1996. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383: 443-6.

- Carroll RC, Beattie EC, von Zastrow M, Malenka RC. 2001. Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2: 315-24.
- Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde YA. 1996. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272: 542-5.
- Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV. 1996. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383: 716-9.
- Casademunt E, Carter BD, Benzel I, Frade JM, Dechant G, Barde YA. 1999. The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J.* 18: 6050-61.
- Chandler CE, Parsons LM, Hosang M, Shooter EM. 1984. A monoclonal antibody modulates the interaction of nerve growth factor with PC12 cells. *J Biol Chem.* 259: 6882-9.
- Charrasse S, Jehan F, Confort C, Brachet P, Clos J. 1992. Thyroid hormone promotes transient nerve growth factor synthesis in rat cerebellar neuroblasts. *Dev Neurosci.* 14: 282-9.
- Chiba H, Chambon P, Metzger D. 2000. F9 embryonal carcinoma cells engineered for tamoxifen-dependent Cre-mediated site-directed mutagenesis and doxycycline-inducible gene expression. *Exp Cell Res.* 260: 334-9.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-12.
- Chittka A, Chao MV. 1999. Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 10705-10.
- Choi YH, Kim KB, Kim HH, Hong GS, Kwon YK, Chung CW, Park YM, Shen ZJ, Kim BJ, Lee SY, Jung YK. 2001. FLASH coordinates NF-kappa B activity via TRAF2. *J Biol Chem.* 276: 25073-7.
- Cohen-Cory S, Fraser SE. 1995. Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature* 378: 192-6.
- Cooke EL, Uings IJ, Xia CL, Woo P, Ray KP. 2001. Functional analysis of the interleukin-1-receptor-associated kinase (IRAK-1) in interleukin-1 beta-stimulated nuclear factor kappa B (NF-kappa B) pathway activation: IRAK-1 associates with the NF-kappa B essential modulator (NEMO) upon receptor stimulation. *Biochem J.* 359: 403-10.
- Corbin JG, Kelly D, Rath EM, Baerwald KD, Suzuki K, Popko B. 1996. Targeted CNS expression of interferon-gamma in transgenic mice leads to hypomyelination, reactive gliosis, and abnormal cerebellar development. *Mol Cell Neurosci.* 7: 354-70.

- Della-Bianca V, Rossi F, Armato U, Dal-Pra I, Costantini C, Perini G, Politi V, Della Valle G. 2001. Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126). *J Biol Chem.* 276: 38929-33.
- Devergne O, Hatzivassiliou E, Izumi KM, Kaye KM, Kleijnen MF, Kieff E, Mosialos G. 1996. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol.* 16: 7098-108.
- DiStefano PS, Johnson EM Jr. 1988. Nerve growth factor receptors on cultured rat Schwann cells. *J Neurosci.* 8: 231-41.
- Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao MV, Hannun YA. 1994. Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 265: 1596-9.
- Dostaler SM, Ross GM, Myers SM, Weaver DF, Ananthanarayanan V, Riopelle RJ. 1996. Characterization of a distinctive motif of the low molecular weight neurotrophin receptor that modulates NGF-mediated neurite growth. *Eur J Neurosci.* 8: 870-9.
- Duckett CS, Gedrich RW, Gilfillan MC, Thompson CB. 1997. Induction of nuclear factor kappaB by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. *Mol Cell Biol.* 17: 1535-42.
- Eggert A, Sieverts H, Ikegaki N, Brodeur GM. 2000. p75 mediated apoptosis in neuroblastoma cells is inhibited by expression of TrkA. *Med Pediatr Oncol.* 35: 573-6.
- Ehrhard PB, Ganter U, Schmutz B, Bauer J, Otten U. 1993. Expression of low-affinity NGF receptor and trkB mRNA in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 330: 287-92.
- Eide FF, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY, Reichardt LF. 1996. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci.* 16: 3123-9.
- Estrach S, Schmidt S, Diriong S, Penna A, Blangy A, Fort P, Debant A. 2002. The Human Rho-GEF trio and its target GTPase RhoG are involved in the NGF pathway, leading to neurite outgrowth. *Curr Biol.* 12: 307-12.
- Fainzilber M, Smit AB, Syed NI, Wildering WC, Hermann, van der Schors RC, Jimenez C, Li KW, van Minnen J, Bulloch AG, Ibanez CF, Geraerts WP. 1996. CRNF, a molluscan neurotrophic factor that interacts with the p75 neurotrophin receptor. *Science* 274: 1540-3.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20: 847-54.
- Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA. 1996. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383: 166-8.

- Frade JM, Barde YA. 1999. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord. *Development* 126: 683-90.
- Frade JM. 2000. Unscheduled re-entry into the cell cycle induced by NGF precedes cell death in nascent retinal neurons. *J Cell Sci.* 113: 1139-48.
- Friedman WJ. 2000. Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci.* 20: 6340-6.
- Fryer RH, Kaplan DR, Feinstein SC, Radeke MJ, Grayson DR, Kromer LF. 1996. Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain. *J Comp Neurol.* 374 :21-40.
- Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. 1996. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16: 19-27.
- Giovannelli A, Limatola C, Ragozzino D, Mileo AM, Ruggieri A, Ciotti MT, Mercanti D, Santoni A, Eusebi F. 1998. CXC chemokines interleukin-8 (IL-8) and growth-related gene product alpha (GROalpha) modulate Purkinje neuron activity in mouse cerebellum. *J Neuroimmunol.* 92: 122-32.
- Gossen M, Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 5547-51.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268: 1766-9.
- Grell M, Zimmermann G, Hulser D, Pfizenmaier K, Scheurich P. 1994. TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *J Immunol.* 153: 1963-72.
- Hallbook F. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. 1999. *Curr Opin Neurobiol.* 9: 616-21.
- Hamanou M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT, Davies AM. 1999. p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci.* 14: 28-40.
- Harrington AW, Kim JY, Yoon SO. 2002. Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci.* 22: 156-66.
- Harris BZ, Lim WA. 2001. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci.* 114: 3219-31.
- Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. 1991. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350: 678-83.

- Hempstead BL. The many faces of p75(NTR). 2002. *Curr Opin Neurobiol.* 12: 260-7.
- Hernandez-Caselles T, Stutman O. 1993. Immune functions of tumor necrosis factor. I. Tumor necrosis factor induces apoptosis of mouse thymocytes and can also stimulate or inhibit IL-6-induced proliferation depending on the concentration of mitogenic costimulation. *J Immunol.* 151: 3999-4012.
- Heumann R, Lindholm D, Bandtlow C, Meyer M, Radeke MJ, Misko TP, Shooter E, Thoenen H. 1987. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84: 8735-9.
- Higashijima T, Uzu S, Nakajima T, Ross EM. 1988. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J Biol Chem.* 263: 6491-4.
- Higashijima T, Ross EM. 1991. Mapping of the mastoparan-binding site on G proteins. Cross-linking of [125I-Tyr³,Cys¹¹]mastoparan to Go. *J Biol Chem.* 266: 12655-61.
- Hummeler E, Cole TJ, Blendy JA, Ganss R, Aguzzi A, Schmid W, Beermann F, Schutz G. 1994. Targeted mutation of the CREB gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 5647-51.
- Huang EJ, Reichardt LF. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 24: 677-736.
- Hutson LD, Bothwell M. 2001. Expression and function of *Xenopus laevis* p75(NTR) suggest evolution of developmental regulatory mechanisms. *J Neurobiol.* 49: 79-98.
- Ibanez CF. 1998. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 21: 438-44.
- Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K, Yonehara S. 1999. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* 398: 777-85.
- Irie S, Hachiya T, Rabizadeh S, Maruyama W, Mukai J, Li Y, Reed JC, Bredesen DE, Sato TA. Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* 460: 191-8.
- Jaaro H, Beck G, Conticello SG, Fainzilber M. 2001. Evolving better brains: a need for neurotrophins? *Trends Neurosci.* 24: 79-85.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. 1996. Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol.* 133: 1041-51.
- Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH. 1994. Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell*

Biol. 126: 801-10.

- Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M. 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47: 545-54.
- Johnson EM Jr, Taniuchi M, DiStefano PS. 1988. Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends Neurosci.* 11: 299-304.
- Jungbluth S, Bailey K, Barde YA. 1994. Purification and characterisation of a brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-3 (BDNF/NT-3) heterodimer. *Eur J Biochem.* 221: 677-85.
- Kanning KC, Amieux PS, Bothwell MA. 2001. Identification of novel p75NTR homologues reveals a subfamily of the TNF receptor superfamily with early evolutionary origins. *Soc Neurosci Abstr.* 695.15
- Khursigara G, Orlinick JR, Chao MV. 1999. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem.* 274: 2597-600.
- Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV. 2001. A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci.* 21: 5854-63.
- Kimura MT, Irie S, Shoji-Hoshino S, Mukai J, Nadano D, Oshimura M, Sato TA. 2001. 14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 276: 17291-300.
- Kimpinski K, Jelinski S, Mearow K. 1999. The anti-p75 antibody, MC192, and brain-derived neurotrophic factor inhibit nerve growth factor-dependent neurite growth from adult sensory neurons. *Neuroscience* 93: 253-63.
- Klein R, Conway D, Parada LF, Barbacid M. 1990. The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 61: 647-56.
- Koch G, Haberman B, Mohr C, Just I, Aktories K. 1991. Interaction of mastoparan with the low molecular mass GTP-binding proteins rho/rac. *FEBS Lett.* 291: 336-40.
- Kohn J, Aloyz RS, Toma JG, Haak-Frendscho M, Miller FD. 1999. Functionally antagonistic interactions between the TrkA and p75 neurotrophin receptors regulate sympathetic neuron growth and target innervation. *J Neurosci.* 19: 5393-408.
- Kong H, Boulter J, Weber JL, Lai C, Chao MV. 2001. An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors. *J Neurosci.* 21: 176-85.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. 1995. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 8856-60.
- Korte M, Bonhoeffer T. 1997. Activity-dependent synaptic plasticity: a new face of action for neurotrophins. *Mol Psychiatry* 2: 197-9.

- Kuhn TB, Meberg PJ, Brown MD, Bernstein BW, Minamide LS, Jensen JR, Okada K, Soda EA, Bamberg JR. 2000. Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases. *J Neurobiol.* 44: 126-44.
- Ladiwala U, Lachance C, Simoneau SJ, Bhakar A, Barker PA, Antel JP. 1998. p75 neurotrophin receptor expression on adult human oligodendrocytes: signaling without cell death in response to NGF. *J Neurosci.* 18: 1297-304.
- Lang P, Gesbert F, Delespine-Carmagnat M, Stancou R, Pouchelet M, Bertoglio J. 1996. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* 15: 510-9.
- Langevin C, Jaaro H, Bressanelli S, Fainzilber M, Tuffereau C. 2002. Rabies virus glycoprotein (RVG) is a trimeric ligand for the N-terminal cysteine-rich domain of the mammalian p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem.* Aug 5 [epub ahead of print]
- Lee KF, Li E, Huber LJ, Landis SC, Sharpe AH, Chao MV, Jaenisch R. 1992. Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell* 69: 737-49.
- Lee KF, Bachman K, Landis S, Jaenisch R. 1994. Dependence on p75 for innervation of some sympathetic targets. *Science* 263: 1447-9.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. 2001. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294: 1945-8.
- Levi-Montalcini R. 1966. The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lect.* 60: 217-59.
- Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF. 1997. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* 16: 4999-5005.
- Limatola C, Ciotti MT, Mercanti D, Vacca F, Ragozzino D, Giovannelli A, Santoni A, Eusebi F, Miledi R. 2000. The chemokine growth-related gene product beta protects rat cerebellar granule cells from apoptotic cell death through alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 6197-201.
- Lindeberg J, Ebendal T. 1999. Use of an internal ribosome entry site for bicistronic expression of Cre recombinase or rtTA transactivator. *Nucleic Acids Res.* 27: 1552-4.
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87: 565-76.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501.
- Luo L. 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 1: 173-80.

- Luthi A, Chittajallu R, Duprat F, Palmer MJ, Benke TA, Kidd FL, Henley JM, Isaac JT, Collingridge GL. 1999. Hippocampal LTD expression involves a pool of AMPARs regulated by the NSF-GluR2 interaction. *Neuron* 24: 389-99.
- Mahanthappa NK, Anton ES, Matthew WD. 1996. Glial growth factor 2, a soluble neuregulin, directly increases Schwann cell motility and indirectly promotes neurite outgrowth. *J Neurosci.* 16: 4673-83.
- Malinow R, Malenka RC. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 25: 103-26.
- Malorni W, Rainaldi G, Tritarelli E, Rivabene R, Cianfriglia M, Lehnert M, Donelli G, Peschele C, Testa U. 1996. Tumor necrosis factor alpha is a powerful apoptotic inducer in lymphoid leukemic cells expressing the P-170 glycoprotein. *Int J Cancer.* 67: 238-47.
- Mamidipudi V, Li X, Wooten MW. 2002. Identification of Interleukin 1 Receptor-associated Kinase as a Conserved Component in the p75-Neurotrophin Receptor Activation of Nuclear Factor-kappa B. *J Biol Chem.* 277: 28010-8.
- Majdan M, Lachance C, Gloster A, Aloyz R, Zeindler C, Bamji S, Bhakar A, Belliveau D, Fawcett J, Miller FD, Barker PA. 1997. Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 17: 6988-98.
- McAllister AK, Lo DC, Katz LC. 1995. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15: 791-803.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. 1997. Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron* 18: 767-78.
- McCarthy JV, Ni J, Dixit VM. 1998. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem.* 273: 16968-75.
- Middlemas DS, Lindberg RA, Hunter T. 1991. trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol.* 11: 143-53.
- Milner R, Wilby M, Nishimura S, Boylen K, Edwards G, Fawcett J, Streuli C, Pytela R, French-Constant C. 1997. Division of labor of Schwann cell integrins during migration on peripheral nerve extracellular matrix ligands. *Dev Biol.* 185: 215-28.
- Minichiello L, Casagrande F, Tatche RS, Stucky CL, Postigo A, Lewin GR, Davies AM, Klein R. 1998. Point mutation in trkB causes loss of NT4-dependent neurons without major effects on diverse BDNF responses. *Neuron* 21: 335-45.
- Minichiello L, Korte M, Wolfner D, Kuhn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R. 1999. Differential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24: 401-14.

- Morgan L, Jessen KR, Mirsky R. 1991. The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: progression from an early phenotype (04+) to a myelin phenotype (P0+, GFAP-, N-CAM-, NGF-receptor-) depends on growth inhibition. *J Cell Biol.* 112: 457-67.
- Morgan L, Jessen KR, Mirsky R. 1994. Negative regulation of the P0 gene in Schwann cells: suppression of P0 mRNA and protein induction in cultured Schwann cells by FGF2 and TGF beta 1, TGF beta 2 and TGF beta 3. *Development* 120: 1399-409.
- Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, Suvanto P, Hanaoka T, Li Y, Irie S, Greene LA, Sato TA. 2000. NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem.* 275: 17566-70.
- Muller Y, Duperray C, Caruso F, Clos J. 1994. Autocrine regulation of proliferation of cerebellar granule neurons by nerve growth factor. *J Neurosci Res.* 38: 41-55.
- Muller Y, Tangre K, Clos J. 1997. Autocrine regulation of apoptosis and bcl-2 expression by nerve growth factor in early differentiating cerebellar granule neurons involves low affinity neurotrophin receptor. *Neurochem Int.* 31: 177-91.
- Myers SJ, Peters J, Huang Y, Comer MB, Barthel F, Dingledine R. 1998. Transcriptional regulation of the GluR2 gene: neural-specific expression, multiple promoters, and regulatory elements. *J Neurosci.* 18: 6723-39.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. 1997. *Cell* 88: 355-65.
- Nakai Y, Irie S, Sato TA. 2000. Identification of IkappaBalpha as a substrate of Fas-associated phosphatase-1. *Eur J Biochem.* 267: 7170-5.
- Nakajima T, Ichii S, Furuyama J, Tamaoki T, Hashimoto T. 1996. A new alternative splice variant of the mouse Fas antigen with a deletion in the N-terminal portion of the extracellular domain. *Life Sci.* 58: 761-8.
- Nakano H, Oshima H, Chung W, Williams-Abbott L, Ware CF, Yagita H, Okumura K. 1996. TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor. *J Biol Chem.* 271: 14661-4.
- Nakayama AY, Harms MB, Luo L. 2000. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 20: 5329-38.
- Narumiya S, Sekine A, Fujiwara M. 1988. Substrate for botulinum ADP-ribosyltransferase, Gb, has an amino acid sequence homologous to a putative rho gene product. *J Biol Chem.* 263: 17255-7.
- Naumann T, Casademunt E, Hollerbach E, Hofmann J, Dechant G, Frotscher M, Barde YA. 2002. Complete deletion of the neurotrophin receptor p75NTR leads to long-lasting increases in the number of basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurosci.* 22: 2409-18.

- Neumann H, Misgeld T, Matsumuro K, Wekerle H. 1998. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 5779-84.
- Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde YA. 2002. Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. *J Neurosci.* 22: 854-62.
- Ninkina N, Adu J, Fischer A, Pinon LG, Buchman VL, Davies AM. 1996. Expression and function of TrkB variants in developing sensory neurons. *EMBO J.* 15: 6385-93.
- Noel J, Ralph GS, Pickard L, Williams J, Molnar E, Uney JB, Collingridge GL, Henley JM. 1999. Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. *Neuron* 23: 365-76.
- Olenik C, Barth H, Just I, Aktories K, Meyer DK. 1997. Gene expression of the small GTP-binding proteins RhoA, RhoB, Rac1, and Cdc42 in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 52: 263-9.
- Pagliacci MC, Fumi G, Migliorati G, Grignani F, Riccardi C, Nicoletti I. 1993. Cytostatic and cytotoxic effects of tumor necrosis factor alpha on MCF-7 human breast tumor cells are differently inhibited by glucocorticoid hormones. *Lymphokine Cytokine Res.* 12: 439-47.
- Pahl HL, Baeuerle PA. 1995. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J.* 14: 2580-8.
- Pahl HL, Baeuerle PA. 1997. The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends Biochem Sci.* 22: 63-7.
- Patapoutian A, Reichardt LF. 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 11: 272-80.
- Puls A, Eliopoulos AG, Nobes CD, Bridges T, Young LS, Hall A. 1999. Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J Cell Sci.* 112: 2983-92.
- Purves D. *Body and Brain: A Trophic Theory of Neural Connections.* Harvard University Press, 1988
- Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE. 1993. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261: 345-8.
- Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM. 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* 325: 593-7.
- Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, Watanabe G, Watanabe N, Fujisawa K, Morii N, Madaule P, Narumiya S. 1996. Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem.* 271: 13556-60.

- Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 18: 578-85.
- Renshaw MW, Toksoz D, Schwartz MA. 1996. Involvement of the small GTPase rho in integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 271: 21691-4.
- Ridley AJ. Rho. In: Hall A. (Ed.) *GTPases. Frontiers in Molecular Biology (24)*, IRL Press at Oxford University Press, 2000
- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA. 1990. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4: 487-92.
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. 1994. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78: 681-92.
- Roux P, Barker P. 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.* 67: 203.
- Ruit KG, Osborne PA, Schmidt RE, Johnson EM Jr, Snider WD. 1990. Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology and survival in the adult mouse. *J Neurosci.* 10: 2412-9.
- Salehi AH, Roux PP, Kubu CJ, Zeindler C, Bhakar A, Tannis LL, Verdi JM, Barker PA. 2000. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 27: 279-88.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. 1999. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol.* 147: 1009-22.
- Schlegel A, Lisanti MP. 2001. The caveolin triad: caveolae biogenesis, cholesterol trafficking, and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12: 41-51.
- Schoenherr CJ, Anderson DJ. 1995. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* 267: 1360-3.
- Scholl T, Stevens MB, Mahanta S, Strominger JL. 1996. A zinc finger protein that represses transcription of the human MHC class II gene, DPA. *J Immunol.* 156: 1448-57.
- Schuman EM. 1999. Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol.* 9: 105-9.
- Sekiguchi M, Shiroko Y, Suzuki T, Imada M, Miyahara M, Fujii G. 1985. Characterization of a human rhabdomyosarcoma cell strain in tissue culture. *Biomed Pharmacother.* 39: 372-80.

- Selmaj K, Raine CS, Farooq M, Norton WT, Brosnan CF. 1991. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol.* 147: 1522-9.
- Serafeim A, Gordon J. 2001. The immune system gets nervous. *Curr Opin Pharmacol.* 1: 398-403.
- Shih SC, Stutman O. 1996. Cell cycle-dependent tumor necrosis factor apoptosis. *Cancer Res.* 56: 1591-8.
- Shikama Y, Shen L, Yonetani M, Miyauchi J, Miyashita T, Yamada M. 2002. Death effector domain-only polypeptides of caspase-8 and -10 specifically inhibit death receptor-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 291: 484-93.
- Skaper SD. 2001. Nerve growth factor: a neurokinine orchestrating neuroimmune-endocrine functions. *Mol Neurobiol.* 24: 183-99.
- Soilu-Hanninen M, Ekert P, Bucci T, Syroid D, Bartlett PF, Kilpatrick TJ. 1999. Nerve growth factor signaling through p75 induces apoptosis in Schwann cells via a Bcl-2-independent pathway. *J Neurosci.* 19: 4828-38.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* 67:227-64.
- Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. 1994. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem.* 63:101-32.
- Strohmaier C, Carter BD, Urfer R, Barde YA, Dechant G. 1996. A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.* 15: 3332-7.
- Susen K, Heumann R, Blochl A. 1999. Nerve growth factor stimulates MAPK via the low affinity receptor p75(LNTR). *FEBS Lett.* 463: 231-4.
- Syroid DE, Maycox PJ, Soilu-Hanninen M, Petratos S, Bucci T, Burrola P, Murray S, Cheema S, Lee KF, Lemke G, Kilpatrick TJ. 2000. Induction of postnatal schwann cell death by the low-affinity neurotrophin receptor in vitro and after axotomy. *J Neurosci.* 20: 5741-7.
- Tanaka H, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS. 2000. The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. *Brain Res.* 886: 190-207.
- Tanaka S, Sekino Y, Shirao T. 2000. The effects of neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor on cerebellar granule cell movement and neurite extension in vitro. *Neuroscience* 97: 727-34.
- Taniuchi M, Clark HB, Johnson EM Jr. 1986. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 4094-8.
- Thoenen H. 1995. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270: 593-8.

- Tibbles LA, Woodgett JR. 1999. The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci.* 55: 1230-54.
- Troy CM, Friedman JE, Friedman WJ. 2002. Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons: Role of caspases. *J Biol Chem.* Jul 3 [epub ahead of print]
- Tucker KL, Meyer M, Barde YA. 2001. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci.* 4: 29-37.
- Tuffereau C, Benejean J, Blondel D, Kieffer B, Flamand A. 1998. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.* 17: 7250-9.
- Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W. 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 7963-8.
- van Kesteren RE, Fainzilber M, Hauser G, van Minnen J, Vreugdenhil E, Smit AB, Ibanez CF, Geraerts WP, Bulloch AG. 1998. Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. *EMBO J.* 17: 2534-42.
- Varani J, Orr W, Ward PA. 1978. A comparison of the migration patterns of normal and malignant cells in two assay systems. *Am J Pathol.* 90: 159-71.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 184: 39-51.
- Verity AN, Bredesen D, Vonderscher C, Handley VW, Campagnoni AT. 1993. Expression of myelin protein genes and other myelin components in an oligodendrocytic cell line conditionally immortalized with a temperature-sensitive retrovirus. *J Neurochem.* 60: 577-87.
- Volmat V, Pouyssegur J. 2001. Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. *Biol Cell.* 93: 71-9.
- Volonte C, Angelastro JM, Greene LA. 1993. Association of protein kinases ERK1 and ERK2 with p75 nerve growth factor receptors. *J Biol Chem.* 268: 21410-5.
- von Schack D, Casademunt E, Schweigreiter R, Meyer M, Bibel M, Dechant G. 2001. Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nat Neurosci.* 4: 977-8.
- Walsh GS, Krol KM, Crutcher KA, Kawaja MD. 1999. Enhanced neurotrophin-induced axon growth in myelinated portions of the CNS in mice lacking the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci.* 19: 4155-68.
- Wang X, Bauer JH, Li Y, Shao Z, Zetoune FS, Cattaneo E, Vincenz C. 2001. Characterization

- of a p75(NTR) apoptotic signaling pathway using a novel cellular model. *J Biol Chem.* 276: 33812-20.
- White JG, Southgate E, Thomas JN and Brenner S. 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. Royal Soc. Lon.* 314B: 1-340.
- Williams RW, Herrup K. 1988. The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci.* 11:423-53.
- Wojciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley AJ. 1998. Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 176: 150-65.
- Yaar M, Zhai S, Fine RE, Eisenhauer PB, Arble BL, Stewart KB, Gilchrest BA. 2002. Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling. *J Biol Chem.* 277: 7720-5.
- Yamashita T, Tucker KL, Barde YA. 1999. Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24: 585-93.
- Yamashita T, Higuchi H, Tohyama M. 2002. The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J Cell Biol.* 157: 565-70.
- Yan Q, Johnson EM Jr. 1987. A quantitative study of the developmental expression of nerve growth factor (NGF) receptor in rats. *Dev Biol.* 121: 139-48.
- Yang B, Slonimsky JD, Birren SJ. 2002. A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nat Neurosci.* 5: 539-45.
- Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, Shin H, Wang JJ, Leo E, Zapata J, Hauser CA, Reed JC, Bredesen DE. 1999. TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem.* 274: 30202-8.
- Yoon SO, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chao MV. 1998. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci.* 18: 3273-81.
- Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR. *Fundamental Neuroscience.* Academic Press, 1999

8 DANKSAGUNG

Als Erstes möchte ich Prof. Yves-Alain Barde aufrichtig dafür danken, dass er mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir eine Möglichkeit zur Promotion geboten hat. Ganz besonders bin ich ihm dankbar dafür, dass er meine Arbeit stets mit großem Interesse verfolgt hat, immer und auch ganz spontan bereit war für ein Gespräch, mir sehr viel Freiraum bei der Projektführung gewährt hat und durch die Zeit so viel Geduld für meine Sache aufgebracht hat.

Weiters möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen in München und Basel danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Speziellen möchte ich erwähnen:

Prof. Georg Dechant; er hat mir in seiner Gruppe „Asyl“ gewährt vor meinem Umzug nach Basel. Auch war er stets ein interessierter Zuhörer und wertvoller Kommentator diverser Probleme aber auch mancher Durchbrüche.

PD Dr. Magdalena Götz; auch sie hat mir „Asyl“ gewährt vor meinem Umzug (in ihrem Kühlraum – war für meine Experimente sehr wertvoll). Darüber hinaus hatte sie auch immer ein offenes Ohr für die Fort- und Rückschritte meiner Arbeit.

Dr. Elisabeth Casademunt; sie hat meine Arbeit immer gefördert und dabei auch sehr viel Geduld aufgebracht.

Dr. Theologos Michaelidis; mein Betreuer zu Beginn meiner Doktorarbeit. Von ihm, ebenso wie von Dr. Harry Schnürch, habe ich einige spezielle Tricks, die nicht im ‘Maniatis’ stehen.

Lothar Lindemann; ein sehr netter Laborkollege, stets bereit, einen Durchbruch zu bewundern oder über eine Hürde mit viel Fachkompetenz hinwegzuhelfen.

Dr. Ed Oakeley; ohne ihn hätte es die Microarray-Daten nicht gegeben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Familie und meinen Freunden, für fortwährende Unterstützung in dynamischen Zeiten.

9 LEBENS LAUF

Name	Rüdiger Schweigreiter
Geburtsdatum	29.08.1971
Geburtsort	Bad Aussee
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Österreich

Schulbildung

1976-1980	Volksschule Stainach
1980-1989	Bundesgymnasium Stainach (Reifeprüfung 06/1989)

Studium

10/1989-06/1992	Grundstudium der Biologie an der Karl-Franzens-Universität Graz (Erste Diplomprüfung 06/1992)
10/1991-12/1996	Hauptstudium der Genetik mit Nebenfach Biochemie an der Universität Wien (Zweite Diplomprüfung 12/1996)
07/1995-07/1996	Diplomarbeit am Forschungsinstitut für Molekulare Pathologie (I.M.P.) in Wien unter der Leitung von Dr. Gerhard Christofori
01/1997	Beginn der Dissertation am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in der Abteilung Neurobiochemie in Martinsried/München unter der Leitung von Prof. Yves-Alain Barde
seit 04/2001	Fortführung der Dissertation unter der Leitung von Prof. Yves-Alain Barde am Friedrich Miescher- Institut (F.M.I.) in Basel

