

# **Signaltransduktion des Neurotrophinrezeptors p75**

**durch die Zinkfingerproteine NRIF1 und NRIF2**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) der  
Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Durchgeführt am Max-Planck-Institut für Neurobiologie,  
Abteilung Neurobiochemie

Isabel Benzel

München, Februar 2001

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in der Abteilung von Prof. Dr. Yves-Alain Barde (Neurobiochemie) in Martinsried durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Elisabeth Casademunt, Bruce D. Carter, Isabel Benzel, José M. Frade, Georg Dechant und Yves-Alain Barde (1999). The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75<sup>NTR</sup> and participates in programmed cell death.

*The EMBO Journal* **18** (21), 6050-6061.

Eingereicht zur Beurteilung am 06. Februar 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. Yves-Alain Barde
2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Georg Dechant

Tag der mündlichen Prüfung: 23. März 2001

---

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

München, Februar 2001

Isabel Benzel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1	Neurotrophine	3
2.2	Rezeptoren der Neurotrophine	5
2.3	Signaltransduktion durch Neurotrophinrezeptoren	7
2.3.1	Die Trk-Rezeptor-Tyrosinkinasen	7
2.3.2	Der Neurotrophinrezeptor p75	9
2.3.3	Interaktion von p75 mit cytoplasmatischen Proteinen	11
2.4	Programmierter Zelltod	12
2.5	Aufgabenstellung	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
3.1	<b>Material</b>	<b>18</b>
3.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	18
3.1.2	Enzyme	19
3.1.3	Molekularbiologische "kits"	19
3.1.4	Bakterienstämme	19
3.1.5	Zelllinien	20
3.1.6	Mäuse	20
3.1.7	Plasmide	20
3.1.8	Oligonukleotide	21
3.1.9	Antikörper	22
3.1.10	Neurotrophine	23
3.1.11	Geräte	23
3.1.12	Kulturmedien und Antibiotika	24
3.1.13	Puffer und andere Lösungen	24
3.2	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>27</b>
3.2.1	Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> -Bakterien	27
3.2.2	Herstellung kompetenter Zellen nach Hanahan	27
3.2.3	Transformation von Bakterien	27
3.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
3.2.5	Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwänzen	28
3.2.6	Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen	28
3.2.7	Phenol-Chloroform-Extraktion	29
3.2.8	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	29
3.2.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarose-Gelen	29
3.2.10	<i>In vitro</i> -Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR	30
3.2.11	Klonierung von Expressionskonstrukten	33
3.2.12	Southern Blot-Analyse	34
3.2.13	RNA-Isolierung aus Zellen und Geweben	35
3.2.14	Northern Blot-Analyse	35
3.2.15	Reverse Transkription von RNA	36
3.2.16	„Screening“ einer cDNA-Bibliothek	36
3.2.17	<i>In vitro</i> -Transkription/Translation	37

<b>3.3</b>	<b>Proteinchemische und immunchemische Methoden</b>	<b>38</b>
3.3.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	38
3.3.2	Herstellung von Bakterienlysaten	39
3.3.3	Herstellung von Zellysaten	39
3.3.4	Immunpräzipitation von Proteinen	40
3.3.5	„Pull-Down“-Experiment	40
3.3.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	41
3.3.7	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue	41
3.3.8	Western Blot-Analyse	41
3.3.9	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	42
3.3.10	Dialyse	42
<b>3.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>43</b>
3.4.1	Kultivierung von Zelllinien	43
3.4.2	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	43
3.4.3	Immunfluoreszenz	44
3.4.4	BrdU-Markierung der DNA eukaryotischer Zellen	45
3.4.5	"Cell death detection" ELISA	45
3.4.6	WST-1-Zellproliferations-„Assay“	45
3.4.7	Herstellung primärer Mausfibroblasten	46
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Hintergrund des Projekts</b>	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>Klonierung der <i>nrif2</i>-cDNA</b>	<b>48</b>
4.2.1	Untersuchung einer cDNA-Bibliothek aus Maushirn	48
4.2.2	Klonierung des 5'-Endes von <i>nrif2</i> mittels 5'-RACE-PCR	50
4.2.3	Vergleich von NRIF1 und NRIF2	52
4.2.4	Genomische Struktur der <i>nrif</i> -Gene	55
<b>4.3</b>	<b>Biochemische Analyse von NRIF-Proteinen</b>	<b>57</b>
4.3.1	Expression von GST-NRIF2 in Bakterien	57
4.3.2	Biochemische Interaktionen von NRIF und p75	59
4.3.3	Einfluß von p75-Liganden auf die Interaktion mit NRIF	65
4.3.4	Wechselwirkung zwischen NRIF und RhoA	66
4.3.5	Dimerisierung von NRIF1 und NRIF2	68
<b>4.4</b>	<b>Subzelluläre Lokalisierung von NRIF und p75 in 293-Zellen</b>	<b>69</b>
4.4.1	Expression von NRIF und p75 in Fibroblasten-Zelllinien	69
4.4.2	Einfluß von NGF auf die subzelluläre NRIF-Lokalisierung	73
<b>4.5</b>	<b>NRIF als Auslöser von Apoptose</b>	<b>73</b>
4.5.1	DNA-Kondensierung	75
4.5.2	Quantifizierung freier Nukleosomen in Zellextrakten	75
4.5.3	Zellproliferations-„Assay“	76
<b>4.6</b>	<b>Analyse der <i>nrif2</i>-mRNA-Expression in der Maus</b>	<b>78</b>
4.6.1	Deletion des <i>nrif1</i> -Gens durch homologe Rekombination	78
4.6.2	Analyse der <i>nrif2</i> -mRNA-Expression im Sv129-Hintergrund	79
4.6.3	Kann NRIF2 das Fehlen von NRIF1 funktionell kompensieren?	82

<b>4.7 Einfluß von NRIF auf den Zellzyklus</b>	<b>84</b>
4.7.1 Versuche mit 293-Zellen	84
4.7.2 Versuche mit HN10-Zellen	87
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>89</b>
<b>5.1 Klonierung von <i>nrif2</i></b>	<b>89</b>
5.1.1 Häufigkeit von <i>nrif1</i> und <i>nrif2</i>	89
5.1.2 Differentielles Spleißen der 5'-untranslatierten Region	90
5.1.3 Vergleich von Maus-NRIF mit seinem humanen Homolog	92
<b>5.2 Funktionsweise des Transkriptionsfaktors NRIF</b>	<b>93</b>
5.2.1 Subzelluläre Lokalisierung von NRIF	93
5.2.2 Interaktion von NRIF mit sich selbst und anderen Kernproteinen	95
<b>5.3 p75-Signaltransduktion durch NRIF: Mechanismus und Konsequenzen</b>	<b>97</b>
5.3.1 Interaktion von NRIF und p75 und Vergleich zu analogen Systemen	97
5.3.2 Einfluß von NRIF auf Apoptose und Zellzyklus	102
<b>5.4 Funktion von NRIF2 in <i>nrif1</i>-transgenen Mäusen</b>	<b>104</b>
<b>5.5 Ausblick</b>	<b>108</b>
<b>6 ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE</b>	<b>109</b>
<b>7 ANHANG</b>	<b>111</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>113</b>

# 1 Zusammenfassung

Der Neurotrophinrezeptor p75 wurde als erstes Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie kloniert. Da die trophischen Eigenschaften der Neurotrophine durch eine zweite Klasse von Rezeptoren, die Trk-Rezeptor-Tyrosinkinasen, vermittelt werden, wurde p75 lange als deren „Corezeptor“ angesehen. Inzwischen gibt es viele Beweise für eine eigenständige Signaltransduktion durch p75, die beispielsweise zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B oder zu programmiertem Zelltod führen kann.

Zu Beginn dieser Arbeit war weitgehend unbekannt, wie der Neurotrophinrezeptor p75 apoptotische Signale im Inneren der Zelle weiterleitet. Unter Verwendung des Hefe-„Two-Hybrid“-Systems war im Vorfeld das Zinkfingerprotein NRIF1 („Neurotrophin Receptor Interacting Factor“) als potentieller p75-Interaktionspartner identifiziert worden. Die wichtige Rolle dieses Proteins als Vermittler von apoptotischen Signalen konnte später durch gezielte Deletion des *nrf1*-Gens in der Maus bestätigt werden: In *nrf1*-Nullmutanten wurde eine Reduktion des embryonalen Zelltodes von Nervenzellen der Netzhaut nachgewiesen, deren Ausmaß dem einer *p75*- oder *ngf* („Nerve Growth Factor“)-Deletion entsprach (Casademunt et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein zweites *nrf*-Gen (*nrf2*) kloniert, das zu über 90% mit *nrf1* identisch ist. Beide Proteine besitzen typische Strukturmerkmale negativ regulatorisch wirkender Transkriptionsfaktoren. Der carboxyterminale Abschnitt enthält fünf Zinkfinger des Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>-Typs, die eine Bindung an DNA vermitteln könnten, während der aminoternale Bereich zwei KRAB-Domänen enthält, die Transkriptionsrepressor-Module darstellen. Das *nrf2*-Gen wird im 5'-untranslatierten Bereich differentiell gespleißt.

Durch Experimente mit rekombinanten Proteinen aus *E. coli* und Fibroblasten-Zelllinien wurde die vermutete Interaktion von NRIF und p75 biochemisch nachgewiesen. Die Verwendung unterschiedlicher Deletionskonstrukte zeigte, daß für die Wechselwirkung nur die Juxtamembran-Domäne des Rezeptors und ein carboxyterminaler Abschnitt von NRIF (stromaufwärts der Zinkfinger) nötig sind. NRIF-Proteine können unter Bildung von Homo- und Heterodimeren mit sich selbst interagieren.

Die Colokalisierung von NRIF1 und NRIF2 bzw. NRIF und p75 nach transienter Transfektion von Fibroblasten-Zelllinien bestätigte die biochemisch nachgewiesenen Interaktionen auch *in vivo*.

Die Expression von NRIF in Zelllinien neuronalen Ursprungs offenbarte eine mögliche Funktion als Auslöser von Apoptose, welche unabhängig von p75 allein durch Überexpression dieser Zinkfingerproteine verursacht wurde. Außerdem war in NRIF-überexprimierenden Zellen der Einbau von BrdU, einem Thymidin-Analogen, das Zellen in der S-Phase des Zellzyklus markiert, stark eingeschränkt. Diese Funktionen von NRIF sind

besonders interessant, da in den letzten zwei Jahren weitere Adaptermoleküle des Neurotrophinrezeptors p75 identifiziert wurden, die einen Einfluß auf Apoptose und/oder den Ablauf des Zellzyklus besitzen.

p75 spielt insbesondere während des programmierten Zelltodes in der Entwicklung des Nervensystems eine wichtige Rolle und wird im Embryonalstadium am stärksten exprimiert. Die Analyse der mRNA-Expression von *nrif* bestätigte, daß auch *nrif1* und *nrif2* während der Embryonalentwicklung deutlich höher exprimiert sind als in adulten Mäusen. *Nrif*-mRNA wurde jedoch im Gegensatz zu *p75*-mRNA ubiquitär in allen untersuchten embryonalen Geweben nachgewiesen.

In weiterführenden Experimenten wurden transgene Mäusen untersucht, in denen das *nrif1*-Gen durch homologe Rekombination entfernt worden war. Diese Mäuse sind in einem kongenen Sv129- oder einem gemischten Sv129/BL6-Hintergrund lebensfähig und fertil, sterben jedoch im BL6-Hintergrund ungefähr am zwölften Embryonaltag. Die Hypothese, daß die *nrif2*-mRNA-Menge in überlebenden Tieren erhöht sein könnte, wurde zuerst in neugeborenen Sv129-Mäusen durch semiquantitative RT-PCR-Analysen bestätigt. Eine vergleichende Untersuchung 10,5 Tage alter Embryonen aus verschiedenen Stämmen deutete auf die Möglichkeit einer funktionellen Kompensation hin: Während in Nullmutanten des Sv129-Stammes die *nrif2*-mRNA-Konzentration ungefähr doppelt so hoch war wie in Wildtyp-Tieren, konnten BL6-Nullmutanten die *nrif2*-Menge nicht differentiell regulieren. Das Fehlen von NRIF1 und die gleichzeitige Unfähigkeit einer ausgleichenden Hochregulation von NRIF2 könnten ein wichtiger Grund für die embryonale Letalität der *nrif1* (-/-)-Embryonen im BL6-Stamm sein. Eine genau ausgewogene Menge der Zinkfingerproteine NRIF1 und NRIF2 scheint demnach essentiell zu sein, damit wichtige Prozesse wie Zellzyklus und Apoptose ungestört ablaufen können.

## 2 Einleitung

Extrazelluläre Signale regulieren in Vertebraten wichtige Entwicklungsprozesse wie Proliferation, Differenzierung, Zellmigration, Morphogenese und das Überleben oder Absterben von Zellen. Hierbei kann derselbe Faktor verschiedene Zellen unterschiedlich beeinflussen, d.h. die Antwort einer Zelle auf ein Signal ist vom Zellkontext und Entwicklungsstadium abhängig. Während der Entwicklung erhält eine Zelle gleichzeitig viele Informationen, die sie integrieren und in eine Reaktion umsetzen muß. Äußere Signale werden meistens von spezifischen Zelloberflächen-Rezeptoren aufgenommen und über unterschiedlichste Mechanismen im Inneren der Zelle weitergeleitet und verarbeitet. Da viele Krankheiten auf Störungen dieser Signaltransduktion zurückzuführen sind, sei es das unkontrollierte Wachstum von Zellen (Krebs) oder der frühzeitige Tod von Nervenzellen bei neurodegenerativen Erkrankungen, liegt ein Schwerpunkt der molekularbiologischen und biomedizinischen Forschung in der Aufklärung der Signalweiterleitung individueller Rezeptoren.

### 2.1 Neurotrophine

Bis auf wenige Ausnahmen werden Nervenzellen von Wirbeltieren nur während der Embryonalentwicklung neu gebildet, während beschädigte Nervenzellen, zumindest im zentralen Nervensystem, zu späteren Zeitpunkten weder regeneriert noch ersetzt werden können. Deshalb ist es besonders wichtig, daß die Entwicklung des Nervensystems sehr präzise abläuft, damit es seine Funktion während der langen Lebenszeit von Vertebraten erfüllen kann. Die Anzahl der Nervenzellen und die Art ihrer Verknüpfungen muß den jeweiligen Erfordernissen unterschiedlicher Zielgebiete genau angepaßt werden. Das innervierte Gewebe spielt hierbei eine zentrale Rolle, indem es über sezernierte Faktoren nur das Überleben einer gewissen Zahl von Zellen ermöglicht: Im Verlauf der Innervierung des Zielgewebes werden oft bis zu 50% der ursprünglich gebildeten Nervenzellen wieder eliminiert (Oppenheim, 1991). Der natürliche Zelltod im Nervensystem wird durch die Freisetzung trophischer Moleküle, sogenannter Nervenwachstumsfaktoren, reguliert. Am besten charakterisiert sind die Neurotrophine, welche das Absterben der Neuronen durch eine Blockade des „Selbstmordprogramms“ der Zelle verhindern und außerdem die Differenzierung und synaptische Erregungsübertragung zentraler und peripherer Neuronen regulieren (Bibel und Barde, 2000). Zur Familie der Neurotrophine gehören in Säugern neben dem zuerst identifizierten „Nerve Growth Factor“ (NGF) (Levi-Montalcini und Hamburger, 1953; Cohen, 1960) der „Brain-Derived Neurotrophic Factor“ (BDNF) (Barde et al., 1982; Hofer und Barde, 1988; Leibrock et al., 1989), Neurotrophin-3 (NT-3) (Ernfors et al., 1990; Hohn et al., 1990; Jones und

Reichart, 1990; Kaisho et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990; Rosenthal et al., 1990) und Neurotrophin-4/5 (Berkemeier et al., 1991; Hallböök et al., 1991; Ip et al., 1992).

Neurotrophine werden als Prä-Pro-Proteine synthetisiert und sind nach ihrer Prozessierung ungefähr 13 kDa groß. Die aktive, sezernierte Form ist ein nichtkovalent verknüpftes Homodimer. Die dreidimensionale Struktur der Neurotrophine (und einiger anderer Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- $\beta$ ) ist durch den „Cystine Knot“ gekennzeichnet, eine charakteristische Anordnung dreier intramolekularer Disulfidbrücken, die von sechs hochkonservierten Cysteinresten gebildet werden (McDonald et al., 1991; McDonald und Hendrickson, 1993; Ibanez, 1998).

Neurotrophine werden im Zielgebiet embryonaler Neuronen zum Zeitpunkt ihrer Innervierung in sehr geringen Mengen sezerniert. Es überleben nur Zellen, die ausreichende Mengen dieser Faktoren erhalten, während die anderen durch programmierten Zelltod absterben. Auf diese Weise wird die Zahl der Neuronen der Größe des Zielgewebes angepaßt. Die „neurotrophe Theorie“ konnte durch *in vivo* Versuche mit blockierenden Antikörpern (Cohen, 1960; Levi-Montalcini und Booker, 1960; Johnson et al., 1980 und 1983; Aloe et al., 1981; Rohrer et al., 1988) sowie durch gezielte Inaktivierung der Neurotrophingene und ihrer Rezeptoren in transgenen Mäusen vielfach verifiziert werden (Klein et al., 1993 und 1994; Crowley et al., 1994; Jones et al., 1994; Smeyne et al., 1994; Snider, 1994). Allerdings erfüllen Neurotrophine auch zahlreiche weitere wichtige Funktionen im Nervensystem (Bibel und Barde, 2000). Sie fördern beispielsweise die Differenzierung von Nervenzellen und das Auswachsen von Axonen und Dendriten (Purves, 1988), sind wichtig für die aktivitätsabhängige Plastizität des Nervensystems (Lo, 1995; Thoenen, 1995; Berninger und Poo, 1999; McAllister et al., 1999; Schuman, 1999; Hall et al., 2000) sowie die Funktion von Mechanorezeptoren (Carroll et al., 1998) und können außerdem die Migration von Schwann-Zellen beeinflussen (Anton et al., 1994; Bentley und Lee, 2000).

Da Neurotrophine auch in der Erhaltung und Reparatur des erwachsenen Nervensystems eine wichtige Rolle spielen, wurden hohe Erwartungen an ihren möglichen therapeutischen Nutzen für die Behandlung neuronaler Krankheiten (Alzheimer, Amyotrophe Lateralsklerose, Schlaganfall, chronischer Schmerz u.a.) gestellt. Klinische Studien verliefen jedoch bisher nahezu erfolglos (Saragovi und Gehring, 2000), was unter anderem auf die kurze biologische Halbwertszeit von Neurotrophinen *in vivo*, ungünstige Pharmakokinetik und unerwünschte pleiotrope Effekte zurückzuführen ist. Vielversprechender erscheint die Suche nach kleineren Molekülen, Neurotrophin-Mimetika, die als partielle Agonisten oder Antagonisten wirken (Xie et al., 2000), oder der Versuch die Transkription endogener Neurotrophine anzuregen.

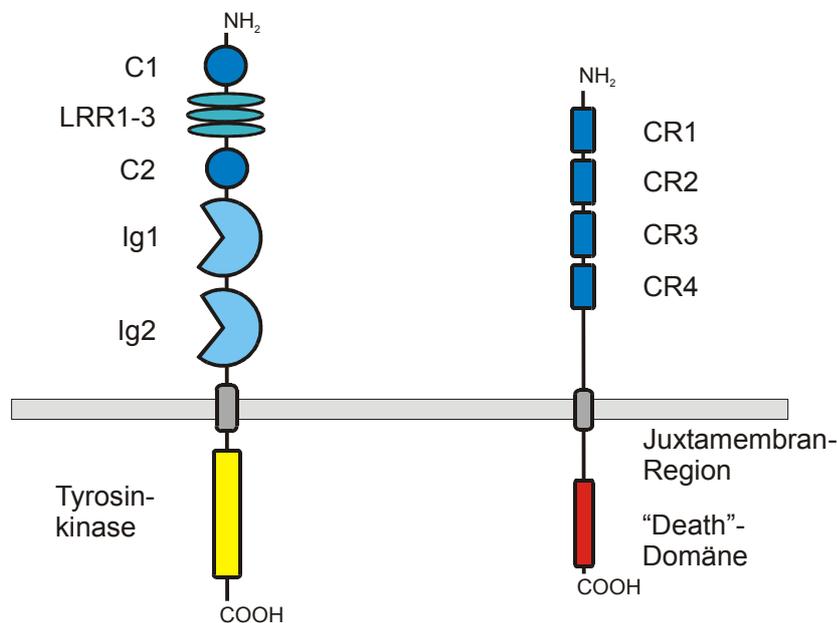
Interessanterweise wurden im Genom der Invertebraten *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* keine Neurotrophin-Homologen gefunden (Bargmann, 1998; Chao, 2000), obwohl viele andere Wachstumsfaktoren wie Insulin, EGF und FGF und deren Rezeptoren evolutionär konserviert sind. Diese Nervenwachstumsfaktoren scheinen also eher für die Etablierung und Aufrechterhaltung eines komplexen, langlebigen Nervensystems mit vielfältigen Leistungen (Plastizität, Gedächtnis) wichtig zu sein, während ein einfaches Nervensystem offensichtlich auch ohne solche Moleküle funktionieren kann.

## 2.2 Rezeptoren der Neurotrophine

Durch Studien mit radioaktiv markierten Liganden wurden zwei Typen von Bindungsstellen auf Neuronen identifiziert, deren Dissoziationskonstanten sich um zwei Zehnerpotenzen unterscheiden: hochaffine ( $K_d = 10^{-11}$  M) und niedrigaffine ( $K_d = 10^{-9}$  M) (Sutter et al., 1979; Rodriguez-Tébar und Barde, 1988; Rodriguez-Tébar et al., 1990). Sie beruhen auf dem Vorhandensein zweier Klassen von Zelloberflächenrezeptoren (Schechter und Bothwell, 1981), denn Neurotrophine können sowohl an „Trk“-Rezeptoren als auch an den Neurotrophinrezeptor p75 binden (Bothwell, 1995; Chao und Hempstead, 1995). Das Ergebnis der Signaltransduktion durch diese Rezeptoren kann stark vereinfacht als Vermittlung von Überlebenssignalen durch die Trk-Familie und Auslösung von Zelltod durch p75 dargestellt werden. Allerdings hängt die tatsächliche Wirkung vom zellulären Kontext und dem momentanen Entwicklungszustand einer Zelle ab (Dechant und Barde, 1997).

Die Trk-Rezeptoren („tropomyosin receptor kinase“) gehören zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase (Martin-Zanca et al., 1986 und 1990; Barbacid, 1994). Alle Trk-Rezeptoren besitzen eine ähnliche Domänenstruktur ihres extrazellulären Bereiches (Abb. 1), eine Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität. In Säugern wurden drei verschiedene Trk-Rezeptoren identifiziert, die jeweils von spezifischen Nervenzellpopulationen des peripheren und zentralen Nervensystems exprimiert werden. TrkA (Hempstead et al., 1991; Kaplan et al., 1991; Klein et al., 1991a) ist spezifisch für NGF, während BDNF und NT-4/5 bevorzugt an TrkB binden (Klein et al., 1991b; Soppet et al., 1991; Squinto et al., 1991). NT3 ist der Ligand für TrkC (Lamballe et al., 1991), kann jedoch mit geringerer Affinität auch an die anderen Trk-Rezeptoren binden (Barbacid, 1994). Die gezielte Mutation des TrkC-Rezeptors in transgenen Mäusen hat deshalb einen weniger starken Effekt als das Fehlen von NT-3, da letzteres seine Funktion *in vivo* zumindest teilweise über Aktivierung anderer Rezeptoren erfüllen kann (Snider, 1994; Davies et al., 1995).

Der Neurotrophinrezeptor p75 (Johnson et al., 1986; Radeke et al., 1987) bindet alle Neurotrophine mit vergleichsweise niedriger Affinität ( $10^{-9}$  M; Rodriguez-Tébar et al., 1990). Über seine genaue biologische Funktion herrschte lange Zeit Unklarheit, da die Trk-Rezeptoren alleine für die anti-apoptotischen Eigenschaften der Neurotrophine verantwortlich zu sein schienen (2.3.1). Allerdings bestehen die hochaffinen Neurotrophin-Bindungsstellen auf Nervenzellen wahrscheinlich aus einem Komplex aus Trk und p75 (Hempstead et al., 1991), so daß eine Funktion als „Co-Rezeptor“ und Modulator als die wichtigste Aufgabe von p75 angenommen wurde (Segal und Greenberg, 1996). p75 wurde als erstes Mitglied der wachsenden „TNF-Rezeptor-Superfamilie“ kloniert (Johnson et al., 1986; Radeke et al., 1987; vgl. Abschnitt 2.4). Die Liganden anderer Mitglieder dieser Superfamilie sind im Unterschied zu den löslichen, dimeren Neurotrophinen trimere Proteine, die häufig membranverankert sind.



**Abb. 1: Schematische Struktur der Neurotrophin-Rezeptoren**

Trk-Rezeptoren (links) sind ungefähr 140 kDa groß und besitzen eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, eine Transmembrandomäne und einen intrazellulären Bereich mit Tyrosinkinase-Aktivität. In der extrazellulären Domäne befinden sich mehrere charakteristische Strukturmerkmale: zwei Cystein-„Cluster“ (C1, C2), eine Wiederholung Leucin-reicher Motive (LRR1-3) und zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen (Ig1, Ig2).

Die glykosylierte extrazelluläre Domäne des Rezeptors p75 (rechts) enthält vier der für die TNF-Rezeptor-Superfamilie typischen Cystein-reichen Domänen. Der intrazelluläre Bereich besitzt keine katalytische Aktivität. (Weitere Erklärungen im Text).

p75 besitzt im intrazellulären Bereich eine „Death“-Domäne, die zwar nur geringe Sequenzhomologien zu entsprechenden Bereichen des TNFR1 oder FasR aufweist, aber sehr ähnlich gefaltet ist (Chapman, 1995; Liepinsh et al., 1997). Diese Domäne ermöglicht bei anderen Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie eine Interaktion mit „Death“-Domänenhaltigen Adapter-Proteinen (FADD, TRADD), was letztendlich zur Induktion von Zelltod führt

(Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993; Feinstein et al., 1995; Hofmann und Tschopp, 1995). Die intrazelluläre Domäne von p75 besitzt außerdem einen Abschnitt mit starker Homologie zu Mastoparan, einem Peptid aus Wespengift, das G-Proteine direkt aktivieren kann (Feinstein und Larhammar, 1990). Interessanterweise wurde das GTP-bindende Protein RhoA kürzlich als cytoplasmatischer p75-Interaktor identifiziert und wird durch p75 konstitutiv aktiviert (Yamashita et al., 1999; vgl. 2.3.3).

Der carboxyterminale Bereich entspricht einer Konsensus-Sequenz, die in zahlreichen Proteinen gefunden wurde, welche mit postsynaptischen Verdichtungen (PSDs, „postsynaptic densities“) assoziiert sind (Kornau et al., 1995 und 1997). Der membranassoziierte Bereich von p75 ist zwischen verschiedenen Spezies (Mensch, Huhn, Ratte) am stärksten konserviert: Die Identität dieser Region, die aus 19 Aminosäuren der extrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne mit 22 Aminosäuren sowie den ersten 46 Aminosäuren der intrazellulären Domäne besteht, beträgt 95%, wohingegen der Rezeptor in der gesamten codierenden Region nur 71%-ige Identität aufweist (Large et al., 1989). Dies läßt auf eine wichtige Funktion dieses Bereiches schließen. Die Juxtamembran-Domäne ist durch Palmytylierung an Cystein 279 modifiziert (Barker et al., 1994a). Mehr als ein Drittel des tatsächlichen Molekulargewichts (75 kDa) von p75 ist auf N- und O-Glykosylierungen des extrazellulären Bereiches zurückzuführen; der Rezeptor besteht nach Abspaltung eines 28 Aminosäuren langen Signalpeptids aus 396 Aminosäuren ( $M_w$  ca. 43 kDa). Außerdem existiert eine Spleißvariante von p75, der das Exon 3, welches für die Cystein-reichen Domänen 2, 3 und 4 codiert, fehlt (Dechant und Barde, 1997; von Schack et al., zur Publikation eingereicht). Diese Variante kann zwar keine Neurotrophine binden, könnte aber eventuell durch Assoziation mit Adapter-Molekülen einen Einfluß auf die intrazelluläre Signaltransduktion ausüben.

## **2.3 Signaltransduktion durch Neurotrophinrezeptoren**

### **2.3.1 Die Trk-Rezeptor-Tyrosinkinasen**

Die klassischen trophischen Wirkungen der Neurotrophine auf das Überleben und die Differenzierung von Nervenzellen werden im Wesentlichen durch die Trk-Rezeptoren vermittelt. Dies wird auch durch die phänotypische Ähnlichkeit der Deletionsmutanten von Neurotrophinen und ihren zugehörigen Trk-Rezeptoren deutlich (Snider, 1994), in denen jeweils spezifische Nervenzellpopulationen betroffen sind. p75-transgene Mäuse haben einen schwächeren Phänotyp mit vergleichsweise geringen Defiziten sensorischer und sympathischer Neuronen (Lee et al., 1992; Bergmann et al., 1997; Stucky und Koltzenburg, 1997). Allerdings führte die von Lee et al. beschriebene Deletion des p75-Rezeptors zu keiner vollständigen Nullmutante, da die oben erwähnte p75-Spleißvariante mit intakter intrazellulärer Domäne in

diesen Mäusen weiterhin exprimiert wird. Die vollständige Deletion beider p75-Formen hatte einen deutlicheren Phänotyp mit stärkeren Defekten im peripheren Nervensystem zur Folge. Außerdem wurde eine ungefähr vierzigprozentige embryonale Letalität beobachtet, die wahrscheinlich auf Störungen bei der Bildung von Blutgefäßen zurückzuführen ist (von Schack et al., zur Publikation eingereicht).

Wie andere Rezeptor-Tyrosinkinase können Trk-Moleküle nach Ligandenbindung Dimere bilden und sich selbst sowie verschiedene Zielproteine phosphorylieren, wodurch verschiedene Signaltransduktions-Kaskaden ausgelöst werden (zusammengefaßt in Kaplan und Miller, 2000; Bibel und Barde, 2000). Die Phosphorylierung konservierter Tyrosinreste der Trk-Rezeptoren (Y499 und Y794 in TrkA aus Ratte) ermöglicht die Anlagerung von Signalmolekülen wie Shc und der Phospholipase PLC- $\gamma$ 1 (Anderson et al., 1990; Obermeier et al., 1993 und 1994; Stephens et al., 1994). Die drei wichtigsten Signaltransduktionswege sind hier kurz zusammengefaßt, sie laufen in der Zelle oft parallel ab und beeinflussen sich gegenseitig.

1.) Die Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) ist für 80% des neurotrophin-regulierten Überlebens von Nervenzellen verantwortlich (Yao und Cooper, 1995; Crowder und Freeman, 1998; Vaillant et al., 1999). Sie kann durch das kleine GTP-bindende Protein Ras sowie die Adapter-Proteine Gab-1 („Grb-associated binder“) und IRS-1/2 („insulin receptor substrates“) aktiviert werden. Das wichtigste Zielmolekül der PI-3K ist die Serin/Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B) (Dudek et al., 1997), die eine Reihe pro-apoptotischer Moleküle (Bad, Pro-Caspase-9, Forkhead) durch Phosphorylierung inaktivieren kann (Bonni et al., 1999; Kaplan und Miller, 2000).

2.) Ein zweiter Signalweg über Ras, Raf, MEK (MAPK Kinase) und MAPK („mitogen activated protein kinase“) ist ebenfalls wichtig für das Überleben bestimmter Nervenzellen, spielt jedoch eine noch größere Rolle für das Auswachsen und die Differenzierung der Neuronen sowie synaptische Plastizität (Borasio et al., 1993; Grewal et al., 1999). Die anti-apoptotische Wirkung ist hauptsächlich auf den Transkriptionsfaktor CREB („cAMP response element binding protein“) zurückzuführen, der die Transkription von *BCL-2* erhöht (Riccio et al., 1997 und 1999; Finkbeiner, 2000).

3.) Die Phospholipase PLC- $\gamma$ 1 beeinflusst über Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) die Konzentration von cytoplasmatischem Ca<sup>2+</sup> und wirkt so auf Signaltransduktionswege, die beispielsweise synaptische Plastizität modulieren (Bibel und Barde, 2000).

### 2.3.2 Der Neurotrophinrezeptor p75

Die physiologische Funktion des p75-Rezeptors ist weniger eindeutig, jedoch konnten in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt werden. p75 kann als „Hilfsrezeptor“ für die Trk-Rezeptoren dienen und deren Bindungsaffinität und -selektivität für ihre Liganden erhöhen (Hempstead et al., 1991; Benedetti et al., 1993; Mahadeo et al., 1994; Verdi et al., 1994). Eine direkte Interaktion von p75 mit den Trk-Rezeptoren wurde in Zellkultursystemen nachgewiesen (Huber und Chao, 1995a; Ross et al., 1996; Gargano et al., 1997; Bibel et al., 1999). Die Tyrosinkinaseaktivität von TrkA nach Ligandenbindung wird in Anwesenheit von p75 erhöht (Barker und Shooter, 1994b). Eine gleichzeitige Expression von p75 und TrkB in Zelllinien erhöht die Spezifität des TrkB-Rezeptors für BDNF im Vergleich zu seinem alternativen Liganden NT-4/5 (Bibel et al., 1999). *In vivo* Experimente mit transgenen Mäusen demonstrierten, daß p75 die Spezifität von TrkA für NGF in sympathischen Neuronen erhöht, während in seiner Abwesenheit auch NT-3 über die Aktivierung des TrkA-Rezeptors das Überleben der Nervenzellen bewirken kann (Brennan et al., 1999).

Hinweise auf eine eigenständige biologische Funktion von p75 ergaben sich unter anderem aus dem Expressionsmuster dieses Rezeptors. Trk-Rezeptoren und p75 werden zwar im peripheren und zentralen Nervensystem häufig coexprimiert, die Expression von p75 ist jedoch viel weiter verbreitet (Ernfors et al., 1988; Thomson et al., 1988; Large et al., 1989; Heuer et al., 1990; Persson et al., 1990; Bothwell, 1991; Sariola et al., 1991; Huber und Chao, 1995b). So kommt p75 z.B. auch auf vielen nicht-neuronalen Zellen vor und wird nach Nervenverletzungen oder -entzündungen hochreguliert (Taniuchi et al., 1986 und 1988; Heumann et al., 1987; Roux et al., 1999; Dowling et al., 1999).

Ein wichtiges Indiz für eine eigenständige Signaltransduktion durch p75 war der Nachweis, daß p75 in Abwesenheit von Trk die Bildung des apoptotisch wirkenden Signalmoleküls Ceramid (Spiegel et al., 1996) aus Sphingomyelin auslösen konnte (Dobrowsky et al., 1994 und 1995; Blöchl und Sirrenberg, 1995). Außerdem konnte NGF in unterschiedlichen Zelltypen wie Schwann-Zellen (Carter et al., 1996), primären Kulturen sympathischer Neuronen (Maggirwar et al., 1998), Oligodendrocyten (Ladiwala et al., 1998) und in der Schwannoma-Zelllinie RN22 (Gentry et al., 2000a) den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B über p75 aktivieren und dadurch anti-apoptotische Wirkung entfalten. Des Weiteren wurde die Aktivierung einer Streß-aktivierten Kinase, der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK), durch Neurotrophinbindung an p75 beobachtet (Casaccia-Bonofil et al., 1996; Yoon et al., 1998). Das Resultat einer Trk-unabhängigen p75-Signaltransduktion war in den meisten Fällen programmierter Zelltod: Die ursprünglich als reine „Überlebensfaktoren“ angesehenen Neurotrophine können also je nach zellulärem Kontext und Entwicklungsstadium auch eine gegenteilige Wirkung entfalten (Casaccia-Bonofil et al., 1998; Miller und Kaplan, 1998). Obgleich erste Versuche auf eine ligandenunabhängige Vermittlung von Zelltod hinwiesen (Rabizadeh et al., 1993; Barret und

Bartlett, 1994; Bunone et al., 1997; Bredesen et al., 1998), der durch Neurotrophine verhindert wurde, wird Apoptose in den meisten zellulären Systemen sowie *in vivo* durch Ligandenbindung an p75 ausgelöst (Casaccia-Bonofil et al., 1996; Aloyz et al., 1998; Davey und Davies, 1998; Kuner und Hertel, 1998; Sedel et al., 1999; Soilu-Hänninen et al., 1999). Die Wirkung eines Neurotrophins auf eine Nervenzelle scheint davon abzuhängen, ob bzw. welche Trk-Rezeptoren gleichzeitig mit p75 exprimiert werden. Durch p75 vermittelter, ligandenabhängiger Zelltod wurde *in vivo* zuerst in der sich entwickelnden Netzhaut des Huhns demonstriert (Frade et al., 1996; Frade, 2000a). Viele Nervenzellen der Netzhaut sterben kurz nach Erreichen der postmitotischen Phase durch NGF-vermittelten programmierten Zelltod, was durch Versuche mit blockierenden Antikörpern und Applikation von exogenem NGF bewiesen wurde. Zu diesem Entwicklungsstadium exprimieren die absterbenden Zellen p75, jedoch kein TrkA. Die Analyse von Nullmutanten für *p75* bzw. *ngf* bestätigte vergleichbare Mechanismen in der Netzhaut und im Rückenmark von Mäusen (Frade und Barde, 1999). BDNF besitzt *in vitro* und *in vivo* eine pro-apoptotische Wirkung auf sympathische Neuronen, die p75 und TrkA, jedoch kein TrkB exprimieren (Bamji et al., 1998). NGF führt *in vitro* zur Apoptose von Oligodendrocyten, die nur p75 exprimieren, was durch retrovirale Expression des TrkA-Rezeptors verhindert werden konnte (Yoon et al., 1998). In Kulturen hippocampaler Neuronen werden jeweils diejenigen Nervenzellen durch NGF, BDNF, NT-3 oder NT-4/5 selektiv getötet, die den entsprechenden Trk-Rezeptor nicht exprimieren (Friedman, 2000).

Ein wichtiger Signaltransduktionsweg, über den p75 programmierten Zelltod auslöst, ist durch eine Beteiligung von JNK, p53 und Bax gekennzeichnet (Aloyz et al., 1998; Friedman, 2000). Die c-jun N-terminale Kinase (JNK) wird im allgemeinen aktiviert, wenn eine Zelle verschiedenen Formen von Streß ausgesetzt wird. Ihre Rolle ist allerdings nicht völlig aufgeklärt, zumal JNK sowohl für Apoptose als auch für Überlebenssignale verantwortlich sein kann (Ip und Davis, 1998). In pro-apoptotischen Szenarien bewirkt JNK durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors p53 dessen Stabilisierung (Davis, 2000); die erhöhte p53-Konzentration als Antwort auf Streß-Signale bewirkt einen Zellyklus-Stop und/oder Apoptose. Das Tumor-Suppressorgen *p53* gehört zu den bei Krebserkrankungen am häufigsten mutierten Genen (Lohrum und Vousden, 2000). Eines der transkriptionellen Zielmoleküle von p53 ist das pro-apoptotisch wirkende Bcl-Protein Bax (vgl. 2.4). Es ist allerdings bisher noch unklar, wie p75 eine Aktivierung der JNK bewirken kann (Kaplan und Miller, 2000).

### 2.3.3 Interaktion von p75 mit cytoplasmatischen Proteinen

In Analogie zur Signaltransduktion durch andere Moleküle der TNF-Rezeptor-Superfamilie wurde angenommen, daß auch p75 seine Signale durch cytoplasmatische Adapter-Moleküle weiterleitet. Während zu Beginn dieser Arbeit keine solchen Interaktoren bekannt waren, konnten innerhalb der letzten zwei Jahre mehrere Moleküle identifiziert werden, die mit der cytoplasmatischen Domäne von p75 wechselwirken.

Das Zinkfinger-Protein SC-1 („Schwann Cell Factor-1“) kann mit der Juxtamembran-Region des Neurotrophinrezeptors p75 interagieren und in COS-Zellen nach Serumentzug oder NGF-Einwirkung in den Zellkern translozieren, wodurch der Zellzyklus gestoppt wird (Chittka und Chao, 1999).

NRAGE („Neurotrophin Receptor-Interacting MAGE [melanoma antigen gene] Homolog“), ein ubiquitär exprimiertes Protein, bindet in Gegenwart von NGF an p75 und blockiert dessen Assoziation mit dem TrkA-Rezeptor. Die Überexpression von NRAGE in MAH<sup>p75NTR</sup>-Zellen hat nach NGF-Behandlung Zellzyklus-Stop und Apoptose zur Folge (Salehi et al., 2000).

Auch Cotransfektion verschiedener Zelllinien mit p75 und NADE („p75-NTR-Associated Cell Death Executor“), einem 14,5 kDa großen Protein, induziert NGF-abhängig Apoptose (Mukai et al., 2000).

Im Gegensatz dazu könnte die Bindung der Fas-assoziierten Phosphatase-1 (FAP-1) an den C-Terminus von p75 in Analogie zur Situation beim Fas-Rezeptor (vgl. 2.4) pro-apoptotische Signale inhibieren (Irie et al., 1999).

Durch Bindung des GTP-bindenden Proteins RhoA beeinflusst p75 das Auswachsen von Nervenfasern (Yamashita et al., 1999): In Abwesenheit von Neurotrophinen bindet RhoA an die „Death“-Domäne von p75 und wird dadurch konstitutiv aktiviert, was das Nervenwachstum hemmen kann (Yamashita et al., 1999; Lehmann et al., 1999). Die Aktivierung ist eventuell auf den Mastoparan-ähnlichen Bereich von p75 zurückzuführen (vgl. 2.2), der in der fünften  $\alpha$ -Helix der „Death“-Domäne liegt. Ligandenbindung an den Rezeptor inaktiviert die GTPase-Aktivität von RhoA.

TRAF-6 („TNF Receptor-Associated Factor“) wurde ursprünglich als Interaktor des CD40-Rezeptors gefunden (Cao et al., 1996; Ishida et al., 1996), kann aber auch – bevorzugt in Gegenwart von NGF – an p75 binden (Khursigara et al., 1999). Die Signaltransduktion über TRAF-6 fördert das Überleben von Zellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Khursigara et al., 1999; Foehr et al., 2000). Die Bindung weiterer Proteine der TRAF-Familie (vgl. 2.4) an p75 wurde in Fibroblasten-Zelllinien demonstriert (Ye et al., 1999). TRAF-2 kann an die „Death“-Domäne von monomerem p75 binden und dadurch Apoptose auslösen, während TRAF-4 mit der Juxtamembran-Region von p75-Dimeren assoziiert und über NF- $\kappa$ B-Aktivierung anti-apoptotisch wirkt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß inzwischen viele cytoplasmatische Adapter-Moleküle des p75-Neurotrophinrezeptors identifiziert wurden, die sehr unterschiedliche Wirkungen auf eine Zelle haben. Der Großteil dieser Interaktoren scheint pro- oder anti-apoptotische Signale zu vermitteln, wobei p75 bis auf die TRAF-Proteine und FAP-1 kaum mit Adaptermolekülen assoziiert, die für andere Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie beschrieben wurden (s.u.). Dies könnte daran liegen, daß sich p75 in vielerlei Hinsicht von diesen unterscheidet und beispielsweise dimerisierte statt trimerisierte Liganden bindet. Die genaue Wirkungsweise der neu identifizierten Moleküle, ihre Eingliederung in bekannte Signaltransduktionswege und ihre Relevanz *in vivo* müssen noch aufgeklärt werden. Für das Auslösen oder Verhindern von Apoptose werden wahrscheinlich Mechanismen verwendet, die den bereits erforschten sehr verwandt sind.

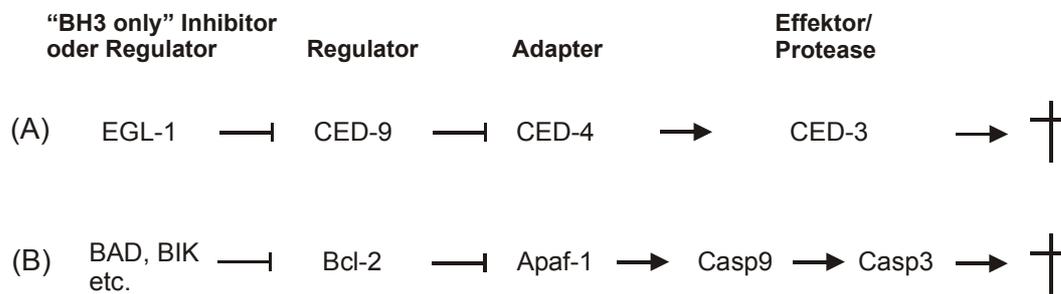
## 2.4 Programmierter Zelltod

Wenn Zellen eines multizellulären Organismus keine äußeren Überlebenssignale erhalten, wird ein intrinsisches Selbstmordprogramm aktiviert. Dieser „programmierte Zelltod“, auch „Apoptose“ genannt (Kerr et al., 1972), spielt eine zentrale Rolle während der normalen Entwicklung und Homöostase von Geweben und Organismen sowie bei vielen Krankheiten.

Die Selbstzerstörung einer Zelle durch Apoptose läuft nach einem präzisen Mechanismus ab, der in den letzten Jahren weitgehend aufgeklärt werden konnte. Die molekularen Grundlagen wurden zuerst im Nematoden *C. elegans* erforscht, bei dem 131 von 1090 somatischen Zellen durch programmierten Zelltod sterben. Durch Analyse verschiedener Mutationen konnte der Vorgang in diesem Modellorganismus genetisch aufgeklärt werden (Ellis und Horvitz, 1986). Interessanterweise ist der Prozeß evolutionär stark konserviert, für alle im Wurm beschriebenen Komponenten wurden Homologe in Säugern identifiziert (Abb. 2).

Die wichtigsten Effektormoleküle der Apoptose sind die „Caspasen“, Cystein-Proteasen, die ihre Substratproteine selektiv nach Aspartat-Resten spalten (Cohen, 1997; Li und Yuan, 1999). Sie werden als inaktive Vorläufermoleküle synthetisiert und nach spezifischen Stimuli durch Autokatalyse oder andere Proteasen aktiviert. In Säugerzellen gibt es mindestens elf verschiedene Caspasen, die in Initiator- und Effektor-Caspasen eingeteilt werden können. Die Initiator-Caspasen (z.B. Caspase-8, -9 und -12) stehen am Anfang einer proteolytischen Kaskade, welche z.B. von Oberflächenrezeptoren der TNF (Tumornekrosefaktor)-Rezeptor-Superfamilie oder über einen mitochondrialen Weg ausgelöst wird. Sie aktivieren Effektor-Caspasen (z.B. Caspase-3, -6, und -7), welche ihrerseits Zielproteine aktivieren oder zerstören können. Die Spaltung ihrer Zielmoleküle, z.B. Proteine der Kernlamina und des

Cytoskeletts, DNA-Reparaturenzyme und viele andere, führt letztendlich zum Tod der Zelle (Nicholson und Thornberry, 1997).



**Abb. 2: Vergleich der Apoptose-Mechanismen von Nematoden und Säugern**

Der „Selbstmord“ einer Zelle durch Apoptose ist ein evolutionär konservierter Prozeß. Während jedoch der Nematode *C. elegans* (A) mit wenigen Hauptkomponenten auskommt, besitzen Säuger (B) mehrere parallele Mechanismen sowie viele Homologe zu den im Wurm zuerst identifizierten Komponenten. CED: cell death abnormal. EGL: egg-laying defective. Nach Vaux und Korsmeyer, 1999.

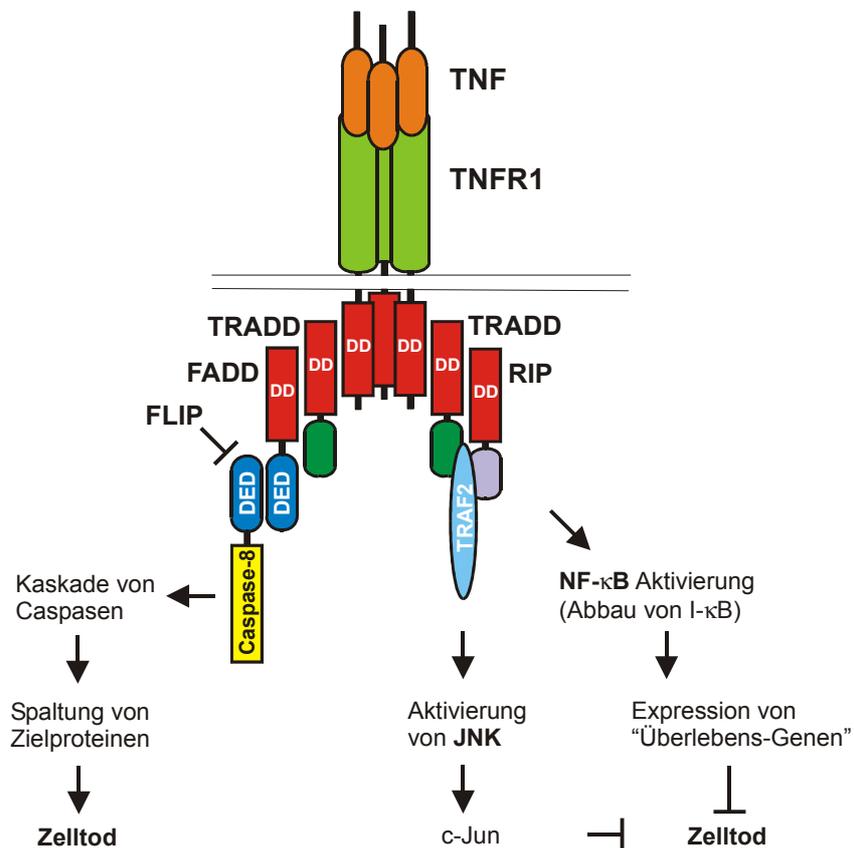
Eine wichtige Möglichkeit der Caspasen-Aktivierung ist der „Mitochondriale Weg“, bei dem Moleküle der Bcl-2-Familie sowie Apaf-1 („apoptosis protease activating factor“) und Cytochrom c (Apaf-2) eine wichtige Rolle spielen. Bcl-2 („B-cell lymphoma“) ähnliche Proteine gehören zu den relevantesten Molekülen während der Effektor-Phase der Apoptose. Das humane *BCL-2*-Gen wurde ursprünglich aufgrund einer Chromosomen-Bruchstelle von B-Zell-Lymphomen identifiziert (Tsujiimoto et al., 1984 und 1985). Als Folge einer Translokation wird *BCL-2* unter der Kontrolle des Immunglobulin-Schwere-Kette-„Enhancers“ konstitutiv in B-Zellen exprimiert und schützt diese vor Apoptose. *BCL-2* ist homolog zum *ced-9*-Gen aus *C. elegans* (vgl. Abb. 2) (Hengartner und Horvitz, 1994). Proteine der Bcl-2-Familie können eine anti-apoptotische (z.B. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w) oder pro-apoptotische (z.B. Bax, Bad, Bik, Bid, Bak, Bcl-X<sub>S</sub>) Wirkung ausüben und sind meist in der äußeren Mitochondrienmembran oder der ER-Membran verankert (Kroemer, 1997). Ihre vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten werden durch Bcl-2-Homologieregionen (BH1 bis BH4) festgelegt. Die Überexpression von Bcl-2 blockiert durch unterschiedliche Stimuli ausgelöste Apoptose in Säugerzellen, beispielsweise Mangel an Wachstumsfaktoren, UV-Bestrahlung oder Anti-Krebsmittel. Die Aktivität von Bcl-Proteinen wird durch Regulation ihrer Expression und posttranslationale Mechanismen kontrolliert. Als Reaktion auf viele „Death“-Signale findet eine verstärkte Transkription oder Translation pro-apoptotischer BH3-Domänen-Proteine statt. Beispielsweise steigt die Konzentration des Proteins Bax bei Apoptose von Cortex-Neuronen unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors p53 (Xiang et al., 1998). Das BH3-Protein Bid, das anders als die meisten Mitglieder der Bcl-Familie keine Transmembrandomäne besitzt, ist ein Substrat der

Caspase-8. Nach Spaltung kann aktiviertes Bid die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien verursachen (Li et al., 1998). Hier zeigt sich auch die enge Verknüpfung der durch „Death-Rezeptoren“ (s.u.) ausgelösten Apoptose (Caspase-8-Aktivierung) und des mitochondrialen Weges.

Bad kann Heterodimere mit Bcl-2 oder Bcl-X<sub>L</sub> bilden, wodurch deren schützende Funktion aufgehoben wird. Serin-Phosphorylierung von Bad durch die anti-apoptotisch wirkende Serin/Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B) verhindert diese Heterodimerisierung, denn phosphoryliertes Bad wird vom Protein 14-3-3 gebunden und so im Cytosol zurückgehalten. Der genaue Wirkungsmechanismus von Bcl-2, das sich in der äußeren Mitochondrienmembran befindet, ist unbekannt. Vermutlich verhindert es die Freisetzung Apoptose-induzierender Faktoren wie Cytochrom c und AIF („apoptosis-inducing factor“) (Yang et al., 1997; Kluck et al., 1997). Cytochrom c befindet sich im Intermembranraum der Mitochondrien und seine Freisetzung ist ein wichtiger Stimulus für die Initiation der Apoptose: Das Protein Apaf-1 kann in Gegenwart von Cytochrom c Pro-Caspase-9 (Apaf-3) über Interaktion ihrer „CARDs“ („caspase recruitment domain“) binden und aktivieren. Diese Initiator-Caspase löst dann eine proteolytische Kaskade aus.

In Vertebraten kann der programmierte Tod einzelner Zellen auch gezielt durch die Bindung spezifischer Liganden an sog. „Death“-Rezeptoren ausgelöst werden, die zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehören. Diese umfaßt in Säugern zwei TNF-Rezeptoren (TNFR1 und 2), den Fas-Rezeptor (APO-1/CD95), DR-3, CD30, CD40, den Neurotrophinrezeptor p75 und mehr als zehn weitere Proteine (Baker und Reddy, 1996 und 1998). Alle diese Rezeptoren besitzen zwei bis vier Cystein-reiche Domänen im extrazellulären Bereich (Ligandenbindung), eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne ohne katalytische Aktivität. Im cytoplasmatischen Anteil einiger Mitglieder (z.B. FasR, TNFR1, DR3) findet sich ein charakteristisches Strukturmotiv, die sog. „Death“-Domäne, welche aus sechs kompakt angeordneten  $\alpha$ -Helices besteht (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993; Feinstein et al., 1995; Huang et al., 1996). Mangels enzymatischer Aktivität übermitteln Rezeptoren dieser Familie ihre Signale über cytoplasmatische Adapter-Proteine. Dieses Prinzip soll exemplarisch am Beispiel des CD95/FasR/Apo-1-Rezeptors erläutert werden, der als erster Rezeptor der TNFR-Superfamilie als Auslöser von Zelltod erkannt wurde (Itoh et al., 1991; Nagata, 1997; Ashkenazi und Dixit, 1998). CD95 gehört zur TNF-Rezeptor-Superfamilie und spielt eine wichtige Rolle bei der Beseitigung aktivierter T-Zellen am Ende einer Immunantwort. Die Bindung des trimeren Liganden (CD95L/FasL) an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors induziert dessen Trimerisierung. Dies ermöglicht die Anlagerung des cytoplasmatischen Adapter-Moleküls FADD („Fas-associated death domain protein“) (Chinnaiyan et al., 1995) über konservierte „Death“-Domänen in beiden Molekülen. FADD rekrutiert seinerseits Pro-

Caspase-8-Moleküle durch Interaktion von „Death“-Effektor-Domänen (DED), wodurch sich die nun benachbarten Zymogene gegenseitig aktivieren und die proteolytische Kaskade initiieren können. Die Signaltransduktion durch den TNF-Rezeptor-1 läuft nach einem sehr verwandten Mechanismus ab (Wallach, 1997; Abb. 3). Allerdings kann dieser Rezeptor durch Verwendung unterschiedlicher Adapter-Moleküle entweder Apoptose oder NF-κB-Aktivierung auslösen. TNFR1-Trimere rekrutieren TRADD („TNF receptor-associated death domain protein“) (Hsu et al., 1995) durch Interaktion der „Death“-Domänen. TRADD kann nun mit verschiedenen Molekülen wechselwirken: Während über FADD Apoptose induziert wird, initiieren RIP („receptor-interacting protein“, eine Serin/Threonin-Kinase) und TRAF2 („TNFR-associated factor“) (Rothe et al., 1994) Signaltransduktionswege, die zu einer Aktivierung von NF-κB bzw. JNK (c-Jun N-terminale Kinase) führen (Liu et al., 1996; Ashkenazi und Dixit, 1998 und 1999).



**Abb. 3: Pro- und anti-apoptische Signaltransduktion des TNFR1**

Erklärungen zu den beteiligten Molekülen finden sich im Text. In dieser vereinfachten Darstellung wurde nicht berücksichtigt, daß RIP („receptor interacting protein“) Apoptose sowohl verhindern als auch auslösen kann. In ähnlicher Weise besitzt JNK (c-Jun N-terminale Kinase) zwar in diesem Szenario eine anti-apoptische Wirkung, löst aber in anderen Zusammenhängen häufig Apoptose aus. FLIP: „FLICE (Caspase-8) inhibitory protein“.

In Säugern wurden bisher sechs TRAF-Proteine (TRAF1 bis 6) identifiziert, die als cytoplasmatische Adapter-Proteine von Zelloberflächen-Rezeptoren fungieren (Arch et al., 1998; Inoue et al., 2000). Alle TRAFs besitzen eine carboxyterminale TRAF-Domäne, die diese Proteinfamilie definiert. Außerdem enthalten alle außer TRAF1 eine aminoternale RING-Finger-Domäne (Borden und Freemont, 1996; Borden, 2000) sowie mehrere Zinkfinger. TRAFs aktivieren Signaltransduktionswege, an denen Kinasen der MAPK-Familie („mitogen activated protein kinase“) beteiligt sind. An deren Ende wird beispielsweise die MAP-Kinase JNK (c-Jun N-terminale Kinase) aktiviert, welche den Transkriptionsfaktor c-Jun phosphoryliert, der zusammen mit c-Fos das aktive Heterodimer AP-1 bildet. Außerdem beeinflussen einige TRAFs (TRAF2, 5 und 6) die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, indem sie über NIK („NF- $\kappa$ B-inducing kinase“) und IKKs (I- $\kappa$ B-Kinasen) die Phosphorylierung seines Inhibitors I- $\kappa$ B bewirken, der daraufhin ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut wird. NF- $\kappa$ B kann sodann in den Zellkern translozieren und verschiedene Gene aktivieren, die meistens das Überleben der Zelle fördern (z.B. IAPs: „Inhibitor of apoptosis proteins“). Die Verfügbarkeit von TRAF-Proteinen hat also einen Einfluß darauf, ob als Antwort auf TNFR1-Aktivierung Zelltod gehemmt wird oder Apoptose stattfindet.

## 2.5 Aufgabenstellung

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß der Neurotrophinrezeptor p75 eine von den Trk-Tyrosinkinase-Rezeptoren unabhängige Funktion besitzt und in einigen Zelltypen programmierten Zelltod auslösen kann. Als Mediatoren der p75-Signaltransduktion waren der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, die Serin/Threonin-Kinase JNK und das Lipid-Signalmolekül Ceramid identifiziert worden. Es war jedoch völlig unklar, auf welche Weise die Signale nach Ligandenbindung an den Rezeptor innerhalb der Zelle weitergeleitet werden, da keine Adapter-Proteine bekannt waren, die mit der katalytisch inaktiven cytoplasmatischen Domäne von p75 interagieren konnten.

In unserem Labor war unter Verwendung des Hefe-„Two-Hybrid“-Systems ein interessantes Protein gefunden worden, das zur Familie der Krüppel-Zinkfingerproteine gehörte und „NRIF“ für „Neurotrophin Receptor Interacting Factor“ genannt wurde. Da es Hinweise auf ein zweites, sehr verwandtes Gen gab, stand dessen Klonierung und molekularbiologische Analyse am Beginn dieser Arbeit. Ein sehr wichtiger Aspekt war sodann der biochemische Nachweis der im Hefe-„Two-Hybrid“-System molekularbiologisch gezeigten Wechselwirkung von p75 mit NRIF-Proteinen. Es sollte verglichen werden, ob p75 für die beiden NRIF-Proteine eine unterschiedliche Affinität aufweist und ob die Wechselwirkung durch Neurotrophin-Bindung an den Rezeptor beeinflusst wird. Durch die Untersuchung der subzellulären Lokalisierung des

Proteins sowie des Expressionsmusters von *nrf1*-mRNA in Mäusen sollten Rückschlüsse auf Funktion und Wirkungsmechanismus von NRIF gezogen werden. Eine weitere interessante Fragestellung war, ob die NRIF-Proteine unabhängig oder zusammen arbeiten und welche Auswirkungen das Fehlen eines *nrf1*-Gens hat (vgl. 4.6). Außerdem sollte erforscht werden, an welchen für eine Zelle bzw. einen Organismus relevanten Prozessen NRIF beteiligt sein könnte und welche Aspekte der vielfältigen p75-Wirkungen durch NRIF-Proteine vermittelt werden könnten.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien (Reinheitsgrad „Für die Analyse“) wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma, Serva, Merck, Roth oder Riedel-de Haen bezogen, Plastikwaren für die Zellkultur von Nunc, Costar, Falcon und Greiner. Radiochemikalien stammten von Amersham. Abkürzungen: NEB: New England Biolabs. B.M.: Boehringer Mannheim. A.P.B.: Amersham Pharmacia Biotech.

Agarose NEEO Ultra (Roth)  
Agarose ultra Pure (Gibco)  
Ammoniumpersulfat (APS) (BioRad)  
Aprotinin aus Rinderlunge (Sigma)  
Bio-Rad Protein Assay (BioRad)  
Bovine Albumin (BSA) Fraction V (Sigma)  
5-Brom-2'-Desoxyuridin, BrdU (Sigma)  
Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva)  
Cytochrom c aus Pferdeherz (B.M.)  
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid)  
DEPC (Diethylpyrocarbonat) (Sigma)  
Diafilm Elite Chrome 400 (Kodak)  
Diethylpyrocarbonat (Sigma)  
Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma)  
1,4-Dithiothreitol (DTT) (B.M.)  
DNA-Mol.gew.marker VI (B.M.)  
DNA-Mol.gew.marker 1 kb DNA Ladder (Gibco)  
DNA-Mol.gew.marker Lambda *Hind* (Sigma)  
ECL Western blotting detection reagents (A.P.B.)  
Effectene Transfektionsreagens (Qiagen)  
Ethidiumbromidlösung 1% (Roth)  
Filter 0,2 µm und 0,4 µm (Millipore)  
Fuji Medical X-Ray Film Super RX (Fuji)  
GeneAmp 10 x PCR buffer (Perkin Elmer)  
Glutathion (Sigma)  
Glutathion-Sepharose® 4B (Pharmacia Biotech)  
Hoechst 33258 (Bisbenzimidazol) (Sigma)  
Hybond™-N Nylonmembran 0,45 µm (A.P.B.)  
Immuno-Fluore Mounting Medium (ICN Biomedicals)  
IPTG, Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (Roth)  
Leupeptin (Sigma)  
L-[<sup>35</sup>S]-Cystein, 370 MBq/ml, 10 mCi/ml (A.P.B.)  
L-[<sup>35</sup>S]-Methionin, 370 MBq/ml, 10 mCi/ml (A.P.B.)  
Magermilchpulver „frema Reform“ (Reformhaus)  
Ni-NTA-Agarose (Qiagen)  
Nonidet P-40 (ICN Biochemicals)  
Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer (Gibco BRL)  
Pefabloc® SC (AEBSF) (B.M.)  
Poly-D-Lysin, Hydrobromid, Mol. Wt. 70 000 (Sigma)  
Poly-DL-Ornithin, Hydrobromid (Sigma)  
Prestained Protein Marker Broad Range (NEB)  
Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range (BioRad)  
ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (A.P.B.)  
Protein A-Sepharose 6 MB (A.P.B.)  
Protein G-Sepharose (A.P.B.)  
PVDF-Membran Immobilon™-P 0,45 µm (Millipore)  
RNA-Mol.gew.marker 0,24-9,5 kb ladder (Gibco)  
RNase-Inhibitor (B.M.)  
Roti®-Phenol pH 7,5-8 (Roth)  
Salmon Sperm DNA (Sigma)  
Slide-A-Lyzer Dialyse-Kassetten (Pierce)  
Spermidin (Sigma)  
Spin-X® columns (Costar)  
SuperFect Transfektionsreagens (Qiagen)  
SYBR® Green I nucleic acid gel stain (Mol.Probes)  
Szintillationsflüssigkeit Rotiszint eco plus (Roth)  
N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) (Sigma)  
Triton X-100 (Sigma)  
TRIzol™ Reagent (Gibco BRL)  
Tween®20 (Roth)  
Ultrapure dNTP set (A.P.B.)  
UltraPure Protgel 30% w/v Acrylamide/0,8% Bis-AA (national diagnostics)  
Whatman® 3MMChr (Whatman)  
Zellkultur-Platten 6 cm und 10 cm (Nunc)  
Zellproliferationsreagens WST-1 (B.M.)  
Ziege Anti-Maus IgG1-Agarose (Sigma)  
Ziegenserum (normal goat serum, NGS) (Sigma)

### 3.1.2 Enzyme

AmpliTaq <sup>®</sup> DNA-Polymerase, 5 U/μl	(Perkin Elmer)
Cloned Pfu DNA-Polymerase, 2,5 U/μl	(Stratagene)
DNA-Polymerase I „Large Fragment“ (Klenow)	(New England Biolabs)
Desoxyribonuklease I (DNase I)	(Sigma)
DNase I, RNase-frei	(Boehringer Mannheim)
Lysozym	(Boehringer Mannheim)
PfuTurbo <sup>™</sup> DNA-Polymerase	(Stratagene)
Proteinase K, Stammlösung 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	(Boehringer Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	(New England Biolabs)
RNase A	(Boehringer Mannheim)
Shrimp Alkalische Phosphatase	(Boehringer Mannheim)
SUPERScript <sup>™</sup> II Reverse Transkriptase	(Gibco BRL)
Taq DNA-Polymerase	(Gibco BRL)
Trypsin	(Worthington)
T4 DNA-Ligase	(New England Biolabs)
T4 Polynukleotid-Kinase	(New England Biolabs)

### 3.1.3 Molekularbiologische “kits”

Cell Death Detection ELISA	(Boehringer Mannheim)
ExAssist <sup>™</sup> Interference-Resistant Helper Phage	(Stratagene)
GST Gene Fusion System	(Pharmacia Biotech)
Lambda ZAP <sup>®</sup> II library	(Stratagene)
Marathon-Ready <sup>™</sup> cDNA Kit	(Clontech)
QIAEX II Kit	(Qiagen)
Qiagen Plasmid Midi und Maxi Kits	(Qiagen)
QIAquick PCR Purification Kit	(Qiagen)
Random Prime Labelling Kit	(Amersham Pharmacia Biotech)
Rapid DNA Ligation Kit	(Boehringer Mannheim)
RNeasy Mini Kit	(Qiagen)
TNT T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	(Promega)

### 3.1.4 Bakterienstämme

	<u>Resistenzen</u>	<u>Verwendungszweck</u>
<i>E. coli</i> XL1-Blue (Stratagene)	Tetracyclin	Phagenvermehrung
<i>E. coli</i> SOLR (Stratagene)	Kanamycin	„in vivo-excision“
<i>E. coli</i> XL10-Gold (Stratagene)	Tetracyclin, Chloramphenicol	DNA-Klonierung
<i>E. coli</i> DH5αF' (Promega)	Kanamycin	DNA-Klonierung
<i>E. coli</i> BL21(DE3) (Novagen)		Proteinexpression
<i>E. coli</i> M15pRep4 (Qiagen)	Kanamycin	Proteinexpression
<i>E. coli</i> JM109 (Promega)		Proteinexpression
<i>E. coli</i> KU97	Kanamycin, Spectinomycin, Chloramphenicol	Proteinexpression
<i>E. coli</i> KU102	Spectinomycin	Proteinexpression
<i>E. coli</i> EJ1	Tetracyclin	Proteinexpression
<i>E. coli</i> SG12045	Kanamycin	Proteinexpression
<i>E. coli</i> SG22101	Kanamycin	Proteinexpression

### 3.1.5 Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Eigenschaften</i>
<u>BHK-21</u> (ATCC-CCL-10)	„Baby hamster kidney“, Fibroblasten-Zelllinie aus der Niere junger Hamster.
<u>COS-7</u> (ATCC-CRL-1651)	Fibroblasten-Zelllinie aus Affen-Niere, abgeleitet von der CV-1-Zelllinie, transformiert mit dem SV40 T-Antigen.
<u>CV-1</u> (ATCC CCL-70)	Fibroblasten-Zelllinie aus Affen-Niere.
<u>HN10</u> (Lee et al., 1990)	Zelllinie hippocampalen Ursprungs, erzeugt durch Fusion embryonaler hippocampaler Zellen aus Maus mit einer Maus-Neuroblastom-Zelllinie.
<u>L-Zellen</u> (LTK-)	Maus-Fibroblasten-Zelllinie, Referenz-Zelllinie für PCNA-Zellen.
<u>NIH3T3</u> (ATCC CRL 1658)	Fibroblasten-Zelllinie aus Mausembryo.
<u>PCNA</u> (Radeke et al., 1987)	p75 <sup>NTR</sup> (Ratte)-überexprimierende Maus-Fibroblasten-Zelllinie. Maus LTK-Zellen wurden mit genomischer DNA aus PC12-Zellen transfiziert und mittels FACS-Analyse auf p75 <sup>NTR</sup> -Expression selektiert.
<u>293</u> (ATCC CRL 1573)	Zelllinie aus humanen, embryonalen Nierenzellen, die mit Adenovirus Typ5 (Ad5)-DNA transformiert wurden.

### 3.1.6 Mäuse

BL6-Mäuse: C57BL/6NJCrI; Charles River Laboratories

Sv129-Mäuse: 129SvPas; Charles River Laboratories

### 3.1.7 Plasmide

#### 3.1.7.1 Vektoren

pBluescript II SK(+) und SK(-)	(Stratagene)
pcDNA3	(Invitrogen)
pEGFP-C1 und -N1	(Clontech)
pFLAG-CMV-2	(Sigma)
pGEX-4T-1	(Pharmacia)
pRc/CMV AC7	(Mayer et al., 1984; pRc/CMV von Invitrogen)
pQE-30	(Qiagen)

#### 3.1.7.2 eigene Plasmide

<i>Bezeichnung</i>	<i>Eigenschaften</i>
pBSK-GAPDH	GAPDH-Fragment in pBluescript II KS(+)
pB-NRIF2	<i>nrf2</i> , komplette cDNA in pBluescript II SK(+)
Klon „Phage 5“	<i>nrf2</i> , partieller genomischer Klon in pBluescript II SK(+)
Klon „Phage 5.8“	<i>nrf2</i> , partieller genomischer Klon in pBluescript II SK(+)
Klon „Phage 7“	<i>nrf2</i> , partieller genomischer Klon in pBluescript II SK(+)
Klon 5-2	<i>nrf2</i> , partielle cDNA in pBluescript II SK(-)
Klon 2.4.1	<i>nrf2</i> , partielle cDNA in pBluescript II SK(-)
Klon 2.4.1 us	<i>nrf2</i> , partielle cDNA in pBluescript II SK(-)
Klon 3.5.2	<i>nrf2</i> , partielle cDNA in pBluescript II SK(-)
Klon 5.2 ds	<i>nrf2</i> , partielle cDNA in pBluescript II SK(-)
Klon „Race 3.1“, „Race 3.2“ und „Race 4.2“	<i>nrf2</i> , partielle cDNA in pBluescript II SK(+)

Klon 6-3	<i>nrf1</i> cDNA in pBluescript II SK(-) (E. Casademunt)
Klon aa530133/8	<i>nrf2</i> , partielle cDNA in pBluescript II SK(-); EST
HA-p75	Ratten-p75 in pRc/CMV AC7 (E. Hoppe)
HA-p75-ICD	Ratten-p75-ICD in pRc/CMV
HA-p75-jm	Ratten-p75, ECD und Juxtamembranregion in pRc/CMV AC7
HA-p75-dd	Ratten-p75, „Death“-Domäne in pRc/CMV
HA-p75-jm2	Ratten-p75, Juxtamembranregion in pRc/CMV
HA-p75-ECD	Ratten-p75-ECD in pRc/CMV AC7
HA-RhoA	Wildtyp-RhoA (Huhn) in pcDNA3 (T. Yamashita)
Nedd-2	Nedd-2 (Caspase-2) in pRc/CMV
pEGFP-NRIF1	<i>nrf1</i> in pEGFP-C1 (B. Carter)
pEGFP-NRIF2	<i>nrf2</i> in pEGFP-C2
pFLAG-NRIF1full	<i>nrf1</i> in pFLAG-CMV-2 (B. Carter)
pFLAG-NRIF1ΔZnf	<i>nrf1</i> ohne Zinkfinger in pFLAG-CMV-2 (B. Carter)
pGEX-NRIF1ΔN	partiell <i>nrf1</i> in pGEX-4T-1 (B. Carter)
pGEX-NRIF2 ΔN	partiell <i>nrf2</i> in pGEX-4T-1
pGEX-NRIF1ΔZnf	<i>nrf1</i> ohne Zinkfinger in pGEX-2T (B. Carter)
p53-CMV	p53 in pRc/CMV (S. Grimm)
p75-pcDNA3	Ratten-p75-cDNA in pcDNA3 (Bibel et al., 1999)
p75-QE31	Ratten-p75-ICD in pQE31 (Liepinsh et al., 1997)
pQE-NRIF1	partiell <i>nrf1</i> in pQE-30
pQE-NRIF2	partiell <i>nrf2</i> in pQE-30

### 3.1.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden bei Metabion (Martinsried) oder bei der Serviceeinheit des MPI für Biochemie (Martinsried) bestellt. Stammlösungen für PCR-Reaktionen hatten eine Konzentration von 10 µM.

#### 3.1.8.1 Oligonukleotide für Phagencharakterisierung, Klonierungen und Sonden

Bezeichnung	Sequenz
2020	GCGCTCGAGTCTCCTGAGCCTTCCC
T3/T7	<b>T3:</b> AATTAACCCTCACTAAAGGG <b>T7:</b> GTAATACGACTCACTATAGGGC
1592	TCCATGACACGAGGTTTACG
1593	CAGAAGTGCTAAGTTCCTCG
H2247 (GSP1)	CCTGGGTTCAAGTCTTCCCCACTTTC
AP1 (Clontech)	CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC
H1644 (NGSP1)	GAAAAGGAATTCATTCCAGGG
AP2 (Clontech; <b>NotI</b> )	ACTCACTATAGGGCTCGAG <b>GCGGCCGC</b>
H2378 (GSP- <b>NotI</b> )	GT <b>GCGGCCGC</b> GTTC AAGTCTTCCCCACTTTC
H5165 ( <b>Bam</b> HI)	GT <b>GGATCC</b> GAGAACACTGAGGACAGTATG ( <u>Start-Codon</u> )
H5120	GGGATCTCTGCTGGTCTGAG
H5131	AGAAATCAGCAGAAGGACTCC
3377 ( <b>Sal</b> I)	GT <b>GTCGACT</b> AGTGCTCTGAAAGGCACAAAG
H2799 ( <b>Bam</b> HI)	GT <b>GGATCC</b> ATGGCAGCTGATGCACCTCC
H2800 ( <b>Xho</b> I)	GT <b>CTCGAG</b> ACAATAGTGCTCTGAAAGGCAC
H7099 ( <b>Hind</b> III; HA-Epitop)	GT <b>CAAGCTT</b> GCCACCA <b>ATG</b> TATCCTTATGACGTGCCTGACTATGCCGG
H7089 ( <b>Not</b> I)	GGGAAAGAGGTGGAACAGCTG ( <u>Start-Codon</u> ) GT <b>GCGGCCGC</b> TCACACTGGGGATGTGGCAG ( <u>Stop-Codon</u> )

HAp75ECD5' ( <b>NheI</b> ; HA-Epitop)	GTC <b>GCTAGCT</b> TATCCTTATGACGTGCCTGACTATGCCGGGGGAAAGG AGACATGTTCCACAGG
H7122 ( <b>NotI</b> )	GTC <b>GCGGCCGCT</b> CAATCACCCCTTGAGGGCCTGG ( <u>Stop-Codon</u> )
HAp75ECD3' ( <b>NotI</b> )	GTC <b>GCGGCCGCT</b> CAGTTCCACCTCTTGAAAGCAAT ( <u>Stop-Codon</u> )

### 3.1.8.2 Oligonukleotide für RT-PCR und Genotypisierung

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
H3060	GAGAGGACTCACTGGGCA	Verifizierung der RACE-Produkte
H3062	CAGTGTCGGCTTCGTTAGTG	Verifizierung der RACE-Produkte
H3063	ATCGCAAGCACTCGTAACGC	Verifizierung der RACE-Produkte
H3075	GTTCAAGTCTTCCCACTTTC	Verifizierung der RACE-Produkte
2705	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	RT-PCR <i>gapdh</i>
2706	ACCACAGTCCATGCCATCAC	RT-PCR <i>gapdh</i>
HPRTdir	TACAGGCCAGACTTTGTTGG	RT-PCR <i>hprt</i>
HPRTrev	AACTTGCGCTCATCTTAGGC	RT-PCR <i>hprt</i>
mp75ex2/3s	CCTGCCTGGACAGTGTTACG	RT-PCR <i>p75</i>
mp75ex4a1	GCCAAGATGGAGCAATAGACAG	RT-PCR <i>p75</i>
H2261	TCCCTCTATCCAGAAAGTGGG	RT-PCR <i>nrif2</i>
H2265	ATCATGATACTTGGTCCTTTGCA	RT-PCR <i>nrif2</i>
3'-neo	GATTCGCAGCGCATCGCCTTC	Genotypisierung <i>nrif1</i>
1592, 1593	s.o.	RT-PCR <i>nrif1</i> ; Genotypisierung

## 3.1.9 Antikörper

(In Klammern: Verdünnung für Immunfluoreszenz, IF, Western Blot, WB bzw. Immunpräzipitation, IP)

### 3.1.9.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	
<u>Anti-Bromdesoxyuridin (BrdU)</u> (Bio-Science Products AG)	Monoklonal aus Maus, IgG1-Subklasse (1:10 für IF)
<u>Anti-FLAG M5</u> (Sigma/Kodak)	Monoklonal aus Maus, IgG1-Subklasse (1:500 für IF, 1:1000 für WB)
<u>Anti-GFP Living Colors</u> <sup>TM</sup> (Clontech)	Polyklonal, Mischung mehrerer monospezifischer Kaninchen anti-GFP-Antikörper (1:1000 für WB)
<u>Anti-GFP</u> (Boehringer Mannheim)	Mischung zweier monoklonaler Antikörper aus Maus, Klone 7.1 und 13.1, beide IgG1 $\kappa$ -Subklasse (1:250 für IP)
<u>Anti-GFP</u> (RDI)	Polyklonal aus Kaninchen (1:500 für IF)
<u>Anti-GST</u> (Pharmacia Biotech)	Polyklonal aus Ziegenserum (1:1000 für WB)
<u>Anti-HA</u> (Sabine Werner)	Monoklonaler Hybridomaüberstand (1:5 für IP)
<u>Anti-HA</u> , Klon 12CA5 (Boehringer Mannheim)	Monoklonal aus Maus, IgG <sub>2b</sub> $\kappa$ (0,5 $\mu$ g/ml für WB, 2,5 $\mu$ g/ml für IP)
<u>Anti-NGF-Rezeptor</u> , MC192	Monoklonal aus Maus, IgG1-Subklasse; gegen extrazelluläre Domäne von Ratten-p75 gerichtet (1:200 für IF, 1:40 für IP)
<u>Anti-NRIF #1002</u> (Bruce Carter)	Polyklonal aus Kaninchen; gegen NRIF-Peptid gerichtet, Epitop ca. 100 AS vor erstem Zinkfinger (Serum 1:800 für IF, 1:2500 für WB)
<u>Anti-p75</u> (Promega)	Polyklonal aus Kaninchen, gegen cytoplasmatische Domäne von Mensch-p75 gerichtet (1:400 für IF, 1:2000 für WB)
<u>Anti-p75 „Gerbu I“</u> (Tim Hucho)	Polyklonal aus Kaninchen (1: 500 für IF, 1:2000 für WB)

### 3.1.9.2 Sekundäre Antikörper:

Falls nicht anders angegeben, stammten die Antikörper von der Firma Dianova.

FITC-konjugiert, Ziege Anti-Kaninchen	(1:50 für IF)
Fluorescein (DTAF)-konjugiert, AffiniPure Schaf Anti-Maus IgG (H+L)	(1:50 für IF)
Lissamin-Rhodamin (LRSC)-konjugiert, AffiniPure Schaf Anti-Kaninchen IgG (H+L)	(1:80 für IF)
Lissamin-Rhodamin (LRSC)-konjugiert, AffiniPure Schaf Anti-Maus IgG (H+L)	(1:80 für IF)
Peroxidase-konjugiert, Esel anti-Ziege IgG (H+L)	(1:10 000 für WB)
Peroxidase-konjugiert, Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) (ImmunoPure <sup>®</sup> , Pierce)	(1:10 000 für WB)
Peroxidase-konjugiert, Ziege anti-Maus IgG (H+L) (ImmunoPure <sup>®</sup> , Pierce)	(1:10 000 für WB)

### 3.1.10 Neurotrophine

Rekombinante Neurotrophine (NGF, BDNF, NT-3) stammten von Genentech, Inc. oder Regeneron Amgen Partners. Sie waren in CHO-Zellen (Chinese Hamster ovary) oder in *E. coli* produziert worden.

### 3.1.11 Geräte

Agarose-Gelkammern (Werkstatt MPI für Biochemie)	Phosphoimager Fujix BAS 1000 (Fuji), Software TINA
Bakterieninkubator (Heraeus)	2.09, Screen BAS-III
Bakterienschüttler innova 4000 (New Brunsw. Scientific)	Power Supplies: Power Pack P25 (Biometra) und
Bioslink <sup>™</sup> Linker/ Transilluminator (Bios corporation)	Electrophoresis Constant Power Supply ECPS
Biacore <sup>®</sup> X Biosensor (Biacore)	3000/150 (Pharmacia)
DNA-Sequencer 373 Abi Prism <sup>™</sup> (Applied Biosystems)	Rotor: Mixing Rotor Variospeed (Renner GmbH)
ELISA-Reader 340 ATC (SLT-Labinstruments)	Saugpumpe (Vacuubrand)
Feinwaage AT261 Delta Range (Mettler Toledo)	Schüttler: Celloshaker Variospeed (Renner GmbH)
Filmentwicklungsgerät Optimax TypTR (MS Laborgeräte)	Spektrophotometer Ultrospec 3000 (Pharmacia)
Fluoreszenz-ELISA-Reader Titertech Fluoroskan II,	SpeedVac Vakuumentrifuge Univapo 100H
Software EIA Version 3.10 (LabSystems/Flow Laborat.)	Sterilbank Class II Type A/B3 (Beckman)
French Pressure Cell (American Instrument Company)	Szintillationszähler LS 5000 TA (Beckman)
Gefriertrockner (Lyophilizer) Lyovac GT2	Ultraschallgerät: Sonifier W-450 (Branson)
Geldokumentationssystem E.A.S.Y. RH mit Software	Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel IKA <sup>®</sup> -Labortechnik)
EasyWin32 (Herolab)	UV-Transilluminator 302 nm bzw. 312 nm/254 nm
Geltrockner (Werkstatt MPI für Biochemie)	(Bachofer)
Slab Gel Dryer (UniEquip)	Vortex Genie-2 (Scientific Industries)
Heizblock Digital Dry Block Heater (PMC)	Wasserultrafiltrationsanlage Seralpur 90 CN und
Heizblock (Liebisch)	Seralpur CF (Seral)
Hybridisierungsöfen: Mini Oven MK II (Hybaid)	Western Semi-Trocken Transfer-Kammern (Werkstatt
Kamera (Polaroid)	MPI für Biochemie)
Mikroskop Axiovert 35M (Zeiss)	Zellinkubatoren: IG150 (Jouan), Cytoperm (Heraeus),
Mikroskope Axioplan 2 und Axiophot (Zeiss)	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero (Heraeus), Water-Jacketed Incubator
Mikroskop Diavert (Leitz)	(Forma Scientific)
Mini PROTEAN II Cell (BioRad)	Zentrifugen: 5415C (Eppendorf), 3K30 (Sigma/B.
Ofen (Bachofer; Heraeus)	Braun), Sorvall RC-5B Plus (DuPont Instruments) mit
PCR-Geräte: GeneAmp PCR System 2400, 9600 und	GSA, HB-4 und SS-34-Rotoren, Varifuge 3.0R
9700 (Perkin Elmer bzw. PE Applied Biosystems);	(Heraeus), Labofuge GL (Heraeus), Universal 30F
Mastercycler Gradient (Eppendorf)	(Hettich), GS-15 (Beckman), Ultrazentrifuge TL-100
Pumpe Minipuls 2 (Abimed)	(Beckman), PicoFuge (Stratagene)

### 3.1.12 Kulturmedien und Antibiotika

Standardmedien für Bakterien wurden nach Sambrook et al. (1989) hergestellt. Die verwendeten Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und 20 min bei 121°C, 1 bar Überdruck autoklaviert. Für Agarplatten wurden 15 g Bacto-Agar pro Liter Medium zugesetzt. Bestandteile von Kulturmedien stammten von DIFCO oder Gibco BRL.

Ampicillin (Stammlösung 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O) (Roth)  
 Chloramphenicol (Stammlösung 34 mg/ml in Ethanol)  
 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (Gibco BRL) mit GlutaMAX-1™, 4500 mg/l Glucose, Pyridoxin  
 Fötale Kälberserum (FCS) (30 min bei 56°C inaktiviert) (Gibco BRL)  
 L-Glutamin 200 mM (100 x) (Gibco BRL)  
 Kanamycin (Stammlösung 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) (Boehringer Mannheim/Roche)  
 MEM nicht-essentielle Aminosäuren 100 x (Gibco BRL)  
 Natriumpyruvat MEM 100 mM (Gibco BRL)  
 Penicillin-Streptomycin (10 000 Units/ml Penicillin und 10 000 µg/ml Strep.) (Gibco BRL)  
 Spectinomycin (Stammlösung 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O)  
 Tetracyclin (Stammlösung 5 mg/ml in Ethanol)  
 Trypsin-EDTA (1 x) für Zellkultur (0,05% Trypsin) (Gibco BRL)  
 Trypsin-EDTA zur Dissoziation von Embryonen (0,25% Trypsin) (Gibco BRL)

### 3.1.13 Puffer und andere Lösungen

Standardpuffer wurden nach Angaben aus Sambrook et al. (1989) hergestellt. Die Zusammensetzung hier nicht aufgeführter Lösungen findet sich bei den jeweiligen Methoden. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen in bidestilliertem H<sub>2</sub>O angesetzt.

#### Aprotinin-Stammlösung

1 mg/ml in 10 mM HEPES pH 8

#### Aufbewahrungslösung für Proteingele

20% Methanol und 3% Glycerin in H<sub>2</sub>O

#### Auftragspuffer für DNA-Proben (10 x)

a) 50% Glycerin  
 1 x TBE  
 0,25% Bromphenolblau  
 0,25% Xylencyanol  
 b) 60 mg Orange G in 10 ml 50% Glycerin

#### Auftragspuffer für Protein-Proben (5 x)

250 mM Tris-HCl pH 6,8  
 10% SDS  
 30% Glycerin  
 0,001% Bromphenolblau  
 5% β-Mercaptoethanol

#### Na-Azid Stammlösung

2% in H<sub>2</sub>O (Verwendung 1:100)

#### Auftragspuffer für RNA-Proben (10 x)

50% Glycerin  
 1 mM EDTA  
 0,25% Bromphenolblau  
 0,25% Xylencyanol

#### BBS (2 x)

50 mM BES (N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethan-sulfonsäure)  
 280 mM NaCl  
 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 pH 6,95 mit NaOH einstellen

#### BrdU-Stammlösung

1 mM in PBS

#### Coomassie-Färbelösung

0,25% Coomassie Brilliant Blue R250  
 50% (v/v) Methanol  
 10% Eisessig

#### Coomassie-Entfärbelösung

5% Eisessig und 10% Methanol in H<sub>2</sub>O

**DNase I Stammlösung**

1 mg/ml in H<sub>2</sub>O

**DTT-Stammlösung**

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

**Fixierlösung für Zellen**

4% (w/v) p-Formaldehyd in PBS pH 7,2

**Hoechst 33258-Stammlösung**

1 mg/ml in H<sub>2</sub>O (Arbeitskonzentration 1 µg/ml)

**IPTG**

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

**Lysozym-Stammlösung**

50 mg/ml in 25 mM Tris pH 8

**MOPS (10 x) für RNA-Puffer**

0,2 M MOPS

50 mM NaAc

10 mM EDTA

in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O; pH 7 mit NaOH

**dNTP-Stammlösung**

je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP  
in 10 mM Tris pH 7,5

**Leupeptin-Stammlösung**

1 mg/ml in H<sub>2</sub>O

**Lysepuffer 1 für Bakterien**

50 mM HEPES pH 7,9

0,5 M NaCl

1 % Triton X-100

0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>

5 mM DTT

je 5 µg/ml Aprotinin und Leupeptin

1 mM PMSF

**Lysepuffer 2 für Bakterien**

50 mM HEPES pH 7,9

150 mM NaCl

1 mM EDTA

5 mM DTT

je 5 µg/ml Aprotinin und Leupeptin

1 mM PMSF

in 1 x PBS

**Lysepuffer für eukaryot. Zellen**

50 mM HEPES pH 7,4

150 mM NaCl

10% Glycerin

0,1% bis 1% Nonidet P-40 oder Triton X-100

je 5 µg/ml Aprotinin und Leupeptin

1 mM PMSF oder 4 mM Pefabloc

**Northern Blot Aufbewahrungspuffer**

25 mM Na-Phosphat pH 7,5

125 mM NaCl

1% SDS

2 mM EDTA

**Northern Blot Prähybridisierungslösung**

7% SDS

0,5 M Na-Phosphatpuffer pH 7,5

1 mM EDTA

1% BSA

**Northern Blot „Stripplösung“**

2,5 mM Na-Phosphat pH 7,15

12,5 mM NaCl

0,7% SDS

**Northern Blot Waschpuffer 1**

40 mM Na-Phosphat pH 7,15

5% SDS

1 mM EDTA pH 8

**Northern Blot Waschpuffer 2**

40 mM Na-Phosphat pH 7,15

1% SDS

1 mM EDTA pH 8

**PMSF-Stammlösung**

100 mM in Isopropanol

**Ponceau S**

2 g/l in 2% Trichloressigsäure

**„Pull-Down“-Experiment, Waschpuffer 1**

0,3 M NaCl

40 mM HEPES pH 7,4

5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM DTT

0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>

**„Pull-Down“-Experiment, Waschpuffer 2**

wie Waschpuffer 2, aber nur 150 mM NaCl

**RF1 für kompetente Zellen**

100 mM RbCl

50 mM MnCl<sub>2</sub>

30 mM KAc

10 mM CaCl<sub>2</sub>

15% Glycerin

pH 5,8 mit Essigsäure einstellen

**RF2 für kompetente Zellen**

10 mM MOPS

10 mM RbCl

75 mM CaCl<sub>2</sub>

15% Glycerin

pH 6,8 mit 0,5 N NaOH einstellen

**SDS-Elektrophoresepuffer (10 x)**

0,25 M Tris

1,92 M Glycin

1% (w/v) SDS

**SM-Puffer**

100 mM NaCl

8 mM MgSO<sub>4</sub>

50 mM Tris-HCl pH 7,5

0,01% (w/v) Gelatine

**TBST (Western Blot Waschlösung)**

25 mM Tris-HCl pH 8  
150 mM NaCl  
0,1% Tween-20

**TENS (Lysepuffer für DNA-Minipräparation)**

10 mM Tris-HCl pH 8  
1 mM EDTA pH 8  
100 mM NaOH  
0,5 % (w/v) SDS

**Western Blot Blockierungslösung**

5% Magermilchpulver in TBST

**Western Blot „Stripplösung“**

100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
2% (w/v) SDS  
62,5 mM Tris-HCl pH 6,7

**Western Blot Transferpuffer**

48 mM Tris  
39 mM Glycin  
20% Methanol  
0,00375 % SDS

**X-Gal**

20 mg/ml in Dimethylformamid

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

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

Angaben zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur oder auf Mediumplatten finden sich bei Sambrook et al. (1989). Es wurden folgende Antibiotikakonzentrationen verwendet: Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Chloramphenicol 30 µg/ml, Tetracyclin 10 µg/ml und Spectinomycin 100 µg/ml. Zur Lagerung von *E. coli* in Glycerinkulturen wurden 700 µl einer ÜN-Kultur mit 300 µl sterilem Glycerin gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und bei -70°C eingefroren.

### 3.2.2 Herstellung kompetenter Zellen nach Hanahan (1983)

*E. coli*-Bakterien des gewünschten Stammes wurden aus einer Glycerinkultur auf SOB-Medium mit geeigneten Antibiotika ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Mit einer Einzelkolonie dieser Platte wurde eine ÜN-Kultur in 3 ml SOB (mit Antibiotika) angeimpft. Am nächsten Morgen wurden 100 ml SOB mit 200 µl der ÜN-Kultur beimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,2 geschüttelt. Die Kultur wurde nun 15 min auf Eis inkubiert, 15 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert (Varifuge 3.0R) und der Überstand verworfen. Der Zellschlag wurde in 32 ml Puffer RF1 resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Niederschlag in 8 ml Puffer RF2 aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert und in Aliquots von 200 µl auf 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Die kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 3.2.3 Transformation von Bakterien

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden bei RT aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. 1-30 ng Plasmid-DNA oder ein Viertel (5 µl) eines Ligationsansatzes wurden zugegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 90 sec-Hitzeschock wurden die Bakterienzellen nochmals 5 min auf Eis gestellt und nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium 30 min bei 37°C inkubiert. 50 µl und 150 µl des Ansatzes wurden auf antibiotikumhaltigen Mediumplatten ausgestrichen.

Bei Durchführung einer „Blau-Weiß-Selektion“ wurden vor dem Plattieren der Bakterien 100 µl 100 mM IPTG und 20 µl 50 mg/ml X-Gal (in Dimethylformamid) auf der Platte ausgestrichen.

### **3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

#### *3.2.4.1 Plasmid-DNA-Minipräparation (Zhou et al., 1990)*

1,5 ml einer 3 ml-ÜN-Kultur in LB-Medium wurden 30 sec bei 13 000 rpm abzentrifugiert, der Überstand fast vollständig abgegossen und die Bakterien in der verbleibenden Flüssigkeit (ca. 50 µl) resuspendiert. Nach Aufschluß der Bakterien durch alkalische Lyse (Zugabe von 300 µl TENS, 4 sec mischen, 5 min auf Eis inkubieren) wurde das Lysat mit 150 µl 3 M NaAc pH 5,2 neutralisiert und 5-10 min bei 14 000 rpm, 4°C zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und die Plasmid-DNA aus dem partikelfreien Überstand durch Zugabe von 900 µl 100% eiskaltem Ethanol gefällt. Der nach 15 min Zentrifugation (4°C, 14 000 rpm) erhaltene DNA-Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, 5 min im Vakuum getrocknet und in 40 µl 10 mM Tris pH 7,4 aufgenommen. Die so gewonnene DNA wurde für Restriktionsanalysen oder PCR-Reaktionen eingesetzt.

#### *3.2.4.2 Plasmidisolierung nach Qiagen*

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden Anionenaustauschersäulen der Firma Qiagen verwendet. Es wurde genau nach Angaben des Herstellers verfahren.

### **3.2.5 Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwänzen**

Genomische DNA aus der Schwanzspitze von Mäusen bzw. aus dem Dottersack von Maus-embryonen wurde nach einem Protokoll von Laird et al. (1991) gewonnen. Ein ca. 2 mm langes Schwanzstück (a) bzw. der Dottersack (b) wurde in 500 µl Lysepuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl, 100 µg/ml Proteinase K) bei 55°C unter Drehen über Nacht (a) bzw. 4 h (b) inkubiert. Gegebenenfalls wurden Haare 10 min bei 14 000 rpm, RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur Fällung der DNA mit 500 µl Isopropanol gemischt und die DNA 15 min bei 4°C, 15 000 rpm sedimentiert. Nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde der Niederschlag bei Raumtemperatur getrocknet und in 60-100 µl TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) aufgenommen. Die genomische DNA wurde für Genotypisierung mittels PCR eingesetzt.

### **3.2.6 Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen**

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte jeweils in dem vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Puffersystem unter den angegebenen Temperaturbedingungen. Es wurden ca. 5 Units eines Enzyms pro 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Bei

der Spaltung von Plasmid-Minipräparationen wurde zusätzlich 0,5 µg/µl RNase A zugegeben, bei Lambda-Phagen-DNA 1 mM Spermidin.

Um eine intramolekulare Religation von linearisierten Vektormolekülen zu vermeiden, wurde die 5'-Phosphatgruppe mit Hilfe von Shrimp Alkalischer Phosphatase nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim/Roche) entfernt (Dephosphorylierung von DNA). Das Enzym konnte durch 15 min Inkubation bei 65°C inaktiviert werden.

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten wurde die Vektor-DNA in drei- bis fünffach geringerer Konzentration als die „Insert“-DNA eingesetzt. Die Ligation wurde mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (Boehringer Mannheim/Roche) oder unter Verwendung von T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) jeweils nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Überhängende 5'-Enden wurden bei Klonierung in einen Vektor mit glatten Enden vor der Ligation mit DNA-Polymerase I großes Fragment (Klenow) aufgefüllt.

### **3.2.7 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Die Phenol-Chloroform-Extraktion diente zur Entfernung kontaminierender Proteinbestandteile aus wässrigen DNA-Proben und wurde nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

### **3.2.8 DNA-Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit 0,7% bis 2% Agarosegelen in 0,5 x TBE-Puffer (Tris-Borat) durchgeführt. Die Gele enthielten zur Anfärbung der DNA-Proben 0,5 µg/ml Ethidiumbromid oder 1:10 000 SYBR<sup>®</sup> Green I. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit 0,1 Volumenanteilen 10 x DNA-Probenpuffer gemischt.

DNA wurde unter UV-Licht (302 nm oder 312 nm für Ethidiumbromidfärbung, 254 nm für SYBR<sup>®</sup> Green I-Färbung) sichtbar gemacht und mit dem Geldokumentationssystem E.A.S.Y. RH (Herolab; Software EasyWin32) oder einer Polaroid-Kamera photographiert.

### **3.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarose-Gelen**

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht (302 nm) aus einem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAEX II Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Bestrahlung mit UV-Licht sollte möglichst kurz sein, um Schädigung der DNA zu vermeiden.

### 3.2.10 In vitro-Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gab es verschiedene Anwendungsmöglichkeiten, deren wichtigste im folgenden erläutert werden:

#### 3.2.10.1 PCR für Klonierungen

Falls DNA-Fragmente für Klonierungen amplifiziert werden sollten, besaßen die verwendeten Oligonukleotid-Primer an einem Ende einen Überhang von nicht-hybridisierenden Nukleotiden, mit dessen Hilfe andere Sequenzen, z.B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen oder sogenannte „Tags“ eingeführt werden konnten. Als „Template“-DNA diente Qiagen-gereinigte Plasmid-DNA. Um Fehler zu vermeiden, wurde eine Polymerase mit Korrektur-Aktivität verwendet (Pfu-Polymerase, Stratagene). Ein typischer Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 100 µl 50 ng Plasmid-DNA, 5 Units Pfu-Polymerase, je 0,4 µM Oligonukleotide, 0,6 mM dNTP-Mischung und 1 x Reaktionspuffer. Das Enzym wurde erst bei einer Temperatur von 94°C zugegeben („Hot Start“). Die Reaktion wurde 5 min bei 94°C denaturiert und sodann folgende Reaktionsbedingungen 25-30-mal zyklisch wiederholt:

30 sec Denaturierung bei 94°C, 1 min Hybridisierung bei einer Temperatur, die mindestens 2°C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen sollte (meist zwischen 55°C und 65°C) und 1 min pro kb Verlängerung bei 72°C. Ein abschließender Zyklus von 5 min bei 72°C sollte das Auffüllen unvollständiger Kopien ermöglichen. 5 µl des Reaktionsansatzes wurden auf einem Agarosegel analysiert, die restliche Probe mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) gereinigt und mit den gewünschten Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Probe wurde auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht (302 nm) ausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAEX II Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Für kurze Fragmente wurde AmpliTaq® DNA-Polymerase (Perkin Elmer) ohne Korrektur-Aktivität verwendet. 100 µl-Reaktionsansätze enthielten 100 pg bis 50 ng Plasmid-DNA, 2,5 Units Taq-Polymerase, je 0,2 µM Oligonukleotide, 0,2 mM dNTP-Mischung und 1 x Reaktionspuffer. Die Taq-Polymerase benötigt nur 30 sec pro kb Verlängerungszeit.

#### 3.2.10.2 Genotypisierung mittels PCR

Bei der Genotypisierung wurde 1 µl genomische DNA (vgl. 3.2.5) eingesetzt und mit Taq-DNA-Polymerase (Gibco BRL) amplifiziert. Die Reaktionen wurden auf 1% Agarosegelen analysiert. Die Oligonukleotide 1592 und 1593 amplifizierten das 521 bp lange Wildtyp-Produkt, während 1592 und 3'-neo im gleichen Reaktionsansatz eine 572 bp große Bande erzeugten, die für das *nrif1*-„knockout“-Allel spezifisch war.

Für die *nrf1*-spezifische PCR wurden folgende Bedingungen verwendet:

<u>Reaktionsansatz (30 µl)</u>	<u>Reaktionsbedingungen</u>
1 µl DNA	4 min 94°C (Denaturierung)
1 x Reaktionspuffer	30 sec 94°C
1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	30 sec 57°C
0,2 mM dNTP	1 min 72°C
je 0,4 µM Oligonukleotid 1592, 1593 und 3'-neo	5 min 72°C (abschließender Zyklus)
1,5 Units Taq-Polymerase	Zykluszahl: 33

### 3.2.10.3 „5'-RACE“

Die sog. „5'-RACE“-PCR wurde angewandt, um Information über das 5'-Ende einer unvollständigen cDNA zu erhalten. „RACE“ steht für „rapid amplification of cDNA ends“, also schnelle Verlängerung von cDNA-Enden. Es wurde eine „Marathon-Ready™ cDNA“ aus Maushirn (Clontech) verwendet und genau nach Anleitung des Herstellers verfahren. Die cDNA war mittels Oligo-dT-Primern aus Poly-A<sup>+</sup>-RNA synthetisiert und an beiden Enden mit spezifischen Adaptoren versehen worden. In PCR-Reaktionen konnte nun unter Verwendung eines genspezifischen Oligonukleotid-Primers („GSP1“, antisense-Primer) und des im „Kit“ enthaltenen Adaptor-spezifischen Primers „AP1“ (sense-Primer) die 5'-Region des gewünschten Gens amplifiziert werden. Der genspezifische Primer sollte möglichst weit stromaufwärts (5') auf der teilweise bekannten Sequenz liegen und einen hohen Schmelzpunkt ( $T_m > 70^\circ\text{C}$ ) besitzen, welcher die Durchführung einer „Touchdown“-PCR ermöglichte: die ersten PCR-Zyklen wurden bei einer Temperatur über dem Primer-Schmelzpunkt (72°C) durchgeführt, wodurch zwar die Effizienz verringert, jedoch die Spezifität stark verbessert wurde. Nach fünf Zyklen wurde die Anlagerungstemperatur für die restlichen 20 bis 25 Zyklen auf den Primer-Schmelzpunkt verringert. PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel isoliert, mit innerhalb der ursprünglichen Sequenz liegenden Oligonukleotiden („nested Primer“) reamplifiziert, in den Vektor pBluescript (Stratagene) kloniert und sequenziert.

In der 5'-RACE-PCR zur Amplifizierung des 5'-Endes von *nrf2* wurde als genspezifischer Primer (GSP1) das Oligonukleotid H2247 zusammen mit AP1 verwendet, als „nested Primer“ (NGSP1) das Oligonukleotid H1644 zusammen mit AP2. Die Klonierung der RACE-PCR-Produkte in den Vektor pBluescript (Stratagene) erfolgte mit Hilfe der Oligonukleotide H2378 und AP2, die beide eine Restriktionsschnittstelle für *NotI* einführten.

### 3.2.10.4 Semiquantitative RT-PCR

Bei der semiquantitativen PCR ist es wichtig, die Primer so zu wählen, daß nur ein einziges PCR-Produkt entsteht, da sonst keine quantitativen Aussagen möglich sind. Außerdem muß die in die Reaktion eingesetzte cDNA frei von DNA-Kontaminationen sein (vgl. 3.2.13 und 3.2.15). Die optimale Anzahl der für die Amplifizierung nötigen Zyklen wurde experimentell so bestimmt, daß die Detektionsgrenze überschritten wurde, die PCR aber noch nicht die Sättigungsphase erreicht hatte. Ein 50 µl-Reaktionsansatz enthielt 1,25 Units Taq-Polymerase (Perkin Elmer), je 0,2 µM Oligonukleotide, 0,2 mM dNTP-Mischung und 1 x Reaktionspuffer. Die Menge an zugegebener cDNA variierte je nach zu amplifizierendem Gen.

Die folgende Übersicht erläutert die am häufigsten durchgeführten RT-PCR-Reaktionen, wobei der Reaktionsansatz vor Beginn der Zyklen 5 min bei 94°C denaturiert wurde und nach Beendigung ein letzter Zyklus von 5 min bei 72°C folgte. Alle Reaktionen wurden auf Eis pipettiert und erst bei 94°C in die PCR-Maschine überführt („cold start“).

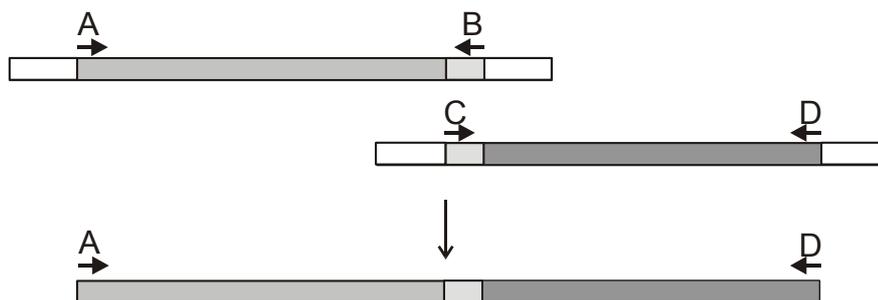
	<i>Reaktionszyklus:</i>
<b>NRIF1:</b>	30 sec 94°C
Oligonukleotide 1592 und 1593	30 sec 58°C
3 µl cDNA in 50 µl	30 sec 72°C
Produktlänge 522 bp	(31 Zyklen)
<b>NRIF2:</b>	30 sec 94°C
Oligonukleotide H2261 und H2265	30 sec 60°C
3 µl cDNA in 50 µl	30 sec 72°C
Produktlänge 531 bp	(35 Zyklen)
<b>GAPDH:</b>	30 sec 94°C
Oligonukleotide 2705 und 2706	30 sec 60°C
1 µl cDNA in 50 µl	30 sec 72°C
Produktlänge 450 bp	(22 Zyklen)
<b>HPRT:</b>	30 sec 94°C
Oligonukleotide <i>HPRTdir</i> und <i>HPRTrev</i>	30 sec 56°C
1 µl cDNA in 50 µl	20 sec 72°C
Produktlänge 150 bp	(28 Zyklen)

	<i>Reaktionszyklus:</i>
<b>p75:</b>	30 sec 94°C
Oligonukleotide <i>mp75ex2/3s</i> und <i>mp75ex4a1</i>	30 sec 63°C
2 µl cDNA in 50 µl	35 sec 72°C
Produktlänge 575 bp	(35-36 Zyklen)

PCR-Produkte wurden auf 1,5%-2% Agarosegelen analysiert, die quantitative Auswertung erfolgte unter Verwendung der EasyWin32-Quantifizierungs-Software (Herolab).

### 3.2.11 Klonierung von Konstrukten für die Analyse und Expression von NRIF1, NRIF2 und p75

Ein *nrif2*-Klon, der die vollständige codierende Region enthielt, wurde aus verschiedenen partiellen *nrif2*-Klonen im Vektor pBluescript zusammengesetzt (vgl. Abb. 5). Der Klon 5-2 ds bestand aus dem Klon 5-2, an den über *HindIII* (Schnittstellen im vierten Zinkfinger von *nrif2* sowie auf der 5'-Seite des Vektors) das fehlende 3'-Ende („ds“ stand für „downstream“) angefügt wurde. Ein Konstrukt (Klon 2.4.1 us; „us“ für „upstream“), das den aminoterminalen Bereich bis zum Ende des Klons 2.4.1 enthielt, wurde aus den Plasmiden Klon 2.4.1 und EST aa530133/8 (beginnt bei Pos. -180 und endet bei Pos. 1000 von *nrif2*) zusammengesetzt, wobei der EST-Klon mit *NsiI* und *HpaI* (stumpfes Ende) und der Klon 2.4.1 mit *NsiI* und *SmaI* (stumpfes Ende) geschnitten wurde. Die vollständige codierende Region wurde durch eine mehrstufige PCR-Reaktion kloniert (Abb. 4).



**Abb. 4: Klonierung von pB-NRIF2**

Zuerst wurde der 5'- bzw. 3'-Abschnitt von *nrif* in getrennten PCR-Reaktionen unter Verwendung der Oligonukleotide A und B (H5165, mit *Bam*HI-Schnittstelle und H5120; „Template“-DNA Klon 2.4.1 us) bzw. C und D (H5131 und 3377, mit *Sal*I-Schnittstelle; „Template“-DNA Klon 5-2 ds) amplifiziert. Die entstehenden PCR-Produkte überlappten im mittleren Bereich,

so daß in einer weiteren PCR-Reaktion mit den beiden äußeren Primern A und D die Gesamtsequenz amplifiziert werden konnte. Das Reaktionsprodukt wurde in den mit *Bam*HI und *Sal*I geschnittenen Vektor pBluescript kloniert und sequenziert (Klon pB-NRIF2).

Für die Expression von NRIF als Fusionsprotein der Glutathion-S-Transferase wurde eine partielle *nrif2*-Sequenz (C-terminales Drittel des Proteins) durch PCR mit dem Klon 5-2 ds als „Template“ und den Oligonukleotiden H2799 (*Bam*HI-Schnittstelle) und H2800 (*Xho*I-Schnittstelle) amplifiziert und in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-4T-1 (Pharmacia) kloniert (Vektor pGEX-NRIF2ΔN).

Die intrazelluläre Domäne von p75 (ab Lys 251) wurde durch PCR mit pcDNA3-p75 (Ratten-p75 im Expressionsvektor pcDNA3) als „Template“-DNA und den Oligonukleotiden H7099 und H7089 amplifiziert (Casademunt et al., 1999). Der 5'-Primer führte eine Kozak-Konsensus-Sequenz ein, der ein HA-Epitop (neun Aminosäuren) und zwei Glycinreste folgten. Subklonierung in mit *Hind*III und *Not*I geschnittenen Vektor pRc/CMV ergab das Plasmid HA-p75ICD. Membranständige p75-Varianten mit aminoterminalen HA-Epitop wurden analog über *Nhe*I und *Not*I in den Vektor pRc/CMV AC7 kloniert (Mayer et al., 1994 und Abschnitt 4.3.2). Als 5'-Primer wurde „HAp75ECD5“ verwendet, als 3'-Primer H7089 für HA-p75, H7122 für HA-p75jm und „HAp75ECD3“ für HA-p75ECD.

Für die Klonierung der Expressionskonstrukte flag-NRIF1, flag-NRIF1ΔZnf, EGFP-NRIF und p75 (in pcDNA3) sei auf die Literatur (Casademunt et al., 1999) verwiesen.

### 3.2.12 Southern Blot-Analyse

Lambda-Phagen-DNA (pro Gelspur ca. 2 µg) wurde mit ungefähr zwanzig verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten, alle Ansätze enthielten außerdem *Not*I zur Abtrennung der Phagenarme (die insertierte DNA wird bei Lambda-Phagen von ca. 9 kb und 21 kb großen Phagenarmen flankiert). Die DNA wurde durch Elektrophorese in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, als Größenstandard dienten Marker VI (Boehringer Mannheim/Roche) und Lambda *Hind*III-Marker (Sigma). Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel neben einem Lineal zur Kontrolle der Laufstrecke photographiert und nacheinander in folgenden Lösungen geschwenkt: 10 min 0,25 N HCl, 2 min H<sub>2</sub>O, 20 min Denaturierungspuffer (175 g NaCl und 40 g NaOH-Plätzchen in 2 l H<sub>2</sub>O) und 10 min in Transferpuffer (175 g NaCl und 20 g NaOH-Plätzchen in 2 l H<sub>2</sub>O). Die DNA wurde durch Kapillartransfer bei RT auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) übertragen. Nach ca. 16 h wurde der DNA-Transfer abgebrochen, die Geltaschen auf der Membran markiert, die Membran 10 min in 2 x SSC geschwenkt, 3 h luftgetrocknet und sodann für die Prähybridisierung eingesetzt. Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten nach der Methode von Church und Gilbert (1984), die unter dem Abschnitt Northern Blot-Analyse (3.2.14) beschrieben wird. Als Sonde wurde ein ca. 800 bp langes *Eco*RI/*Bam*HI-Fragment aus „Phage 5“ verwendet (Sonde A2, Abb. 9).

### 3.2.13 RNA-Isolierung aus Zellen und Geweben

Um eine Kontamination der Proben durch RNasen zu vermeiden, wurden Glaswaren 12 h bei 180°C und Plastikwaren 6 h bei 140°C gebacken. Lösungen wurden 12 h bei 37°C mit 0,1% DEPC behandelt und danach 15 min autoklaviert (nicht bei Tris-haltigen Puffern). RNA wurde aus eukaryotischen Zellen mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Für die Isolierung von RNA aus Mausgewebe wurde das TRIzol-Reagens (Gibco) verwendet. Bei -70°C eingefrorene Gewebe wurden ohne vorheriges Auftauen in 1,5 ml TRIzol pro 100 mg Gewebe mit einem „Ultra-Turrax T25“ bei 13 500 rpm ca. 1 min homogenisiert. Nach Angaben des Herstellers wurden kontaminierende Proteine durch eine Chloroform-Extraktion entfernt und die RNA mit Isopropanol aus dem wässrigen Überstand gefällt. Der RNA-Niederschlag wurde mit 75% und 70% Ethanol gewaschen, 5 min bei 37°C getrocknet und in 10 mM Tris pH 7,5 oder H<sub>2</sub>O 10 min bei 55°C gelöst. Die RNA wurde durch UV-Spektrometrie quantifiziert und bei -70°C gelagert.

Sollte die RNA für reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR) verwendet werden, wurde sie in 10 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 1 h bei 37°C mit ca. 4 Units DNase I, RNase-frei (Boehringer Mannheim/Roche) pro µg RNA behandelt, um etwaige DNA-Kontaminationen zu beseitigen. Anschließend wurde die DNase nach dem „Clean-up“-Protokoll des „RNeasy Mini Kit“ entfernt und die RNA in H<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.2.14 Northern Blot-Analyse

Für die RNA-Analyse mittels Northern Blot wurden pro Spur 10-15 µg Gesamt-RNA vorbereitet. Die RNA wurde fast komplett lyophilisiert (Restvolumen 5,5 µl in H<sub>2</sub>O oder 10 mM Tris pH 7,4) und mit 2,5 µl 10 x MOPS, 4,5 µl 37% Formaldehyd sowie 12,5 µl deionisiertem Formamid versetzt. Nach zehnmütiger Denaturierung bei 65°C wurde die RNA auf Eis abgeschreckt, mit 2,5 µl Auftragspuffer für RNA-Proben gemischt und auf ein 1,2% bis 1,4% Formaldehyd-haltiges Agarosegel (1 x MOPS, 2,22 % Formaldehyd, 0,4 µg/µl Ethidiumbromid) geladen. Eine 0,24-9,5 kb „RNA Ladder“ (Gibco BRL) diente als Größenstandard. Die Proben wurden bei 5 V/cm ca. 5-6 h aufgetrennt, während der Elektrophorese wurde der Laufpuffer (1 x MOPS) zirkularisiert. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht photographiert und nacheinander mit folgenden Lösungen behandelt: 15 min RNase-freies H<sub>2</sub>O, 15 min 50 mM NaOH/10 mM NaCl, 30 min 0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 30 min 20 x SSC. Die RNA wurde durch Kapillartransfer in 20 x SSC bei RT auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) übertragen. Nach ca. 16 h wurde der RNA-Transfer abgebrochen, die Geltaschen auf der Membran markiert, die Membran 30 min bei RT zwischen Whatman-Papier getrocknet und mit UV-Licht bestrahlt (302 nm, 0,60 J/cm<sup>2</sup>, 1 min; Bioslink™ Linker), um die RNA zu fixieren. Die Membran wurde weitere 2 h bei RT getrocknet und dann nach der Methode von Church und Gilbert (1984) 2 h bei 65°C mit Prähybridisierungslösung

(ca. 20 ml für eine 12,8 cm x 14 cm große Membran) inkubiert. Lineare DNA-Fragmente (ca. 30 ng DNA) wurden mit Hilfe des „Random Prime Labelling Kit“ (Amersham) mit  $^{32}\text{P}$ -dCTP markiert, mit „Probe Quant G50 Micro Columns“ (Pharmacia) von freien Nukleotiden gereinigt, denaturiert und sodann zu 7 ml Prähybridisierungslösung gegeben. Als Sonde für *nrf1* diente ein ungefähr 800 bp langes *SpeI/EcoRV*-Fragment aus „Klon 6-3“ (Pos. 1205 bis 2015, enthielt keine Zinkfinger), als *nrf2*-Sonde ein 850 bp langes *EcoRI*-Fragment aus „Klon 5-2“ (Pos. 1334 bis 2184; enthielt die ersten beiden Zinkfinger) und für *gapdh* wurde ein 500 bp-*EcoRI/BamHI*-Fragment aus pBSK-GAPDH verwendet. Die Hybridisierung der Northern-Membran erfolgte ÜN bei 65°C unter ständigem Rotieren im Hybridisierungssofen. Am nächsten Tag wurde die Membran 10 min und 30 min bei RT mit Northern Blot-Waschpuffer 1 sowie viermal 15 min mit Waschpuffer 2 bei 65°C gewaschen. Der feuchte Blot wurde in Saran Wrap-Folie gewickelt und eine Phosphoimager-Platte oder ein Film für geeignete Zeiten exponiert.

Falls eine Membran mit mehreren Sonden hybridisiert werden sollte, wurde die erste Sonde durch zwei Inkubationen (10 min bei 95°C und 30 min bei RT) in Northern Blot „Stripplösung“ entfernt.

### 3.2.15 Reverse Transkription von RNA

1 µg DNase-behandelte RNA wurde in einem Gesamtvolumen von 11 µl (in H<sub>2</sub>O) mit 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer (0,5 µg/ml, Gibco BRL) gemischt, 10 min bei 70°C denaturiert und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 µl 5 x „first strand buffer“ (Gibco BRL), 2 µl 0,1 M DTT (Gibco BRL), 1 µl 10 mM dNTP-Mix (Pharmacia), 0,5 µl RNase Inhibitor (40 U/µl, Boehringer Mannheim/Roche) und 0,8 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl, Gibco BRL) wurde der Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 20 µl) gemischt und 60 min bei 42°C inkubiert. Das Enzym wurde 10 min bei 70°C inaktiviert, der Ansatz mit 10 mM Tris pH 8,5 auf 40 µl aufgefüllt und die cDNA bei -20°C gelagert. Als Negativkontrolle für die sich anschließenden PCR-Reaktionen wurde für alle Proben ein analoger Ansatz ohne Zugabe von Reverser Transkriptase durchgeführt. So konnte eine Kontamination der Proben mit genomischer DNA ausgeschlossen werden.

### 3.2.16 „Screening“ einer cDNA-Bibliothek

Um vollständige cDNA-Klone einer partiell bekannten DNA-Sequenz zu finden, wurde eine cDNA-Bibliothek aus Maus-Hirn (neugeborene Mäuse des ICR outbred strain, Harlan Sprague Dawley) im Lambda ZAP<sup>®</sup>II-Vektor (Stratagene) durchsucht. Die λZAPII-Phagen enthielten DNA-Insertionen einer durchschnittlichen Größe von 1 kb, für die cDNA-Herstellung waren Oligo-dT und „random“ Primer verwendet worden und die Klonierungs-

schnittstelle auf beiden Seiten der insertierten cDNA war *EcoRI*. cDNA aus interessierenden Phagen konnte mittels „*in-vivo*-Excision“ als pBluescript-SK(-)-Plasmid ausgeschnitten und charakterisiert werden.

Bei allen Schritten wurde genau nach Angaben des Herstellers (Stratagene) verfahren. Ungefähr  $6,5 \times 10^5$  „plaque-forming units“ (pfu) der cDNA-Bibliothek in Lambda ZAP<sup>®</sup>II wurden plattiert (je 50 000 pfu pro 145 mm-Platte) und auf Nylonmembranen (Hybond<sup>™</sup>-N, Amersham) übertragen. Von jeder Platte wurden zwei Filter-Abzüge genommen, die Phagenproteine auf der Membran durch alkalische Lyse zerstört, um die DNA freizusetzen, danach neutralisiert und 2 h bei 80°C gebacken. Die Membranen wurden mit zwei verschiedenen, *nrif*-spezifischen <sup>32</sup>P-dCTP-markierten DNA-Sonden hybridisiert (Abb. 5), die Markierung erfolgte mit dem „Random Prime Labelling Kit“ (Amersham). Als Sonde 1 wurde ein 850 bp langes *EcoRI*-Fragment aus dem cDNA-„Klon 5-2“ (Pos. 1334 bis 2184) verwendet, Sonde 2 wurde mittels PCR aus dem genomischen „Klon 7“ amplifiziert (ca. 950 bp, Pos. 1008 bis 1959, Oligonukleotide T3 und 2020; vgl. Abb. 5). Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen der Nylonmembranen erfolgten wie unter 3.2.14 beschrieben nach der Methode von Church and Gilbert (1984) bei 65°C. Positive Phagen-Plaques wurden isoliert und in SM-Puffer (mit 20 µl Chloroform pro 1 ml) bei 4°C gelagert. Um reine Phagenpopulationen zu erhalten, wurden eine zweite und dritte „Screening“-Prozedur analog der ersten durchgeführt, wobei nur 500 bis 1000 pfu pro Platte (2. Screening) bzw. 50 bis 100 pfu pro Platte (3. Screening) ausgebracht wurden, um einzelne Phagenplaques ernten zu können. Positive Klone wurden mit Hilfe des „ExAssist<sup>™</sup> Interference-Resistant“ Helfer-Phagen und der *E. coli* SOLR<sup>™</sup>-Empfänger-Zellen *in vivo* aus dem λZAPII-Phagen ausgeschnitten (Protokoll des Herstellers Stratagene), wodurch die gewünschte cDNA direkt als pBluescript SK(-)-Plasmid vorlag. Die erhaltenen cDNA-Klone wurden mittels PCR, Restriktionsanalyse und Sequenzierung charakterisiert, Sequenzanalysen wurden mit der Genetics Computer Group Software (GCG) durchgeführt.

### 3.2.17 *In vitro*-Transkription/Translation

Das „TNT Coupled Reticulocyte Lysate System“ (Promega) ermöglichte die gekoppelte Transkription und Translation von Genen, die hinter einen T3 oder T7 RNA-Polymerase-Promotor kloniert wurden. Plasmid-DNA konnte direkt in die Reaktion eingesetzt werden. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 12,5 µl Kaninchen-Retikulozytenlysat, 1 µl TNT-Reaktionspuffer, 0,5 µl T3- oder T7-RNA-Polymerase, 0,5 µl Aminosäuremischung ohne Cystein bzw. Methionin, 2 µl L-[<sup>35</sup>S]-Cystein oder L-[<sup>35</sup>S]-Methionin (10 mCi/ml), 0,5 µl RNase-Inhibitor und 0,5 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl (aufgefüllt mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O). Der Ansatz wurde 60 bis 120 min bei 30°C inkubiert und konnte danach direkt verwendet werden.

### 3.3 Proteinchemische und immunchemische Methoden

#### 3.3.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Rekombinante Proteine wurden in *E. coli* JM109 oder *E. coli* BL21(DE3) unter Verwendung des „GST Gene Fusion System“ (Pharmacia) exprimiert. Dabei wurden Proteine als Fusionsprotein der 26 kDa großen Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert, um ihre Löslichkeit zu erhöhen und eine einfache Affinitätsreinigung zu ermöglichen.

500 ml Bakterienmedium (LB-Medium oder 2 x YT-Medium) wurden in einem 2 l-Kolben mit 10 ml einer ÜN-Kultur beimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,7 bei 37°C geschüttelt. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert, außerdem wurde dem Bakterienmedium (LB) bei Expression von NRIF-Proteinen 0,1 mM  $ZnCl_2$  zugesetzt. Die Zellen wurden nach IPTG-Zugabe 4 h bei Raumtemperatur geschüttelt, da die über-exprimierten Fusionsproteine bei niedriger Temperatur besser löslich waren. Vor und nach der Induktion wurden Proben für die Herstellung von Bakterienlysaten entnommen. Die Bakterien wurden geerntet und bis zur Lyse bei -70°C gelagert. Auf Eis angetaute Bakterien-Niederschläge wurden in 4 ml kaltem „Lysepuffer für Bakterien“ pro g Naßgewicht Bakterien resuspendiert und durch Ultraschall (Sonifier W-450, Branson; Mikrospitze, Ø 3 mm; 5 Pulse à 30 sec bei „Output Control“ 4 und „Duty Cycle“ 80%; 30 sec Pause zwischen den einzelnen Pulsen) aufgeschlossen.

Alternativ wurden die Bakterien mit Hilfe einer „French Pressure Cell“ bei einem Druck von 1000 psi aufgeschlossen. Die Bakteriensuspension wurde hierbei in einem Druckzylinder komprimiert und konnte durch ein regulierbares Kugelventil langsam ausströmen, dabei wurde die bakterielle Zellwand durch Scherkräfte zerstört. Vor dem Aufschluß in der „French Press“ wurde die Bakteriensuspension mit 750 µg/ml Lysozym und 25 µg/ml DNase I behandelt. Nach 30 min Zentrifugation der Suspension bei 4°C, 12 000 g (Sorvall RC-5B Plus, HB4-Rotor) wurden Fusionsproteine aus dem Überstand mittels Bindung an Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Affinitätsbindung an die Matrix erfolgte für 4 h im „batch“-Verfahren unter ständigem Drehen der Probe bei 4°C. Danach wurde die Sepharose mit den gebundenen Proteinen mindestens fünfmal mit Waschpuffer (0,3 M NaCl, 0,1 mM  $ZnCl_2$  in PBS) gewaschen (jeweils ca. 10 min inkubieren, dann 5 min Zentrifugation bei 4°C, 500 g). An Glutathion-Sepharose 4B gebundene Proteine konnten mit 10 mM Glutathion in 50 mM Tris pH 8 eluiert werden. Für „Pull-Down“-Experimente wurden die Proteine jedoch nicht eluiert, sondern die proteinbeladene Sepharose direkt in den Versuch eingesetzt.

Folgende Proteine wurden mit dem GST-System exprimiert: Glutathion-S-Transferase (GST, Kontrolle), GST-NRIF1 $\Delta$ N, GST-NRIF2 $\Delta$ N und GST-NRIF1 $\Delta$ Znf (Schema in Abb. 12).

Rekombinante Proteine wurden außerdem mit sechs aminoterminalen Histidin-Resten exprimiert, um eine Reinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Es wurde das „QIAexpressionist“ System (Qiagen) verwendet und genau nach Anweisungen des Herstellers verfahren.

### 3.3.2 Herstellung von Bakterienlysaten

Zur Herstellung von *E. coli*-Lysaten wurden 300  $\mu$ l bis 500  $\mu$ l einer Kultur 30 sec. bei 13 000 rpm sedimentiert, in 130  $\mu$ l PBS resuspendiert, mit 70  $\mu$ l Protein-Auftragspuffer (5 x konzentriert) gemischt und sofort 10 min bei 95°C gekocht. Während des Kochens wurden die Proben häufig in einer Pipette aufgezogen, um die genomische DNA zu scheren. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert. Für die Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese wurden 10 bis 15  $\mu$ l Lysat pro Gelspur verwendet.

Falls die Löslichkeit von Proteinen bestimmt werden sollte, wurden der Bakterienniederschlag in Lysepuffer 2 für Bakterien resuspendiert und durch Ultraschall lysiert (Mindestvolumen 400  $\mu$ l; Mikrospitze, „Output Control“ 3,5, „Duty Cycle“ 75%, 5 bis 10 Pulse, Probe auf Eis). Die Probe wurde 15 min bei 4°C, 12 000 rpm zentrifugiert, der lösliche Überstand abgenommen und das unlösliche Sediment in 2 x Auftragspuffer resuspendiert und gekocht. Lösliche und die unlösliche Proteinfractionen wurden bei -20°C gelagert.

### 3.3.3 Herstellung von Zellysaten

Adhärenent wachsende Zellen wurden von der Zellkulturschale abgekratzt, sedimentiert (5 min bei 1000 rpm), einmal mit kaltem PBS gewaschen und in 300  $\mu$ l bis 1 ml Lysepuffer für eukaryotische Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale resuspendiert. Bei geringen Detergenismengen (< 0,1% Nonidet-P40) im Lysepuffer wurden die Zellen mit einem Dounce-Homogenisator vollständig aufgeschlossen. Die Suspension wurde 30 min bei 4°C lysiert und 20 min bei 15 000 g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Lysat) enthielt lösliche cytoplasmatische Proteine sowie viele membranständige Proteine, Kernproteine befanden sich im Sediment. Falls der Gesamtproteinbestand von Zellen untersucht werden sollte, wurden „Komplett-Lysate“ hergestellt: 150  $\mu$ l Zellsuspension in Lysepuffer wurden ohne vorherige Zentrifugation mit 50  $\mu$ l Protein-Auftragspuffer (5 x konzentriert) gemischt und 10 min bei 95°C gekocht, genomische DNA wurde durch mehrfaches Aufziehen in einer Pipette geschert.

### 3.3.4 Immunpräzipitation von Proteinen

Bei der Immunpräzipitation von Proteinen aus Zellysaten wurde das nach 3.3.3 erhaltene Lysat ca. 2 h bei 4°C mit einem gegen das gewünschte Epitop gerichteten Antikörper inkubiert. Danach wurden pro ml Lysat 60 µl Protein A-Sepharose 6 MB (Pharmacia), 1:1 in Lysepuffer verdünnt, zugegeben und ÜN bei 4°C inkubiert. Alternativ wurde für Antikörper der Subklasse IgG1 „Ziege-Anti-Maus IgG1“ (schwere Kette-spezifische)-Agarose (Sigma) verwendet. Der an die Sepharose immobilisierte Antigen-Antikörper-Komplex (Protein A bindet an den Fc-Teil der IgG-Klasse von Immunglobulinen) wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen (wie Lysepuffer für eukaryotische Zellen, aber nur 5% Glycerin; bei NRIF-Proben außerdem mit 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>). Die Sedimentation der Matrix erfolgte jeweils bei 500 g. Gebundene Proteine wurden durch Kochen mit 40 µl Protein-Auftragspuffer (2 x konzentriert) eluiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Immunpräzipitationen wurden mit Antikörpern gegen p75, gegen das Hämagglutinin (HA)-Epitop, gegen das flag-Epitop (anti-flag) und gegen GFP durchgeführt. Die verwendeten Verdünnungen finden sich unter Abschnitt 3.1.9. Der Anti-HA-Antikörper 12CA5 (Boehringer Mannheim) wurde mit Hilfe von Protein G-Sepharose präzipitiert.

Falls *in-vitro*-translatierte (ivt) Proteine coimmunpräzipitiert werden sollten, wurde ca. 10 µl ivt-Protein (<sup>35</sup>S-markiert) mit 1 ml Zellysat gemischt und 1,5% BSA (Rinderserumalbumin) zugesetzt, um unspezifische Bindung an die Sepharose zu vermindern.

### 3.3.5 „Pull-Down“-Experiment

Um die Interaktion von zwei Proteinen biochemisch nachzuweisen, wurde ein sog. „Pull-Down“-Experiment durchgeführt. Ein Protein wurde in 293-Zellen transient exprimiert (Abschnitt 3.4.2), während das andere in *E. coli* JM109 als GST-Fusionsprotein exprimiert und durch Affinitätsbindung an Glutathion-Sepharose gereinigt wurde (Abschnitt 3.3.1). Zwei Tage nach Transfektion der 293-Zellen wurden diese mit kaltem PBS gewaschen, in 1 ml Lysepuffer (25 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 0,8% Nonidet-P40, 4 mM Pefabloc, je 5 µg/ml Aprotinin und Leupeptin) pro 10 cm-Schale resuspendiert und 30 min bei 4°C lysiert. Das Zellysat wurde 20 min bei 15 000 g, 4°C zentrifugiert, je 300 µl des Überstandes mit 900 µl Bindungspuffer (25 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,13 mM ZnCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 4 mM Pefabloc, je 5 µg/ml Aprotinin und Leupeptin) gemischt und ÜN bei 4°C mit 50 µl Bettvolumen Protein-beladener Glutathion-Sepharose-4B inkubiert. Die Sepharose wurde einmal mit Waschpuffer 1 und zweimal mit Waschpuffer 2 gewaschen (Inkubation mit Waschpuffer 5-10 min, Zentrifugation 3 min bei 4°C, 500 g), um unspezifisch gebundene Proteine zu beseitigen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Überstand vollständig entfernt und an die Matrix gebundene Proteine wurden durch 8 min Kochen mit

50 µl 2 x Protein-Auftragspuffer eluiert. Die Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

### 3.3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molaren Masse erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unter Verwendung einer Mini PROTEAN II Cell (BioRad). Die verwendeten Sammelgele enthielten 4% Acrylamid, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS und 0,1% TEMED, die Trenngele (Minigele, Größe 5,2 cm x 8,3 cm) 7% bis 12% Acrylamid, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS und 0,05% TEMED. Als Laufpuffer diente einfach konzentrierter SDS-Elektrophoresepuffer. Die Proben wurden 5-10 min in 1 x Auftragspuffer bei 95°C gekocht, in die Geltaschen geladen und bei 150 V ca. 1 h aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Bande das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Als Größenstandard wurde meist der *Prestained Protein Marker Broad Range* (New England Biolabs) verwendet, der Proteine der folgenden Größen enthielt:

MBP-β-Galaktosidase	175 kDa
MBP-Paramyosin	83 kDa
Glutamin-Dehydrogenase	62 kDa
Aldolase	47,5 kDa
Triosephosphat-Isomerase	32,5 kDa
β-Lactoglobulin A	25 kDa
Lysozym	16,5 kDa
Aprotinin	6,5 kDa

### 3.3.7 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Zum Nachweis von Proteinmengen größer als 30 ng wurden die Gele 20 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und danach bis zum vollständigen Entfärben des Hintergrundes in Entfärbelösung inkubiert. Der Entfärbvorgang konnte durch Erhitzen der Lösung auf ca. 70°C beschleunigt werden. Zur Lagerung von Gelen wurden sie mindestens 5 h in Aufbewahrungslösung gelegt und zwischen Einmach-Folie (Zellglas) getrocknet.

### 3.3.8 Western Blot-Analyse

Über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennte Proteine wurden mit Hilfe einer Semi-Trocken Transfer-Kammer (Werkstatt des MPI für Biochemie) vom Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, 0,45 µm, Millipore) übertragen. Das in Western Blot-Transferpuffer äquilibrierte Gel und die mit Methanol benetzte und in Transferpuffer äquilibrierte Membran wurden zwischen je fünf Lagen Transferpuffer-getränktes Whatman® 3MMChr-Papier gelegt, der Transfer erfolgte 1 h bei 80 mA für eine 5,2 cm x 8,3 cm große Membran. Um die Transfer-effizienz zu überprüfen, konnte die Membran 1 min mit Ponceau S gefärbt werden, dieser

Farbstoff machte Proteine in roter Farbe sichtbar und ließ sich mit H<sub>2</sub>O oder TBST leicht wieder von der Membran abwaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5% Magermilchpulver in TBST abgesättigt und die Membran wurde ÜN bei 4°C mit einer geeigneten Verdünnung des primären Antikörpers (gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet) in Western Blot-Blockierungslösung inkubiert. Der Western Blot wurde viermal 10 min in TBST gewaschen, 1 h bei RT mit einer 1:10 000-Verdünnung des sekundären Antikörpers (gegen die Spezies gerichtet, aus der der primäre Antikörper stammte; gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase) in TBST inkubiert und nochmals wie oben gewaschen. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit Hilfe des „ECL-Chemilumineszenz-Detektionssystems“ (Amersham) nachgewiesen und auf einem Autoradiographiefilm (Fuji) sichtbar gemacht. Falls nacheinander verschiedene Antigene auf einer Membran detektiert werden sollten, wurde die Membran zweimal 15 min bei 50°C mit Western Blot „Stripplösung“ inkubiert, um gebundene Antikörper zu entfernen, danach wurde mehrmals mit TBST gewaschen und erneut blockiert. Für die Detektion von Ratten- oder Maus-p75 wurde ein polyklonaler Anti-p75 (Mensch) Antikörper (Promega) aus Kaninchen verwendet. Hämagglutinin (HA)-Epitop-markierte Proteine wurden mit einem monoklonalen Anti-HA Antikörper aus Maus (Klon 12CA5; Boehringer Mannheim) detektiert. Flag-Epitop-markierte Proteine konnten mit dem monoklonalen Antikörper anti-FLAG M5 aus Maus (Sigma/Kodak) sichtbar gemacht werden. Für die Detektion von GFP wurde der polyklonale Anti-GFP-Living Colors™ Peptid-Antikörper aus Kaninchen (Clontech) verwendet, für GST-Fusionsproteine ein polyklonaler Anti-GST Antikörper aus Ziege (Pharmacia) (Waschpuffer mit 0,5% Tween-20 statt wie sonst 0,1% Tween-20).

### 3.3.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinmenge in Proben wurde mit dem *Bio-Rad Protein Assay* nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Der Test beruht auf dem Prinzip, daß der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung an Proteine bindet und dabei seine spektralen Eigenschaften ändert, das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 465 nm auf 595 nm. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (Sigma) verwendet. Die Messungen wurden in kleinen Volumina (100 µl) auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt, die Detektionsgrenze lag bei ca. 1 µg Protein.

### 3.3.10 Dialyse

Um unerwünschte Bestandteile aus Proteinproben zu entfernen (z.B. bei der Reinigung rekombinanter Proteine) wurde die Probe in einer „Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette“ (Ausschlußvolumen 10 kDa) mindestens 30 h bei 4°C in einem großen Volumen des gewünschten Puffers (z.B. PBS) unter mehrfachem Pufferwechsel dialysiert.

## 3.4 Zellbiologische Methoden

### 3.4.1 Kultivierung von Zelllinien

Eukaryotische Zellen wurden in DMEM (High Glucose; mit Glutamax I) mit 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% Pyruvat bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre adhärent auf Zellkulturschalen kultiviert. Bei 293-Zellen betrug der FCS-Anteil im Medium nur 5%. Konfluente Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und durch kurze Inkubation (ca. 2-5 min bei 37°C) in einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin) von der Platte abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium inaktiviert, die Zellen durch Zentrifugation (5 min bei 1000 rpm, RT) sedimentiert, in frischem Medium gründlich resuspendiert und in der gewünschten Zelldichte auf neue Schalen verteilt.

Für die dauerhafte Lagerung von Zellen wurden diese in eiskaltem Einfriermedium (20% FCS und 10% DMSO in DMEM) resuspendiert und in speziellen Einfrieröhrchen (Nunc) zuerst langsam auf -80°C abgekühlt und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen von Zellen erfolgte möglichst schnell im Wasserbad bei 37°C, die Zellen wurden sofort mit Kulturmedium gemischt, abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausgesät.

### 3.4.2 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Sofern nicht anders angegeben, wurden adhärent wachsende eukaryotische Zellen mittels der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode (Chen und Okayama, 1987) transfiziert. CaCl<sub>2</sub> bildet mit DNA unter bestimmten pH- und Salzbedingungen ein schwerlösliches Präzipitat, das von den Zellen aufgenommen werden kann.

24 h vor der Transfektion wurden z.B. 2,5 bis 3 x 10<sup>6</sup> 293-Zellen pro 10 cm-Schale in 10 ml Medium ausgesät. Das Transfektions-Gemisch enthielt je nach Plasmid 1-10 µg DNA, 450 µl H<sub>2</sub>O, 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> und 500 µl 2 x BBS. Die Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge unter starkem Schütteln zusammengegeben, 20 min bei RT inkubiert und vorsichtig auf den Zellen verteilt. Die Zellen wurden bei 3% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert, nach ca. 12-16 h wurde frisches Medium zugegeben und die Zellen bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Die Ernte oder Fixierung der Zellen erfolgte ungefähr 48 h nach der Transfektion. Bei Verwendung kleinerer Zellkulturgefäße wurden die Volumina entsprechend der Grundfläche des Gefäßes verkleinert, z.B. wurden bei 24-„well“-Schalen pro Vertiefung 7 x 10<sup>4</sup> bis 9 x 10<sup>4</sup> 293-Zellen in 440 µl Medium plattiert und nach ca. 30 h mit 40 µl Transfektions-Gemisch transfiziert (ungefähr 0,3 µg DNA pro Vertiefung). Bei Transfektion anderer Zelllinien wurde die Zellzahl optimiert, z.B. für 24-„well“-Schalen 2-4 x 10<sup>4</sup> HN10-Zellen oder 1,5 x 10<sup>4</sup> BHK-Zellen pro Vertiefung.

Die Transfektionseffizienz konnte durch gleichzeitige Transfektion mit dem Plasmid pEGFP-N1 (Clontech) analysiert werden, welches GFP unter dem CMV-Promotor exprimiert und somit eine Detektion transfizierter Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert; Anregung für GFP bei 488 nm, Emission bei 507 nm) ermöglichte.

Falls sich Zelllinien mit der Calcium-Phosphat-Methode nicht effizient transfizieren ließen, wurden das „Superfect transfection reagent“ (Qiagen) und das „Effectene transfection reagent“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers getestet.

### 3.4.3 Immunfluoreszenz

Eukaryotische Zellen wurden auf einer 24-„well“-Platte mit Glas-Objektträgern (Ø 13 mm, beschichtet mit Poly-L-Lysin oder Poly-Ornithin) ausgesät und transient transfiziert.

Für einige Experimente wurden transfizierte Zellen vor der Fixierung mit Neurotrophinen behandelt: Eventuell vorhandene endogene Neurotrophine wurden über einige Stunden hinweg durch mehrfachen Mediumwechsel abgewaschen, sodann wurden die Zellen 1-3 h in 100 ng/ml NGF oder BDNF inkubiert. Negativkontrollen enthielten 100 ng/ml bis 1 µg/ml eines p75-„Receptorbody“ (vgl. 4.3.3), der im Medium vorhandene Neurotrophine binden konnte. Ungefähr 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 15 min bei RT mit 4% para-Formaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Nach einstündiger Blockierung unspezifischer Bindungsstellen bei RT mit 10% BSA und 10% Serum, aus dem der sekundäre Antikörper stammt (meist Ziegenerum, NGS) in PBS wurden die Zellen über Nacht mit einer geeigneten Verdünnung des primären Antikörpers in PBS mit 5% NGS inkubiert. Es wurde dreimal 10 min mit PBS gewaschen und sodann 1 h bei RT mit dem zweiten Antikörper in PBS mit 5% NGS und 0,5 µg/ml DAPI zur Anfärbung der Zellkerne inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurden die Proben mit „Immuno Fluore Mounting Medium“ (ICN) eingebettet und konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 oder Axiophot, Zeiss) analysiert und photographiert werden.

Falls Epitope im Inneren der Zelle angefärbt werden sollten, enthielten alle PBS-haltigen Lösungen zusätzlich 0,2% Triton X-100 zur Permeabilisierung der Zellen.

Bei Doppelfärbungen von externen und internen Epitopen wurde immer zuerst mit dem gegen das externe Epitop gerichteten Antikörper gefärbt (primärer und sekundärer Ak) und erst dann permeabilisiert und die zweite Färbung durchgeführt.

Die Anfärbung von BrdU erforderte eine besondere Vorbehandlung der Zellen. Um die DNA zu denaturieren und dadurch das eingebaute BrdU für anti-BrdU-Antikörper zugänglich zu machen, wurden die fixierten Zellen 30 min mit 2 N HCl behandelt und zweimal 15 min mit 0,1 M Natriumtetraborat in H<sub>2</sub>O (pH 8,5) neutralisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde ÜN bei 4°C mit einer 1:10-Verdünnung des anti-BrdU-Antikörpers in PBS (ohne NGS)

inkubiert und im folgenden wie sonst verfahren. Bei Doppelfärbungen erfolgte die Färbung gegen BrdU erst nach der Färbung gegen das andere Epitop.

#### **3.4.4 BrdU-Markierung der DNA eukaryotischer Zellen**

Transient transfizierte Zellen auf Glas-Objektträgern wurden 2 h oder länger in Gegenwart von 10  $\mu$ M BrdU (Bromdesoxyuridin) kultiviert. BrdU kann an Stelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA eingebaut werden und markiert Zellen, die während des BrdU-Pulses die S-Phase des Zellzyklus (DNA-Synthese-Phase) durchlaufen. Die Zellen wurden gewaschen, fixiert und wie unter 3.4.3 beschrieben gefärbt.

#### **3.4.5 "Cell death detection" ELISA**

Mit diesem photometrischen Enzym-Immunoassay konnten cytoplasmatische Histon-assoziierte DNA-Fragmente *in vitro* nachgewiesen werden. Transient transfizierte 293-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion geerntet und nach Anleitung des Herstellers für den ELISA eingesetzt. Dieser beruhte auf folgenden Grundlagen: Im Verlauf des induzierten Zelltodes (Apoptose) spaltet eine Nuklease den DNA-Doppelstrang in den leicht zugänglichen Regionen zwischen den Nukleosomen in Mono- und Oligonukleosomen. Die DNA in den Nukleosomen ist eng mit Histonen assoziiert und deshalb vor Nuklease-Spaltung geschützt. Die erhaltenen DNA-Fragmente mit einer Länge von 180 bp und dem Vielfachen hiervon können als „DNA-Leiter“ auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden. Der hier verwendete „Cell Death Detection ELISA“ (Boehringer Mannheim) war ein „Sandwich“-ELISA, bei dem zwei monoklonale Maus-Antikörper gegen Histon und DNA verwendet wurden. Der anti-DNA-Antikörper war mit Peroxidase (POD) gekoppelt, deren Substrat ABTS<sup>®</sup> (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat(6)]) bei 405 nm photometrisch bestimmt werden konnte. Die erhaltenen  $A_{405}$ -Werte wurden auf den Proteingehalt der Proben normiert (vgl. 3.3.9).

#### **3.4.6 WST-1-Zellproliferations-, „Assay“**

Dieser kolorimetrische Test diente zur Quantifizierung der Lebensfähigkeit und Proliferationsgeschwindigkeit von Zellen in einer Kultur. Er beruht auf dem Prinzip, daß Tetrazoliumsalze wie WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) nur in lebenden Zellen durch Enzyme der mitochondrialen Atmungskette zu einem sogenannten Formazan, einem tiefroten Farbstoff, gespalten werden. Eukaryotische Zellen wurden auf Zellkulturschalen ausgesät, transient transfiziert und ca. 48 h später für 30 min bis 2 h mit einer 1:10-Verdünnung des WST-1-Reagens (Boehringer Mannheim) in Kulturmedium inkubiert. Die Negativkontrolle enthielt keine Zellen. Nach verschiedenen

Zeitpunkten wurden 100 µl-Proben des Zellüberstandes in eine Mikrotiter-Platte entnommen und die Absorption des wasserlöslichen Reaktionsproduktes bei 420-480 nm (Referenzwellenlänge > 600 nm) gemessen.

### 3.4.7 Herstellung primärer Mausfibroblasten

10,5 Tage alte Mausembryonen wurden aus dem Muttertier isoliert, vom Dottersack befreit und mit kaltem PBS gewaschen. Der Dottersack wurde für die Bestimmung des Genotyps bei -20°C eingefroren. Einzelne Embryonen wurden mit einem Skalpell in sehr kleine Stücke geschnitten und in 800 µl bis 2 ml 0,25% Trypsin, 1 mM EDTA in HBSS (Gibco BRL) mit 10 µg/ml DNase I 20 min bei 37°C inkubiert, wobei alle paar Minuten leicht geschüttelt wurde. Das Trypsin wurde durch Zugabe von FCS-haltigem DMEM inaktiviert und die Suspension wurde mit einer silikonisierten Pasteurpipette, deren scharfe Glaskanten in einer Bunsenbrennerflamme abgerundet worden waren, trituriert. Die Zellen wurden 5 min bei 1200 rpm, RT sedimentiert. Viele Zellen befanden sich jedoch nicht wie in der Literatur beschrieben im Sediment (Freshney, 1994), sondern bildeten ein amorphes Aggregat, das dicht unter der Oberfläche schwamm. Auch dieses wurde in frisches Medium überführt, und die Zellen eines Embryos wurden in je einer Vertiefung einer Zellkulturschale mit zwölf Vertiefungen (12-„well“-Platte) ausgesät. Am folgenden Tag wurden tote Zellen durch mehrfachen Mediumwechsel entfernt. Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Schale abgelöst und in einer Verdünnung von 1:2 bis 1:3 auf neue Schalen verteilt. Das für primäre Mausfibroblasten verwendete Zellkulturmedium setzte sich folgendermaßen zusammen:

DMEM (mit 4500 mg/l Glucose, mit Pyridoxin; Gibco BRL)

10% FCS (Fötale Kälberserum)

3% NCS (Serum aus neugeborenen Kälbern)

1% ml NEAA (nichtessentielle Aminosäuren) (Gibco BRL)

4 mM Glutamin (Gibco BRL)

1% Pyruvat (Gibco BRL)

1% Pen/Strep (Gibco BRL)

0,001% β-Mercaptoethanol

Während das Medium für immortalisierte eukaryotische Zelllinien GlutaMAX-I™ (L-Alanyl-L-Glutamin) als Glutaminquelle enthielt, war es wichtig, für Fibroblastenmedium normales Glutamin zu verwenden, da die Zellen sonst ihr Wachstum einstellen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Hintergrund des Projekts

Um cytosolische Proteine zu identifizieren, die mit der cytoplasmatischen Domäne des p75-Rezeptors interagieren, war das Hefe-„Two-Hybrid“-System (LexA-System) verwendet worden, dessen Prinzip kurz erläutert werden soll (Golemis und Brent, 1992; Golemis et al., 1994). Dieser in Hefe durchgeführte genetische Test beruht auf der Domänenstruktur vieler Transkriptionsfaktoren, die aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer Transaktivierungsdomäne bestehen. Das interessierende Protein, in diesem Fall die intrazelluläre Domäne von p75 („p75-ICD“), wurde mit einer DNA-Bindungsdomäne fusioniert, während eine komplette cDNA-Bibliothek, hier eine humane fötale Bibliothek aus Hirn, als Fusion mit einer Transaktivierungsdomäne exprimiert wurde (Casademunt et al., 1999). Nach Transformation der hybriden Konstrukte in Hefe ermöglichten die gewählten Wachstumsbedingungen nur dann ein Überleben der Hefe, falls eine Interaktion zwischen der p75-ICD und einem Klon der cDNA-Bibliothek stattfand und somit ein funktioneller Transkriptionsfaktor rekonstituiert wurde.

Einer der gefundenen cDNA-Klone, pJG-NRIF (Neurotrophin Receptor Interacting Factor), der im „Two-Hybrid“-System spezifisch mit der intrazellulären Domäne von p75 interagiert, bestand aus einer 1,3 kb langen Sequenz, die Homologie zu vielen Zinkfingerproteinen aufwies, jedoch nicht in der Datenbank vorhanden war. Mit einem Fragment des partiellen humanen *nrf1*-Klons wurde eine Maus-cDNA-Bank untersucht, um das Maus-Homolog des potentiellen p75-Interaktors zu finden. Es konnte ein 3289 kb langer Klon („Klon 6.3“) isoliert werden, der einen offenen Leserahmen von 2484 kb sowie einen 644 bp langen nicht translatierten 3'-Bereich besaß (Casademunt et al., 1999). Ein Vergleich der NRIF-Sequenzen aus Maus und Mensch ergab, daß die Ähnlichkeit ca. 56% betrug, wobei die Zinkfinger-Region eine Identität von 83% aufwies, die aminoternale Region aber nur ca. 27% identisch war. Da jedoch erstens eine Wechselwirkung von Maus-NRIF und p75 im „Two-Hybrid“-System nachgewiesen werden konnte und zweitens die Gene für Maus-NRIF und humanes NRIF auf orthologen Chromosomen zu finden sind, konnte davon ausgegangen werden, daß es sich trotz der eher geringen Ähnlichkeit um Orthologe handelt. Neuere Kenntnisse über die Gesamtsequenz von humanem NRIF verifizierten diese Annahme nochmals (vgl. Kapitel 5.1.3 der Diskussion).

Bei der Untersuchung der Maus-cDNA-Bank war ein weiterer, allerdings nur partieller, Klon identifiziert worden, der ungefähr 1100 bp lang war und eine sehr starke Ähnlichkeit (91,3% auf DNA-Ebene) zum gefundenen Maus-NRIF aufwies. Außerdem zeigte sich auch bei der Untersuchung genomischer DNA-Banken, daß eine für NRIF spezifische Sonde nicht nur eine mit dem Klon 6.3 identische Sequenz erkannte, sondern ein weiteres Gen, das mit NRIF

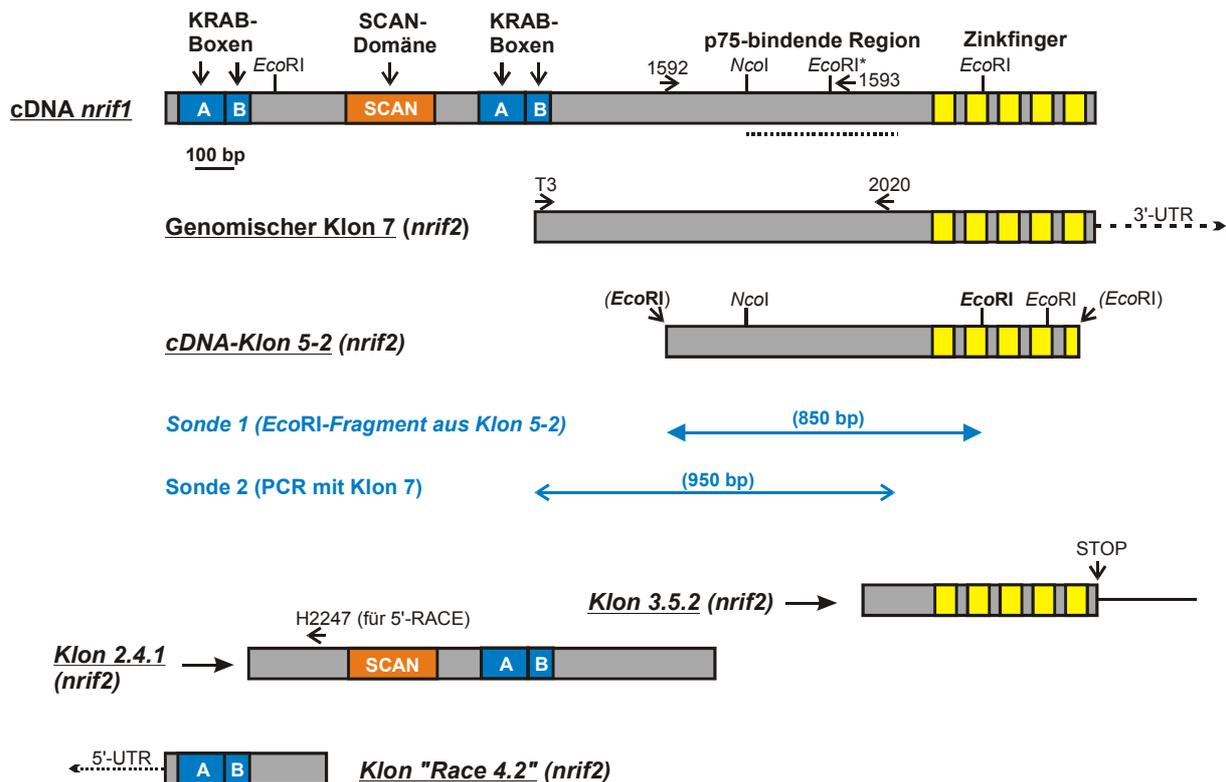
ca. 90% übereinstimmte. Vier identifizierte genomische Klone ließen sich in zwei Gruppen einteilen: Die genomischen Klone 2 und 4 waren völlig identisch mit dem cDNA-Klon 6.3 und werden im folgenden mit *nrif1* bezeichnet, während die Klone 5 und 7 mit dem partiellen cDNA-Klon 5-2 übereinstimmten und *nrif2* genannt wurden.

## 4.2 Klonierung der *nrif2*-cDNA

### 4.2.1 Untersuchung einer cDNA-Bibliothek aus Maushirn

Ein vollständiger *nrif2*-cDNA-Klon sollte unter Verwendung einer cDNA-Bibliothek aus Maushirn (Neugeborene) im Lambda ZAP<sup>®</sup>II-Vektor (Stratagene) isoliert werden. Die bereits bekannte *nrif1*-Sequenz (Klon 6.3) stammte aus derselben Bibliothek. Da die partielle *nrif2*-Sequenz zu ca. 91% mit der *nrif1*-Sequenz übereinstimmte, konnten keine für *nrif2* völlig spezifischen Sonden konstruiert werden. Es war also zu erwarten, daß mit der angewandten Methode sowohl *nrif1*- als auch *nrif2*-Klone gefunden würden. Wie in Abb. 5 dargestellt, bestand die „Sonde 1“ (91,6% identisch mit *nrif1*) aus einem 850 bp-*Eco*RI-Fragment des partiellen cDNA-Klons 5-2, während die ca. 950 bp lange „Sonde 2“ (90% identisch mit *nrif1*) mittels PCR aus dem partiellen genomischen Klon „Phage 7“ amplifiziert wurde. Die parallele Verwendung zweier Sonden für das „Screening“-Verfahren sollte die Spezifität erhöhen, d.h. nur Phagenklone, die mit beiden Sonden hybridisierten, wurden berücksichtigt.

Im primären „Screen“ wurden ungefähr  $6,5 \times 10^5$  „plaque-forming units“ (pfu) der cDNA-Bibliothek (je 50 000 pfu pro 145 mm-Platte) untersucht. Insgesamt vierzehn positive Signale hybridisierten mit beiden Sonden und waren somit potentielle *nrif*-Klone. Ein zweiter und dritter „Screen“ wurden durchgeführt, um positive Klone zu bestätigen und reine Phagenpopulationen zu erhalten. Die Phagenklone wurden zuerst mittels PCR charakterisiert, um herauszufinden, welche Klone die *nrif1*-Sequenz enthielten und somit uninteressant waren. *Nrif1*-spezifische PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotiden 1592 und 1593 resultierten in einem 520 bp langen Fragment (Abb. 5). Sechs der vierzehn Klone (Nr. 1, 6, 7, 9, 10 und 12) ergaben in dieser PCR-Reaktion ein Produkt, sie enthielten somit *nrif1*-cDNA und waren für die folgenden Analysen nicht relevant. Die restlichen Klone waren potentielle *nrif2*-Klone, wobei die Möglichkeit bestand, daß die Anlagerungs-Region der gewählten Oligonukleotide nicht vorhanden war, es sich aber dennoch um *nrif1*-Sequenzen handelte. Auch die ungefähre Größe der gefundenen Klone konnte durch PCR bestimmt werden: die  $\lambda$ ZAPII-Phagen enthielten die insertierte cDNA in der *Eco*RI-Schnittstelle des pBluescript SK(-)-Vektors, dessen „Multiple Cloning Site“ vom T3- und T7-RNA-Promotor flankiert wird, so daß mit Hilfe der T3- und T7-Primer das „Insert“ amplifiziert werden konnte. Die Größe der im Phagen enthaltenen cDNA konnte mit der T3/T7-PCR auf 800 bp bis 4 kb bestimmt werden.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der *nrif1*-cDNA und der partiellen *nrif2*-Klone**

Der genomische *nrif2*-Klon 7 sowie der partielle cDNA-Klon 5-2 dienen als Ausgangspunkt für die Herstellung *nrif2*-„spezifischer“ Sonden (Sonde 1 und Sonde 2) für die Durchsuchung einer cDNA-Bibliothek. Wie im Text beschrieben, wurden zwei weitere partielle *nrif2*-Klone, „Klon 3.5.2“ und „Klon 2.4.1“, gefunden. Das 5'-Ende von *nrif2* konnte mittels 5'-RACE-PCR kloniert werden (4.2.2).

Die cDNA aus interessierenden Phagen wurde mittels „*in-vivo*-Excision“ als pBluescript-Plasmid ausgeschnitten und durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung charakterisiert. Die Restriktionsanalyse mit dem Enzym *EcoRI* beruhte auf einer zusätzlichen *EcoRI*-Schnittstelle in der *nrif1*-Sequenz (Nukleotid-Pos. 1761; in Abb. 5 mit \* gekennzeichnet), die ein charakteristisches 436 bp-Fragment erzeugte, welches bei *nrif2*-Klonen nicht entstehen konnte. Auf diese Weise konnten fünf weitere Klone verworfen werden (Klone Nr. 3, 8, 11, 13 und 14). Drei potentielle *nrif2*-Klone (Nr. 2, 4 und 5) wurden sequenziert. Nur zwei der ursprünglich vierzehn Klone enthielten *nrif2*-Sequenzen, die Klon Nr. 4 („Klon 2.4.1“) und Nr. 5 („Klon 3.5.2“). *nrif1*-mRNA schien also im Hirn neugeborener Mäuse häufiger vorzukommen als *nrif2*-mRNA, denn ansonsten sollte eine identische Repräsentation beider Klone zu erwarten sein (siehe auch Diskussion, 5.1.1). Beide cDNA-Klone waren partielle Sequenzen, die mit dem schon bekannten cDNA-Klon 5-2 teilweise überlappten (Abb. 5).

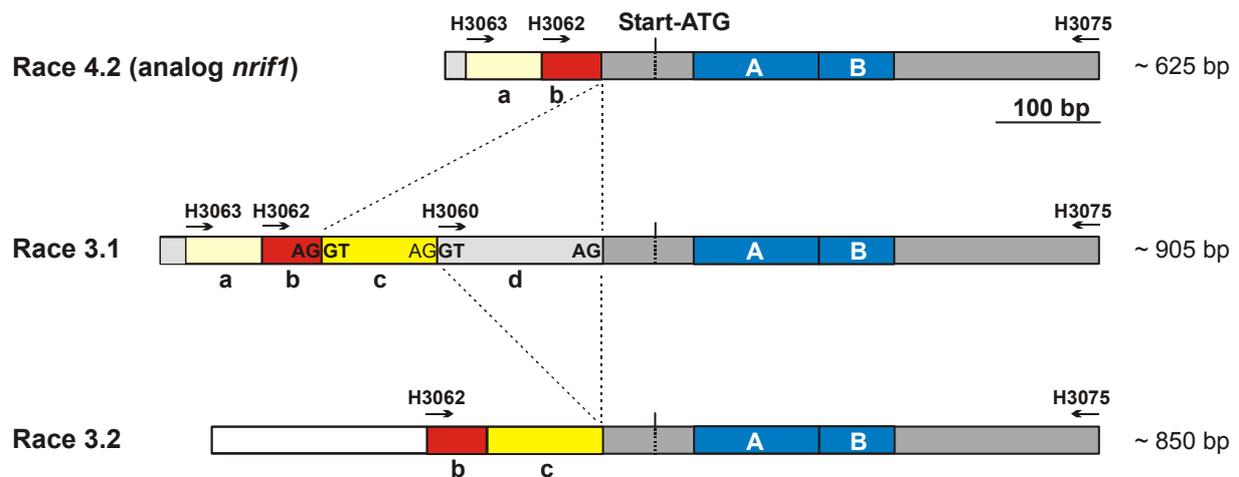
Klon 3.5.2 war 850 bp lang, enthielt 200 bp stromaufwärts der Zinkfingerregion, fünf Zinkfinger (432 bp) und 215 bp stromabwärts des Stop-Codons. Klon 2.4.1 überlappte auf einer Länge von 127 bp mit Klon 5-2 (Pos. 1334 bis 1461), enthielt weitere 1120 bp strom-

aufwärts und begann somit kurz nach dem Bereich, der in *nrif1* für die sog. KRAB-Domänen (Krüppel-associated box) (Bellefroid et al., 1991; Rosati et al., 1991) codierte. Etwa ein Drittel der 300 bis 700 humanen Zinkfingerproteine des Krüppel-Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>-Typs enthält dieses konservierte Sequenzmotiv im aminoterminalen Bereich des Proteins. KRAB-Domänen sind ungefähr 75 Aminosäuren lang und oft in A- und B-Box unterteilt, welche von unterschiedlichen Exons codiert werden. 1994 konnte erstmals gezeigt werden, daß insbesondere die KRAB A-Domäne als starker Transkriptionsrepressor wirkt (Margolin et al., 1994; Pengue et al., 1994; Witzgall et al., 1994). Da dieser Befund in den folgenden Jahren für alle untersuchten KRAB-Boxen bestätigt wurde (z.B. Lange et al., 1995; Pengue et al., 1996; Moosmann et al., 1997; Agata et al., 1999), kann man aus dem Vorhandensein von KRAB-Domänen in NRIF1 schließen, daß es sich auch bei diesem Protein wahrscheinlich um einen Transkriptionsrepressor handelt.

#### 4.2.2 Klonierung des 5'-Endes von *nrif2* mittels 5'-RACE-PCR

Um herauszufinden, ob auch NRIF2 KRAB-Domänen besitzt, mußte das fehlende 5'-Ende kloniert werden. Es wurde durch 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) unter Verwendung einer „Marathon-Ready™ cDNA“ aus Maushirn (Clontech) amplifiziert. Durch Vergleich der *nrif1*-Sequenz mit der partiellen *nrif2*-Sequenz wurde ein *nrif2*-spezifischer „antisense primer“ entworfen: An Aminosäure-Position 133 (vgl. Abb. 8) weist *nrif1* eine Deletion von neun Nukleotiden im Vergleich zu *nrif2* auf, so daß diese Position ideal für einen genspezifischen Primer war (Oligonukleotid H2247). In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß ein Unterschied von nur zwei Nukleotiden am 3'-Ende des Primers nicht ausreichte, um Spezifität der PCR-Reaktion zu erreichen. Mit der 5'-RACE-PCR wurden insgesamt drei *nrif2*-Klone identifiziert, die zwar alle ein Startcodon enthielten, das eine gute „Kozak“-Konsensus-Sequenz aufwies (optimale Sequenzumgebung des Startcodons; Kozak, 1987), jedoch teilweise unterschiedliche 5'-Sequenzen besaßen. Die Sequenzen stimmten ab Position -47 vor dem Startcodon 100% überein, sie codierten ebenso wie bei *nrif1* für zwei KRAB-Domänen im aminoterminalen Bereich. Alle Unterschiede lagen im nicht translatierten Bereich (5'-UTR, untranslated region), d.h. eventuell wird diese Region differentiell gespleißt, was auch für andere Zinkfingerproteine beschrieben ist (siehe Diskussion, Kapitel 5.1.2). Alternativ könnte es sich um nur partiell prozessierte Vorläufer-RNA handeln.

Der Klon „Race 4.2“, besaß die gleiche Struktur wie *nrif1* und stimmte auch im 5'-untranslatierten Bereich zu 83,3% mit der bekannten Sequenz überein. Ab Position -48 traten bei den Klonen „Race 3.1“ und „Race 3.2“ Unterschiede auf, d.h. es fanden sich zusätzliche interne Sequenzen (Abb. 6).



**Abb. 6: Unterschiedliche Spleißformen von *nrif2* im nicht-translatierten 5'-Bereich**

Die drei durch 5'-RACE-PCR identifizierte cDNA-Klone unterschieden sich im nicht translatierten 5'-Bereich (5'-UTR). Der vorhergesagte Startpunkt für die Translation der *nrif2*-mRNA ist markiert, identische Sequenzabschnitte sind farblich gekennzeichnet. Die Position der für RT-PCR-Reaktionen verwendeten Primer wird durch Pfeile angezeigt. Die potentiellen Exons sind mit a, b, c und d bezeichnet.

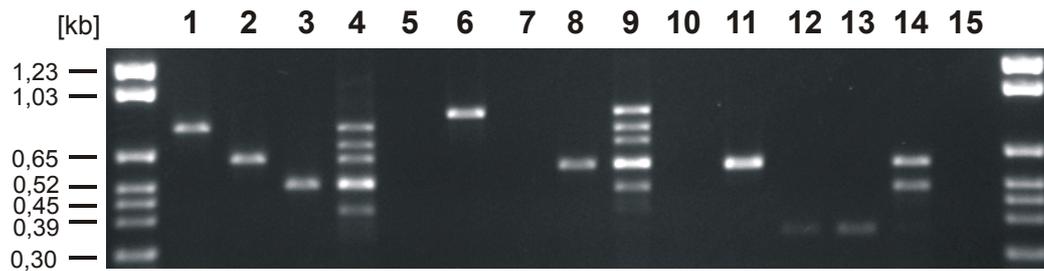
Um auszuschließen, daß es sich bei diesem Befund um Klonierungsartefakte bei der Herstellung der cDNA-Bibliothek handelt, wurden spezifische Oligonukleotide für die verschiedenen *nrif2*-UTR-Variationen hergestellt, mit denen cDNA aus Maushirn mittels RT-PCR untersucht wurde. Die verschiedenen Kombinationen sind in Tab. 1 dargestellt.

	H3062 + H3075	H3063 + H3075	H3060 + H3075
<b>Race 3.1</b>	787 bp	867 bp	590 bp
<b>Race 3.2</b>	624 bp	-	-
<b>Race 4.2</b>	514 bp	593 bp	-

**Tab. 1: Nachweis der verschiedenen Spleißformen im 5'-UTR von *nrif2*.**

Während mit der Primerkombination H3062 + H3075 alle Varianten nachgewiesen werden konnten, sollte bei Verwendung von H3063 + H3075 nur mit Race 3.1 und Race 4.2 ein PCR-Produkt entstehen. H3060 + H3075 war spezifisch für den Nachweis von Race 3.1. Die zu erwartende Größe der PCR-Produkte (in bp) sind angegeben.

Das Vorhandensein aller drei *nrif2*-UTR-Varianten in Maushirn (P0) wurde bestätigt (Abb. 7), wobei die Variante Race 4.2, die mit der *nrif1*-Struktur übereinstimmt, am häufigsten zu sein scheint. Es wurden noch zwei weitere Formen amplifiziert, von denen eine durch Kombination der Exons a, b und d erklärbar ist (Abb. 6, Abb. 7).



**Abb. 7: Nachweis der 5'-UTR-Spleißformen von *nrif2* durch PCR.**

Die Position der verwendeten Oligonukleotide und die zu erwartende Größe der Produkte sind in Abb. 6 und Tab. 1 erklärt. Alle Reaktionen wurden mit den durch RACE-PCR identifizierten Plasmiden als Kontrolle durchgeführt: Race 3.1 (**1, 6, 11**), Race 3.2 (**2, 7, 12**) und Race 4.2 (**3, 8, 13**). Bei Verwendung von cDNA aus Maushirn (**4, 9, 14**) wurden zusätzlich zu den erwarteten Produkten noch weitere Banden amplifiziert. **5, 10, 15**: Negativkontrollen ohne „Template“-DNA.

Für alle weiteren Experimente war vor allem die Sequenz der codierenden Region ab dem Start-ATG wichtig. Diese stimmte, wie schon erwähnt, in den drei identifizierten RACE-Klonen überein und wurde außerdem durch Vergleich mit einem EST-Klon aus der Datenbank („*expressed sequence tag*“; partielle cDNA exprimierter Gene), dem „Klon aa530133“, verifiziert, der ebenfalls im 5'-untranslatierten Bereich der Variante 4.2 entsprach. Die gesamte bekannte Sequenz der *nrif2*-cDNA mit Teilen der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen findet sich im Anhang (S. 111). Die Analyse der Primärstruktur des codierten NRIF2-Proteins offenbarte mehrere funktionell relevante Domänen, auf deren Bedeutung im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird.

#### 4.2.3 Vergleich von NRIF1 und NRIF2

Ein Vergleich der Sequenzen von *nrif1* und *nrif2* ergab eine große Übereinstimmung auf DNA- und Proteinebene (Tab. 2 und Abb. 8), wobei die Identität auf DNA-Ebene in allen Regionen höher war als auf Proteinebene. Dieser Befund deutet auf eine nicht sehr lange zurückliegende Genduplikation hin. Das NRIF2-Protein besteht aus 824 Aminosäureresten, es hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 93,2 kDa und einen isoelektrischen Punkt (IP) von 10. NRIF1 besitzt vier Aminosäuren mehr, ein Molekulargewicht von 93,6 kDa und einen IP von 9,77. Beide Proteine haben einen ungewöhnlich hohen Anteil der Aminosäuren Lysin (ca. 8,7%) und Serin (ca. 9,6%).

NRIF-Proteine besitzen zwei KRAB-Domänen, auf deren Funktion als Transkriptionsrepressor-Modul bereits eingegangen wurde. Zwischen diesen befindet sich eine sog. SCAN-Domäne, auch LeR (Leu-reiche Region) genannt. Die Bezeichnung leitet sich von den Namen der vier Proteine ab, in denen diese Domäne zuerst identifiziert wurde: SRE-ZBP,

CT-fin-51, AW-1 und Number 18 cDNA (Williams et al., 1995 und 1999). SCAN-Domänen wurden bisher in ungefähr zwanzig C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingerproteinen gefunden, ihre Bedeutung konnte erst kürzlich aufgeklärt werden: Sie ermöglichen selektive Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, die SCAN-Domänen enthalten (Williams et al., 1999; Schumacher et al., 2000).

Am carboxyterminalen Ende besitzen beide Proteine fünf Zinkfinger des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typs, die jeweils durch eine sieben Aminosäuren lange „Linker“-Region getrennt werden. Diese serielle Anordnung wurde zuerst für den *Drosophila*-Transkriptionsfaktor *Krüppel* beschrieben (Schuh et al., 1986). Das menschliche Genom enthält mehrere hundert verschiedene Zinkfinger-Gene des Krüppel-Typs (Bellefroid et al., 1989 und 1993; Shannon et al., 1996), die in „Clustern“ auf mehreren Chromosomen verteilt sind (Huebner et al., 1991; Hoovers et al., 1992; Tommerup und Vissing, 1995). Zinkfinger können die Bindung an DNA vermitteln, in ihnen koordinieren einige konservierte Aminosäuren ein Zinkion, wodurch eine abgegrenzte dreidimensionale Domäne entsteht. Der carboxyterminale Teil eines Fingers bildet nach Kristallstrukturanalysen eine  $\alpha$ -Helix, die an die große Furche der DNA bindet, während der aminoternale Teil eine  $\beta$ -Faltblattstruktur einnimmt (Klevit, 1991; Klug und Schwabe, 1995).

<b>Vergleich von NRIF1 und NRIF2</b>	<i>Identität auf Proteinebene</i>	<i>Ähnlichkeit auf Proteinebene</i>	<i>Identität auf DNA-Ebene</i>
Gesamtes Protein/ Gen	<b>85,6%</b>	86,9%	<b>91,9%</b>
1. KRAB-Domäne	84,6%	84,6%	87,2%
SCAN-Box	95%	95%	96,7%
2. KRAB-Domäne	90,6%	93,8%	93,3%
Potentielle p75-bindende Region	<b>79,9%</b>	82,7%	<b>90,7%</b>
Zinkfinger	91,7%	93,2%	93,2%
5'-UTR	-	-	83,3%
3'-UTR	-	-	80,8%

**Tab. 2: Vergleich der Protein- und DNA-Sequenzen von NRIF1 und NRIF2.**



Transkriptionsfaktoren bestehen aus verschiedenen funktionellen Domänen, die jeweils für DNA-Bindung bzw. Wechselwirkung mit Proteinen des Transkriptionsapparates und somit Transkriptionsaktivierung bzw. -hemmung verantwortlich sind. NRIF-Proteine besitzen somit alle strukturellen Eigenschaften von Transkriptionsfaktoren, wobei wahrscheinlich die fünf Zinkfinger im carboxyterminalen Bereich an die DNA binden, während über KRAB-Boxen und SCAN-Domäne vielfältige Proteininteraktionen stattfinden, durch die letztendlich die Transkriptionsrate von Genen beeinflusst wird.

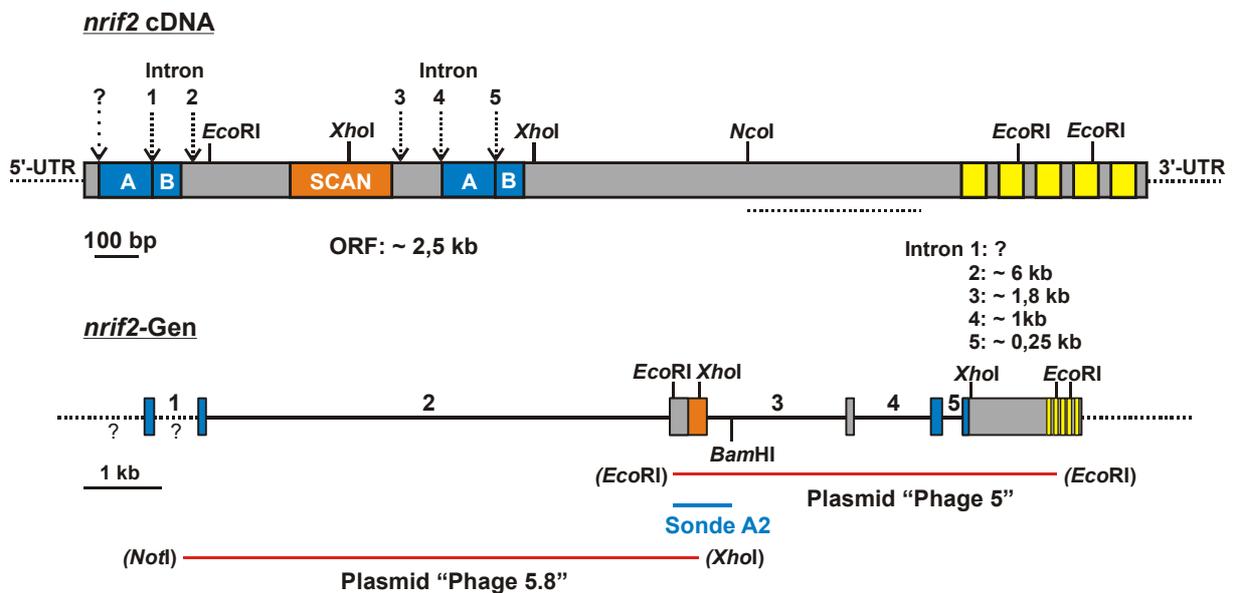
Im „Hefe-Two-Hybrid“-System war untersucht worden, welche Domäne von NRIF1 mit p75 interagieren kann (Casademunt et al., 1999). Dabei konnte gezeigt werden, daß die Region direkt stromaufwärts der Zinkfinger (ca. Pos. 515 bis 660) eine Interaktion vermitteln konnte. Interessanterweise sind NRIF1 und NRIF2 gerade in der potentiellen p75-Bindungsregion am wenigsten homolog (Tab. 2), so daß eine unterschiedliche Affinität der beiden NRIF-Proteine zu p75 möglich schien (vgl. Abschnitt 4.3.2).

#### 4.2.4 Genomische Struktur der *nrif*-Gene

Die genomische Struktur des *nrif2*-Gens wurde durch Sequenzierung und Restriktionsanalyse genomischer Klone charakterisiert. Dabei konnte auf Lambda-Phagen-DNA zurückgegriffen werden, die von E. Casademunt zuvor aus einer genomischen DNA-Bibliothek (Lambda FIX II, genomic mouse, 129SV; Stratagene) isoliert worden war. Wie bereits erwähnt enthielt der „Phage Nr. 5“ *nrif2*-DNA, er besaß eine Insertion mit einer Länge von ca. 18,9 kb. Zur Vereinfachung der Analyse wurden kleinere Fragmente des Phagen in das Plasmid pBluescript II SK(+) (Stratagene) subkloniert. Ein ca. 5 kb großes *EcoRI*-Fragment in pBluescript (Plasmid „Phage 5“) stand bereits zur Verfügung (Abb. 9). Um Informationen über die bisher unbekannt Region stromaufwärts der am weitesten 5' liegenden *EcoRI*-Schnittstelle zu erhalten, wurde ein ca. 8 kb großes, weiter stromaufwärts liegendes *XhoI/NotI*-Fragment subkloniert, welches zuvor mittels Southern Blot-Analyse unter Verwendung der Sonde A2 identifiziert worden war (Plasmid „Phage 5.8“). Beide genomischen *nrif2*-Plasmide wurden mit verschiedenen *nrif2*-spezifischen Oligonukleotiden, deren Sequenz aus der bereits bekannten *nrif2*-cDNA-Sequenz abgeleitet wurde, sequenziert.

Abb. 9 (Mitte) zeigt eine schematische Darstellung des *nrif2*-Gens. Es besteht im codierenden Bereich aus sechs Exons und fünf Introns. Weitere intronische Sequenzen in der 5'-nichtcodierenden Region wurden bereits diskutiert. Die Länge des ersten Introns ist unbekannt, da die für KRAB-A codierende Region nicht im Phagen enthalten war, die anderen Introns haben eine Länge zwischen ca. 250 bp (Intron 5) und ca. 6 kb (Intron 2). Interessanterweise ist das Gen modulartig angeordnet, d.h. funktionelle Domänen wie z.B. KRAB-Domänen (KRAB-A, KRAB-B) oder SCAN-Box sind jeweils in einem Exon enthalten. Diese

Eigenschaft wurde bereits für andere Zinkfingerproteine des Krüppel-Typs beschrieben (Bellefroid et al., 1991; Rosati et al., 1991; Bellefroid et al., 1993; Lange et al., 1995). Das letzte Exon ist am größten und enthält die potentiell p75-bindende Region sowie die Zinkfinger. Die DNA-Sequenzdaten der *nrf2*-cDNA-Klone konnten durch die Sequenzierung der genomischen Klone bestätigt werden.



**Abb. 9: cDNA und Genstruktur von *nrf2*.**

*nrf2*-cDNA und genomische DNA mit wichtigen funktionellen Domänen sind vergleichend dargestellt, wobei für die cDNA ein ungefähr Faktor 5 größerer Maßstab gewählt wurde. Aus Phage Nr. 5 wurden verschiedene Bereiche subkloniert, die Plasmide „Phage 5“ und „Phage 5.8“. Die Länge des ersten Introns ist unbekannt (mit „?“ gekennzeichnet).

Die Struktur des *nrf1*-Gens entspricht, soweit bekannt, der des *nrf2*-Gens. Das *nrf1*-Gen der Maus liegt auf Chromosom 7 in einem „Cluster“ von Zinkfingerproteinen (Locus Zfp110; Casademunt et al., 1999). Ein homologer Zinkfinger-„Cluster“ wurde auf dem humanen Chromosom 19 gefunden, und es wird vermutet, daß alle Zinkfinger-Gene in dieser Region des Chromosoms 19 ein in ähnlicher Position lokalisiertes Homolog auf dem Maus-Chromosom 7 besitzen (Shannon et al., 1996; Stubbs et al., 1996; Shannon and Stubbs, 1998). Diese Vorhersage trifft auch für *nrf* zu, da das humane *nrf*-Gen auf dem Chromosom 19 lokalisiert wurde (Casademunt et al., 1999; Yano et al., 2000). Maus-*nrf2* konnte, wie erwartet, ebenfalls dem Zinkfinger-„Cluster“ auf Chromosom 7 zugeordnet werden, die beiden Gene liegen höchstens 100 kb auseinander (L. Stubbs, persönliche Mitteilung).

### 4.3 Biochemische Analyse von NRIF-Proteinen

Die Wechselwirkung von NRIF1 und p75 war zuerst im Hefe-„Two-Hybrid“-System molekularbiologisch gezeigt worden (E. Casademunt und B. Carter). Dieses System ist jedoch relativ anfällig für Artefakte, d.h. eine postulierte Wechselwirkung von zwei Proteinen muß auch biochemisch nachgewiesen werden. Dazu bieten sich unterschiedliche Methoden an: Die zu untersuchenden Proteine können in Bakterien, eukaryotischen Zelllinien oder Insektenzellen exprimiert oder durch eine gekoppelte *in vitro*-Transkription/Translation synthetisiert werden. Der Nachweis der Interaktion kann z.B. durch Coimmunpräzipitation, „Pull-Down“-Experiment oder mit Hilfe von Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie („BIAcore“-System) erfolgen. Die nachfolgend beschriebenen Analysen sollten zuerst klären, ob eine Interaktion von NRIF und p75 überhaupt stattfindet, sodann sollten die beteiligten Proteindomänen identifiziert sowie mögliche Affinitätsunterschiede der beiden NRIF-Proteine für p75 überprüft werden.

#### 4.3.1 Expression von GST-NRIF2 in Bakterien

Im Hefe-„Two-Hybrid“-System war nachgewiesen worden, daß eine Teilsequenz von NRIF, die ungefähr das letzte Drittel des Proteins beinhaltet, die Wechselwirkung mit p75 vermitteln kann (Casademunt et al., 1999). Da die Expression großer Proteine oft problematisch ist (NRIF hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von ca. 94 kDa), wurden analog zu den Versuchen in Hefe partielle NRIF-Proteine hergestellt, die nur aus der potentiell p75 bindenden Region sowie den Zinkfingern bestanden (NRIF $\Delta$ N: 4.3.2, Abb. 12). Rekombinante Proteine wurden in *E. coli* als carboxyterminales Fusionsprotein der 26 kDa großen Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert. Eine Fusion mit GST kann die Löslichkeit von Proteinen erhöhen und ermöglicht außerdem eine einfache Affinitätsreinigung mittels Glutathion-Sepharose.

Die Expression des ca. 60 kDa großen GST-NRIF2-Fusionsproteins erwies sich als unerwartet schwierig, so daß umfangreiche Optimierungen nötig waren, um Expressionseffizienz, Löslichkeit und Stabilität des exprimierten Proteins zu verbessern. Es war jedoch unmöglich, alle gewünschten Parameter (hohe Ausbeute, wenig Proteinabbau, Zeitaufwand der Reinigung) gleichzeitig zu optimieren, so daß die letztendlich etablierte Reinigung einen Kompromiß darstellte.

Für die Herstellung rekombinanter Proteine eignen sich verschiedene *E. coli*-Stämme, für NRIF wurden mit *E. coli* JM109 die besten Ergebnisse erzielt. Eine Expression in *E. coli* BL21 führte zwar zu einer höheren Ausbeute, aber auch zu einem stärkeren Abbau des Proteins, obwohl in diesem Bakterienstamm bestimmte Proteasen deletiert sind, was eine erhöhte Stabilität exprimierter Proteine gewährleisten sollte. Auch andere Protease-defiziente Bakterienstämme (z.B. *E. coli* SG22101) brachten keine Verbesserung der





**Abb. 11: Reinigung von rekombinantem GST-NRIF2 aus *E. coli* BL21.**

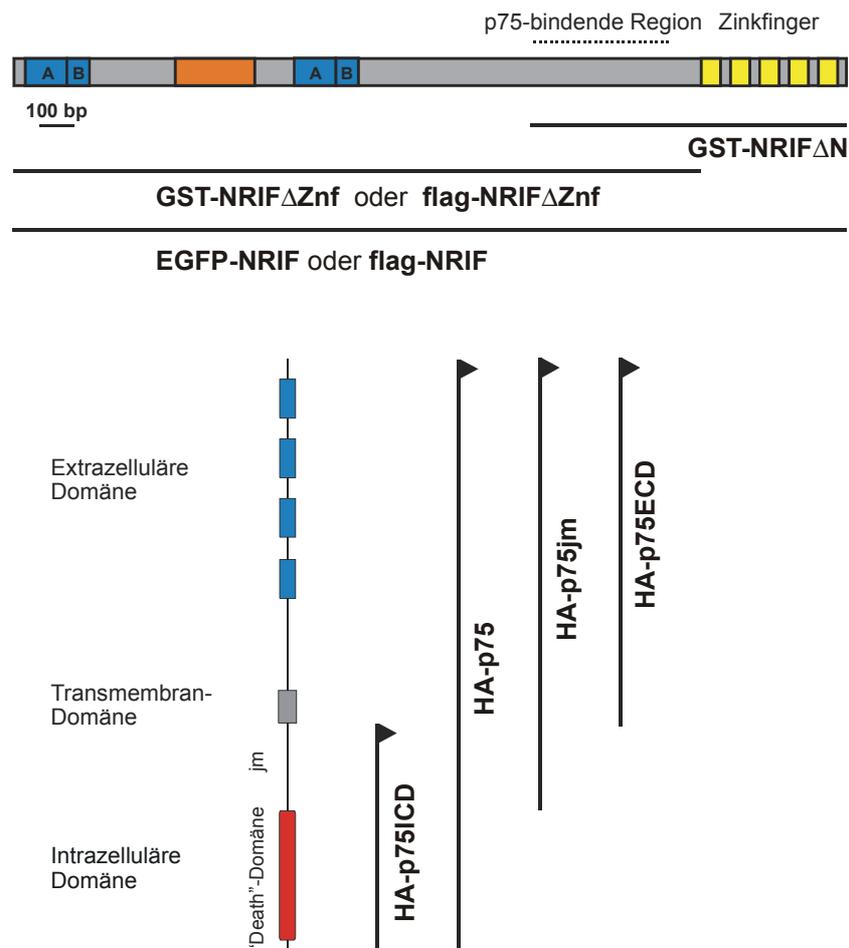
Das Protein ließ sich gut exprimieren, wurde allerdings in Bakterien teilweise und während der Reinigung stark abgebaut. Die Zusatzbanden beim gereinigten Protein (**3**, eluiert mit einem Glutathion-haltigen Puffer) waren tatsächlich partielles GST-NRIF und keine unspezifisch gebundenen Proteine, wie die Western Blot-Analyse mit  $\alpha$ -GST zeigte. **1**, Bakterienlysat vor Induktion. **2**, Bakterienlysat nach 3,5 h Induktion. **3**, gereinigtes GST-NRIF2 $\Delta$ N.

Die gereinigten Proteine konnten nicht länger als 24 h bei 4°C gelagert werden, da die Hauptbande (bei ca. 60 kDa) sonst fast vollständig abgebaut wurde. Für alle Experimente mußten deshalb GST-NRIF-Proteine direkt vor Verwendung gereinigt werden. GST selbst hingegen war mehrere Wochen bei 4°C stabil.

Wegen der dargestellten Limitationen des GST-Expressionssystems wurden andere Systeme getestet. Da die Expression von NRIF mit sechs aminoterminalen Histidin-Resten jedoch zu einer vollständigen Unlöslichkeit der exprimierten Proteine führte und eukaryotische Zellen zu geringe Mengen an NRIF exprimierten (s.u.), mußte dennoch auf GST-Fusionsproteine zurückgegriffen werden.

#### 4.3.2 Biochemische Interaktionen von NRIF und p75

Der biochemische Nachweis der Wechselwirkung von NRIF und p75 konnte mit Hilfe von „Pull-Down“-Experimenten erbracht werden. GST-NRIF-Fusionsproteine wurden in *E. coli* JM109 exprimiert und an Glutathion-Sepharose gebunden. Wie in Abschnitt 4.3.1 erklärt, wurde das C-terminale Drittel von NRIF1 und 2 exprimiert, das im Hefe-„Two-Hybrid“-System für die Bindung an p75 ausreichend war (GST-NRIF $\Delta$ N). Ein anderes GST-NRIF-Konstrukt (GST-NRIF $\Delta$ Znf) bestand aus der Gesamtsequenz ohne die für die Bindung an p75 potentiell unwichtigen Zinkfinger (Abb. 12). Eine erhöhte Stabilität des Fusionsproteins durch Deletion der Zinkfinger konnte leider nicht erreicht werden, auch dieses Protein wurde während der Reinigung stark abgebaut und konnte nicht gelagert werden (Abb. 13, Coomassie-Gel).



**Abb. 12: Expressionskonstrukte für NRIF und p75.**

Neben den im Text beschriebenen bakteriellen GST-Fusionsproteinen sind auch Konstrukte für die Expression in eukaryotischen Zellen dargestellt, auf die in späteren Abschnitten genauer eingegangen wird. p75 wurde aminoterminal mit einem HA-Epitop markiert. HA: Hämagglutinin. ICD: intrazelluläre Domäne. jm: Juxtamembran-Domäne. ECD: extrazelluläre Domäne.

Verschiedene p75-Varianten wurden in 293-Zellen exprimiert. Diese Zellen bieten den Vorteil, daß sie sich leicht effizient transfizieren lassen und große Mengen Protein produzieren. Um die Detektion verschiedener p75-Varianten (z.B. nur intrazelluläre oder nur extrazelluläre Domäne) mit demselben Antikörper zu ermöglichen und da die vorhandenen gegen p75 gerichteten Antikörper teilweise sehr unspezifisch waren, wurden alle p75-Konstrukte mit dem 12CA5-Epitop des Influenza Hämagglutinin-Proteins (HA) aminoterminal Epitop-markiert (Klodziej und Young, 1991). Die freie Beweglichkeit des HA-Epitops wurde durch Einfügen von zwei Glycin-Resten zwischen der HA-Sequenz (neun Aminosäuren) und dem jeweiligen p75-Konstrukt ermöglicht. Eine „Kozak“-Konsensus-Sequenz vor dem Startcodon (Kozak, 1987) sollte eine hohe Effizienz der Translations-Initiation sicherstellen. Der CMV (Cytomegalovirus)-Promotor der verwendeten Plasmide erlaubte eine hohe Expression in 293-Zellen. Eine lösliche Form der intrazellulären Domäne von p75 wurde in den Vektor pRc/CMV (Invitrogen) kloniert (HA-p75ICD). Für membranständige p75-Versionen (HA-p75,

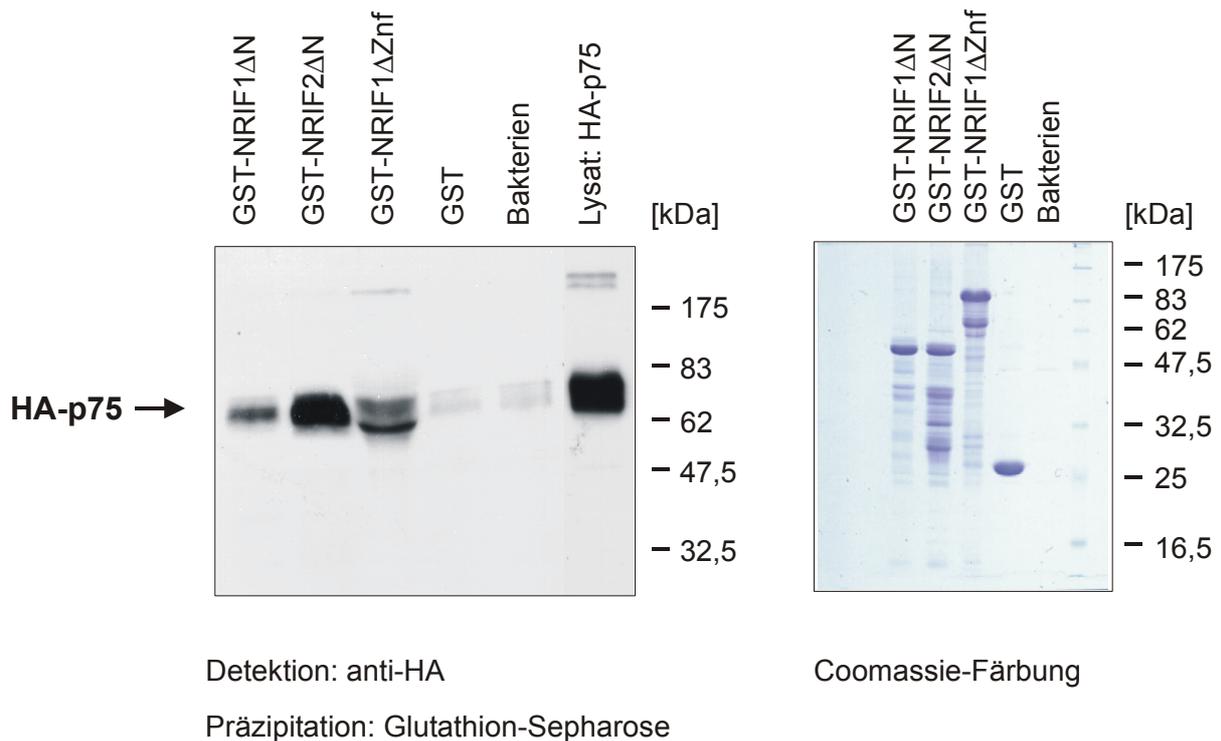
HA-p75ECD, HA-p75jm) wurde der Vektor pRc/CMV AC7 verwendet, eine modifizierte Form von pRc/CMV, die das Signalpeptid BM40 enthielt (Mayer et al., 1994). BM40 ersetzte das eigentliche p75-Signalpeptid und ermöglichte den Einbau der exprimierten Proteine in die Zellmembran. Nach erfolgter Membraninsertion werden Signalpeptide vom reifen Protein abgespalten.

p75-Konstrukte wurden nach der Calcium-Phosphat-Methode transient in 293-Zellen transfiziert, die Transfektionseffizienz betrug ungefähr 70-80% und wurde durch Cotransfektion mit EGFP bestimmt (3.4.2). Die Zellen wurden mit 0,8% Nonidet-P40 lysiert und die lösliche Zellfraktion nach Entfernung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation für das Bindungsexperiment eingesetzt. Getestet wurde die Bindung verschiedener p75-Varianten an GST (Negativkontrolle), GST-NRIF1 $\Delta$ N, GST-NRIF2 $\Delta$ N und GST-NRIF1 $\Delta$ Znf. Dabei wurden p75-Zellysate mit GST-Fusionsprotein-beladener Glutathion-Sepharose inkubiert. Da GST-NRIF-Proteine weniger stark exprimiert wurden als das Kontrollprotein GST und außerdem deutlich schlechter an die Affinitätsmatrix binden konnten, wurde die gebundene Proteinmenge vor Zugabe zum Zellysat durch Gelelektrophorese eines Aliquots mit anschließender Coomassie-Färbung abgeschätzt. Es wurden ungefähr gleiche Mengen an GST und GST-NRIF-Protein voller Länge (ohne Berücksichtigung der Abbauprodukte) eingesetzt.

#### 4.3.2.1 Interaktion von GST-NRIF-Proteinen mit HA-p75

An Glutathion-Sepharose immobilisierte GST-NRIF-Proteine konnten HA-p75 aus 293-Zellysaten spezifisch binden, wie durch Western Blot-Analyse unter Verwendung von gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörpern nachgewiesen wurde (Abb. 13). Eine anfangs beobachtete unspezifische Bindung von p75 an GST bzw. an die Sepharose-Matrix konnte durch Optimierung der Zusammensetzung von Bindungspuffer und Waschpuffer stark reduziert werden. Der Bindungspuffer enthielt verschiedene Salze (NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, Gesamtkonzentration ca. 155 mM), 0,2% Detergens (Nonidet-P40) und 5 mM DTT (Reduktionsmittel). Gewaschen wurde nacheinander mit hoher und geringerer Salzkonzentration (0,3 M bzw. 0,15 M NaCl).

Die Bindung von HA-p75 an NRIF2 war unter diesen Versuchsbedingungen deutlich stärker als an NRIF1. Ob NRIF2 wirklich mit höherer Affinität an p75 bindet, kann aus diesem Experiment jedoch nicht mit Sicherheit geschlossen werden, da die Gesamtproteinmenge der Proben nicht völlig identisch war (Abb. 13, Coomassie-Gel). Die Normierung der Proteinmenge erfolgte auf GST-NRIF-Protein voller Länge, GST-NRIF2 enthielt aber eine höhere Konzentration an Abbauprodukten, die eventuell ebenfalls p75 binden konnten. In Negativkontrollen wurde sichergestellt, daß der GST-Anteil der Fusionsproteine keine unspezifische Bindung mit p75 eingehen kann. Außerdem wurde Glutathion-Sepharose mit Lysaten aus *E. coli* JM109-Bakterien inkubiert und in das Experiment eingesetzt.



**Abb. 13: Biochemische Interaktion von NRIF1 und NRIF2 mit p75.**

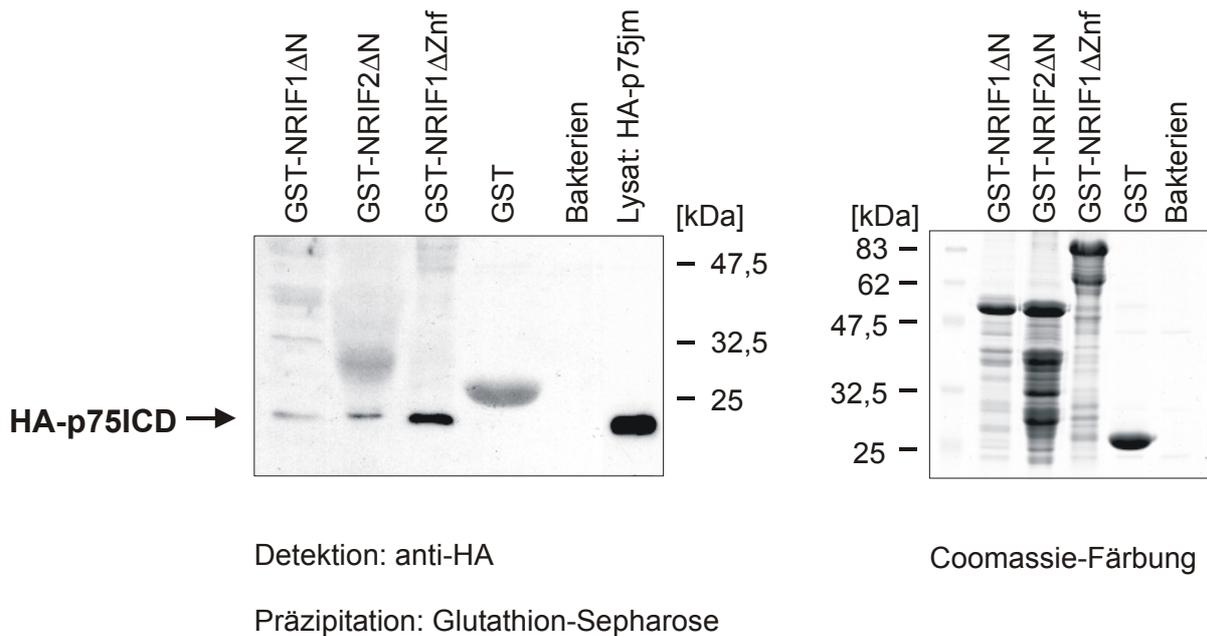
In „Pull-Down“-Experimenten mit GST-NRIF-Fusionsproteinen wurde HA-p75 aus 293-Zellysaten copräzipitiert und durch Western Blot-Analyse sichtbar gemacht (links, Spur 1-3). Bei Verwendung von Sepharose-Matrix, die mit GST-Protein (Spur 4) beladen oder mit einem JM109-Bakterienextrakt (Spur 5) inkubiert worden war, konnte kein HA-p75 gebunden werden. In allen Proben wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt (Coomassie-Färbung, rechts), die Normierung erfolgte auf NRIF-Protein voller Länge.

Bei p75-Expression in eukaryotischen Zellen konnten in Western Blot-Analysen zwei Hauptbanden detektiert werden, die auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster des extrazellulären Proteinanteils zurückzuführen sind (Abb. 13, Lysat HA-p75). Während GST-NRIF-Konstrukte ohne die aminoternale Domäne nur eine dieser Varianten binden konnten, interagierte ein NRIF-Protein ohne Zinkfinger (GST-NRIF $\Delta$ Znf) mit beiden Formen. Eine Erklärung für dieses Phänomen konnte nicht gefunden werden. Das Experiment zeigte, daß Zinkfinger für die Interaktion von NRIF und p75 wie erwartet nicht nötig sind, die Bindung aber eventuell beeinflussen können. Andererseits ist auch ein großer Anteil der aminoterminalen Domäne nicht essentiell. Wahrscheinlich sind *in vivo* mehrere Domänen an der Interaktion beteiligt.

#### 4.3.2.2 Interaktion von GST-NRIF mit einer löslichen intrazellulären p75-Domäne

Da eine Wechselwirkung des Zinkfingerproteins NRIF mit dem Neurotrophinrezeptor p75 auf die intrazelluläre Domäne von p75 beschränkt sein sollte, wurde eine lösliche Form dieser Domäne in „Pull-Down“-Experimente eingesetzt. HA-p75ICD interagierte mit allen getesteten NRIF-Varianten, die beobachtete Interaktion war aber schwächer als bei Verwendung von

Gesamt-p75. Möglicherweise bindet NRIF bevorzugt dimerisiertes p75, eine lösliche p75-ICD konnte wahrscheinlich im Gegensatz zu Gesamt-p75 nicht oder weniger gut dimerisieren (Liepinsh et al., 1997) und NRIF deshalb nur mit geringerer Affinität binden. Extrazelluläre p75-Anteile könnten auch einen Einfluß auf die Konformation der intrazellulären Domäne haben und dadurch die Bindungsaffinität beeinflussen. Bei weniger stringenten Bedingungen im „Pull-Down“-Experiment war die Bindung zwar stärker, andererseits nahm auch der unspezifische Hintergrund deutlich zu.



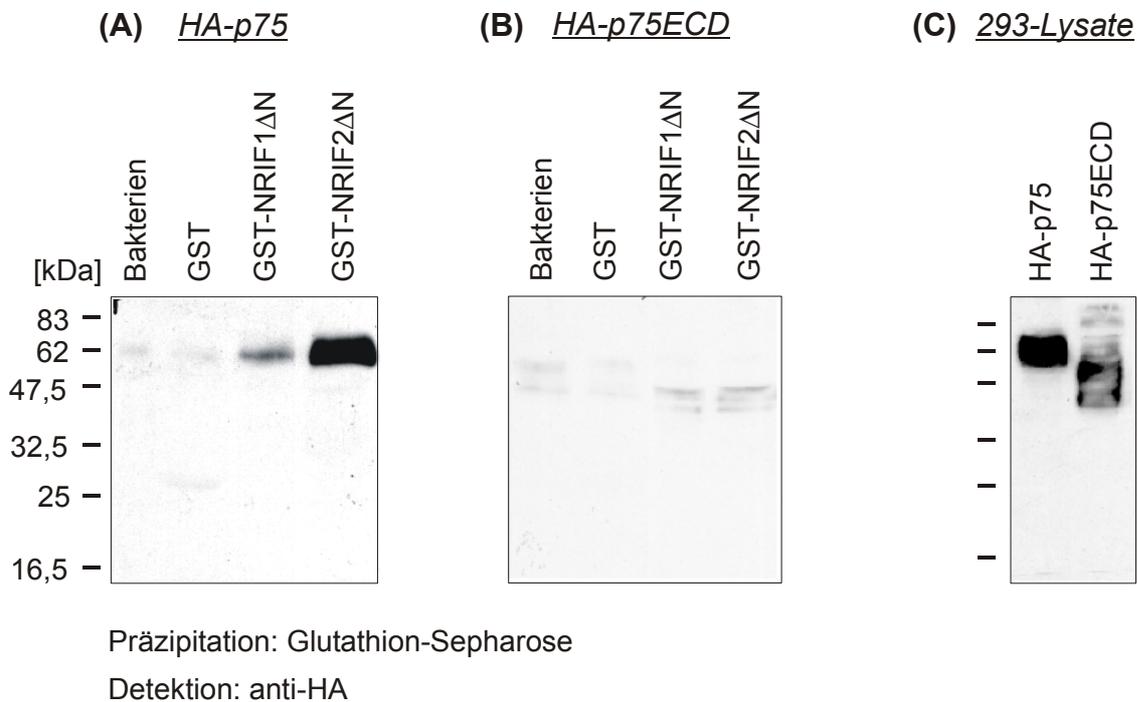
**Abb. 14: Interaktion von NRIF1 und NRIF2 mit der intrazellulären Domäne von p75.**

Die Wechselwirkung von GST-NRIF-Fusionsproteinen mit einer löslichen Form der intrazellulären p75-Domäne (HA-p75ICD) in „Pull-Down“-Experimenten war schwächer als mit Gesamt-p75, was eventuell auf eine fehlende Dimerisierung dieser Variante zurückzuführen ist. Rechts: Die Menge der eingesetzten GST-Fusionsproteine wurde auf Protein voller Länge normiert.

#### 4.3.2.3 NRIF interagiert nicht mit extrazellulären p75-Anteilen

In den vorhergehenden Experimenten hatte eine deutlich stärkere Wechselwirkung von NRIF-Proteinen mit Gesamt-p75 als mit einer löslichen intrazellulären Domäne stattgefunden. Neben den oben ausgeführten Erklärungen könnte theoretisch auch eine direkte Interaktion mit der extrazellulären Domäne von p75 dafür verantwortlich sein. NRIF ist ebenso wie die Liganden des p75-Rezeptors, die Neurotrophine, ein basisches Protein. Deshalb wurde das Auftreten einer elektrostatischen Wechselwirkung zwischen NRIF und der eher sauren extrazellulären Domäne von p75 befürchtet. Um die Möglichkeit einer *in vitro*-Interaktion dieser Domäne mit NRIF auszuschließen, wurde eine p75-Variante konstruiert, die nur aus dem membranverankerten extrazellulären Anteil bestand. HA-p75ECD konnte im „Pull-Down“-Experiment nicht an verschiedene NRIF-Konstrukte binden (Abb. 15).

Die Wechselwirkung zwischen p75 und NRIF wurde also tatsächlich von der intrazellulären p75-Domäne vermittelt und war nicht auf Anteile aus der extrazellulären Domäne zurückzuführen.



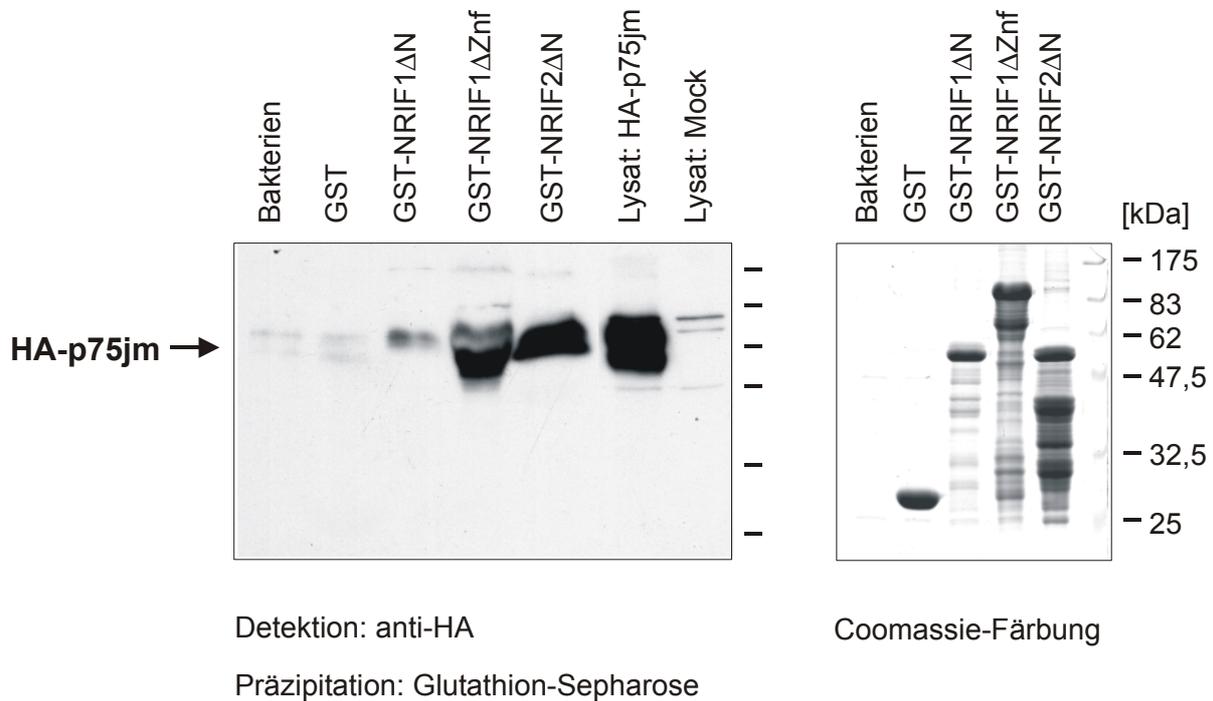
**Abb. 15: NRIF interagiert nicht mit der extrazellulären Domäne von p75.**

Eine Variante des p75-Rezeptors, die nur aus der membranverankerten extrazellulären Domäne bestand (HA-p75ECD), konnte in „Pull-Down“-Experimenten nicht an GST-NRIF-Proteine binden (B). Die Interaktion von NRIF und p75 ist demnach nur auf Anteile der intrazellulären Domäne zurückzuführen. Eine vergleichbare Expression der verwendeten HA-p75-Konstrukte wurde durch Analyse der Zellysate (C) überprüft. Alle Proben wurden auf 14%-SDS-Gelen aufgetrennt.

#### 4.3.2.4 Die Juxtamembran-Domäne von p75 vermittelt die Wechselwirkung mit NRIF

Um die an der Interaktion mit NRIF beteiligten p75-Domänen genauer zu lokalisieren, wurde eine Variante kloniert, die aus der extrazellulären Domäne von p75 (mit aminoterminalen HA-Epitop) und dem Juxtamembran-Anteil der intrazellulären Domäne ohne die sog. „Death“-Domäne bestand, HA-p75jm (Abb. 12). Die Copräzipitation dieser Variante war vergleichbar mit der für Gesamt-p75 beobachteten, d.h. die Juxtamembran-Region alleine konnte eine Wechselwirkung von p75 und NRIF vermitteln (Abb. 16). In Hefe war gezeigt worden, daß sowohl die Juxtamembran-Region als auch die „Death“-Domäne jeweils unabhängig voneinander NRIF binden konnten (Casademunt et al., 1999). Mit einer löslichen Form der „Death“-Domäne konnte im „Pull-Down“-Experiment jedoch keine Wechselwirkung beobachtet werden. Eventuell war dies aber, wie bereits oben diskutiert, auf eine fehlende Dimerisierung dieser Variante zurückzuführen. Alternativ könnte die „Death“-Domäne *in vivo* in einer anderen Faltung vorliegen als in den hier durchgeführten Experimenten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Juxtamembran-Region von p75 alleine mit NRIF interagieren kann, *in vivo* aber wahrscheinlich auch die „Death“-Domäne beteiligt ist.



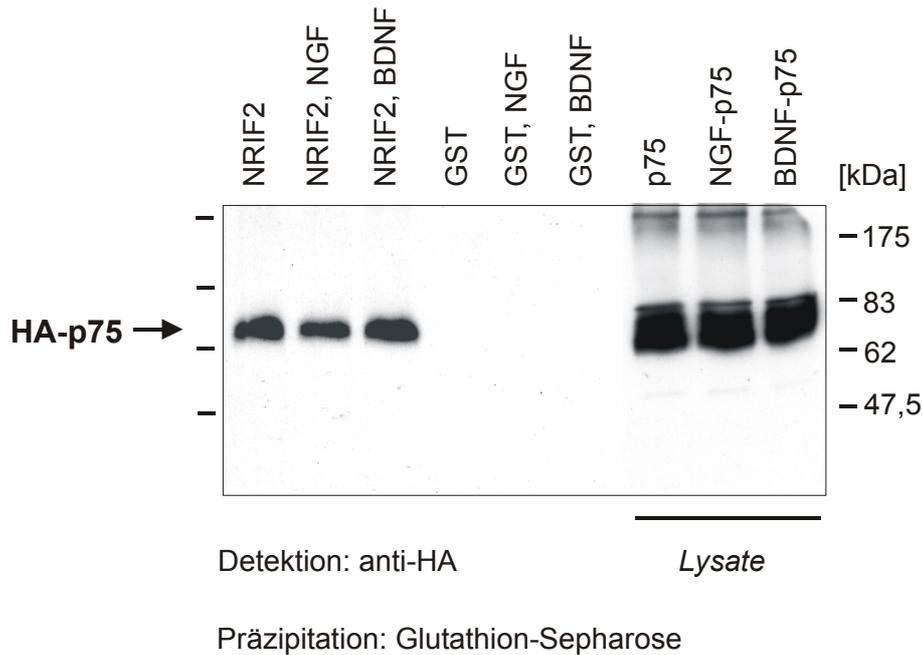
**Abb. 16: Interaktion von NRIF1 und NRIF2 mit der Juxtamembran-Domäne von p75.**

GST-NRIF-Fusionsproteine konnten in „Pull-Down“-Experimenten mit der membranverankerten Juxtamembran-Region von p75 (HA-p75jm) interagieren. Diese Domäne des p75-Rezeptors scheint demnach für eine Wechselwirkung ausreichend zu sein.

#### 4.3.3 Einfluß von p75-Liganden auf die Interaktion mit NRIF

Die Interaktion des Neurotrophinrezeptors p75 mit NRIF könnte in Analogie zu anderen Systemen (vgl. Diskussion, 5.3.1) von der Bindung eines Liganden an den Rezeptor beeinflusst werden. Man könnte sich z.B. vorstellen, daß NRIF-Proteine im Normalzustand der Zelle an p75 assoziiert vorliegen und nach Bindung eines Liganden (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) abdissoziieren, in den Zellkern wandern, an DNA binden und durch Beeinflussung der Transkription spezifischer Gene ihre Funktion ausüben. Allerdings war der bisher beschriebene Versuchsaufbau nicht optimal, um diese Fragestellung zu beantworten, da Rezeptor und Interaktionspartner aus verschiedenen Systemen zusammengegeben wurden. Besser geeignet wäre die gleichzeitige Expression beider Proteine in eukaryotischen Zellen. Die Coimmunpräzipitation von NRIF und p75 aus 293-Zellen gelang jedoch nicht, so daß folgendermaßen vorgegangen wurde: mit HA-p75 transient transfizierte 293-Zellen wurden über einen Zeitraum von mehreren Stunden mit frischem Medium gewaschen, um eventuelle endogene Neurotrophine zu beseitigen. Sodann wurden die Zellen mit Trypsin vorsichtig von der Schale abgelöst und mit Neurotrophinen (NGF, BDNF, je 100 ng/ml) oder einem

p75-„Receptorbody“ (100 ng/ml) (von Schack, 1998) inkubiert. Die Bindung in Lösung sollte die Zugänglichkeit der Rezeptoren verbessern. Nach 1,5 h wurden die Neurotrophine durch Kreuzvernetzung mit EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid) kovalent an p75 gekoppelt, die Zellen wurden lysiert und die lösliche Fraktion in „Pull-Down“-Experimente mit GST-NRIF2-beladener Sepharose eingesetzt. Dabei zeigte sich, daß die Bindung von NGF an p75 im Vergleich zu BDNF oder Kontrollen ohne Neurotrophin (p75-„Receptorbody“) die Interaktion mit NRIF2 nur leicht verringerte.



**Abb. 17: Einfluß von NGF auf die Interaktion von NRIF2 und p75.**

Die Kreuzvernetzung eines in 293-Zellen exprimierten p75-Rezeptors (HA-p75) mit NGF führte in „Pull-Down“-Experimenten zu einer leichten Verminderung seiner Bindungsaffinität für GST-NRIF2 (links). Alle 293-Zellysate enthielten vergleichbare p75-Konzentrationen (rechts).

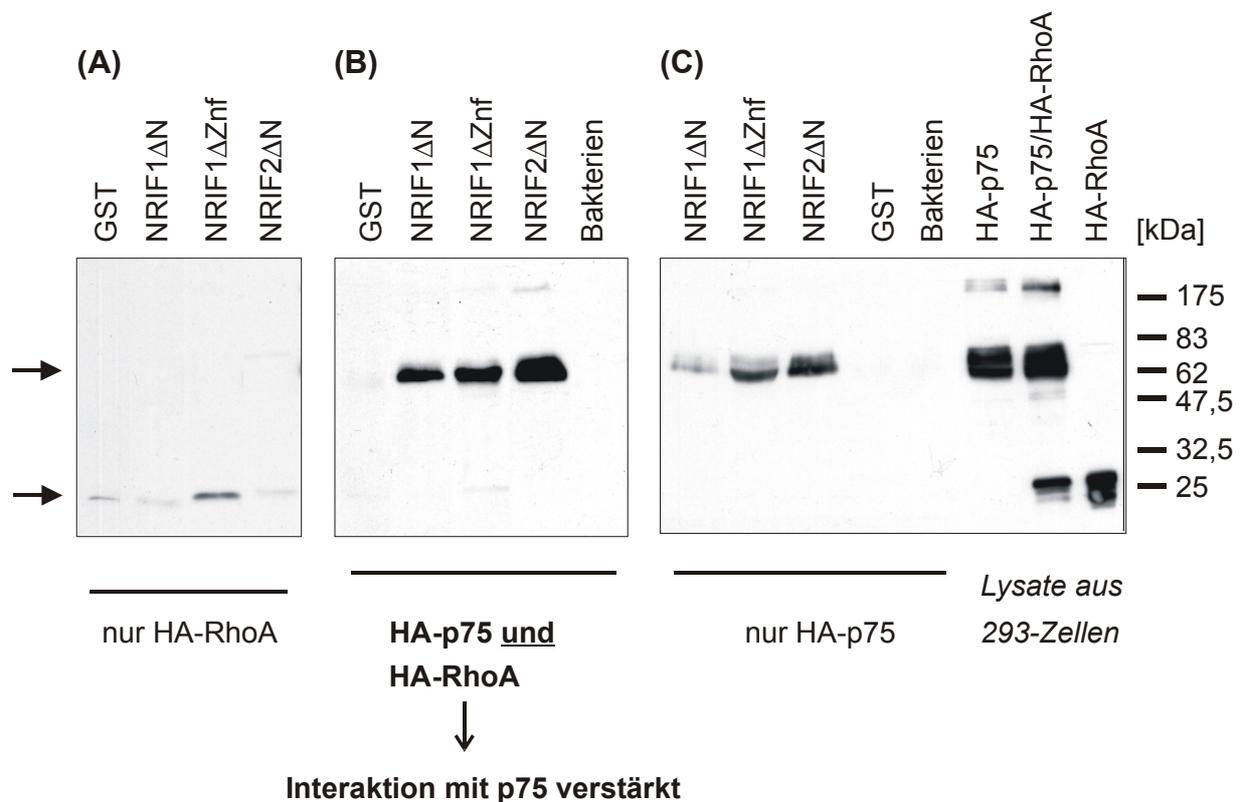
Ähnliche Experimente, bei denen Iod-125 radioaktiv markierte Neurotrophine ( $^{125}\text{I}$ -NGF,  $^{125}\text{I}$ -BDNF) mit p75 aus PCNA-Zellen kreuzvernetzt wurden, erbrachten ebenfalls kein eindeutiges Ergebnis. Wahrscheinlich waren die *in vitro*-Versuchssysteme aus verschiedenen Gründen ungeeignet, um eine mögliche Ligandenabhängigkeit der p75-NRIF-Interaktion nachzuweisen (vgl. Kapitel 5.3.1 der Diskussion).

#### 4.3.4 Wechselwirkung zwischen NRIF und RhoA

RhoA ist eine GTPase der Ras-Superfamilie, die von T. Yamashita in unserem Labor als weiterer Interaktor des Neurotrophinrezeptors p75 identifiziert wurde (Yamashita et al., 1999). RhoA bindet an die „Death“-Domäne von p75 und wird dadurch konstitutiv aktiviert.

Neurotrophinbindung an p75 inaktiviert die GTPase-Aktivität von RhoA, dies hat ein verstärktes Wachstum von Nervenfasern zur Folge.

Um zu überprüfen, ob die unabhängig voneinander identifizierten p75-Interaktionspartner NRIF und RhoA miteinander in Wechselwirkung stehen bzw. sich in ihrer Bindung an den p75-Rezeptor gegenseitig beeinflussen, wurde RhoA mit aminoterminalen HA-Epitop in 293-Zellen allein oder gemeinsam mit HA-p75 exprimiert. Sodann wurde ein „Pull-Down“-Experiment mit GST-NRIF1 $\Delta$ N, -NRIF2 $\Delta$ N oder -NRIF1 $\Delta$ Znf durchgeführt. Bei Verwendung der gleichen Reaktionsbedingungen wie für das p75-„Pull-Down“-Experiment konnte eine schwache Wechselwirkung zwischen GST-NRIF $\Delta$ Znf und RhoA beobachtet werden (Abb. 18). Da sie deutlich stärker als mit der GST-NRIF $\Delta$ N-Variante war, scheint für diese Interaktion im Gegensatz zur Bindung an p75 der aminoternale Proteinabschnitt von NRIF wichtig zu sein. Die Coimmunpräzipitation von RhoA und p75-ICD (lösliche Form) war sehr sensitiv gegenüber der Detergengkonzentration (T. Yamashita, persönliche Mitteilung), es konnten nur geringe Mengen (0,05%) eingesetzt werden. Da im hier beschriebenen Versuch deutlich höhere Detergengkonzentrationen verwendet wurden (0,8% für die Lyse der Zellen bzw. 0,2% während der Bindung), könnte auch dies der Grund für die nur schwache Bindung sein.



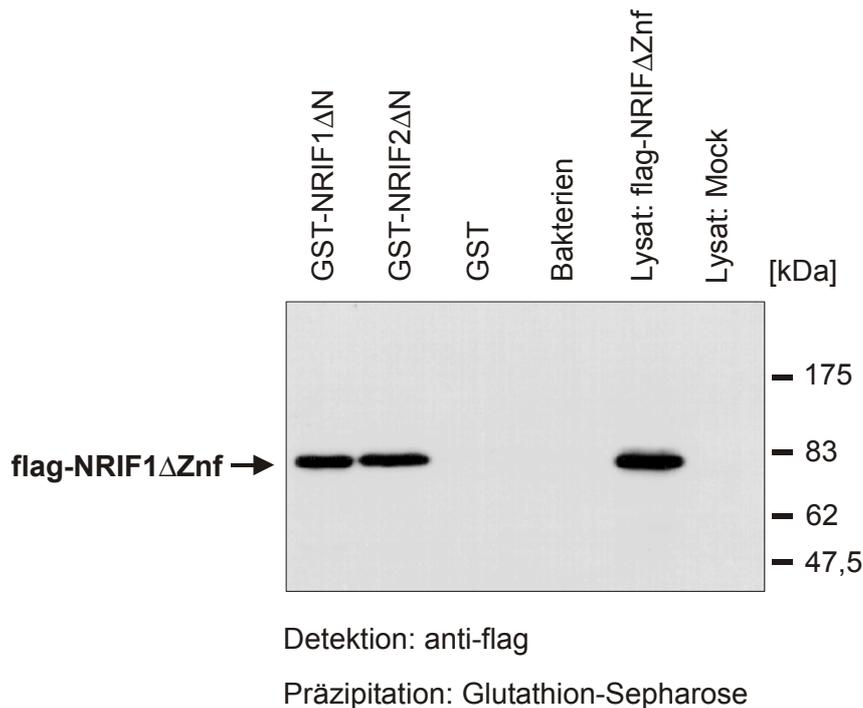
**Abb. 18: Interaktion von NRIF mit RhoA und mit p75 in Gegenwart von RhoA.**

RhoA konnte unter den angewandten Versuchsbedingungen nur schwach an NRIF binden (A), führte aber zu einer Verstärkung der Wechselwirkung zwischen NRIF und p75 (B, C). (Gel: Gradientengel 10-20%)

Interessanterweise wurde die Affinität von p75 für NRIF durch RhoA positiv verändert, insbesondere die Bindung von NRIF1 und p75 war in Anwesenheit von RhoA deutlich stärker (Abb. 18). Über die Bedeutung dieser Beobachtung kann nur spekuliert werden. Eventuell hat p75 in Gegenwart von RhoA eine andere Konformation, die NRIF besser binden kann. Andererseits scheint unter den experimentellen Bedingungen höchstens eine minimale gleichzeitige Bindung von HA-RhoA und HA-p75 an immobilisiertes GST-NRIF stattgefunden zu haben, da ansonsten in Abb. 18 zusätzlich zum p75-Signal ein deutliches Signal für HA-RhoA bei ca. 26 kDa zu erwarten wäre.

#### 4.3.5 Dimerisierung von NRIF1 und NRIF2

Wie schon in vorhergehenden Abschnitten erwähnt, bestehen Transkriptionsfaktoren aus zwei verschiedenen funktionellen Domänen, die für DNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung bzw. -hemmung verantwortlich sind. Ein wichtiger regulatorischer Mechanismus, der sowohl die Bindungsaffinität für DNA als auch die Transkriptionsregulation beeinflusst, ist die Oligomerisierung. Diese kann sowohl zwischen identischen als auch zwischen verschiedenen Proteinen stattfinden. Insofern stellte sich die Frage, ob auch NRIF-Proteine, bei denen es sich aufgrund ihrer Strukturmerkmale eindeutig um Transkriptionsfaktoren handelt, Homo- und Heterodimere bilden können. Diese Hypothese wurde *in vitro* durch „Pull-Down“-Experimente überprüft. NRIF1 wurde mit einem aminoterminalen flag-Epitop (Vektor pFLAG-CMV-2, Sigma) in 293-Zellen exprimiert. Die flag-Sequenz besteht aus acht Aminosäuren (Prickett et al., 1989) und ermöglicht eine einfache Detektion des rekombinanten Proteins durch kommerziell erhältliche anti-flag-Antikörper. Eine NRIF-Variante ohne Zinkfinger (flag-NRIF1 $\Delta$ Znf) ließ sich sehr viel besser exprimieren als ein vollständiges NRIF1-Protein (flag-NRIF1) und wurde deshalb für die Bindungsstudien verwendet. Sowohl GST-NRIF1 $\Delta$ N als auch GST-NRIF2 $\Delta$ N konnten flag-NRIF1 $\Delta$ Znf binden (Abb. 19), die Detergens- und Salzbedingungen entsprachen den bereits für p75-Experimente beschriebenen. NRIF1 und NRIF2 können also zumindest *in vitro* sehr stabile Homo- und Heterodimere bilden, eine typische Eigenschaft von Transkriptionsfaktoren. Ein interessanter Aspekt der Dimerisierung von NRIF-Proteinen ist die Tatsache, daß die „SCAN-Domäne“ scheinbar nicht für die Dimerisierung essentiell ist, da nur eines der für die Interaktionsstudie verwendeten NRIF-Konstrukte diese Domäne enthielt (vgl. Abb. 12). Wie in Abschnitt 4.2.3 erläutert, ermöglichen SCAN-Domänen selektive Protein-Protein-Wechselwirkungen (Williams et al., 1999 und Schumacher et al., 2000). Es ist aber durchaus möglich daß (a) eine Interaktion von zwei NRIF-Konstrukten mit SCAN-Domäne noch stärker wäre als hier beobachtet und (b) über die SCAN-Domäne eine Wechselwirkung mit anderen für die Transkriptionsregulation wichtigen Proteinen stattfindet.



**Abb. 19: Wechselwirkung zwischen NRIF1 und NRIF2.**

Die Interaktion von NRIF1 und NRIF2 konnte biochemisch durch „Pull-Down“-Experimente nachgewiesen werden. Wahrscheinlich binden NRIF1 und NRIF2 *in vivo* als Homo- oder Heterodimere an spezifische DNA-Sequenzen.

## 4.4 Subzelluläre Lokalisierung von NRIF und p75 in 293-Zellen

### 4.4.1 Expression von NRIF und p75 in Fibroblasten-Zelllinien

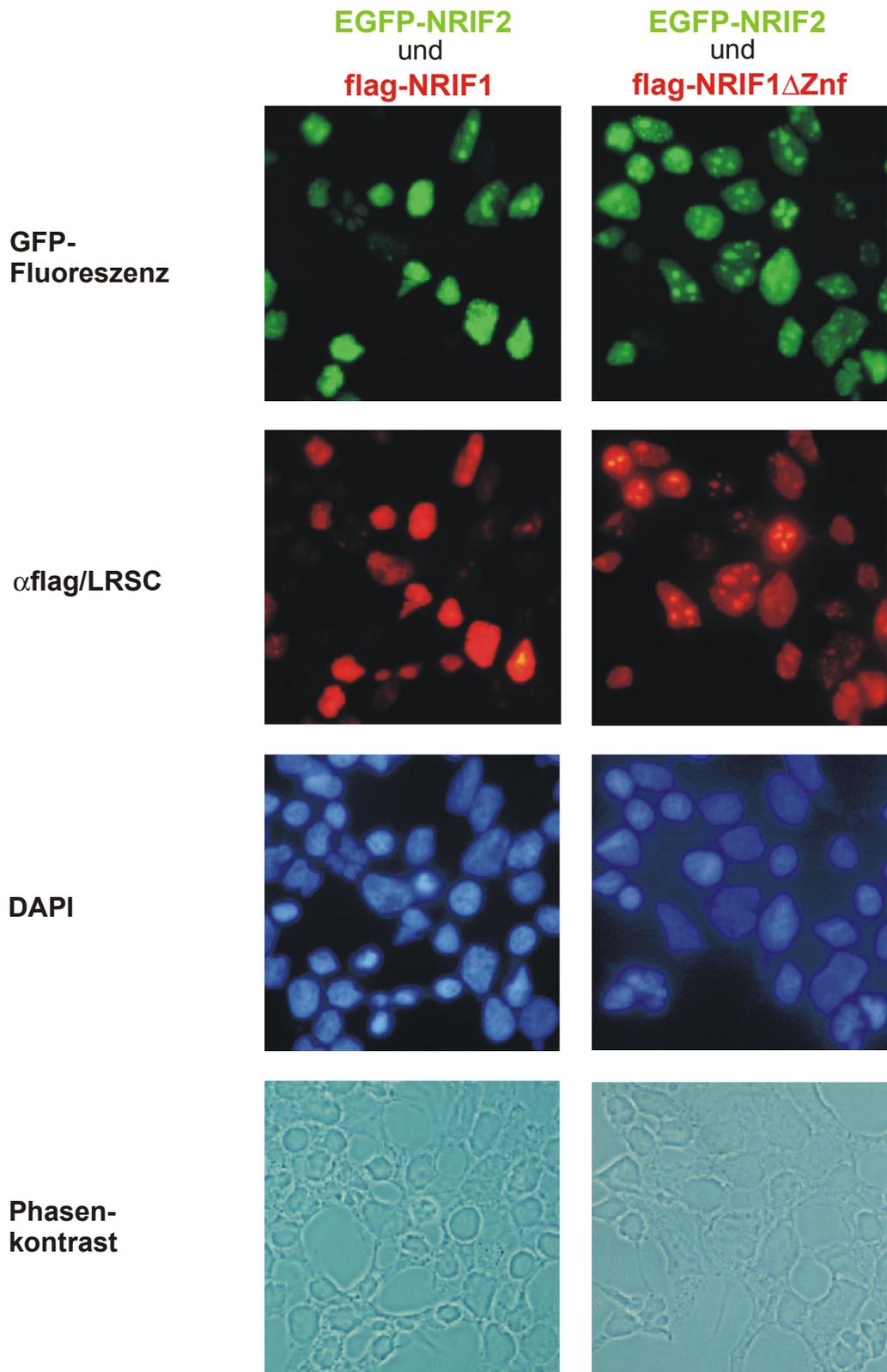
Die in „Pull-Down“-Experimenten nachgewiesene biochemische Assoziation von NRIF1 und 2 mit p75 bzw. von NRIF1 mit NRIF2 war zusammen mit den Daten aus dem Hefe-„Two-Hybrid“-System ein deutlicher Hinweis auf eine Interaktion dieser Proteine. Falls diese Wechselwirkung *in vivo* tatsächlich stattfindet, sollten die Proteine sich in Zellen zumindest teilweise am gleichen Ort befinden, also colokalisieren. Der Nachweis von endogenem NRIF-Protein war nicht möglich, da kein Antikörper zur Verfügung stand, der eine spezifische Detektion des in sehr geringer Konzentration vorliegenden Proteins erlaubte. Deshalb wurden die zu untersuchenden Proteine in eukaryotischen Zellen transient überexprimiert. Die Detektion von NRIF wurde einerseits durch die Überexpression der Proteine (unter Kontrolle des Promotors des Cytomegalovirus, CMV), andererseits durch leicht zu detektierende Epitope ermöglicht. NRIF1 wurde mit einem aminoterminalen flag-Epitop gekoppelt (flag-NRIF und flag-NRIF1 $\Delta$ Znf, Abb. 12), beide NRIF-Proteine wurden als carboxyterminales Fusionsprotein des „green fluorescent protein“, GFP, exprimiert (EGFP-NRIF1, EGFP-NRIF2). GFP ist ein Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das bei Anregung mit Licht der Wellenlänge

490 nm grün fluoresziert. Die verwendete GFP-Variante EGFP („enhanced green fluorescent protein“) ist eine optimierte Form des Wildtyp-GFP, die ca. 35-fach stärker leuchtet (Clontech). p75 wurde ohne Epitop exprimiert und mit dem sehr spezifischen monoklonalen Antikörper MC192 detektiert. Für die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen sind flach wachsende Zellen geeignet, die einen nicht zu großen Zellkern besitzen. Allgemein können für diesen Zweck Fibroblasten-Zelllinien unterschiedlicher Spezies verwendet werden. Die Expression des Proteins NRIF wurde jedoch von vielen Zelllinien nicht toleriert. So konnten nach transienter Transfektion der Fibroblasten-Linien COS-7 und CV-1 (aus Affe), BHK-21 (aus Hamster) und NIH3T3 (aus Maus) nur vereinzelt NRIF-exprimierende Zellen detektiert werden (unter 1%). Eine sehr hohe Transfektionseffizienz war deshalb der wichtigste Aspekt bei der Auswahl der Zelllinie, so daß 293-Zellen verwendet wurden. Bei diesen betrug die Effizienz für EGFP oder p75 ca. 70-80%, EGFP-NRIF konnte bei Verwendung hoher DNA-Mengen im Transfektionsansatz in ca. 35% der Zellen nachgewiesen werden.

293-Zellen auf Glas-Objektträgern wurden transient mit NRIF1, NRIF2 und p75 jeweils allein oder in unterschiedlichen Kombinationen transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen fixiert, mit geeigneten Antikörpern gefärbt und durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

EGFP-NRIF befand sich hauptsächlich im Zellkern von 293-Zellen (Abb. 20). Dies entsprach den Vorhersagen, da NRIF ein potentiell Kernlokalisierungssignal enthält (Abb. 8) und höchstwahrscheinlich ein Transkriptionsfaktor ist. EGFP-NRIF-Expression führte in manchen Zellen zu einer einheitlichen Färbung des gesamten Zellkerns, während in anderen Zellen relativ große, punktförmige Proteinaggregate beobachtet wurden. Sie waren besonders häufig, wenn eine NRIF-Variante ohne Zinkfinger (flag-NRIF1 $\Delta$ Znf) zusammen mit Gesamt-NRIF (EGFP-NRIF2) exprimiert wurde (Abb. 20, rechts). Bei der alleinigen Transfektion von NRIF1 oder NRIF2 traten sie deutlich seltener auf. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um den Nukleolus, der den Ort der Ribosomensynthese darstellt. Transformierte Zelllinien wie 293-Zellen sind polyploid und besitzen im Gegensatz zu normalen Körperzellen mehrere Nukleoli. Der Nukleolus löst sich während der Mitose auf. Die mögliche Colokalisierung von NRIF mit Nukleoli wurde durch Transfektion mit dem Nukleolus-Protein Nop30 (Stoss et al., 1999) verifiziert. Allerdings traten die NRIF-Aggregate bei Coexpression mit dem sehr stark exprimierten Nop30-Konstrukt viel seltener auf als bei Coexpression beider NRIF-Proteine. Die genaueren Sequenzmerkmale und Mechanismen, die eine nukleoläre Lokalisierung ermöglichten, wurden nicht untersucht.

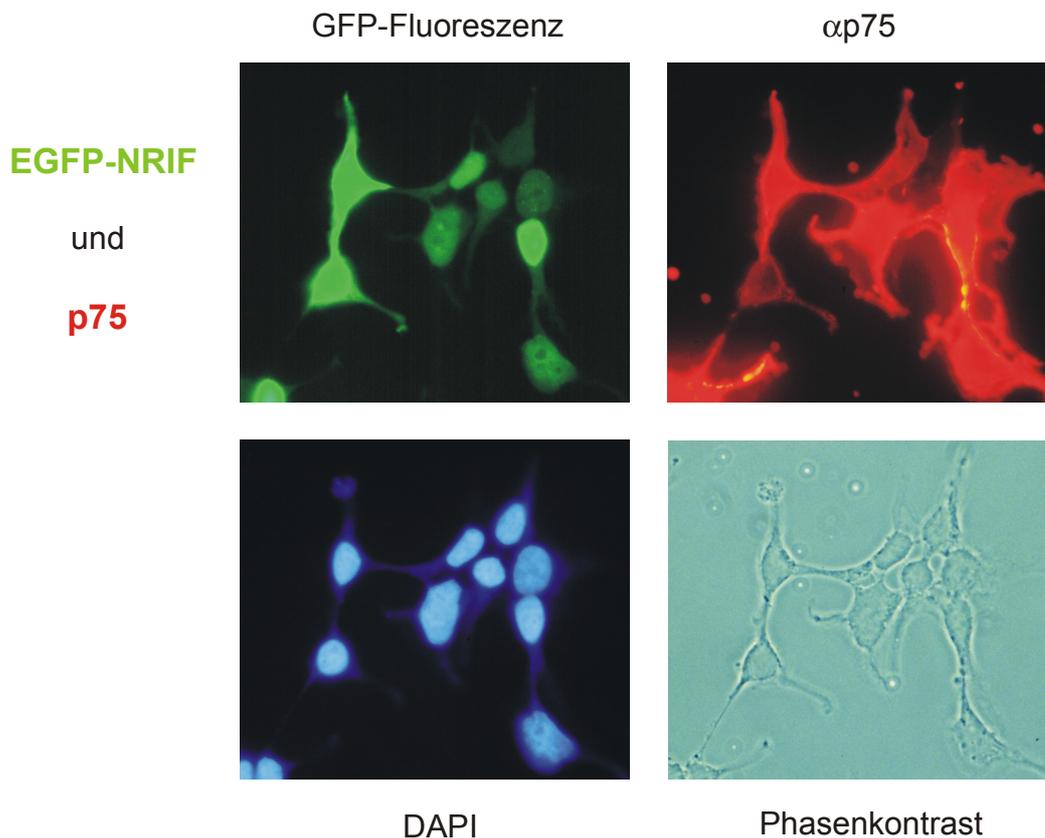
Eine gleichzeitige Transfektion von flag-NRIF1 (Gesamtprotein mit oder ohne Zinkfinger) und EGFP-NRIF2 führte zu einer fast vollständigen Überlappung der Lokalisierung (Abb. 20). Dies war zusammen mit der biochemischen Interaktion (4.3.5) ein weiteres Indiz für die Dimerisierung von NRIF-Proteinen.



**Abb. 20: EGFP-NRIF2 und flag-NRIF1 colokalisieren in 293-Zellen.**

NRIF-Proteine wurden nach transienter Transfektion von 293-Zellen hauptsächlich im Zellkern nachgewiesen, wo sie entweder das gesamte Nukleoplasma ausfüllten oder hauptsächlich im Nukleolus konzentriert waren. Die gleichzeitige Transfektion von EGFP-NRIF2 (grün; GFP-Fluoreszenz) und flag-NRIF1 (rot; Färbung mit einem  $\alpha$ flag-Antikörper und einem LRSC-gekoppelten sekundären Antikörper) demonstrierte eine Überlappung ihrer Lokalisierung. Die DNA der Zellkerne wurde durch Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI sichtbar gemacht.

Nach gleichzeitiger Transfektion von NRIF und p75 wurde in vielen Zellen eine Colokalisierung der beiden Proteine an der Plasmamembran beobachtet, die Interaktion war also auch *in vivo* möglich. Dabei schien NRIF manchmal wie der Rezeptor p75 nur membranlokalisiert zu sein, während das Protein in anderen Zellen derselben Population an der Membran, im Cytoplasma und im Zellkern nachgewiesen wurde (Abb. 21). In vielen Zellen war NRIF jedoch auch bei Cotransfektion mit p75 hauptsächlich im Kern zu finden. Außerdem exprimierten viele Zellen nur p75, obwohl versucht worden war, die schlechtere Expressionsrate von NRIF durch höhere DNA-Mengen im Transfektionsansatz auszugleichen. Eine Überlappung von NRIF und p75 wurde auffallend häufig in Zellen beobachtet, die relativ wenig p75 exprimierten. Dies könnte darauf hindeuten, daß die Interaktion der Proteine nur dann möglich ist, wenn die Gleichgewichtskonzentrationen in einem bestimmten, exakt ausgewogenen Verhältnis zueinander stehen. Die Interaktion könnte auch von der Phase des Zellzyklus abhängig sein.



**Abb. 21: Subzelluläre Lokalisierung von GFP-NRIF und p75 in 293-Zellen.**

Bei Cotransfektion von NRIF und p75 war NRIF in einigen Zellen nur im Zellkern lokalisiert, während die Proteine in anderen Zellen an der Plasmamembran colokalisierten und damit die biochemisch nachgewiesene Interaktion auch *in vivo* bestätigten.

Die GFP-Fluoreszenz der EGFP-NRIF-transfizierten Zellen wurde bei 490 nm angeregt, p75 wurde durch Färbung mit dem monoklonalen αp75-Antikörper MC192 und einem LRSC-gekoppelten sekundären Antikörper sichtbar gemacht. Der unter UV-Anregung blau fluoreszierende Farbstoff DAPI färbte selektiv die DNA der Zellkerne.

#### 4.4.2 Einfluß von NGF auf die subzelluläre NRIF-Lokalisierung

Wie schon in Abschnitt 4.3.3 erläutert, wurde die Hypothese einer ligandenabhängigen Dissoziation der NRIF-Proteine vom p75-Rezeptor aufgestellt. Falls dies zuträfe, sollte in co-transfizierten 293-Zellen NRIF nach NGF-Behandlung nur noch im Zellkern lokalisiert sein. Mit GFP-NRIF1/2 und p75 transfizierte 293-Zellen wurden 1,5 Tage nach Transfektion ca. 15 h mit einem p75-„Receptorbody“ (vgl. 4.3.3) inkubiert, um eventuell vorhandene Neurotrophine abzufangen. Sodann wurden die Zellen mehrere Stunden mit Medium gewaschen und 1,5 h bis 12 h mit 100 ng/ml NGF bzw. 1 µg/ml „Receptorbody“ (Negativkontrolle) behandelt. Es wurde FCS-haltiges oder serumfreies Medium verwendet. Die fixierten, gefärbten Zellen wurden durch Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

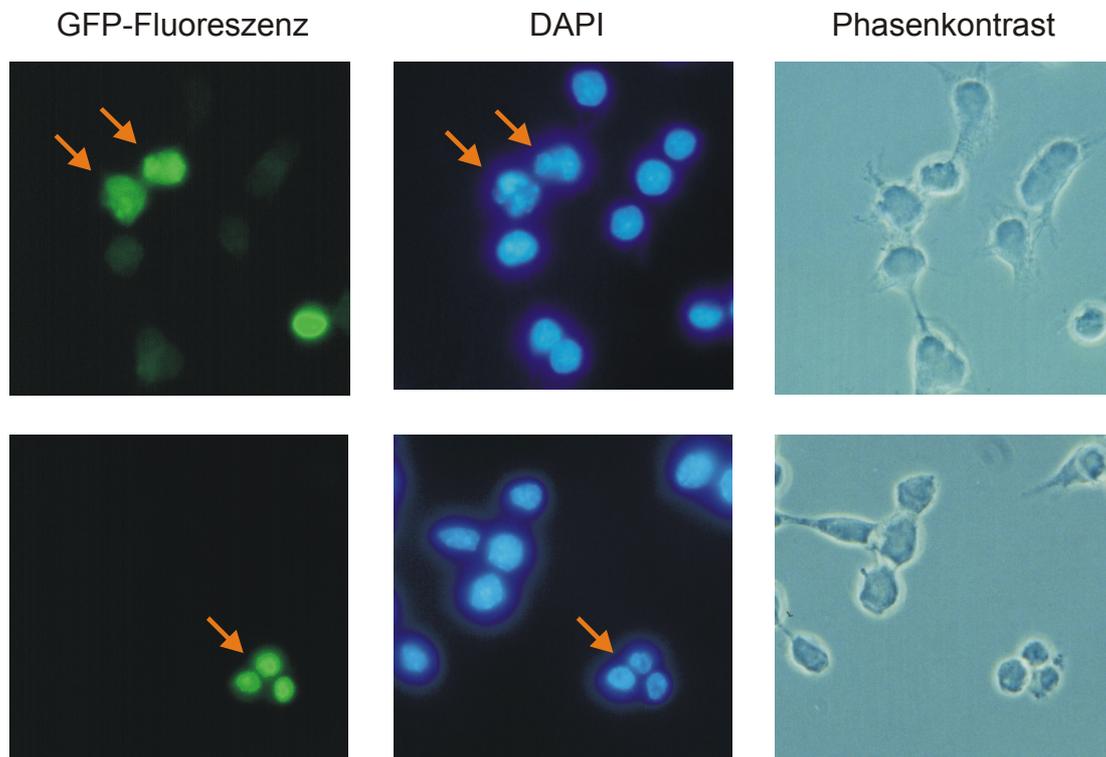
In diesem System konnte kein Effekt von NGF auf die Lokalisierung von EGFP-NRIF festgestellt werden: NRIF war weiterhin sowohl ausschließlich im Kern als auch zusätzlich im Cytoplasma bzw. an der Membran der Zellen zu finden. Dies könnte eventuell daran liegen, daß das Verhältnis der Menge an NRIF und p75 nicht ausgewogen war, die überexprimierten Proteine lagen wahrscheinlich in einer unphysiologisch hohen Konzentration vor. Versuche mit endogenem NRIF waren jedoch wegen mangelnder Detektions-Sensitivität nicht möglich. Die postulierte Ligandenabhängigkeit konnte also im Zellkultursystem nicht nachgewiesen werden.

#### 4.5 NRIF als Auslöser von Apoptose

Die Colokalisierung von NRIF und p75 wurde auch in Zellen neuronalen Ursprungs bestätigt. Da die Expression von NRIF, wie bereits erwähnt, im allgemeinen problematisch war, mußten effizient transfizierbare Zellen gewählt werden. Die immortalisierte Zelllinie „HN10“ (Lee et al., 1990) war durch Fusion hippocampaler Mauszellen (C57BL6, E18) mit einer Neuroblastoma-Zelllinie (N18TG2) erzeugt worden und besitzt viele Eigenschaften primärer Hippocampus-Neuronen. HN10-Zellen exprimieren endogen den p75-Neurotrophinrezeptor. NGF-mRNA wird zwar produziert, das Protein konnte jedoch im ELISA nicht in signifikanter Menge nachgewiesen werden.

Bei Transfektion nach der Calcium-Phosphatmethode wurde mit GFP eine Effizienz von 20% bis 40% erreicht. Für GFP-NRIF lag dieser Wert jedoch um eine Zehnerpotenz niedriger: NRIF konnte auch bei Verwendung höherer DNA-Mengen nach Waschen und Fixieren nur in 2% bis 4,5% der Zellen detektiert werden. Die subzelluläre Lokalisierung war ähnlich wie in 293-Zellen, also entweder nur im Kern, oder eine Colokalisierung mit p75 an der Membran, wobei in einigen Zellen lange GFP-NRIF-angefärbte Fortsätze erkennbar waren.

Die Färbung der Zellkerne mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI ermöglichte die Beobachtung, daß NRIF-überexprimierende Zellen häufig keine gesunden Zellkerne besaßen, sondern diese in unterschiedlichem Maße zerfallen waren. Zellen mit beschädigten Zellkernen waren im Phasenkontrast oft kleiner und abgerundeter als ihre Nachbarzellen (Abb. 22).



**Abb. 22: Apoptotische Zellkerne in GFP-NRIF-exprimierenden HN10-Zellen.**

GFP-NRIF-exprimierende HN10-Zellen (grüne Fluoreszenz) besaßen häufig eine Kernmorphologie, die typisch für apoptotische Zellen war (Kondensation des Chromatins, Zerfall in kleinere Stücke). Die DNA der Zellkerne wurde durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI sichtbar gemacht.

Auch in der 293-Zelllinie wurden NRIF-exprimierende Zellen mit gestörter Kernmorphologie beobachtet. Die Kondensation des Kern-Chromatins, das bei Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen wie DAPI oder Hoechst 33258 stärker leuchtet, und der Zerfall der Zellkerne sind typische Merkmale für Zelltod durch Apoptose. Allerdings besaßen längst nicht alle NRIF-exprimierenden Zellen apoptotische Zellkerne. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wurde jedoch ein Großteil der abgestorbenen und deshalb nicht mehr gut an der Unterlage haftenden Zellen schon während des Waschens, der Fixierung und der Färbung verloren, so daß eine Abschätzung des tatsächlichen Ausmaßes der Apoptose schwierig war. Der selektive Verlust abgestorbener Zellen würde auch erklären, warum in HN10-Zellen nur höchstens 4,5% GFP-NRIF-positive Zellen gefunden wurden, während die Transfektionsrate für GFP deutlich höher lag.

Die Problematik der NRIF-Expression in anderen getesteten Zelllinien könnte ebenfalls darauf zurückzuführen sein, daß NRIF-überexprimierende Zellen nicht überlebten. Es gab also mehrere Hinweise auf eine Rolle von NRIF als Auslöser von Apoptose:

1. Erfolgreich transfizierte Zellen besaßen häufig eine Kernmorphologie, die der apoptotischer Zellen entsprach.
2. *In vivo*-Daten aus Mäusen mit einer *nrf1*-Nullmutation hatten gezeigt, daß NRIF während der Entwicklung von Mausembryonen an p75-vermittelten Zelltod-Prozessen in der Retina beteiligt ist (Casademunt et al., 1999).
3. Verschiedene Zelllinien tolerierten keine Überexpression von GFP-NRIF (vgl. 4.4.1).

Die quantitative Bestätigung des Phänomens war jedoch problematisch und zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit nicht vollständig abgeschlossen. Da die in HN10-Zellen erreichte Transfektionsrate mit GFP-NRIF zu gering erschien, wurden die Versuche mit 293-Zellen durchgeführt.

#### 4.5.1 DNA-Kondensierung

Ein erster Ansatz zur Quantifizierung der Apoptose war die Anfärbung der Zellkerne mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (1 µg/ml Hoechst 33258) und das Zählen pyknotischer, also apoptotischer, Kerne unter dem Fluoreszenzmikroskop. 293-Zellen wurden entweder mit GFP-NRIF (+/- p75) oder Kontrollplasmiden (GFP, pcDNA3) transient transfiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Bei Mediumwechsel und Waschen wurden jedoch gerade tote, schlecht haftende Zellen bevorzugt verloren, die bei Transfektion von GFP-NRIF häufiger vorkamen. Außerdem war das Zählen der oft übereinander wachsenden 293-Zellen schwierig, so daß andere Experimente konzipiert werden mußten.

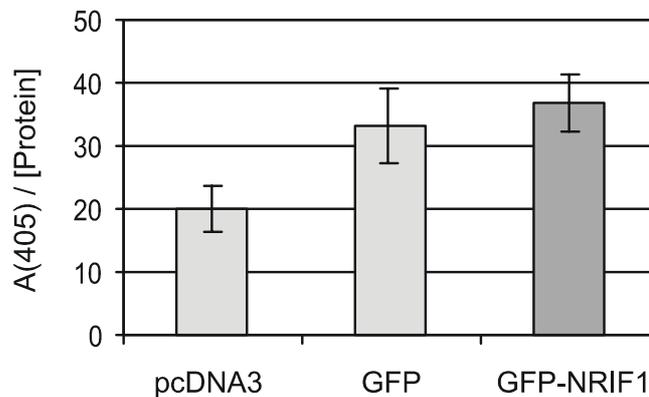
#### 4.5.2 Quantifizierung freier Nukleosomen in Zellextrakten

Wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben, konnten die während der Apoptose durch DNA-Spaltung entstehenden Histon-assoziierten DNA-Fragmente (Mono- und Oligonukleosomen) in einem „Sandwich-ELISA“ spezifisch nachgewiesen werden. Es wurden Lysate von transient mit GFP-NRIF oder Kontrollplasmiden (GFP, pcDNA3) transfizierten 293-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion analysiert.

Mit dem Kontrollplasmid pcDNA3 transfizierte Zellen besaßen immer deutlich weniger freie Nukleosomen als GFP-NRIF-exprimierende Zellen (Abb. 23). GFP schien jedoch keine geeignete Kontrolle zu sein: In GFP-transfizierten Zellen waren fast genausoviele freie Nukleosomen nachweisbar wie bei NRIF, GFP hatte also ebenfalls eine toxische Wirkung (vgl. auch Liu et al., 1999). Bei der Interpretation der Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß nur ein Durchschnittswert der gesamten Zellpopulation bestimmt werden konnte, also einer Mischung von wenigen tatsächlich GFP-NRIF-exprimierenden Zellen (von denen

wiederum nur ein gewisser Prozentsatz apoptotisch war) und vielen nicht transfizierten Zellen. Für GFP hingegen lag die Transfektionseffizienz mit über 70% viel höher.

Zusammenfassend zeigten die Messungen freier Nukleosomen demnach je nach Vergleichspunkt eine eindeutige apoptotische Wirkung von GFP-NRIF (Vergleich mit pcDNA3) oder eine Tendenz zu verstärkter Apoptose (Vergleich mit GFP).



**Abb. 23: Quantifizierung von Apoptose durch Messung freier Nukleosomen.**

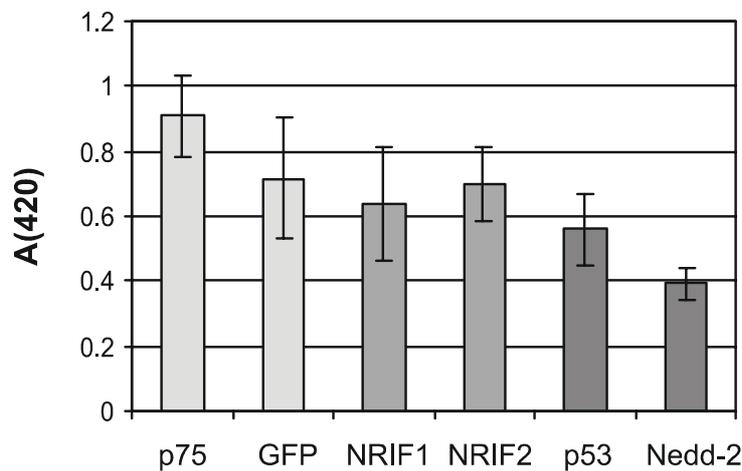
Bei Zellen in späten apoptotischen Stadien findet eine Fragmentierung der Kern-DNA statt, die durch Messung freier Nukleosomen im Cytoplasma transient transfizierter 293-Zellen quantifiziert wurde. Die Zellen wurden ca. 26 h nach Transfektion geerntet und für den „Cell Death Detection ELISA“ (Boehringer Mannheim) eingesetzt. Alle Meßwerte (Extinktion eines umgesetzten Substrates bei 405 nm) wurden auf den Proteingehalt der Probe normiert. Je höher der Meßwert war, umso mehr apoptotische Zellen enthielt die Probe.

#### 4.5.3 Zellproliferations-„Assay“

Die Proliferationsgeschwindigkeit und Lebensfähigkeit von Zellen wurde mit dem Tetrazoliumsalz „WST-1“ bestimmt, das nur in lebenden Zellen durch Enzyme der mitochondrialen Atmungskette zu einem sog. Formazan, einem tiefroten Farbstoff, gespalten werden kann (3.4.6). Die Absorption des Zellkulturüberstandes war demnach ein Maß für die Menge an gebildetem Formazan und somit für die Vitalität der Zellen.

Die Lebensfähigkeit transient transfizierter 293-Zellen wurde ca. 2,5 Tage nach Transfektion gemessen. Als Positivkontrollen für das Auftreten von Apoptose dienten p53 und Nedd-2. Das Tumor-Suppressorprotein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der in vielen zu Apoptose führenden Stoffwechselwegen eine wichtige Rolle spielt. Nedd-2 (Caspase-2) gehört zur Familie der „Caspasen“, wichtigen Effektormolekülen des programmierten Zelltodes. Diese cytosolischen Cystein-Proteasen spalten ihre Substratproteine (z.B. andere Caspasen, PARP, MEKK, spezifische DNasen und viele weitere cytoplasmatische und nukleäre Proteine) nach Aspartat-Resten (vgl. Einleitung).

Auch in diesem Versuch zeigten die Ergebnisse eine hohe Variabilität (Abb. 24). Wie erwartet, überlebten mit der Caspase Nedd-2 transfizierte Zellen am schlechtesten. Die Transfektion mit GFP-NRIF führte zu einer im Vergleich mit p75 deutlich geringeren Lebensfähigkeit, aber wie bereits in anderen Experimenten beobachtet, war auch GFP alleine schädlich für die Zellen. Wie in Abschnitt 4.5.2 erläutert, war GFP unter anderem wegen der viel höheren Expressionslevel kein idealer Kontrollmarker.



**Abb. 24: Messung der Lebensfähigkeit transfizierter Zellen mit dem WST-1-„Assay“.**

Die Lebensfähigkeit von 293-Zellen wurde 2,5 Tage nach Transfektion mit Hilfe des Tetrazoliumsalzes „WST-1“ bestimmt, das nur von lebenden Zellen umgesetzt wird. Die Absorption des gebildeten Formazans war ein Maß für die Vitalität der Zellen, d.h. je niedriger der Meßwert war, desto mehr Zellen waren gestorben.

Die Versuche bestätigten also die Vermutung, daß NRIF apoptotisch wirken kann. Um einen endgültigen Beweis für diese Hypothese zu erbringen, sollten noch weitere Experimente, eventuell unter Verwendung anderer Zelltypen, durchgeführt werden (vgl. Abschnitt 5.3.2 der Diskussion).

## 4.6 Analyse der *nrif2*-mRNA-Expression in der Maus

### 4.6.1 Deletion des *nrif1*-Gens durch homologe Rekombination

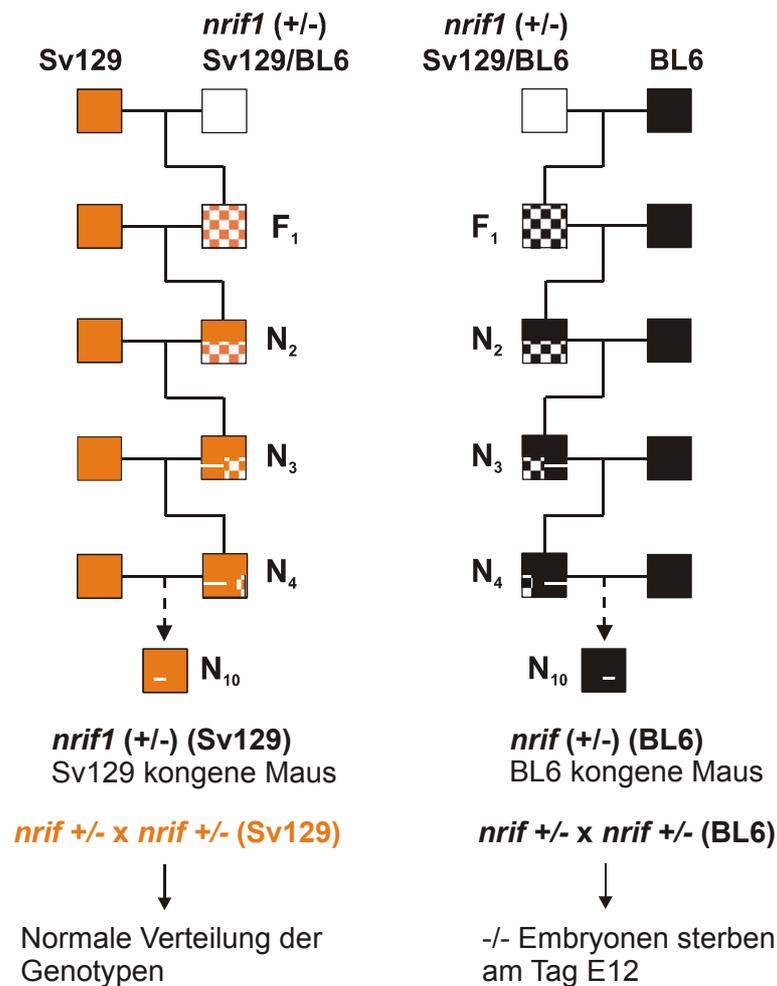
Um die *in vivo*-Funktion von NRIF1 beurteilen zu können, generierte E. Casademunt in unserer Abteilung eine Mauslinie mit einer gezielten Mutation im *nrif1*-Gen. In *nrif1*-Nullmutanten war ein Teil des letzten Exons, der die potentiell p75-bindende Region sowie vier der fünf Zinkfinger umfaßt, durch homologe Rekombination gegen eine pGK-Neo-Selektionskassette ersetzt worden. *Nrif1*-mRNA war in diesen Mäusen durch RT-PCR nicht mehr nachweisbar. Genauere Angaben zur Strategie und zum Phänotyp finden sich in Casademunt et al., 1999. Der genetische Hintergrund der durch homologe Rekombination erzeugten Nullmutante war, bedingt durch die angewandte Technik, eine Mischung aus zwei Maus-Stämmen. Der Genaustausch selbst war in Stammzellen aus Sv129-Mäusen vorgenommen worden. Neomycin-resistente, rekombinante Stammzellen wurden in BL6-Blastocysten injiziert und in scheinsschwangere Mäuse implantiert. Diese Strategie ermöglichte die Erkennung chimärer Mäuse an einer gefleckten Fellfarbe.

Die Analyse transgener Mäuse sollte aus Gründen der Vergleichbarkeit in einem eindeutig definierten Hintergrund erfolgen, da sich verschiedene Stämme genetisch und in ihrem Verhalten teilweise erheblich unterscheiden (vgl. 5.4; Gerlai, 1996; Crawley, 1996; Montagutelli et al., 2000). Aus praktischen Gründen (Zeitfaktor) werden jedoch meist auch Mäuse mit gemischtem genetischen Hintergrund analysiert. Um kongene Mauslinien zu erhalten, wurden heterozygote, gemischte Sv129/BL6-*nrif1*-Nullmutanten mit reinerbigen Sv129- oder BL6-Mäusen gekreuzt (Abb. 25). Nach spätestens zehn Generationen von Rückkreuzungen konnte man davon ausgehen, daß die Mäuse nur noch Gene des entsprechenden, zur Kreuzung verwendeten Stammes, besaßen. Erstaunlicherweise waren Nullmutanten im BL6-Hintergrund ab der sechsten Rückkreuzungsgeneration nicht mehr lebensfähig, sondern starben in einem frühen Embryonalstadium (ungefähr E12). Am elften Embryonaltag untersuchte Würfe enthielten in etwa die nach Mendel erwartete Anzahl *nrif1*-Nullmutanten, diese waren jedoch kleiner als Wildtyp- oder heterozygote Tiere. Nach dem dreizehnten Embryonaltag wurden keine lebenden *nrif1* (-/-) Embryonen mehr gefunden, zu späteren Stadien waren Nullmutanten komplett reabsorbiert.

(Nächste Seite:)

#### Abb. 25: Rückkreuzung zur Erzeugung kongener Mauslinien.

Heterozygote *nrif1* (+/-)-Mäuse eines gemischten Sv129/BL6-Hintergrundes wurden mit reinerbigen Sv129-Mäusen (links) oder reinerbigen BL6-Mäusen (rechts) gekreuzt. Das Genom der F1-Generation enthielt zu mindestens 50% Gene des für die Rückkreuzung verwendeten Stammes. Mit jeder weiteren Rückkreuzung (N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, N<sub>4</sub> etc.) wurde der Prozentsatz der Gene des reinerbigen Stammes erhöht (75% in N<sub>2</sub>, 87,5% in N<sub>3</sub> usw.), bis die Mäuse nach zehn Generationen nur noch Gene dieses Stammes besaßen. Nur die das mutierte Gen (*nrif1*) umgebende Region (weißer Strich in N<sub>3</sub>, N<sub>4</sub>,..., N<sub>10</sub>) stammte immer aus der ursprünglichen Mauslinie (vgl. auch 5.4).



**Abb. 25: Rückkreuzung zur Erzeugung kongener Mauslinien**

(Erklärungen siehe vorherige Seite.)

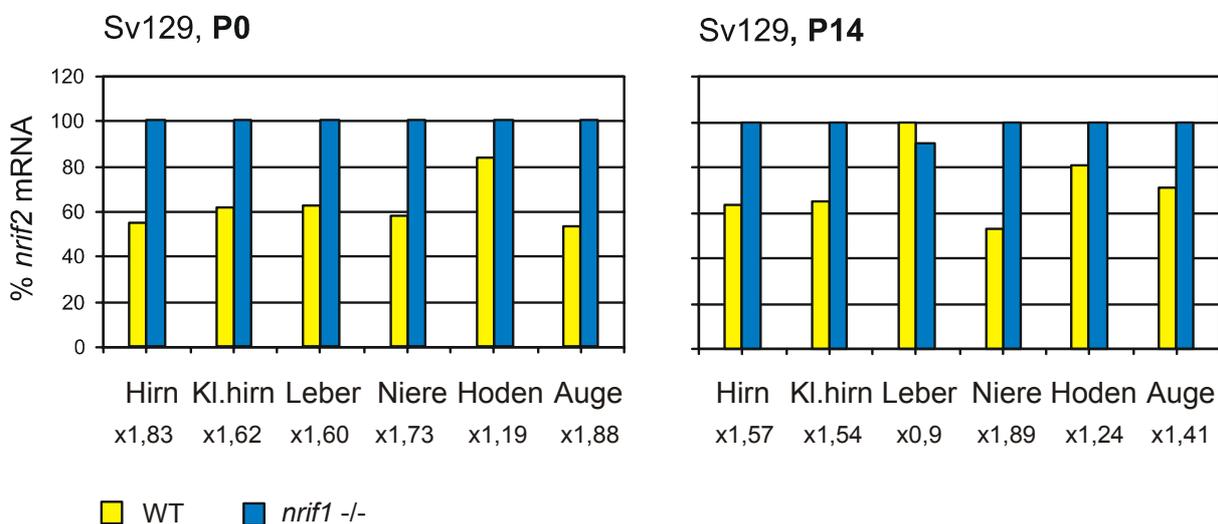
#### 4.6.2 Analyse der *nrif2*-mRNA-Expression im Sv129-Hintergrund

Aus Voruntersuchungen von E. Casademunt war bereits bekannt, daß *nrif1*-mRNA ubiquitär in vielen Mausgeweben sowie Zelllinien exprimiert wird. Auch *nrif2*-mRNA konnte mittels RT-PCR in allen untersuchten Geweben von drei Wochen alten Mäusen nachgewiesen werden: in Gesamthirn, Kleinhirn, Cortex, Hippocampus, Hypophyse, Spinalganglien, Sehnerv, Trigemini-Nerv, Riechkolben, Rückenmark, Ischiasnerv, Auge, Thymus, Skelettmuskel (geringe Mengen), Herz, Nieren, Darm, Leber, Lunge, Eierstock, Uterus, Hoden, Milz und Magen.

Für genauere Analysen wurden die *nrif2*-mRNA-Mengen in unterschiedlichen Geweben aus kongenen Sv129-Mäusen zum Zeitpunkt P0 (direkt nach der Geburt) und P14 jeweils vergleichend in Wildtyp-Tieren und *nrif1*-Nullmutanten mittels RT-PCR und Northern Blot bestimmt. Die RT-PCR erlaubte eine semiquantitative Analyse der Expressionslevel. Dabei

mußten alle Proben auf ein in konstanter Menge exprimiertes Gen normiert werden, um Qualitätsunterschiede zwischen verschiedenen cDNA-Präparationen ausschließen zu können. Das häufig zur Normierung herangezogene Gen für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Enzym in der Glykolyse) variierte stark zwischen unterschiedlichen Geweben wie Kleinhirn, Leber, Auge und Hoden. Deshalb wurde für die Normierung stattdessen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT, ein Enzym des „salvage pathways“ zur Wiederverwertung von Purinbasen) verwendet. Alle PCR-Reaktionen wurden mindestens vierfach durchgeführt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit der EasyWin32-Software (Herolab) quantifiziert. Folgende Gewebe wurden untersucht: Kleinhirn, restliches Hirn, Leber, Niere, Hoden und Auge. *Nrif1*-mRNA war in vierzehn Tage alten und erwachsenen Mäusen in Hoden am stärksten exprimiert, während *nrif2* hier nicht in höherer Menge vorlag. Die *nrif2*-Mengen waren in Kleinhirn und Leber am höchsten, in Hoden und Auge am niedrigsten. In neugeborenen Mäusen (P0) wurde in Auge und Hirn am meisten *nrif1*- und *nrif2*-mRNA gefunden, die Mengen waren insgesamt höher als in älteren Mäusen, d.h. *nrif* wird im Laufe der Entwicklung herabreguliert.

Wichtiger als die Unterschiede zwischen unterschiedlichen Geweben eines Tieres war die Frage, ob das Fehlen von *nrif1* in Nullmutanten einen Effekt auf das Expressionsniveau von *nrif2* haben könnte. Mittels semiquantitativer RT-PCR und durch Northern Blot-Analyse konnte gezeigt werden, daß dies tatsächlich der Fall war (Abb. 26 und Abb. 27).



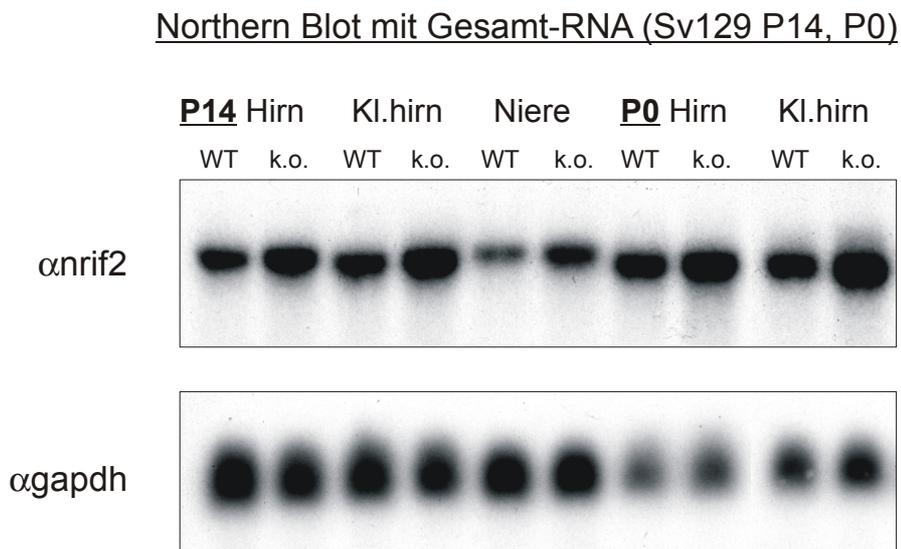
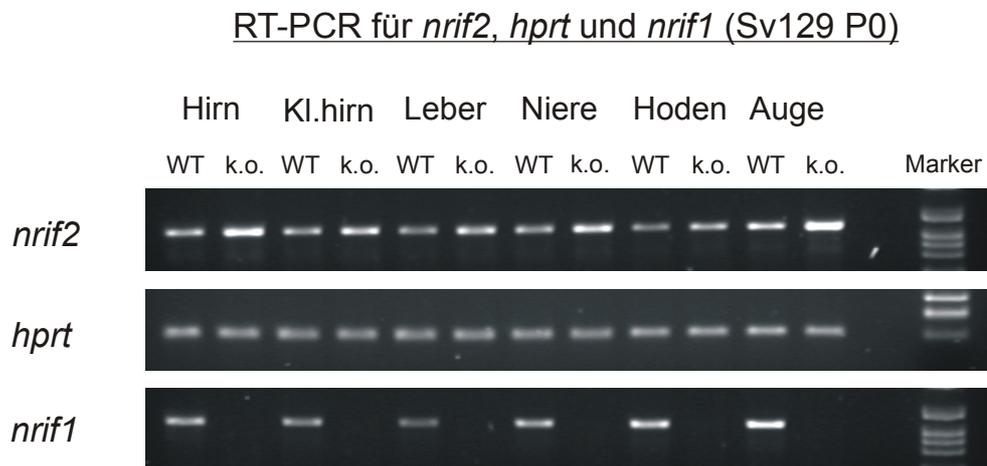
**Abb. 26: Regulation der *nrif2*-mRNA-Menge in Sv129 *nrif1*-Nullmutanten.**

Die *nrif2* mRNA-Konzentration unterschiedlicher Gewebe aus neugeborenen (P0) oder zwei Wochen alten (P14) Mäusen des Sv129-Stammes wurde mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt (Meßwerte auf *hprt* normiert, siehe Text).

In fast allen untersuchten Geweben war die Konzentration der *nrif2*-mRNA in *nrif1*-Nullmutanten gegenüber Wildtyp-Tieren 1,5- bis 1,9-fach erhöht. Der beobachtete Effekt war in P0-Mäusen etwas stärker als in P14-Mäusen.

Die Graphik zeigt keine absoluten, sondern nur relative Werte: Alle Meßergebnisse wurden auf 100% normiert, um das unterschiedliche Maß der Regulation (und nicht die Unterschiede zwischen verschiedenen Geweben) deutlich zu machen. (Kl.hirn: Kleinhirn).

In Neugeborenen *nrf1*-Nullmutanten wurden in Gesamthirn (ohne Kleinhirn), Kleinhirn, Leber, Niere und Auge bis zu doppelt so hohe *nrf2*-Mengen wie in Wildtyp-Mäusen nachgewiesen. In 14 Tage alten Mäusen trat eine Hochregulation der *nrf2*-mRNA in Hirn, Kleinhirn, Niere und Auge auf, die Mengen in Leber und Hoden waren nicht verändert.



**Abb. 27: Analyse der *nrf*-mRNA-Expression durch RT-PCR und Northern Blot.**

Die Konzentration der *nrf2*-mRNA war in verschiedenen Geweben aus *nrf1*-Nullmutanten höher als in Wildtyp-Tieren (Quantifizierung in Abb. 26). Alle Untersuchungen erfolgten in P0- oder P14-Mäusen des Sv129-Stammes.

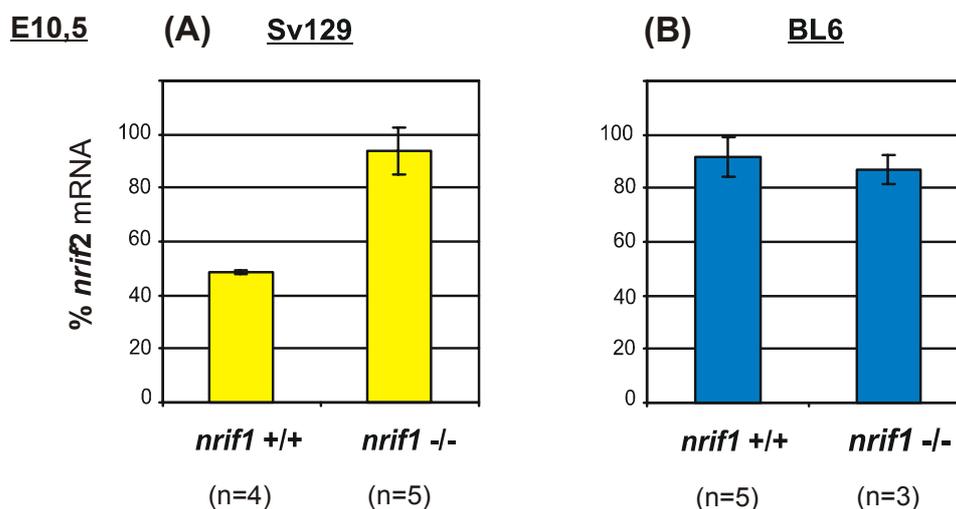
Für RT-PCR-Analysen wurde cDNA aus DNase I-behandelter Gesamt-RNA der entsprechenden Gewebe hergestellt und die jeweiligen Gene mit spezifischen Primern amplifiziert (3.2.10.4). In allen Proben waren gleiche cDNA-Mengen vorhanden (Normierung auf *hprt*).

Für Northern Blot-Experimente wurden 15  $\mu$ g/Spur Gesamt-RNA auf einem 1,4%igen Gel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit gegen *nrf2* oder *gapdh* gerichteten Sonden hybridisiert. (Kl.hirn: Kleinhirn; k.o.: „knockout“; WT: Wildtyp).

### 4.6.3 Kann NRIF2 das Fehlen von NRIF1 funktionell kompensieren?

Welche Bedeutung könnte die Hochregulation der *nrf2*-mRNA in *nrf1*-Nullmutanten haben? Es drängte sich die Hypothese auf, daß es sich hierbei um eine funktionelle Regulation handelt. Unter der Voraussetzung, daß die Unterschiede auch auf Proteinebene bestehen, könnte also im Sv129-Stamm das Fehlen von NRIF1 durch NRIF2 soweit ausgeglichen werden, daß keine größeren Defekte auftreten. Es ist zwar anzunehmen, daß NRIF1 und NRIF2 nicht *völlig* identische Eigenschaften und Funktionen besitzen, allerdings wurden in allen untersuchten Parametern (Sequenz, Interaktion mit p75, Expressionsprofil, Einfluß auf Apoptose und Zellzyklus) keine fundamentalen Unterschiede festgestellt.

Die Überprüfung der Hypothese erfolgte in Mäusen des BL6-Stammes. Reinrassige BL6-Mäuse können ein Fehlen von NRIF1 nicht kompensieren, sondern sterben ca. am zwölften Embryonaltag (4.6.1). Eine mögliche Theorie wäre demzufolge, daß sie in der Embryonalentwicklung entweder überhaupt kein *nrf2* exprimieren oder zumindest keine Regulation wie in Sv129 auftritt. Die Kreuzung von heterozygoten *nrf1*-Mäusen des Stammes BL6 bzw. Sv129 erzeugte alle drei Genotypen, also Wildtyp, Heterozygote und Nullmutanten. Am späten Vormittag des zehnten Tages nach der Paarung (E10,5) wurden Embryonen isoliert. Zu diesem Zeitpunkt waren *nrf1*-Nullmutanten im BL6-Hintergrund zwar kleiner als ihre Wildtyp-Geschwister, lebten jedoch und sahen morphologisch normal aus. RNA aus gesamten Embryonen wurde in cDNA umgeschrieben und die Menge an *nrf2*-mRNA mittels RT-PCR quantifiziert (Abb. 28).

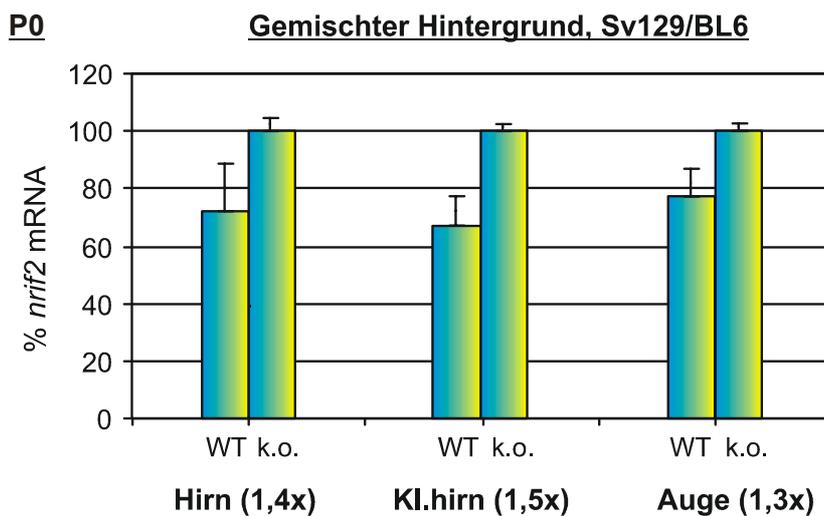


**Abb. 28: Differentielle Regulation der *nrf2*-mRNA-Menge in Embryonen (E10,5).**

Aus 10,5 Tage alten Embryonen des Sv129- oder BL6-Stammes wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Konzentrationsbestimmung der *nrf2*-mRNA erfolgte durch semiquantitative RT-PCR (Normierung auf *hprt*). Die Werte in (A) und (B) wurden jeweils auf 100% normiert, sind also nicht untereinander vergleichbar. Eine differentielle Regulation der *nrf2*-mRNA wurde nur im Sv129-Hintergrund beobachtet, nicht jedoch im BL6-Stamm, in dem die *nrf1*-Mutation letal ist. (n: Anzahl der untersuchten Embryonen eines Genotyps).

Während im Sv129-Hintergrund die *nrf2*-Menge in *nrf1*-Nullmutanten durchschnittlich doppelt so hoch war wie in Wildtyp-Embryonen desselben Wurfs, konnte im BL6-Hintergrund keine differentielle Regulation nachgewiesen werden (Abb. 28). Das Fehlen der Hochregulation von NRIF2 könnte also tatsächlich ein wichtiger Grund für die mangelnde Überlebensfähigkeit von *nrf1*-Nullmutanten des BL6-Stammes sein.

Die Kreuzung von BL6-*nrf1* (+/-)-Mäusen mit heterozygoten Sv129-Mäusen führte schon in der ersten Generation zu überlebenden *nrf1* (-/-) Tieren (ungefähr 11% statt der theoretisch zu erwartenden 25%). Falls die Hochregulation von *nrf2* tatsächlich mitverantwortlich für das Überleben der Tiere sein sollte, müsste sie auch im gemischten Sv129/BL6-Hintergrund auftreten. Dies war tatsächlich der Fall (Abb. 29): In Kleinhirn, Hirn und Auge aus Sv/BL6-Mäusen (P0) sind die *nrf2*-Mengen in *nrf1*-Nullmutanten 1,3- bis 1,5-fach erhöht (Abb. 29). Diese Werte liegen, wie zu erwarten, ungefähr zwischen denen eines reinerbigen Sv129-Hintergrundes und eines BL6-Hintergrundes (keine Regulation).



**Abb. 29: Kreuzung von BL6 *nrf1* (+/-)-Mäusen mit Sv129.**

In einem gemischten Sv129/BL6-Hintergrund wurde eine Hochregulation der *nrf2*-mRNA beobachtet, deren Ausmaß zwischen den Werten für die reinrassigen Stämme lag. cDNA wurde aus DNase I-behandelter Gesamt-RNA aus Hirn, Kleinhirn (KI.hirn) und Auge neugeborener Mäuse (P0, gemischter Sv129/BL6-Hintergrund) hergestellt. Die Konzentrationsbestimmung der *nrf2*-mRNA erfolgte durch semiquantitative RT-PCR (Normierung auf *hprt*). (k.o.: „knockout“; WT: Wildtyp).

## 4.7 Einfluß von NRIF auf den Zellzyklus

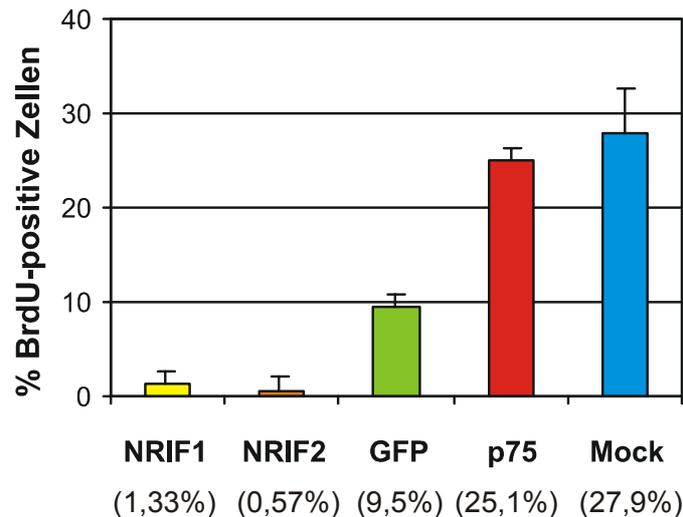
Ein Zusammenhang zwischen NRIF-Expression und Regulation des Zellzyklus wurde aus zweierlei Gründen vermutet. Einerseits waren weitere p75-Interaktoren identifiziert worden, deren Überexpression einen Zellzyklus-Stop verursachte: SC-1 (Chittka et al., 1999) und NRAGE (Salehi et al., 2000) (vgl. 2.3.3). Andererseits lagen interessante *in vivo*-Daten aus *nrf1*-Nullmutanten vor (vgl. 4.6). Wie bereits erwähnt, sind *nrf1*-defiziente Embryonen in einem reinerbigen BL6-Hintergrund nicht lebensfähig, sondern sterben ungefähr am zwölften Embryonaltag. Durch *in vivo*-BrdU-Markierungsexperimente mit elf Tage alten Embryonen war gezeigt worden, daß dies mit einem vollständigen Stop der Proliferation aller embryonalen Zellen korrelierte (E. Casademunt). In heterozygoten oder Wildtyp-Embryonen desselben Wurfes hingegen waren viele Strukturen BrdU-markiert. BrdU kann statt Thymidin in neu synthetisierte DNA eingebaut werden und markiert Zellen, die gerade die S-Phase des Zellzyklus (DNA-Synthese-Phase) durchlaufen, also proliferieren. Das Fehlen von NRIF1 schien demnach (zusammen mit der mangelnden Hochregulation von NRIF2) durch unbekannte Effekte das Wachstum der Zellen zu inhibieren. In Zellkultursystemen sollte nun quantitativ untersucht werden, welchen Einfluß eine Überexpression von NRIF1 oder NRIF2 auf den Zellzyklus hat.

### 4.7.1 Versuche mit 293-Zellen

293-Zellen auf Glas-Objektträgern wurden mit unterschiedlichen NRIF-Konstrukten oder Kontrollplasmiden transfiziert, 2 h in Gegenwart von BrdU kultiviert und sodann fixiert und mit spezifischen Antikörpern gefärbt (vgl. 3.4.4, 3.4.3).

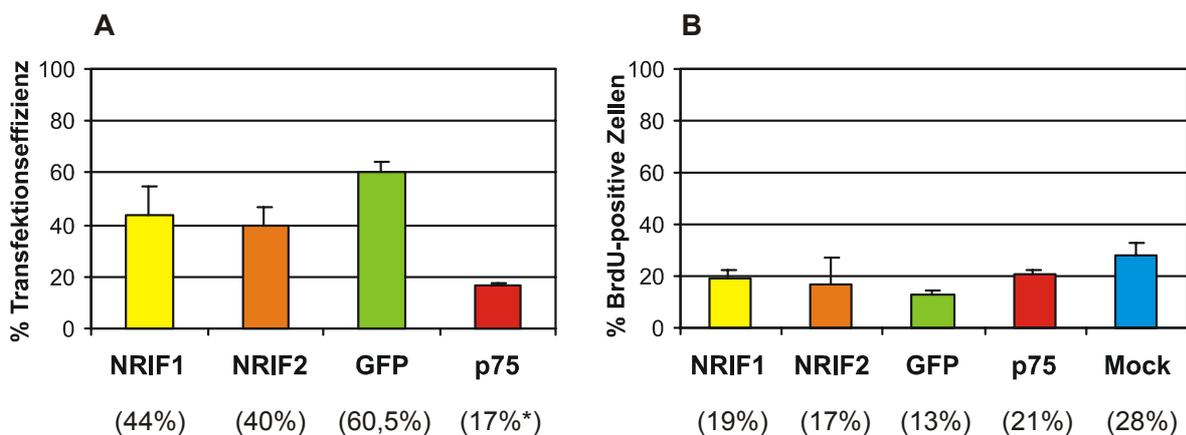
Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen ergab, daß nur durchschnittlich 0,5% bis 1,4% aller GFP-NRIF-positiven 293-Zellen BrdU in ihre DNA einbauen konnten, während im gleichen Zeitraum ungefähr 25% der mit pcDNA3 oder p75 transfizierten Zellen markiert wurden. Die Ergebnisse für NRIF1 und NRIF2 waren sehr ähnlich und unabhängig von einer gleichzeitigen p75-Expression (Abb. 30).

Bei der Quantifizierung des BrdU-Einbaus wurden nur transfizierte Zellen berücksichtigt, d.h. es wurde z.B. gezählt, wieviel Prozent aller GFP-NRIF-positiven Zellen gleichzeitig BrdU-positiv waren. Der auf Einzelzellebene völlig eindeutige Effekt war nicht erkennbar, wenn man die Anzahl BrdU-positiver Zellen in der Gesamtkultur zählte, die Prozentzahl *insgesamt* BrdU-positiver Zellen war für p75 und GFP-NRIF sehr ähnlich (21% bzw. 17-19%). Für GFP-überexprimierende Zellen lag der BrdU-Einbau in der Gesamtkultur jedoch aus unbekanntem Gründen niedriger (ca. 13%) (Abb. 31). Auf Einzelzellebene bauten in 2 h ungefähr 10% aller GFP-positiven Zellen BrdU ein, d.h. deutlich mehr als bei GFP-NRIF-Expression.



**Abb. 30: Quantifizierung der BrdU-Markierung von 293-Zellen.**

GFP-NRIF-exprimierende 293-Zellen wurden während eines zweistündigen BrdU-Pulses nur selten markiert (NRIF1, NRIF2). Mit Kontrollplasmiden (GFP, p75, pcDNA3) transfizierte Zellen waren hingegen viel häufiger BrdU-positiv, befanden sich also in der S-Phase des Zellzyklus. Bei der Quantifizierung wurden nur tatsächlich transfizierte Zellen berücksichtigt, d.h. es wurde z.B. gezählt, wieviel Prozent aller GFP-NRIF-positiven Zellen gleichzeitig BrdU-positiv waren. „Mock“: Transfektion mit leerem Vektor-Plasmid (pcDNA3).

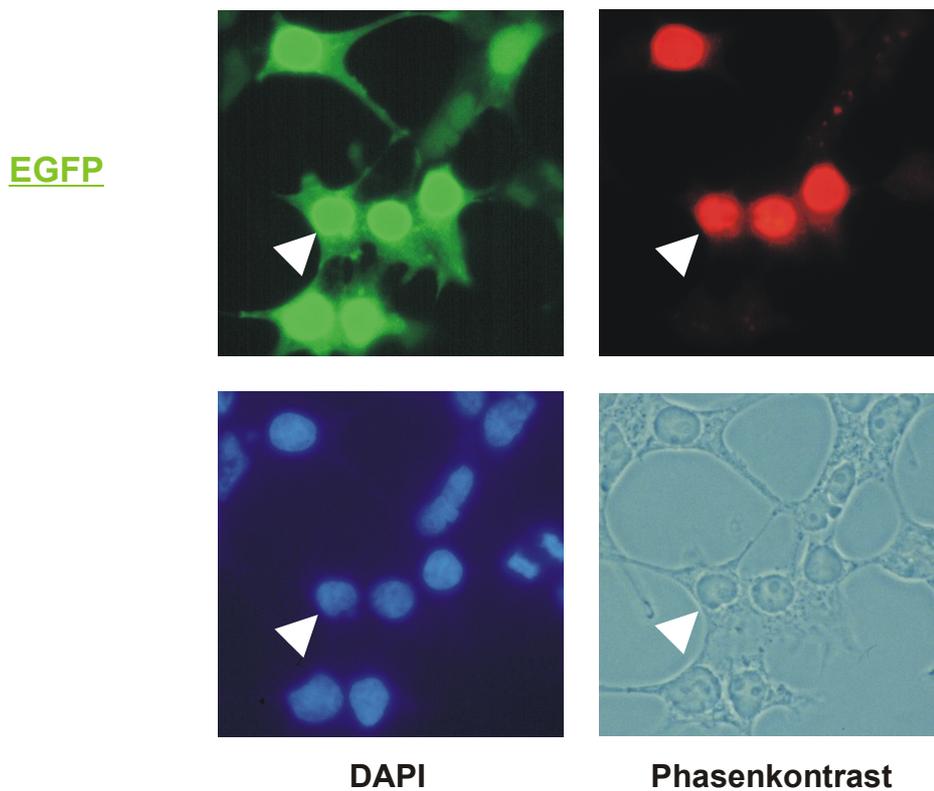
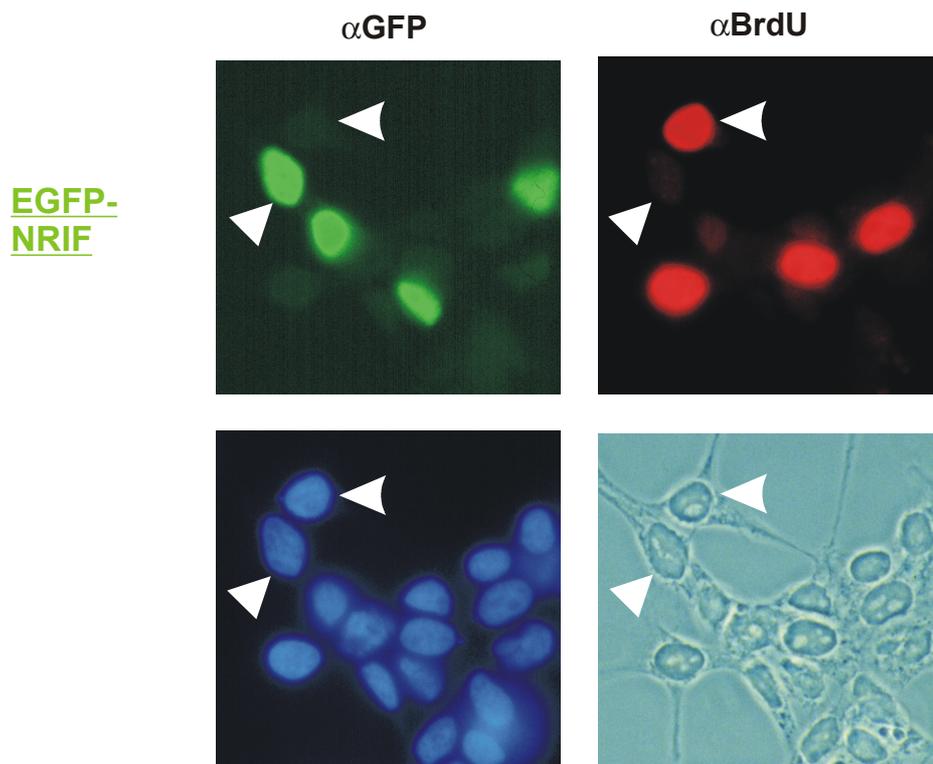


\*(Bei Immunfärbung mit einem polyklonalen Ak aus Kaninchen waren nur 17% der Zellen eindeutig positiv für p75. Färbungen mit dem sensitiveren monoklonalen Ak MC192 zeigten jedoch, daß eigentlich über 50% der Zellen p75 exprimierten.)

**Abb. 31: Transfektionseffizienz und Anzahl insgesamt BrdU-positiver 293-Zellen.**

Die Transfektionseffizienz (A) wurde bestimmt, indem die Anzahl gefärbter Zellen (anti-GFP oder anti-p75) durch die Gesamtzahl der Zellen (DAPI-Färbung der Zellkerne) dividiert wurde. Der Prozentsatz insgesamt BrdU-positiver Zellen in der Gesamtkultur (B) wurde analog durch Zählen aller BrdU-positiven Zellen analysiert, wobei im Gegensatz zur Graphik in Abb. 30 nicht berücksichtigt wurde, ob Zellen transfiziert waren oder nicht.

Um mit Sicherheit ausschließen zu können, daß der Zellzyklus-hemmende Effekt von GFP-NRIF nicht teilweise durch dessen GFP-Anteil ausgelöst wurde, wurden die Experimente mit einem flag-NRIF-Konstrukt wiederholt. Der hemmende Effekt von NRIF auf die Proliferation konnte mit diesem Konstrukt eindeutig bestätigt werden: Nur durchschnittlich 2,3% der flag-NRIF-exprimierenden Zellen waren auch positiv für BrdU.



**Abb. 32: Immunfluoreszenz transfizierter 293-Zellen.**

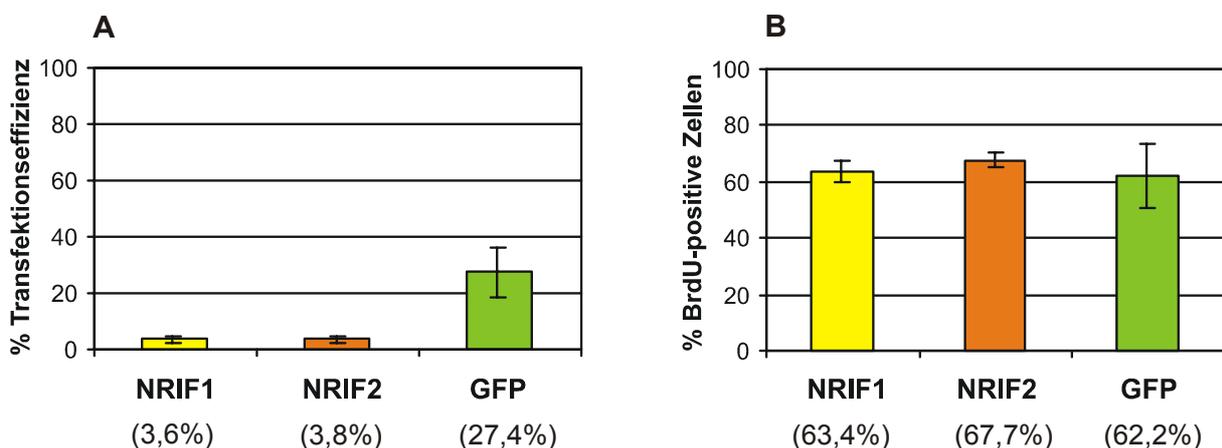
Transient transfizierte 293-Zellen wurden nach einem zweistündigen BrdU-Puls fixiert und mit Antikörpern gegen GFP und BrdU gefärbt. Die DNA der Zellkerne wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI sichtbar gemacht.

GFP-NRIF-exprimierende Zellen (oben) konnten im Gegensatz zu solchen, die mit GFP transfiziert waren (unten), kein BrdU einbauen.

Der verminderte BrdU-Einbau in NRIF-exprimierenden Zellen könnte entweder auf einen vollständigen Proliferations-Stop oder auf eine Verlangsamung des Zellzyklus zurückzuführen sein. Letzteres hätte zur Folge, daß während eines zweistündigen Pulses nur wenige Zellen BrdU in detektierbarer Menge inkorporieren können, die Anzahl aber mit der Zeit ansteigt. Nach 10,5 h Wachstum in Gegenwart von BrdU waren ca. 6% aller NRIF-exprimierenden Zellen BrdU-positiv, im Vergleich zu durchschnittlich 29% GFP-exprimierenden Zellen. 45% der gesamten Zellkultur bauten in diesem Zeitraum BrdU ein (17-19% in 2 h). NRIF-Expression führte demnach zu einer massiven Verlangsamung des Zellzyklus, stoppt ihn aber wahrscheinlich nicht vollständig, da ansonsten die Länge des BrdU-Pulses keine Rolle spielen dürfte.

#### 4.7.2 Versuche mit HN10-Zellen

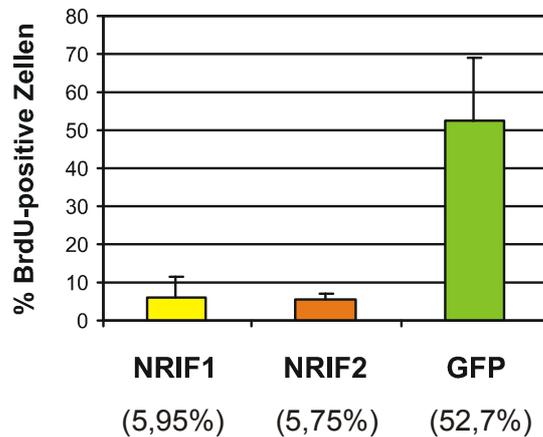
Um sicherzugehen, daß der Effekt von NRIF auf den Zellzyklus nicht spezifisch für 293-Zellen war, wurden analoge BrdU-Markierungsexperimente auch in der neuronalen Zelllinie HN10 durchgeführt (vgl. 4.5). Diese teilten sich schneller als 293-Zellen, so daß während eines zweistündigen Pulses über 60% der gesamten Zellen BrdU einbauten, also in der S-Phase des Zellzyklus waren. Wie bereits erwähnt, war die Transfektionseffizienz für GFP-NRIF sehr viel schlechter als für GFP (Abb. 33).



**Abb. 33: Transfektionseffizienz und Anzahl insgesamt BrdU-positiver HN10-Zellen**

HN10-Zellen wurden mit GFP-NRIF1, GFP-NRIF2 oder GFP transfiziert. Die Transfektionseffizienz (A) gibt die Anzahl gefärbter Zellen (anti-GFP) dividiert durch die Gesamtzahl der Zellen (DAPI-Färbung der Zellkerne) an. Bei der Bestimmung des Prozentsatzes insgesamt BrdU-positiver Zellen in der Gesamtkultur (B) wurden analog alle BrdU-positiven Zellen analysiert (unabhängig davon, ob sie transfiziert waren).

Die Überexpression von GFP-NRIF führte auch in HN10-Zellen zu einer starken Verlangsamung des Zellzyklus: Knapp 6% der NRIF-exprimierenden Zellen waren nach 2 h BrdU-positiv, im Vergleich zu ca. 53% der GFP-transfizierten Zellen (Abb. 34). NRIF beeinträchtigt demnach die Zellzyklusprogression in Fibroblastenzellen und Zellen neuronalen Ursprungs in ähnlicher Weise.



**Abb. 34: NRIF-exprimierende HN10-Zellen sind selten BrdU-positiv.**

Während mehr als 50% der GFP-exprimierenden HN10-Zellen während eines zweistündigen BrdU-Pulses markiert wurden, bauten GFP-NRIF-exprimierende Zellen (NRIF1, NRIF2) in diesem Zeitraum sehr viel seltener BrdU ein.

Es wurden nur tatsächlich transfizierte Zellen gezählt, d.h. es wurde der Anteil der mit einem gegen GFP gerichteten Antikörper gefärbten Zellen gezählt, die gleichzeitig BrdU-positiv waren.

## 5 Diskussion

### 5.1 Klonierung von *nrf2*

#### 5.1.1 Häufigkeit von *nrf1* und *nrf2*

Die *nrf2*-cDNA wurde aus einer cDNA-Bank aus Maushirn (Neugeborene) kloniert. Obwohl die verwendeten Sonden eine etwas höhere Spezifität für *nrf2* als für *nrf1* aufweisen sollten, waren nur zwei von insgesamt vierzehn isolierten Klonen *nrf2*-Sequenzen. Das Auffinden beider cDNA-Spezies war wegen der starken Homologie der beiden *nrf*-Gene nicht verwunderlich: Im Bereich der Sonden betrug die Sequenzidentität ungefähr 90%. Es waren jedoch keine Bereiche mit geringerer Ähnlichkeit bekannt, die eine Wahl selektiverer Sonden erlaubt hätten. Die deutliche Überrepräsentation von *nrf1* (sechs zu eins) schien darauf hinzudeuten, daß *nrf2*-mRNA im Hirn neugeborener Mäuse seltener vorkommt als *nrf1*-mRNA. Ein ähnliches Ergebnis erbrachten Datenbankanalysen mit EST-Datenbanken („expressed sequence tags“, partielle cDNA exprimierter Gene) mit dem BLAST-Algorithmus: Es wurden deutlich mehr Fragmente gefunden, die mit der *nrf1*-Sequenz übereinstimmten, als solche, die *nrf2* repräsentierten. Außerdem waren in RT-PCR-Reaktionen mehr Zyklen nötig, um vergleichbare Mengen von *nrf2* zu amplifizieren (35 Zyklen für *nrf2*, 31 Zyklen für *nrf1*). Im Gegensatz zu diesen Befunden standen jedoch die Ergebnisse aus Northern Blot-Hybridisierungen: Die Signale für *nrf2* waren mindestens genauso stark wie für *nrf1*. Das Ergebnis war unabhängig davon, ob eine aus der *nrf1*- oder *nrf2*-Sequenz abgeleitete Sonde verwendet wurde, denn beide Sonden waren wegen der starken Homologien nicht spezifisch. Im Northern Blot-Experiment zeigte sich auch, daß die *nrf2*-Boten-RNA mit einer Größe von ungefähr 9 kb sehr viel größer war als die *nrf1*-mRNA (ca. 3,7 kb). Da die codierende Region nur knapp 2,5 kb umfaßt und beide Sequenzen ein in optimaler Sequenzumgebung liegendes Start-codon sowie ein Stopcodon in identischer Position aufweisen, kann der Größenunterschied nur durch längere untranslatierte Regionen in der *nrf2*-mRNA erklärt werden. Wenn man also postuliert, daß *nrf2* eine deutlich längere 3'-untranslatierte Region enthält als *nrf1*, sollte gerade bei der Herstellung von cDNA mit einem Oligo-dT-Primer (der an den Poly(A)-Schwanz, also das äußerste 3'-Ende der mRNA bindet) die Reaktion sehr viel ineffektiver ablaufen. Die verwendete cDNA-Bibliothek (Stratagene) war zwar mit „Oligo-dT“- und „Random-Primer“ hergestellt worden, dennoch ist es wahrscheinlich, daß *nrf1* häufiger amplifiziert wurde und deshalb im Vergleich zu *nrf2* überrepräsentiert war, obwohl die beiden mRNA-Spezies *in vivo* vermutlich in vergleichbaren Mengen vorliegen.

Die Bedeutung der sehr viel längeren untranslatierten Regionen von *nrf2* wurde nicht weiter analysiert. Der 3'-UTR kann sowohl die Translationseffizienz als auch die Stabilität eukaryotischer mRNA beeinflussen (Jackson und Standart, 1990). Letztere wird durch die

Anwesenheit oder das Fehlen spezifischer destabilisierender Elemente kontrolliert. Manche instabile mRNA-Spezies enthalten z.B. eine AU-reiche Sequenz von ca. 50 Basen (ARE genannt) in der 3'-untranslatierten Region (Lewin, 1998: Molekularbiologie der Gene). Aber auch Sequenzen in der 5'-untranslatierten Region tragen zur mRNA-Stabilität entscheidend bei (Roy et al., 1992).

### 5.1.2 Differentielles Spleißen der 5'-untranslatierten Region

Bei der Klonierung des 5'-Endes von *nrf2* wurden drei unterschiedliche Varianten identifiziert, deren Sequenz ab Position -47 vor dem Startcodon divergierte. RT-PCR-Experimente mit cDNA aus Maushirn unter Verwendung Subtyp-spezifischer Primerkombinationen zeigten, daß es sich bei diesen Sequenzen nicht um Klonierungsartefakte handelte, sondern diese und sogar weitere Varianten tatsächlich existieren. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um differentielles Spleißen der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR). Dafür spricht auch das Vorhandensein von Spleißkonsensus-Sequenzen an den jeweiligen 5'- bzw. 3'-Positionen der vermuteten Introns (GT an der 5'-Spleißstelle, AG an der 3'-Spleißstelle). Es ist durchaus möglich, daß sich die Genregion, die die 5'-UTR-Exons und -Introns enthält, wie für andere Gene beschrieben über einen sehr großen Bereich erstreckt. Der Transkriptionsfaktor „Nuclear respiratory factor 1“ (NRF-1) besitzt z.B. sechs Exons im 5'-UTR, die differentiell gespleißt und unterschiedlich effizient transkribiert werden, und ist inklusive Introns 47 kb lang (Huo und Scarpulla, 1999).

Es stellt sich die Frage, ob den unterschiedlichen Formen eine Funktion zukommt, oder ob es sich um partiell prozessierte Vorläufer-RNA handelt. Gegen letztere Möglichkeit spricht jedoch, daß die für die Amplifizierung der RACE-Fragmente verwendete cDNA aus Poly(A)-RNA gewonnen worden war. Nach der klassischen Theorie der mRNA-Prozessierung läuft die Modifikation der primären RNA-Transkripte sequentiell ab, d.h. die primären Transkripte werden zuerst am 5'-Ende mit 7-Methylguanin versehen („capping“), dann finden Spleißvorgänge statt, und zuletzt wird ein Poly(A)-Schwanz an das 3'-Ende der mRNA angehängt (Polyadenylierung). Somit könnte nur vollständig gespleißte mRNA einen Poly(A)-Schwanz besitzen und unter den hier verwendeten Bedingungen identifiziert werden. Andererseits sind laut neueren Befunden Transkription und RNA-Prozessierung zeitlich eng gekoppelte, parallel ablaufende Prozesse, die nicht getrennt voneinander betrachtet werden können (zusammengefaßt in Proudfoot, 2000). Insofern kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß es sich bei den *nrf2*-Klonen um partiell gespleißte Formen handelt. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da zwar Transkription und Spleißen mit Sicherheit parallel ablaufen, die Polyadenylierung jedoch meist erst später erfolgt.

Obwohl in RT-PCR-Reaktionen eindeutig unterschiedliche 5'-UTR-Varianten von *nrif2* nachgewiesen wurden, war in Northern Blot-Analysen kein komplexes Bandenmuster erkennbar. Dies lag wahrscheinlich daran, daß sich die mRNA-Varianten nur um wenige hundert Basenpaare unterschieden, was bei einer Gesamtgröße der mRNA von ca. 9 kb vermutlich unterhalb der Auflösungsgrenze lag. Für *nrif1*, dessen mRNA mit ca. 3,7 kb deutlich kleiner war, konnten reproduzierbar zwei eng beieinander liegende Banden detektiert werden, auch hier gibt es demnach unterschiedliche mRNA-Formen (vgl. Abschnitt 5.1.3).

Das differentielle Spleißen von mRNA bietet die Möglichkeit, verschiedene Proteinvarianten zu erzeugen, es gibt aber auch viele Beispiele für unterschiedliche Spleißformen im 5'-untranslatierten Bereich. Das über 40 kb große Gen für BDNF besteht beispielsweise aus insgesamt fünf Exons; das am weitesten stromabwärts (3') liegende Exon enthält die gesamte für BDNF codierende Region (Timmusk et al., 1993). Die vier möglichen 5'-Exons liegen in verschiedenen Geweben unterschiedlich häufig vor, es handelt sich vermutlich um gewebsspezifische Promotoren. Die Existenz vieler *BDNF*-Promotoren und -Transkripte erlaubt wahrscheinlich eine Feinregulation der *BDNF*-Expression auf verschiedenen Ebenen wie Transkription, Translationseffizienz und Stabilität der mRNA. Einer der Promotoren enthält beispielsweise ein „cAMP response element“ (CRE), an das der Transkriptionsfaktor CREB binden und die *BDNF*-Expression in Abhängigkeit von Calcium und somit neuronaler Aktivität regulieren kann (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998).

Interessanterweise ist der 5'-UTR bei vielen in der Embryonalentwicklung regulierten Genen ungewöhnlich lang und wichtig für deren post-transkriptionelle Regulation (Reynolds et al., 1996; Wood et al., 1996). Beispielsweise besitzt der 5'-UTR der NMDA-Rezeptor-Untereinheit  $\epsilon_2$  drei Exons, die unterschiedlich gespleißt werden, und die Promotorregion enthält Bindungsstellen für CREB und andere Transkriptionsfaktoren (Klein et al., 1998). Differentielle Spleißvorgänge in der 5'-untranslatierten Region wurden für viele weitere Gene beschrieben, z.B. „Insulin-like growth factor II“ (Shen et al., 1988), einen muskarinischen Acetylcholinrezeptor (Peralta et al., 1987) und den Wachstumshormon-Rezeptor (Domene et al., 1995), um nur einige zu nennen. Meistens wurde eine gewebes- und entwicklungspezifische Expression beschrieben.

Die 5'-UTR-Spleißformen von NRIF könnten eine ähnliche Bedeutung besitzen. Wahrscheinlich werden sie gewebsspezifisch bzw. sogar zelltypspezifisch exprimiert, dies wurde jedoch nicht untersucht. Außerdem ist anzunehmen, daß sich die Effizienz der Translations-Initiation bei den verschiedenen Varianten unterscheidet und die mRNA-Stabilität beeinflusst werden könnte (Roy et al., 1992).

### 5.1.3 Vergleich von Maus-NRIF mit seinem humanen Homolog

Wie bereits erwähnt (Abschnitt 4.1), wurde im Hefe-„Two Hybrid“-System mit der intrazellulären p75-Domäne als „Köder“ zuerst ein partieller humaner Klon von NRIF, pJG-NRIF (1,3 kb, carboxyterminaler Bereich) gefunden. Mit dieser Information konnte das Maus-Homolog aus einer cDNA-Bank isoliert werden. Die DNA-Sequenzidentität betrug zwar im Bereich der Zinkfinger 83%, war aber in der davor liegenden Region mit 27% relativ niedrig. Die Vermutung, daß es sich tatsächlich um Orthologe handelt, wurde vor allem durch folgenden Befund unterstützt: Die Gene liegen in zwischen Maus und Mensch konservierten Zinkfinger-„Clustern“ auf Maus-Chromosom 7 (Locus *Zfp110*) bzw. humanem Chromosom 19 (Casademunt et al., 1999). Gene für Zinkfingerproteine liegen häufig in einer „Cluster“-Organisation vor, wie die Analyse von humanen und Maus-Chromosomen zeigte (Huebner et al., 1991; Hoovers et al., 1992). Auf Chromosom 19 des Menschen wurden besonders viele Zinkfinger-Gene in insgesamt sechs „Clustern“ gefunden, die Homologe auf Maus-Chromosom 7 besitzen (Shannon et al., 1996; Stubbs et al., 1996; Shannon und Stubbs, 1998). Das Vorhandensein eines homologen Gens im Menschen deutet auf eine evolutionär konservierte, wichtige Funktion hin.

Während in der vorliegenden Arbeit nur mit Maus-NRIF1 und 2 gearbeitet wurde, ist kürzlich ein neues Zinkfingerprotein (ZNF274) beschrieben worden, das zu 100% mit der Sequenz des partiellen humanen Klons pJG-NRIF übereinstimmt (Yano et al., 2000). Dies erlaubte einen Vergleich der homologen Gene aus Maus und Mensch und offenbarte interessante Gemeinsamkeiten und Unterschiede.

Im Gegensatz zu Maus-NRIF mit einer Länge von 824 Aminosäuren besitzt das humane Protein nur 621 Aminosäuren. Der Aufbau aus verschiedenen funktionellen Domänen ist bei beiden Proteinen identisch: auf die erste KRAB-Region folgen eine SCAN-Domäne, eine zweite KRAB-Region sowie ein carboxyterminaler Bereich mit fünf Zinkfingermotiven des Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Typs (vgl. Abb. 5). Die Identität dieser konservierten Bereiche liegt auf DNA-Ebene bei 81% bis 84%. Während jedoch bei Maus-NRIF zwischen der zweiten KRAB-Box und dem Zinkfingerbereich ungefähr 365 Aminosäuren liegen, ist diese Region in humanem NRIF ca. 200 Reste kürzer. Die Deletion liegt also in dem Bereich, der für die Bindung von Maus-NRIF an p75 wichtig ist. Andererseits konnte auch humanes NRIF im Hefe-„Two-Hybrid“-System an p75 binden, insofern besteht die p75-bindende Region wie andere Bindungsdomänen wahrscheinlich aus einer Sequenz von relativ wenigen Aminosäuren.

Humanes *nrif* existiert in zwei Spleißformen: ZNF274b (584 Aminosäuren) unterscheidet sich von ZNF274a durch das Fehlen der ersten KRAB-A-Domäne und entsteht durch Verwendung eines alternativen Start-Methionins (Yano et al., 2000). Dieser Spleißvorgang könnte auch bei Maus-NRIF vorkommen, da beide *nrif*-Gene an genau derselben Position (Pos. 106, Abb. 8) ein Methionin besitzen. Das würde auch das Auftreten der *nrif1*-Doppelbande in

Northern Blot-Analysen erklären. Differentielles Spleißen von KRAB-Domänen wurde für viele Zinkfingerproteine beschrieben (z. B. Rosati et al., 1991; Lovering und Trowsdale, 1991; Bellefroid et al., 1993; Mazarakis et al., 1996; Odeberg et al., 1998) und könnte zu Proteinen mit unterschiedlichen Eigenschaften führen, da die KRAB-Domänen Repressionsmodule sind (Witzgall et al., 1994; Pengue et al., 1994; Margolin et al., 1994). NRIF besitzt allerdings zwei KRAB-Domänen, so daß vermutlich auch ein Protein ohne die erste KRAB-Domäne noch einen hemmenden Einfluß auf die Transkription ausüben kann.

Die Region, in der sich das alternative Start-Methionin befindet, liegt zwischen der ersten KRAB-Domäne und der SCAN-Box (vgl. Abb. 8) und ist einer der zwischen Maus und Mensch am stärksten konservierten Bereiche (90% auf DNA-Ebene, 81,5% auf Proteinebene). Da die Identität in anderen Bereichen des Proteins teilweise deutlich geringer ist und die höchsten Homologien in bekannten funktionellen Domänen wie KRAB-Domäne, Zinkfinger und SCAN-Box auftreten, erfüllt dieser Bereich höchstwahrscheinlich eine wichtige Funktion für das Protein. In der DNA-Datenbank „GenBank“ wurde mit unterschiedlichen Programmen (Advanced BLAST Search, Conserved Domain Database) nach der ca. 37 Aminosäuren langen Sequenz gesucht. Es handelt sich zwar um keine bereits bekannte Domäne, in vielen weiteren Proteinen wurden jedoch Ähnlichkeiten zwischen 50% und 100% (Identität 30% bis 70%) mit Teilsequenzen dieses Bereiches gefunden. Einige dieser Proteine sind an DNA- oder RNA-Modifikationen bzw. Wechselwirkungen beteiligt, z.B. DNA-Polymerase I (P56105), RecA-Protein (P32725), RNA-Polymerase (P20470), ribosomales Protein L7 (P32101), und Replication Gene A Protein (Q06419), was auch zur wahrscheinlichen Funktion von NRIF als Transkriptionsrepressor paßt. Aber auch Proteine mit völlig anderen Funktionen besitzen eine partiell sehr ähnliche Domäne, z.B. humanes Cyclin A2 (P20248), Serinhydroxymethyltransferase (P50434) und das Homöobox-Protein HOX-D4 (O57374) (in Klammern: „Accession“-Nr. des Gens in der DNA-Datenbank „GenBank“).

## 5.2 Funktionsweise des Transkriptionsfaktors NRIF

### 5.2.1 Subzelluläre Lokalisierung von NRIF

NRIF-Proteine befanden sich nach transienter Transfektion von 293- oder HN10-Zellen hauptsächlich im Zellkern und waren entweder einheitlich über das gesamte Nukleoplasma verteilt oder hauptsächlich in den Nukleoli nachweisbar (Kapitel 4.4). Da auch NRIF ohne Zinkfinger im Zellkern nachgewiesen wurde, ist das vorhergesagte carboxyterminale Kernlokalisierungssignal (NLS: „nuclear localization signal“) vermutlich nicht alleine für den Transport in den Zellkern verantwortlich. Kernlokalisierungssignale sind sehr viel komplexer als beispielsweise Erkennungsmerkmale, die Proteine zum endoplasmatischen Retikulum

dirigieren (carboxyterminales „KDEL“). Sie setzen sich häufig aus Sequenzen zusammen, die über das ganze Protein verteilt sind und bestehen oft aus mehreren basischen Aminosäuren (Lys-Arg/Lys-x-Arg/Lys), die von sauren Resten und Prolin flankiert werden (zusammengefaßt in Powers und Forbes, 1994). Phosphorylierung von Proteinen in der Nähe des NLS kann dessen Funktion beeinflussen und den Import der Proteine in den Zellkern regulieren (Silver, 1991).

Die subzelluläre Lokalisierung von überexprimiertem GFP-ZNF274 (humanes NRIF) in COS-7-Zellen ähnelt der für Maus-NRIF beschriebenen Verteilung. Das Protein wurde im Zellkern und im Nukleolus detektiert, wobei ein Deletionskonstrukt ohne die Zinkfinger-Region zwar noch im Zellkern, nicht jedoch im Nukleolus gefunden wurde. Maus-NRIF ohne Zinkfinger wurde hingegen besonders häufig in Nukleoli nachgewiesen (Abb. 20). Da auch die Zinkfinger-Domäne alleine für Kern- und Nukleolus-Lokalisierung genügt (Yano et al., 2000), gibt es vermutlich mehrere Signale innerhalb des Proteins, die einen Einfluß auf die Sortierung innerhalb der Zelle ausüben.

Welche Bedeutung könnten KRAB-Zinkfinger-Proteine im Nukleolus ausüben? Im Nukleolus findet die Transkription ribosomaler RNA (rRNA) durch die RNA-Polymerase I statt. Da KRAB-Domänen sowohl RNA-Polymerase II (mRNA) als auch RNA-Polymerase III (tRNA) hemmen können, nicht oder kaum jedoch RNA-Polymerase I (rRNA) (Moosmann et al., 1997), ist es unwahrscheinlich, daß NRIF einen Effekt auf die Transkription ribosomaler RNA ausübt. Neuere *in vivo*-Daten sprechen jedoch dafür, daß KRAB-Domänen eventuell doch die rRNA-Transkription inhibieren können (Huang et al., 1999).

Bisher sind nur wenige Zinkfingerproteine bekannt, die im Nukleolus lokalisiert sind:

„JAZ“ beispielsweise besitzt vier Zinkfinger und ist das erste in Säugern beschriebene Zinkfingerprotein, das bevorzugt an doppelsträngige RNA bindet, jedoch kaum an dsDNA. Die Überexpression von JAZ in NIH3T3-Zellen führte zu Apoptose (Yang et al., 1999).

Das p53-induzierte Zinkfingerprotein „PAG608“ wurde ebenfalls hauptsächlich im Nukleolus gefunden und kann bei transienter Überexpression in humanen Tumor-Zelllinien sowie wahrscheinlich auch im Tiermodell apoptotisch wirken (Israeli et al., 1997; Gillardon et al., 1999). In beiden Fällen wird vermutet, daß eine Störung der Ribosomen-Biosynthese für den apoptotischen Effekt verantwortlich sein könnte.

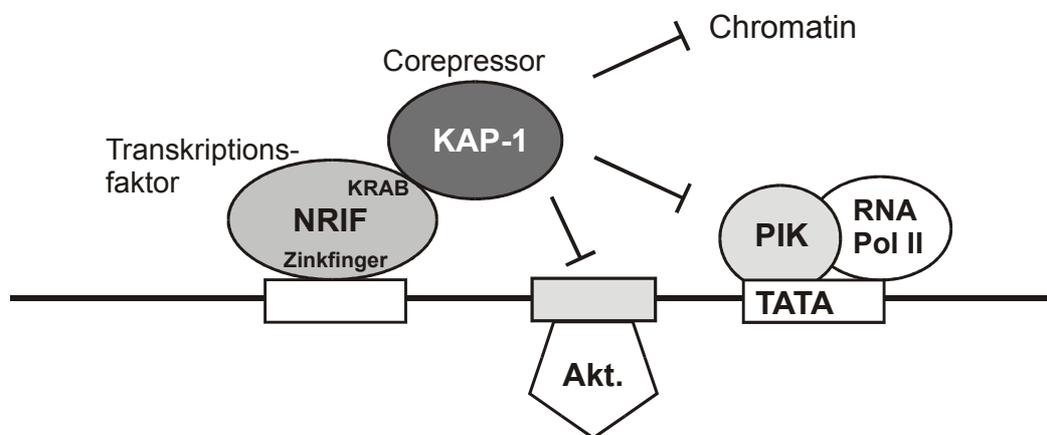
„ZPR1“ besitzt zwei Zinkfinger, kann über diese an die cytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors binden und wandert nach Bindung des Liganden EGF („epidermal growth factor“) in den Zellkern, wo es im Nukleolus lokalisiert ist (Galcheva-Gargova, 1996 und 1998). ZPR1 ist – zumindest in Hefe – ein essentielles Gen und für die normale Funktion des Nukleolus (rRNA-Synthese) notwendig. Die genaueren Mechanismen sind jedoch nicht bekannt.

Die einzigen bisher beschriebenen Zinkfingerproteine mit KRAB-Domäne, die im Nukleolus nachgewiesen wurden, sind „ZFP-37“ (unvollständige KRAB-Domäne; Payen et al., 1998), „MOK-2“ (Arranz et al., 1997) und „Kid-1“. Überexpression von Kid-1 in COS-7-Zellen führt zur Auflösung des Nukleolus und einem KRAB-A-abhängigen Stop der rRNA-Synthese (Huang et al., 1999). Die subzelluläre bzw. subnukleäre Verteilung von NRIF könnte auch abhängig von der Phase des Zellzyklus sein, wie z.B. für das p53-bindende Protein 53BP1 beobachtet (Iwabuchi et al., 1998).

### 5.2.2 Interaktion von NRIF mit sich selbst und anderen Kernproteinen

NRIF-Proteine enthalten eine SCAN-Domäne (vgl. 4.2.3), die in allen entscheidenden Positionen mit der bekannten Konsensus-Sequenz übereinstimmt (Williams et al., 1999). Proteine der SCAN-Familie spielen verschiedenste Funktionen in der Regulation von Zelldifferenzierung und Entwicklung, einige sind wie auch *nrif1* besonders stark in Hoden exprimiert. Kürzlich wurde gezeigt, daß dieses Modul eine sehr selektive Wechselwirkung mit anderen Proteinen, die SCAN-Domänen enthalten, vermittelt (Schumacher et al., 2000). Für den Nachweis der Wechselwirkung von NRIF1 mit sich selbst oder mit NRIF2 wurden Deletionskonstrukte ohne den aminoterminalen Bereich verwendet (4.3.5). Demnach ist die SCAN-Domäne für die Bildung von NRIF-Homo- und Heterodimeren nicht essentiell, sie könnte aber die Interaktion mit anderen Proteinen vermitteln. Dies wurde in der Tat experimentell nachgewiesen (Schumacher et al., 2000 und persönliche Mitteilung). *Nrif1* wurde bei der Untersuchung einer Maus-Leber-cDNA-Bank als Klon Zfp110 (GenBank: AJ242914) gefunden. Zfp110 kann andere Proteine mit SCAN-Domänen selektiv binden, z.B. ZNF191 und SDP1. ZNF191 ist ein Zinkfingerprotein unbekannter Funktion mit aminoterminaler SCAN-Domäne, während SDP1 (SCAN domain protein 1) zu einer neuen Familie von Proteinen mit isolierter SCAN-Domäne ohne DNA-bindende Proteinbereiche gehört. Es könnte die Bildung funktioneller Transkriptionskomplexe durch kompetitive Bindung stören. In ähnlicher Weise fungiert z.B. die „Id“-Familie von Helix-Loop-Helix-Proteinen als negativer Regulator von Helix-Loop-Helix-Proteinen wie MyoD (Benezra et al., 1990; Sun et al., 1991). NRIF bzw. Zfp110 kann noch mit weiteren Proteinen interagieren, z.B. einem für KRAB-Domänen-Proteine beschreibenden Corepressor namens „KAP-1“; diese Assoziation wird durch SDP1 geschwächt (Schumacher, persönliche Mitteilung). KAP-1 (Friedman et al., 1996; auch KRIP-1 oder TIF1 $\beta$  genannt: Kim et al., 1996; Moosmann et al., 1996) ist ein universeller Corepressor für Zinkfingerproteine mit KRAB-Domänen (Agata et al., 1999). Es enthält einen RING-Finger (Cystein-reiche, Zink-bindende Domäne) sowie weitere konservierte Proteindomänen (Borden, 2000) und ist ubiquitär exprimiert. RING-Finger-Proteine sind häufig an der Kontrolle von Wachstum und Zelldifferenzierung beteiligt. Die Interaktion

von NRIF und KAP-1 bestätigt die naheliegende Vermutung, daß NRIF tatsächlich als Transkriptionsrepressor wirken kann: NRIF könnte also, wahrscheinlich als Homo- oder Heterodimer, über seine Zinkfinger an eine cis-regulatorische Sequenz auf der DNA binden. In „EMSAs“ („electrophoretic shift mobility assay“) wurde die Assoziation der NRIF-Zinkfinger mit DNA experimentell demonstriert (Gentry et al., 2000b). Der universelle KRAB-Corepressor KAP-1 assoziierte in diesem Modell an die KRAB-Domäne von NRIF, diese Bindung würde durch Interaktion mit dem SCAN-Domänen-Protein SDP-1 negativ beeinflusst. Für den genauen Mechanismus der Repression gibt es mehrere Modelle, die hier nur kurz erwähnt werden sollen. Die Wechselwirkung von KAP-1 mit Heterochromatin-assoziierten „HP1“- bzw. „MOD“-Proteinen könnte zur Bildung von Heterochromatinbereichen führen, in denen die DNA stärker kondensiert vorliegt als im Euchromatin und somit die transkriptionelle Aktivität gesenkt wird (Le Douarin et al., 1996; Ryan et al., 1999). Wahrscheinlicher ist jedoch ein aktiver Repressions-Mechanismus (Agata et al., 1999; Pengue und Lania, 1996; Hanna-Rose und Hansen, 1996). KAP-1 interagiert mit spezifischen Proteinen des basalen Transkriptionsapparates und interferiert so mit dessen Zusammenbau oder Funktion. Alternativ ist auch eine Wechselwirkung von KAP-1 mit Transkriptionsaktivatoren denkbar, die dadurch gehemmt würden.



**Abb. 35: Modell für die Wirkungsweise von NRIF als Transkriptionsrepressor.**

Nach der Modellvorstellung kann NRIF mit seinen Zinkfingern an spezifische DNA-Regionen stromaufwärts von Genen binden und deren Transkription durch unterschiedliche Mechanismen negativ beeinflussen. Der Corepressor KAP-1 bindet an die KRAB-Domäne und könnte seine hemmende Wirkung über Veränderung der Chromatinstruktur oder durch Interaktion mit Elementen des basalen Transkriptionsapparates (PIK, Prä-Initiationskomplex auf dem Promotor; besteht aus TBP [TATA-Box-bindendes Protein] und den allgemeinen Transkriptionsfaktoren) bzw. Transkriptionsaktivatoren (Akt.) ausüben.

## 5.3 p75-Signaltransduktion durch NRIF: Mechanismus und Konsequenzen

### 5.3.1 Interaktion von NRIF und p75 und Vergleich zu analogen Systemen

Die Wechselwirkung des Neurotrophinrezeptors p75 mit dem Transkriptionsfaktor NRIF konnte in biochemischen Versuchen („Pull-Down“-Experimente) demonstriert werden. Außerdem bewies die Colokalisierung der Proteine an der Plasmamembran eine *in vivo*-Interaktion in eukaryotischen Zellen. Die Verwendung von Deletionskonstrukten zeigte, daß die Juxtamembran-Region von p75 ausreichend war, um eine Wechselwirkung zu vermitteln. Im Hefe-„Two-Hybrid“-System konnte auch eine Interaktion mit der „Death“-Domäne des Rezeptors gezeigt werden, möglicherweise sind also beide Regionen beteiligt.

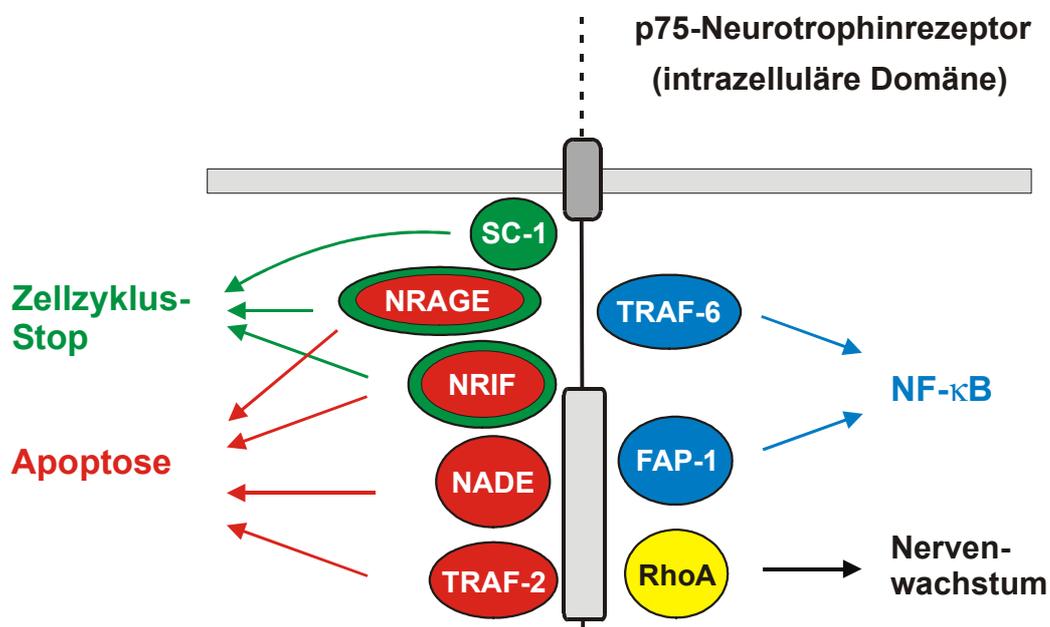
Die Bindung von NRIF an die Juxtamembran-Domäne von p75 ist insofern besonders relevant, als es immer mehr Hinweise dafür gibt, daß diese Region primär für die Zelltod-vermittelnde Wirkung von p75 verantwortlich ist (Coulson et al., 2000). Bei anderen Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie wurde die „Death“-Domäne als Apoptose-induzierendes Modul identifiziert. Diese Domänen unterscheiden sich jedoch zwischen p75 einerseits und TNFR1 bzw. FasR andererseits deutlich voneinander. Die Faltung der sechs  $\alpha$ -Helices ist zwar grundsätzlich verwandt, jedoch sind die Helices unterschiedlich zueinander angeordnet. Außerdem dimerisiert bzw. multimerisiert die „Death“-Domäne von p75 im Gegensatz zu der anderer Proteine nicht spontan in Lösung (Liepinsh et al., 1997; Kong et al., 1999) und bindet keines der „Death“-Domänen-haltigen Adaptermoleküle (Coulson et al., 1999). Versuche mit chimären Rezeptoren in 293-Zellen demonstrierten, daß die intrazelluläre Domäne von p75 Zelltod durch einen anderen Mechanismus vermittelt als der Fas-Rezeptor und daß p75 kein klassischer „Death“-Rezeptor ist, sondern seine Wirkung sehr stark vom Zellkontext, Zellzyklus und vom momentanen metabolischen Zustand der Zelle (Streß, *in vivo* z.B. Hypoxie oder Entzündung) abhängt (Kong et al., 1999). Insofern wäre p75 eher als eine Art Streß-Rezeptor anzusehen (Dobrowsky und Carter, 2000).

Die Juxtamembran-Region von p75, die der zwischen verschiedenen Spezies am stärksten konservierte Bereich des Rezeptors ist (Large et al., 1989), scheint für p75-vermittelten Zelltod sensorischer Neuronen aus Spinalganglien nötig und hinreichend zu sein. Als neue Bezeichnung für diese Domäne wurde der Begriff „Chopper“ (Hackbeil) vorgeschlagen (Coulson et al., 1999 und 2000). Nur eine membranständige Juxtamembran-Region konnte Zelltod auslösen. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, daß NRIF eine lösliche Form der Juxtamembran-Domäne nicht binden konnte, sondern nur ein Konstrukt, das auch die Transmembranregion enthielt. Dies könnte ebenso wie die relativ schwache Bindung von NRIF an eine lösliche intrazelluläre Domäne darauf zurückzuführen sein, daß das Protein

wahrscheinlich bevorzugt an p75-Dimere bindet, die bei Verwendung löslicher Konstrukte nicht entstehen (Liepinsh et al., 1997).

Die Interaktion von NRIF und p75 könnte durch zwei wichtige Faktoren beeinflusst werden: die Präsenz weiterer Adapter-Moleküle, die mit der intrazellulären Domäne des Rezeptors interagieren können, sowie die Bindung von Neurotrophinen an seinen extrazellulären Bereich.

In den letzten zwei Jahren wurden außer NRIF eine Reihe weiterer p75-Interaktoren identifiziert (vgl. 2.3.3 und Abb. 36). TRAF-6 (Khursigara et al., 1999), TRAF-4 (Ye et al., 1999), SC-1 (Chittka und Chao, 1999) und NRAGE (Salehi et al., 2000) binden bevorzugt an die Juxtamembran-Region von p75, während RhoA (Yamashita et al., 1999), TRAF-2 (Ye et al., 1999) und NADE (Mukai et al., 2000) mit der „Death“-Domäne assoziieren. Die Tyrosin-Phosphatase FAP-1 bindet an die carboxyterminalen drei Aminosäuren des Rezeptors. Für einige dieser Proteine (TRAF-6, NADE, NRAGE) wurde eine stärkere Bindung in Gegenwart eines Liganden beschrieben, während das Zinkfingerprotein SC-1 bei NGF-Bindung vom Rezeptor abdissoziiert und in den Zellkern wandert. Die GTPase-Aktivität von RhoA wird durch Ligandenbindung inhibiert.



**Abb. 36: Cytoplasmatische Interaktoren des Neurotrophinrezeptors p75.**

Dargestellt ist nur die intrazelluläre Domäne von p75. Cytoplasmatische Proteine interagieren mit unterschiedlichen Domänen des Rezeptors und vermitteln gegensätzliche Signale wie NF-κB-Aktivierung (anti-apoptotisch), Apoptose oder Zellzyklus-Stop. Weitere Erklärungen im Text.

In „Pull-Down“-Experimenten wurde untersucht, ob die Anwesenheit von RhoA einen Einfluß auf die Bindung von NRIF an p75 besitzt. Eine gleichzeitige Expression von RhoA verstärkte die Interaktion der NRIF-Proteine mit dem Neurotrophinrezeptor deutlich. Eventuell wird die Konformation von p75 durch RhoA beeinflusst, so daß die Affinität für NRIF erhöht ist. Die nur schwache Wechselwirkung von p75 und RhoA unter den experimentellen Bedingungen könnte auf die Anwesenheit von zuviel Detergens zurückzuführen sein (vgl. 4.3.4). Da NRIF und RhoA eine Präferenz für unterschiedliche Subdomänen von p75 aufweisen, sollte eine gleichzeitige Bindung möglich sein.

Auch TRAF-6 und NRIF beeinflussen sich gegenseitig. Ihre Interaktion wurde durch Co-immunpräzipitation demonstriert, und bei gleichzeitiger Expression der beiden Proteine in 293-Zellen waren NRIF-Protein und -mRNA stabilisiert. Außerdem wurde eine partielle Colokalisierung von NRIF und TRAF-6 im Zellkern gezeigt (Gentry et al., 2000b). Die Wechselwirkung der beiden Proteine könnte eine funktionelle Bedeutung besitzen, da sie nach bisherigen Versuchsergebnissen gegensätzliche Signalwege aktivieren: TRAF-6 scheint über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B anti-apoptotisch zu wirken, während NRIF den Zellzyklus stoppen und Apoptose fördern kann (s.u.). Über die Protein-Interaktion können sich diese Signaltransduktionswege direkt beeinflussen.

Die p75-Signaltransduktion durch NRIF-Proteine könnte nach folgendem Modell ablaufen: Die Bindung bestimmter Neurotrophine (z.B. NGF) an die extrazelluläre Domäne des Neurotrophinrezeptors p75 führt zur einer Konformationsänderung, wodurch konstitutiv an den Rezeptor gebundenes NRIF freigesetzt wird. NRIF-Proteine wandern (wahrscheinlich als Dimer) in den Zellkern, binden mit Hilfe der Zinkfinger an spezifische DNA-Sequenzen und hemmen über die KRAB-Domänen die Transkription spezifischer Gene. Um diese Modellvorstellung zu überprüfen, wurde die Neurotrophin-Abhängigkeit der Interaktion von p75 und NRIF in mehreren Versuchsansätzen getestet. In „Pull-Down“-Experimenten war die Bindung von NRIF2 an p75 nur leicht geschwächt, wenn NGF an den Rezeptor gebunden hatte (4.3.3). Bei Cotransfektion der beiden Proteine in 293-Zellen war in Gegenwart von NGF oder BDNF kein signifikanter Unterschied in der subzellulären Lokalisierung von NRIF und p75 zu beobachten (4.4.2). Abgesehen von der Möglichkeit, daß keine Ligandenabhängigkeit der Bindung besteht, könnten hierfür verschiedene Gründe verantwortlich sein.

- Falls bei „Pull-Down“-Experimenten nur ein Teil der in der Probe vorhandenen p75-Rezeptoren durch Kreuzvernetzung mit NGF gekoppelt wurde, stand immer noch genug überschüssiges p75-Protein für die Bindung an GST-NRIF zur Verfügung.
- Der Einfluß der NGF-Bindung auf die p75-Konformation müßte sehr stabil sein, um die lange Inkubationszeit (ca. 14 h) zu überstehen.

- Auch eine Interaktion von p75 mit trk-Rezeptoren konnte nur nachgewiesen werden, wenn beide Proteine in derselben Zelle exprimiert wurden, jedoch nicht, falls proteinhaltige Lysate aus unterschiedlichen Zellen gemischt wurden (Bibel et al., 1999). Allerdings handelte es sich dabei um zwei membranständige Proteine, für deren Wechselwirkung andere Faktoren wichtig sein könnten.
- Bei den Kollokalisierungs-Experimenten in 293-Zellen lagen die Proteine eventuell im falschen Mengenverhältnis zueinander vor.
- Möglicherweise ist eine Modifikation (z.B. Phosphorylierung) durch ein in diesem System nicht vorhandenes Enzym nötig, damit NRIF nach NGF-Einwirkung vom Rezeptor abdissoziieren kann.

Letztere Möglichkeit ist besonders interessant, da sich ein Vergleich zu anderen Systemen anbietet, bei denen die Lokalisierung und Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch Zelloberflächenrezeptoren reguliert wird. Viele Mitglieder der Cytokin-Rezeptor-Superfamilie besitzen wie solche der TNF-Rezeptor-Superfamilie intrazelluläre Domänen ohne katalytische Aktivität. Sie bewirken über cytoplasmatisch assoziierte „Janus-Kinasen“ (JAKs) eine Tyrosin-Phosphorylierung zellulärer Proteine. Ligandenbindung an den Rezeptor führt zur Aktivierung der Janus-Kinasen, die den Cytokin-Rezeptor phosphorylieren. Dadurch entstehen Bindungsstellen für STAT-Proteine („signal transducers and activators of transcription“), inaktiv im Cytosol vorliegende Transkriptionsfaktoren. Die STAT-Proteine binden über SH2-Domänen („src homology domain“) an Phospho-Tyrosin-Reste des Rezeptors, werden daraufhin selbst durch Janus-Kinasen phosphoryliert und können dimerisieren, vom Rezeptor abdissoziieren und in den Zellkern wandern. Dort aktivieren sie die Transkription spezifischer Gene (Horvath, 2000; Ihle und Kerr, 1995; Ihle et al., 1994).

Grundsätzlich ist ein ähnliches Szenario für NRIF vorstellbar, wobei NRIF nach den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten (4.3.2) im Gegensatz zu STAT-Proteinen scheinbar nicht phosphoryliert sein muß, um mit dem Rezeptor interagieren bzw. dimerisieren zu können. Womöglich ist aber eine Phosphorylierung nötig, um effektiv vom Rezeptor abzu-dissoziieren. Die zu geringe Konzentration der entsprechenden Kinase(n) in den hier verwendeten Versuchssystemen könnte einer der Gründe sein, warum eine Ligandenabhängigkeit der Assoziation von p75 und NRIF nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Andererseits waren NRIF1 und 2 bei Überexpression in 293-Zellen hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, d.h. eine Kernlokalisierung wurde auch ohne ligandeninduzierte Phosphorylierung (oder andere Modifikationen) erreicht. Experimente mit überexprimierten Proteinen müssen grundsätzlich kritisch betrachtet werden, da die Proteine verglichen mit regulatorisch wirkenden Faktoren eventuell in einem unphysiologischen Verhältnis vorliegen. Womöglich sind Modifikationen von NRIF nur für die Bindung an bestimmte genregulatorische DNA-

Sequenzen nötig. Die Kernlokalisierung alleine garantiert nicht, daß NRIF auch an potentielle DNA-Bindungsstellen binden und die Transkription regulieren kann. Es gibt experimentelle Hinweise auf post-translationale Modifikationen von NRIF, die dessen Wirkung und Spezifität beeinflussen könnten. Das Protein besitzt eine potentielle Konsensus-Sequenz für eine Phosphorylierung durch c-jun N-terminale Kinase (JNK) sowie eine Sequenz mit Homologie zur JNK-Bindungsstelle von c-jun. *In vitro* kann immunpräzipitierte Jun-Kinase ein GST-NRIF-Fusionsprotein phosphorylieren (Gentry et al., 2000b). Interessanterweise wurde für STAT-Proteine (s.o.) eine Serin-Phosphorylierung der Transkriptionsaktivierungs-Domäne durch eine MAP-Kinase (JNK, ERK oder p38) beschrieben, die die Rekrutierung genspezifischer Coaktivatoren ermöglicht (Ouchi et al., 2000; Horvath, 2000).

Es sei kurz auf weitere Rezeptoren verwiesen, die ein Signal sehr direkt von der Zellmembran zum Zellkern vermitteln, indem assoziierte Transkriptionsfaktoren freigesetzt werden. Beim TGF $\beta$ -Rezeptor/SMAD-System (Massague und Wotton, 2000; Heldin et al., 1997) werden nach Aktivierung des Rezeptors durch Ligandenbindung Proteine der SMAD-Familie (Vertebraten-Homologe der zuerst in *C. elegans* und *Drosophila* gefundenen Proteine *Sma* und *Mad*) freigesetzt, translozieren in den Zellkern und üben dort ihre jeweiligen Funktionen aus. Allerdings besitzen TGF $\beta$ -Rezeptoren katalytische Aktivität (Serin/Threonin-Kinasen), und das System ist komplizierter als hier vereinfacht dargestellt und unterliegt vielfältigen negativen und positiven Kontrollmechanismen (Lo und Massague, 1999; Onichtchouk et al., 1999).

Das C<sub>4</sub>-Zinkfingerprotein ZPR1 kann über seine Zinkfinger an die cytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors binden und wandert nach Bindung des Liganden EGF („epidermal growth factor“) in den Zellkern (Galcheva-Gargova, 1996; vgl. 5.2.1).

Das Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-Zinkfingerprotein Fiz1 („Flt3-interacting zinc finger protein 1“) bindet an die Rezeptor-Tyrosinkinase Flt3, eine Ligandenabhängigkeit der Bindung konnte nicht nachgewiesen werden (Wolf und Rohrschneider, 1999). In Analogie zur NRIF-p75-Situation wird der Interaktor Fiz1 ubiquitär exprimiert, während der Rezeptor Flt3 nur in definierten Gebieten vorkommt (hauptsächlich im Knochenmark, hämatopoetischen Vorläuferzellen, Thymus, Milz und Gonaden). An dieser Stelle sei erwähnt, daß beispielsweise auch das mit p75 interagierende Protein NRAGE (Salehi et al., 2000) im Gegensatz zu p75 ubiquitär in allen embryonalen Geweben nachgewiesen wurde (Kendall et al., 2000).

Intrazelluläre Adapter-Proteine wie NRIF, NRAGE und Fiz1 können also wahrscheinlich je nach Zellkontext mit unterschiedlichen Rezeptoren interagieren.

### 5.3.2 Einfluß von NRIF auf Apoptose und Zellzyklus

Obwohl es mehrere Indizien gab, daß NRIF Apoptose verursachen kann (vgl. 4.5), erwies sich die exakte Quantifizierung als problematisch. Wahrscheinlich war die gewählte Fibroblasten-Zelllinie (293) kein ideales System, um Zelltod durch NRIF eindeutig zu demonstrieren. Kong et al. (1999) und Coulson et al. (2000) fanden analog zu diesen Ergebnissen, daß Überexpression von p75 in 293-Zellen auch in Gegenwart von NGF keinen Zelltod auslöste, während die Überexpression in anderen Zellsystemen (Neuronen aus Spinalganglien, Schwann-Zellen) Apoptose zur Folge hatte. Nicht jeder Zelltyp enthält alle für einen bestimmten Apoptose-Weg nötigen Elemente, und in 293-Zellen fehlt eventuell eine bestimmte Komponente, die für eine effiziente Signaltransduktion nötig wäre.

Es stellt sich die Frage, ob NRIF in einem Zellsystem, in dem programmierter Zelltod durch p75 schon nachgewiesen wurde, apoptotische Wirkung entfaltet. Erste Versuche mit Kulturen primärer Neuronen sind recht vielversprechend: Sympathische Neuronen aus dem oberen Cervicalganglion oder sensorische Neuronen des Ganglion Nodosum wurden mit GFP-NRIF2 oder GFP transfiziert. Hierbei starben sogar in Gegenwart von „Überlebensfaktoren“ (je nach Zelltyp NGF oder BDNF und CNTF) signifikant mehr GFP-NRIF-transfizierte Zellen als GFP-exprimierende (Lucia Pinon, persönliche Mitteilung). Das durch NRIF-Überexpression verursachte pro-apoptotische Signal war also stärker als die anti-apoptotischen Einflüsse.

Wie läßt sich NRIF in das bisherige, kontrovers diskutierte Modell p75-abhängiger Apoptose einordnen? Wie bereits erwähnt (vgl. Einleitung), ist die Wirkung des Neurotrophinrezeptors p75 vom zellulären Kontext und Entwicklungsstadium einer Zelle abhängig. Dies könnte auf die differentiell regulierte Expression und Modifikation cytoplasmatischer Adaptermoleküle wie NRIF, TRAF-6, SC-1 usw. zurückzuführen sein. Vereinfacht läßt sich zusammenfassen, daß p75 über TRAF-6 und NF- $\kappa$ B-Aktivierung anti-apoptotisch wirken kann (Maggirwar et al., 1998; Hamanoue et al., 1999; Khursigara et al., 1999; Foehr et al., 2000), während Apoptose wahrscheinlich unter Beteiligung der Proteine JNK, p53 und Bax ausgelöst wird (Aloyz et al., 1998; Kaplan und Miller, 2000; Miller et al., 2000). Eine gleichzeitige Expression von Trk-Rezeptoren aktiviert Überlebenswege (vgl. 2.3.1) und hemmt Apoptose, während p75 umgekehrt Trk-abhängige Überlebenssignale beeinflußt.

Die Beteiligung von NRIF an einer pro-apoptotischen Signaltransduktion des Neurotrophinrezeptors p75 könnte z.B. über eine Regulation der p53-Menge erfolgen, da es Hinweise auf eine erhöhte Menge an p53-Protein nach Transfektion von *nrif* in 293-Zellen gibt (E. Casademunt, persönliche Mitteilung). NRIF besitzt aber typische Merkmale eines Transkriptionsfaktors mit Repressoraktivität (KRAB-Domänen, vgl. 4.2.1), so daß keine direkte Bindung an aktivierende Elemente im p53-Promotor stattfinden könnte. Über einen indirekten

Mechanismus könnte jedoch z.B. die Transkription eines Repressors der p53-Transkription gehemmt werden. Allgemein kann eine höhere p53-Konzentration den Stop des Zellzyklus oder Apoptose zur Folge haben. Das Tumor-Suppressorgen p53 hat in gesunden Zellen nur eine geringe Halbwertszeit, wird jedoch als Antwort auf Streß-Signale von Kinasen der MAPK-Familie (z.B. JNK oder p38) phosphoryliert und dadurch stabilisiert (Lohrum und Vousden, 2000; Davis, 2000). Für den p53-verursachten Zellzyklus-Stop durch Blockade des G1/S-Überganges ist vor allem das Retinoblastoma-Protein (Rb) wichtig (Levine, 1997; Harbour und Dean, 2000), Apoptose wird z.B. durch Anregung der Transkription proapoptotischer Moleküle wie Bax und Bad ausgelöst (Morrison und Kinoshita, 2000).

Wahrscheinlich kann NRIF aber auch unabhängig von p53 wirken, was beispielsweise für ein potentiell Tumor-Suppressorgen namens „ZAC“ beschrieben wurde. Das Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>-Zinkfingerprotein ZAC („zinc finger protein which regulates apoptosis and cell cycle arrest“) wird in vielen Hirnregionen exprimiert und kann ebenso wie p53 Apoptose induzieren und den Zellzyklus stoppen, es verwendet aber zumindest teilweise andere Mechanismen als p53 (Spengler et al., 1997 und Varrault et al., 1998).

Interessanterweise besitzen mehrere der kürzlich identifizierten p75-Interaktoren einen Einfluß auf den Zellzyklus (vgl. Abb. 36) und es wird postuliert, daß der apoptotische Effekt von p75 eventuell ein sekundärer Effekt dieser Störungen ist (Salehi et al., 2000; Frade, 2000b). Darauf deuten auch *in vivo*-Experimente hin. In der embryonalen Retina von Hühnern sterben viele postmitotische retinale Ganglionzellen, die nur p75 und kein TrkA exprimieren, durch NGF-induzierte Apoptose. Dieser programmierte Zelltod ist die Folge eines zum falschen Zeitpunkt erfolgten Wiedereintrittes in den Zellzyklus (Frade, 2000a). Im allgemeinen werden Neuronen zu einem bestimmten Zeitpunkt ihrer Entwicklung postmitotisch und teilen sich danach nicht mehr. Falls die Kontrollmechanismen versagen und ein Wiedereintritt in den Zellzyklus stattfindet, stirbt die Zelle durch Apoptose. Störungen des Zellzyklus scheinen allgemein ein wichtiger Grund für den Zelltod von Neuronen zu sein (Herrup und Busser, 1995; Park et al., 1996; Pucci et al., 2000).

Durch NRIF verursachte Zellzyklus-Störungen sind nicht auf einen einzigen Zelltyp beschränkt. In Mäusen des BL6-Stammes hatte das Fehlen von *nrf1* ungefähr am elften Embryonaltag einen generellen Proliferations-Stop zur Folge (E. Casademunt). Andererseits führte eine Überexpression von NRIF-Proteinen in einer Fibroblasten-Zelllinie (293-Zellen) oder einer Zelllinie mit hippocampalen Eigenschaften (HN10-Zellen) zu einer sehr starken Verlangsamung des Zellzyklus. Folglich wird die Zellproliferation sowohl durch eine zu niedrige als auch durch eine zu hohe Konzentration dieses Transkriptionsfaktors negativ beeinflusst. Das entscheidende Kriterium scheint eine genau ausgewogene NRIF-Menge zu sein, da sonst Störungen der Zellzyklus-Regulation auftreten (vgl. auch 5.4).

## 5.4 Funktion von NRIF2 in *nrf1*-transgenen Mäusen

Die *in vivo*-Funktion von NRIF1 wurde von E. Casademunt in Mäusen untersucht, in denen das letzte Exon des *nrf1*-Gens durch homologe Rekombination entfernt worden war (Casademunt et al., 1999). In einem gemischten Sv129/BL6 und in einem reinerbigen Sv129-Hintergrund waren homozygote *nrf1* (-/-)-Mutanten lebensfähig, fruchtbar und hatten keine größeren anatomischen Defekte. Männliche Nullmutanten waren etwas weniger aggressiv und zeigten eine altersabhängige Reduzierung im Gewicht der Hoden, einem Gewebe, in dem *nrf1* (aber nicht *nrf2*) besonders stark exprimiert wird. Mäuse eines kongenen BL6-Hintergrundes überlebten das Fehlen von NRIF1 nicht, sondern starben ungefähr am zwölften Embryonaltag (Casademunt et al., 1999). Was könnte die Ursache der Abhängigkeit des Phänotyps vom genetischen Hintergrund sein?

Die *nrf1*-Mutation ist nicht der erste in der Literatur beschriebene Fall, bei dem der Phänotyp einer Mutation sehr stark vom Maus-Stamm abhängig ist. Als Beispiele seien Mutationen von *Pax-2* (Schwarz et al., 1997), *Egfr* (Sibilia und Wagner, 1995; Threadgill et al., 1995) oder *Tgfb1* (Bonyadi et al., 1997) genannt, bei denen embryonale Letalität in dem als empfindlicher geltenden Sv129-Stamm beobachtet wurde.

Verschiedene Maus-Stämme sind weder genetisch noch in ihrem Verhalten völlig identisch. So besitzen beispielsweise Sv129-Mäuse grundsätzlich ein schlechtes Lernvermögen, während BL6-Mäuse beim „Passive Avoidance Test“ kaum reagieren (Crawley, 1996; Lathe, 1996). Allgemein werden „Modifizier“-Gene für stammspezifische Auswirkungen einer Mutation verantwortlich gemacht. Ähnliche Effekte treten auch beim Menschen auf: Individuen stimmen in ihrem Genotyp nie völlig überein, so daß das Vorhandensein eines Proteins bzw. einer bestimmten Variante den Verlauf einer Krankheit entscheidend verändern kann (MacPhee et al., 1995; Cormier et al., 1997; Upadhyya et al., 1999). Der Phänotyp beruht dann also nicht alleine auf der vererbten Mutation eines Gens, sondern wird durch den Genotyp anderer Loci beeinflusst (Montagutelli, 2000).

In der vorliegenden Arbeit waren kongene Sv129- und BL6-Mauslinien durch zehn Generationen von Rückkreuzungen erzeugt worden (Abb. 25). Das Genom entspricht dann statistisch gesehen zu 99,9% der „Empfänger“-Mauslinie. Allerdings muß man sich klarmachen, daß die den mutierten Bereich direkt umgebende Region zwangsläufig immer aus der ursprünglichen Mauslinie stammt (meist Sv129), da ein „Crossover“ der Chromosomen während der Meiose in dieser Position nicht stattfinden kann, ohne die Mutation zu beseitigen (Gerlai, 1996). Phänotypische Unterschiede können also entweder auf die Nullmutation oder auf Sv129-Gene, die nahe am mutierten Genlocus liegen, zurückzuführen sein. Diese Region enthält statistisch gesehen immer noch ungefähr 300 Gene, kann also nicht als vernachläss-

sigbar klein angesehen werden, zumal das Genom verschiedener Mausstämme viele Sequenzunterschiede aufweist (Gerlai, 1996; Lathe, 1996).

Insofern gilt auch für die *nrif1*-Mutation, daß wahrscheinlich spezifische „Modifier“-Gene bzw. -Proteine des Sv129-Stammes das Überleben ermöglichen bzw. einen Defekt kompensieren können. Das Vorhandensein eines sehr ähnlichen zweiten Gens (*nrif2*) mit möglicherweise redundanten Funktionen ist eine naheliegende Erklärung für das Fehlen größerer Defekte bei Abwesenheit von *nrif1*. *Nrif2*-mRNA wurde jedoch auch im BL6-Stamm nachgewiesen, sie scheint allerdings, anders als im Sv129-Hintergrund, nicht differentiell reguliert zu werden. Die Analyse der mRNA von Wildtyp-Mäusen und *nrif1*-Nullmutanten eines kongenen Sv129-Hintergrundes ergab, daß die *nrif2*-mRNA-Mengen in Nullmutanten (P0 und P14) gewebeabhängig bis zu doppelt so hoch waren wie in Wildtyp-Tieren (4.6.2). Reinrassige BL6-Nullmutanten sind am Embryonaltag E10,5 noch lebendig und morphologisch normal, wenn auch deutlich kleiner als ihre Wildtyp-Geschwister. Im Gegensatz zu gleichaltrigen Embryonen des Sv-129-Stammes wurde bei ihnen jedoch *keine* differentielle Regulation der *nrif2*-Level beobachtet, so daß dies ein möglicher Grund für ihr kurze Zeit später erfolgendes Absterben sein könnte. Wahrscheinlich muß eine sehr genau regulierte NRIF-Konzentration vorliegen, um eine normale Entwicklung zu ermöglichen, und die „richtige“ Menge an NRIF2 kann scheinbar in allen lebenswichtigen Aspekten das Fehlen von NRIF1 kompensieren. Die „Kompensations-Hypothese“ beruht auf der Annahme, daß ein Unterschied in der mRNA-Ebene sich auch auf Proteinebene widerspiegelt. Dies ist wahrscheinlich, konnte aber mangels spezifischer Antikörper zur Detektion des in sehr geringen Mengen vorliegenden Transkriptionsfaktors NRIF nicht überprüft werden. Für den umgekehrten Fall, also eine Regulation *nur* auf Proteinebene bei unveränderter mRNA-Menge (sei es in der Proteinmenge oder durch spezifische Modifikationen) gibt es viele Beispiele (z.B. Ubiquitin-abhängiger Abbau oder Phosphorylierung von Zellzyklusproteinen; p53; I- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B).

Um einen Hinweis zu erhalten, ob die Letalität der *nrif1*-Mutation im BL6-Stamm tatsächlich auf der mangelnden Hochregulation von *nrif2* beruht, wurden *nrif1*-transgene BL6 (+/-)- mit Sv129 (+/-)-Mäusen gekreuzt. Schon in der F1-Generation wurden ca. 11% homozygote „knockout“-Tiere erhalten. In diesen BL6/Sv129 (-/-)-Tieren war die *nrif2*-mRNA-Menge hochreguliert, was ein Indiz für die Richtigkeit der Hypothese war und darauf hinwies, daß wahrscheinlich Sv129-spezifische Gene/Proteine für die Regulation der *nrif*-Menge verantwortlich sind.

Ein interessante Möglichkeit zur Verifizierung der Hypothese wäre ein „rescue“-Versuch, also die Generierung *nrif2*-transgener *nrif1* (-/-)-Mäuse. Falls diese Mäuse im BL6-Hintergrund überlebten, wäre dies ein eindeutiger Beweis dafür, daß die „richtige“ Menge an NRIF2 tatsächlich das Fehlen von NRIF1 ausgleichen kann.

Befruchtete Eizellen müßten aus heterozygoten BL6-Weibchen entnommen und nach Injektion eines geeigneten *nrf2*-Konstruktes in scheinchwangere Mäuse reimplantiert werden. Zu einem späten Embryonalstadium (z.B. E15) könnte man untersuchen, ob es überlebende *nrf1* (-/-)-Tiere gibt. Allerdings müßten sehr viele Mäuse untersucht werden, da ja höchstens 25% homozygote *nrf1*-Nullmutanten erwartet würden und die Wahrscheinlichkeit, daß diese transgen sind, nur 10%-50% betrüge. Abgesehen vom sehr hohen experimentellen Aufwand birgt dieser Ansatz noch ein weiteres Problem: Die exprimierte Menge müßte sehr genau reguliert sein, da zuviel NRIF mit großer Wahrscheinlichkeit auch schädlich wäre, wie die Überexpression von NRIF in Zelllinien zeigte (Abschnitt 4.5 und 4.7).

Da *in vitro*-Experimente mit Primärkulturen von Fibroblasten aus BL6 (-/-)-Embryonen einfacher zu verwirklichen sein sollten als transgene Mäuse, wurde dieser Versuchsansatz getestet. Der spätestmögliche Zeitpunkt für die Gewinnung der Fibroblasten aus BL6-Embryonen war E10,5, da die Nullmutanten einen Tag später abstarben. Es ist aber sehr schwierig, aus so jungen Embryonen proliferierende Kulturen zu etablieren, denn sie erreichen schnell Seneszenz (Zindy et al., 1997 und M. Roussel, persönl. Mitteilung). Normalerweise werden Fibroblastenkulturen aus ca. dreizehn Tage alten Embryonen hergestellt (Freshney, 1994). Die im Vergleich kleineren Nullmutanten lieferten weniger Zellen als die Wildtyp-Tiere, beide stellten nach wenigen Teilungen ihr Wachstum ein. BrdU-Markierungsexperimente zeigen, daß bei beiden Genotypen nur sehr wenige Zellen BrdU einbauten, also proliferierten. Deshalb wurden weiterführende Experimente, bei denen die Fibroblasten aus *nrf1*-Nullmutanten mit *nrf2* transfiziert werden sollten, um mögliche Defekte zu komplementieren (vgl. Sobol et al., 1996; Humbert et al., 2000), nicht mehr durchgeführt. Auch hier hätte sich das Problem ausgewogener Expressions-Level ergeben (s.o.).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die regulatorische Anpassung der *nrf2*-Menge als Reaktion auf das Fehlen von *nrf1* wahrscheinlich im Sv129- oder gemischten Hintergrund ein Überleben von *nrf1*-Nullmutanten erlaubt. Für diese Hypothese konnten einige Indizien gefunden werden, der schlußendliche Beweis steht jedoch noch aus und ist nur sehr schwierig zu erbringen.

Warum können BL6-Mäuse die *nrf2*-Menge nicht entsprechend regulieren? Möglicherweise sind hierfür Sequenzunterschiede in der Promotor-Region der NRIF-Gene von Sv129 bzw. BL6 verantwortlich. Da die Gene für *nrf1* und *nrf2* auf dem gleichen Chromosom sehr nahe beieinander liegen (L. Stubbs, persönliche Mitteilung), besteht diese Region höchstwahrscheinlich auch nach zehn Rückkreuzungen immer noch aus Sv129-DNA und weist Sequenzunterschiede zwischen den beiden Stämmen auf. Womöglich sind für die Regulation sehr sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren verantwortlich, die nur im jeweiligen Kontext

einwandfrei binden können. Es kann aber auch nicht völlig ausgeschlossen werden, daß die Erhöhung der *nrf2*-mRNA-Menge im Sv129-Hintergrund eine unspezifische Reaktion ist, die durch die „Gene Targeting“-Strategie hervorgerufen wird. In der Literatur finden sich Beispiele, bei denen eine eingeführte Selektionskassette die Expression benachbarter Gene beeinflusste, deshalb werden inzwischen häufig ortsspezifische Rekombinasen verwendet (*Cre/loxP*, *Flp/frt*), die eine Entfernung dieser Abschnitte nach erfolgreicher Selektion erlauben (Plagge et al., 2000).

Aufgrund der starken Homologie von NRIF1 und NRIF2 sind funktionelle Redundanzen nicht unwahrscheinlich. Hier ist ein Vergleich mit Transkriptionsfaktoren aus der Familie der STAT-Proteine interessant. In Säugetieren gibt es sieben STAT-Proteine, die auf drei Chromosomen verteilt und wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind. Sie besitzen alle einen identischen Aufbau aus konservierten Domänen, die Sequenzähnlichkeit zwischen den meisten Mitgliedern der Genfamilie beträgt aber nur 20-50%. Eine Ausnahme bilden STAT5a und STAT5b, die (zusammen mit STAT3) auf Maus-Chromosom 11 liegen und deren Aminosäuresequenz zu 96% identisch ist (Copeland et al., 1995). Die Duplikation, die zu den beiden STAT5-Formen führte, fand also wie bei NRIF vor evolutionär gesehen kurzer Zeit statt. STAT5-Proteine sind für die Signaltransduktion von Prolactin, Wachstumshormon und einigen Cytokinen wichtig. Die Analyse von Mäusen, in denen die Gene für STAT5a und 5b einzeln oder gleichzeitig deletiert wurden, offenbarte, daß die Funktionen der Proteine zwar vielfach überlappen und vom jeweils anderen Protein übernommen werden können, jedoch keinesfalls völlig redundant sind (Teglund et al., 1998; Park et al., 1999; Horvath, 2000). Homo- und Heterodimere aus STAT5a und -5b erfüllen verschiedene Funktionen, z.B. bei der zwischen männlichen und weiblichen Mäusen unterschiedlichen Wirkung von Wachstumshormon auf die Leber (Park et al., 1999).

In diesem Zusammenhang sollen auch Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie erwähnt werden, die als Heterodimere mit „DP“-Proteinen Proliferation und Differenzierung von Zellen beeinflussen (Helin, 1998; Müller und Helin, 2000). Ihre Aktivität wird während der G1-Phase des Zellzyklus durch das Retinoblastoma-Protein (Rb) negativ reguliert. Beim Übergang zur S-Phase dissoziiert phosphoryliertes Rb von E2F-Proteinen ab, die freien Transkriptionsfaktoren können sodann die Transkription von Genen aktivieren, deren Proteinprodukte die Zellproliferation anregen. Die sechs bekannten E2F-Faktoren lassen sich in drei verschiedene Klassen einteilen, nur Mitglieder der ersten Subklasse, zu der E2F1, 2 und 3 gehören, sind starke Transkriptionsaktivatoren. Ihre Rolle wurde in transgenen Mäusen untersucht, insbesondere in primären Fibroblasten aus Maus-Embryonen, denen *E2f3* fehlte. Diese zeigten Defekte der Proliferation und des Zellzyklus, ohne E2F3 konnte keine Transaktivierung der meisten bekannten E2F-responsiven Gene beobachtet werden (Humbert et al., 2000). Interessanterweise konnten die meisten Defekte durch ektopische Überexpression (mittels

Retroviren) von E2F3 oder E2F1 aufgehoben werden. E2F1 konnte also den E2F3-Verlust in primären Fibroblastenkulturen ausgleichen, obwohl die Proteine *in vivo* oft unterschiedliche Funktionen ausüben.

Wahrscheinlich liegt bei NRIF-Proteinen eine ähnliche Situation vor, in der eine gewisse Redundanz besteht, sich aber im Laufe der Evolution divergierende Funktionen entwickelt haben.

## 5.5 Ausblick

Für zukünftige Studien sind mehrere Aspekte der NRIF-Proteine besonders interessant, die in folgenden Abschnitten zusammengefaßt sind:

- 1.) Bisher wurde hauptsächlich die Wechselwirkung dieser Zinkfingerproteine mit dem Neutrophinrezeptor p75 untersucht. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß NRIF-Proteine an weitere Proteine binden können, worauf bereits die Interaktion von NRIF1 und NRIF2 hinweist. Ein weiteres Indiz für diese Vermutung ist der Nachweis von *nrf1*-mRNA in Geweben, in denen kein p75 exprimiert wird. Die Wechselwirkung von NRIF mit anderen Proteinen, insbesondere den cytoplasmatischen Domänen anderer Rezeptoren, könnte z.B. mit Hilfe des Hefe-„Two-Hybrid“-Systems charakterisiert werden.
- 2.) Die Funktionsweise von NRIF als Transkriptionsfaktor sollte genauer untersucht werden. Wahrscheinlich beeinflusst NRIF die Transkription von Genen, deren Proteinprodukte an der Regulation von Apoptose und Zellzyklus beteiligt sind. Es stellt sich die folglich die Frage, an welche DNA-Sequenzen bzw. an die Promotoren welcher Gene NRIF binden kann.
- 3.) Um die Hypothese einer ligandenabhängigen Dissoziation der NRIF-Proteine vom Rezeptor p75 zu prüfen, sollten insbesondere eine mögliche Phosphorylierung und deren Einfluß auf die subzelluläre Lokalisierung von NRIF analysiert werden. Sowohl die Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren als auch die Wechselwirkung mit cytoplasmatischen Proteinen könnte von posttranslationalen Modifikationen beeinflusst werden.
- 4.) Im Hinblick auf die starke Abhängigkeit der *nrf1*-Nullmutation vom genetischen Hintergrund der Mäuse stellt sich die Frage, welche stammspezifischen „Modifizier“-Gene an diesem Effekt beteiligt sind. Bisher wurde in der Literatur nach unserem Wissensstand kein weiterer Fall beschrieben, bei dem eine vergleichsweise geringe Regulation auf mRNA-Ebene das Fehlen eines eng verwandten Genproduktes möglicherweise ausgleichen kann. Die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen könnte dazu beitragen, die genetischen Unterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen und deren phänotypische Auswirkungen besser zu verstehen.

## 6 Abkürzungen und Begriffe

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APAF	„Apoptosis protease activating factor“
AS	Aminosäure
(d)ATP	(Desoxy-)Adenosintriphosphat
Bcl	„B-cell lymphoma“
BDNF	„Brain-derived neurotrophic factor“
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CARD	„Caspase recruitment domain“
cDNA	„complementary DNA“
CREB	„cAMP response element binding protein“
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid
DD	„Death“-Domäne
DED	„Death“-Effektor-Domäne
DMEM	„Dulbecco's modified eagle's medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Tag der Embryonalentwicklung
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECD	Extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzyme linked immunosorbent assay“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	„Extracellular-signal regulated kinase“
EST	„Expressed sequence tag“
FADD	„Fas-associated protein with death domain“
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GFP	„Green fluorescent protein“
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
ICD	Intrazelluläre Domäne
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
$K_D$	Dissoziationskonstante
KRAB	„Krüppel associated box“
M	Molar
mAk	Monoklonaler Antikörper

---

MAPK	„Mitogen activated protein kinase“
MEKK	Kinase aus der Familie der MAPKKK
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
NGF	„Nerve Growth Factor“
NF- $\kappa$ B	„Nuclear factor kappa B“
NIK	„NF- $\kappa$ B-inducing kinase“
NLS	Kernlokalisierungssignal („nuclear localization signal“)
NRIF	„Neurotrophin Receptor Interacting Protein“
NT	Neurotrophin
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster („open reading frame“)
P	Tag nach der Geburt (postnatal)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
p75	Neurotrophinrezeptor p75
Primer	Oligonukleotid für die PCR
RACE	„Rapid amplification of cDNA ends“
RING	„Really interesting new gene“
RIP	„Receptor interacting protein“
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„Reverse transcription“ PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBP	TATA-Bindeprotein
TF	Transkriptionsfaktor
Template	Matrize
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	„TNF receptor-associated death domain protein“
TRAF	„TNF receptor associated factor“
Trk	„Tropomyosin receptor kinase“
ÜN	Über Nacht
UTR	„Untranslated Region“
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid



```

E W R D R S G S T P V T H G S S I K N Q 472
GAG TGG CGA GAC AGG AGT GGC AGC ACT CCT GTG ACA CAT GGC TCC TCT ATA AAA AAC CAA 1416

Q L G S E Q G K T Q T S R D P I T L T V 492
CAA TTG GGT TCT GAG CAG GGA AAA ACT CAG ACC AGC AGA GAT CCC ATT ACA CTT ACT GTG 1476

P A E F Y Q E A T G S E E G R F R N S S 512
CCT GCA GAA TTT TAC CAG GAA GCC ACT GGC TCT GAA GAG GGT AGG TTT AGG AAC AGT AGC 1536

N A M A A D A P P K I H Q K G P E W H K 532
AAT GCC ATG GCA GCT GAT GCA CCT CCA AAG ATT CAC CAG AAA GGC CCT GAA TGG CAT AAA 1596

A G K S N N S M L Q G S S A Q N H Q M G 552
GCT GGG AAA AGT AAC AAT TCC ATG TTA CAA GGT TCG TCT GCA CAA AAT CAC CAG ATG GGG 1656

S R A G R A R D N S I L T H V K I H Q K 572
TCT AGG GCA GGA AGA GCC AGG GAC AAC AGC ATC TTA ACA CAT GTA AAA ATT CAC CAG AAA 1716

G Y K E G K I Q G N N N Y L K H V K P H 592
GGC TAT AAA GAA GGC AAA ATC CAA GGA AAC AAT AAT TAC TTG AAA CAT GTA AAA CCT CAC 1776

R K G S K E E R L R E L S T C Q K H V P 612
CGG AAG GGT TCT AAA GAG GAA AGA CTC AGG GAA CTT AGC ACT TGT CAA AAA CAT GTC CCC 1836

Y V K Q H L K T S G R G K G R K I N A S 632
TAT GTA AAA CAA CAC CTA AAG ACC TCG GGA AGA GGA AAA GGC AGG AAA ATC AAT GCT TCC 1896

I K C G P Y I K T Y Y R G S D V G R L R 652
ATA AAA TGT GGT CCC TAT ATA AAA ACT TAC TAT AGA GGT TCT GAT GTG GGA AGG CTC AGG 1956

R A N N C R K A I S R H A Q Q I S F I K 672
AGA GCC AAC AAT TGT AGG AAA GCC ATC AGC CGG CAT GCT CAG CAG ATA TCC TTT ATA AAA 2016

I H K G S Q V C Q C S E C G K M F R N A 692
ATT CAC AAG GGG AGC CAA GTT TGC CAA TGC AGT GAA TGT GGT AAA ATG TTC CGG AAT GCT 2076

R Y F S V H K K I H T G E R P Y M C M S 712
AGG TAT TTC TCT GTC CAT AAG AAG ATC CAC ACA GGA GAG CGG CCT TAC ATG TGT ATG TCC 2136

C G K A F V O S S S L T O H L R I H S G 732
TGT GGG AAA GCA TTT GTT CAG AGC TCC TCC CTC ACA CAG CAT CTT AGA ATT CAC AGT GGA 2196

E R P F E C S E C G R T F S D R S A A S 752
GAG AGA CCC TTT GAG TGT TCA GAG TGT GGG AGA ACT TTC AGT GAC CGC TCA GCT GCC TCT 2256

Q H L R T H T G A K P Y Q C Q H C G K A 772
CAG CAC CTG AGA ACT CAT ACT GGA GCT AAG CCC TAC CAA TGT CAG CAC TGT GGG AAA GCT 2316

F R Q S S H L T R H V R I H T G E R P Y 792
TTC CGC CAG AGT TCC CAC CTC ACC AGG CAT GTG AGA ATT CAT ACT GGG GAG CGA CCT TAT 2376

V C T K C G K A F T O S S N L I G H Q K 812
GTG TGT ACC AAG TGT GGG AAG GCA TTC ACA CAG AGC TCA AAC CTT ATT GGG CAT CAG AAA 2436

T H R K K F K K Q P K L * 824
ACA CAC AGA AAG AAG TTC AAG AAG CAG CCT AAA TTG TAG ACT TTG TGC CTT TCA GAG CAC 2496

TAT TGT TTC AGC ATT GAG ATG TAC CAT GCA GTC ACT GAG TAT GAT AGG CTT TGG ATA AGG 2556
AGA GCC CCA CAC CTT AAG GAC AGC ACG GGA AAC CAC CTA GCA GGC AGC CAG TGA AAC CAT 2616
CAG GGA GGT TGT TTT TGT TTT TTT TTT AAG ATA TTT TCT TCA TTT ACA TTT CAA ATG CTA 2676
TCC CCG AAG TCC TGC AG 2693

```

**Abb. 37: DNA- und Proteinsequenz von *nrf2*.**

Das offene Leseraster des *nrf2*-Gens umfaßt 2472 Nukleotide und codiert für ein 824 Aminosäuren langes Zinkfingerprotein mit zwei N-terminalen **KRAB**-Domänen (jeweils unterteilt in KRAB-A und KRAB-B), einer **SCAN**-Box und fünf C-terminalen **Zinkfingern**. Nukleotide an Exon-Grenzen sind fett gedruckt und unterstrichen (z.B. **GG**). Besonders relevante Restriktionsschnittstellen sind fett kursiv markiert.

## 8 Literaturverzeichnis

- Agata, Y., Matsuda, E., and Shimizu, A. (1999) Two novel Kruppel-associated box-containing zinc-finger proteins, KRAZ1 and KRAZ2, repress transcription through functional interaction with the corepressor KAP-1 (TIF1beta/KRIP-1). *J. Biol. Chem.* **274**, 16412-16422.
- Aloe, L., Cozzari, C., Calissano, P., and Levi-Montalcini, R. (1981) Somatic and behavioral postnatal effects of fetal injections of nerve growth factor antibodies in the rat. *Nature* **291**, 413-415.
- Aloyz, R.S., Bamji, S.X., Pozniak, C.D., Toma, J.G., Atwal, J., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (1998) P53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J. Cell Biol.* **143**, 1691-1703.
- Anderson, D., Koch, C.A., Grey, L., Ellis, C., Moran, M.F. and Pawson, T. (1990) Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* **250**, 979-982.
- Anton, E.S., Weskamp, G., Reichardt, L.F., and Matthew, W.D. (1994) Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2795-2799.
- Arch, R.H., Gedrich, R.W., and Thompson, C.B. (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) - a family of adaptor proteins that regulates life and death. [Review]. *Genes & Dev.* **12**, 2821-2830.
- Arranz, V., Harper, F., Florentin, Y., Puvion, E., Kress, M., and Ernoult-Lange, M. (1997) Human and mouse MOK2 proteins are associated with nuclear ribonucleoprotein components and bind specifically to RNA and DNA through their zinc finger domains. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2116-2126.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. [Review]. *Science* **281**, 1305-1308.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. [Review]. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 255-260.
- Baker, S.J. and Reddy, E.P. (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. [Review]. *Oncogene* **12**, 1-9.
- Baker, S.J. and Reddy, E.P. (1998) Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. [Review]. *Oncogene* **17**, 3261-3270.
- Bamji, S.X., Majdan, M., Pozniak, C.D., Belliveau, D.J., Aloyz, R., Kohn, J., Causing, C.G., and Miller, F.D. (1998) The p75 receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J. Cell Biol.* **140**, 911-923.
- Barbacid, M. (1994) The Trk family of neurotrophin receptors. [Review]. *J. Neurobiol.* **25**, 1386-1403.
- Barde, Y.A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* **1**, 549-553.
- Bargmann, C.I. (1998) Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. [Review]. *Science* **282**, 2028-2033.
- Barker, P.A., Barbee, G., Misko, T.P., and Shooter, E.M. (1994a) The low affinity neurotrophin receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *J. Biol. Chem.* **269**, 30645-30650.
- Barker, P.A. and Shooter, E.M. (1994b) Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* **13**, 203-215.

- Barrett, G.L. and Bartlett, P.F. (1994) The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6501-6505.
- Bellefroid, E.J., Poncelet, D.A., Lecocq, P.J., Revelant, O., and Martial, J.A. (1991) The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3608-3612.
- Bellefroid, E.J., Marine, J.C., Ried, T., Lecocq, P.J., Riviere, M., Amemiya, C., Poncelet, D.A., Coulie, P.G., de Jong, P., and Szpirer, C. (1993) Clustered organization of homologous KRAB zinc-finger genes with enhanced expression in human T lymphoid cells. *EMBO J.* **12**, 1363-1374.
- Benedetti, M., Levi, A., and Chao, M.V. (1993) Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7859-7863.
- Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., and Weintraub, H. (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**, 49-59.
- Bentley, C.A., and Lee, K.F. (2000) p75 is important for axon growth and Schwann cell migration during development. *J. Neurosci.* **20**, 7706-7715.
- Bergmann, I., Priestley, J.V., McMahon, S. B., Brocker, E.B., Toyka, K.V., and Koltzenburg, M. (1997) Analysis of cutaneous sensory neurons in transgenic mice lacking the low affinity neurotrophin receptor p75. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 18-28.
- Berkemeier, L.R., Winslow, J.W., Kaplan, D.R., Nikolics, K., Goeddel, D.V., and Rosenthal, A. (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* **7**, 857-866.
- Berninger, B. and Poo, M. (1999) Exciting neurotrophins [news; comment]. *Nature* **401**, 862-863.
- Bibel, M., and Barde, Y.A. (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. [Review]. *Genes & Dev.* **14**, 2919-2937.
- Bibel, M., Hoppe, E., and Barde, Y.A. (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75(NTR). *EMBO J.* **18**, 616-622.
- Blöchl, A. and Sirrenberg, C. (1996) Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via trk and p75(LNTR) receptors *J. Biol. Chem.* **271**, 21100-21107.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A., and Greenberg, M.E. (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**, 1358-1362.
- Bonyadi, M., Rusholme, S.A., Cousins, F.M., Su, H.C., Biron, C.A., Farrall, M., and Akhurst, R.J. (1997) Mapping of a major genetic modifier of embryonic lethality in TGF beta 1 knockout mice. *Nature Genet.* **15**, 207-211.
- Borasio, G.D., Markus, A., Wittinghofer, A., Barde, Y.A., and Heumann R. (1993) Involvement of ras p21 in neurotrophin-induced response of sensory, but not sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* **121**, 665-672.
- Borden, K.L. and Freemont, P.S. (1996) The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. [Review]. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 395-401.
- Borden, K.L.B. (2000) RING domains: Master builders of molecular scaffolds? [Review]. *J. Mol. Biol.* **295**, 1103-1112.
- Bothwell, M. (1991) Tissue localization of nerve growth factor and nerve growth factor receptors. [Review]. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **165**, 55-70.

- Bothwell, M. (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. [Review]. *Annu. Rev. Neurosci.* **18**, 223-253.
- Bredesen, D.E., Ye, X., Tasinato, A., Sperandio, S., Wang, J.J., Assa-Munt, N., and Rabizadeh, S. (1998) p75NTR and the concept of cellular dependence: seeing how the other half die. [Review]. *Cell Death and Differ.* **5**, 365-371.
- Brennan, C., Rivas-Plata, K., and Landis, S.C. (1999) The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons in vivo. *Nature Neurosci.* **2**, 699-705.
- Bunone, G., Mariotti, A., Compagni, A., Morandi, E., and Dellavalle, G. (1997) Induction of apoptosis by p75 neurotrophin receptor in human neuroblastoma cells. *Oncogene* **14**, 1463-1470.
- Cao, Z.D., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D.V. (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443-446.
- Carroll, P., Lewin, G.R., Koltzenburg, M., Toyka, K.V., and Thoenen, H. (1998) A role for BDNF in mechanosensation. *Nature Neurosci.* **1**, 42-46.
- Carter, B.D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhäuser, N., Böhm-Matthaei, R., Baeuerle, P.A., and Barde, Y.A. (1996) Selective activation of NF-kappa-B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* **272**, 542-545.
- Casaccia-Bonofil, P., Carter, B.D., Dobrowsky, R.T., and Chao, M.V. (1996) Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* **383**, 716-719.
- Casaccia-Bonofil, P., Kong, H., and Chao, M.V. (1998) Neurotrophins: the biological paradox of survival factors eliciting apoptosis. [Review]. *Cell Death and Differ.* **5**, 357-364.
- Casademunt, E., Carter, B.D., Benzel, I., Frade, J.M., Dechant, G., and Barde, Y.A. (1999) The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75(NTR) and participates in programmed cell death. *EMBO J.* **18**, 6050-6061.
- Chao, M.V. (2000) Trophic factors: An evolutionary cul-de-sac or door into higher neuronal function? *J. Neurosci. Res.* **59**, 353-355.
- Chao, M.V. and Hempstead, B.L. (1995) p75 and Trk: a two-receptor system. [Review]. *Trends Neurosci.* **18**, 321-326.
- Chapman, B.S. (1995) A region of the 75 kDa neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas. *FEBS Lett.* **374**, 216-220.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512.
- Chittka, A. and Chao, M.V. (1999) Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10705-10710.
- Church, G.M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1995.
- Cohen, G.M. (1997) Caspases - The executioners of apoptosis. [Review]. *Biochem. J.* **326**, 1-16.
- Cohen, S. (1960) Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 302-311.
- Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Schindler, C., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., Jr., Mui, A.L., Miyajima, A., Quelle, F.W., and Ihle, J.N. (1995) Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics* **29**, 225-228.

- Cormier, R.T., Hong, K.H., Halberg, R.B., Hawkins, T.L., Richardson, P., Mulherkar, R., Dove, W.F., and Lander, E.S. (1997) Secretory phospholipase Pla2g2a confers resistance to intestinal tumorigenesis. *Nature Genet.* **17**, 88-91.
- Coulson, E.J., Reid, K., Barrett, G.L., and Bartlett, P.F. (1999) p75 neurotrophin receptor-mediated neuronal death is promoted by Bcl-2 and prevented by Bcl-x(L). *J. Biol. Chem.* **274**, 16387-16391.
- Coulson, E.J., Reid, K., Baca, M., Shipham, K.A., Hulett, S.M., Kilpatrick, T.J., and Bartlett, P.F. (2000) Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J. Biol. Chem.* **275**, 30537-30545.
- Crawley, J.N. (1996) Unusual behavioral phenotypes of inbred mouse strains - commentary. *Trends Neurosci.* **19**, 181-182.
- Crowder, R.J. and Freeman, R.S. (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **18**, 2933-2943.
- Crowley, C., Spencer, S.D., Nishimura, M.C., Chen, K.S., Pitts-Meek, S., Armanini, M.P., Ling, L.H., MacMahon, S.B., Shelton, D.L., and Levinson, A.D. (1994) Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* **76**, 1001-1011.
- Davey, F. and Davies, A.M. (1998) TrkB signalling inhibits p75-mediated apoptosis induced by nerve growth factor in embryonic proprioceptive neurons. *Curr. Biol.* **8**, 915-918.
- Davies, A.M., Minichiello, L., and Klein, R. (1995) Developmental changes in NT3 signalling via TrkA and TrkB in embryonic neurons. *EMBO J.* **14**, 4482-4489.
- Davis, R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. [Review]. *Cell* **103**, 239-252.
- Dechant, G. and Barde, Y.A. (1997) Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. [Review]. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 413-418.
- Dobrowsky, R.T., Werner, M.H., Castellino, A.M., Chao, M.V., and Hannun, Y.A. (1994) Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* **265**, 1596-1599.
- Dobrowsky, R.T., Jenkins, G.M., and Hannun, Y.A. (1995) Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J. Biol. Chem.* **270**, 22135-22142.
- Dobrowsky, R.T., and Carter, B.D. (2000) p75 neurotrophin receptor signaling: Mechanisms for neurotrophic modulation of cell stress? *J. Neurosci. Res.* **61**, 237-243.
- Domene, H.M., Cassorla, F., Werner, H., Roberts, C.T., Jr., and Leroith, D. (1995) Rat growth hormone receptor/growth hormone-binding protein mRNAs with divergent 5'-untranslated regions are expressed in a tissue-specific manner. *DNA & Cell Biol.* **14**, 195-204.
- Dowling, P., Ming, X., Raval, S., Husar, W., Casaccia-Bonnel, P., Chao, M., Cook, S., and Blumberg, B. (1999) Up-regulated p75NTR neurotrophin receptor on glial cells in MS plaques. *Neurology* **53**, 1676-1682.
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R.J., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., and Greenberg, M.E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serin-threonine protein kinase Akt. *Science* **275**, 661-665.
- Ellis, H.M. and Horvitz, H.R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-829.

- Ernfors, P., Hallböök, F., Ebendal, T., Shooter, E.M., Radeke, M.J., Misko, T.P., and Persson, H. (1988) Developmental and regional expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat. *Neuron* **1**, 983-996.
- Ernfors, P., Ibanez, C.F., Ebendal, T., Olson, L., and Persson, H. (1990) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5454-5458.
- Feinstein, D.L. and Larhammar, D. (1990) Identification of a conserved protein motif in a group of growth factor receptors. *FEBS Lett.* **272**, 7-11.
- Feinstein, E., Kimchi, A., Wallach, D., Boldin, M., and Varfolomeev, E. (1995) The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 342-344.
- Finkbeiner, S. (2000) CREB couples neurotrophin signals to survival messages. [Review]. *Neuron* **25**, 11-14.
- Foehr, E.D., Lin, X., O'Mahony, A., Gelezianus, R., Bradshaw, R.A., and Greene, W.C. (2000) NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J. Neurosci.* **20**, 7556-7563.
- Frade, J.M., Rodriguez-Tébar, A., and Barde, Y.A. (1996) Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* **383**, 166-168.
- Frade, J.M., and Barde, Y.A. (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**, 683-690.
- Frade, J.M. (2000a) Unscheduled re-entry into the cell cycle induced by NGF precedes cell death in nascent retinal neurones. *J. Cell Sci.* **113**, 1139-1148.
- Frade, J.M. (2000b) NRAGE and the cycling side of the neurotrophin receptor p75. *Trends Neurosci.* **23**, 591-592.
- Freshney, R.I. (1994) Culture of animal cells: a manual of basic technique. *John Wiley & Sons Inc., New York.*
- Friedman, J.R., Fredericks, W.J., Jensen, D.E., Speicher, D.W., Huang, X.P., Neilson, E.G., and Rauscher, F.J. (1996) KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes & Dev.* **10**, 2067-2078.
- Friedman, W.J. (2000) Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J. Neurosci.* **20**, 6340-6346.
- Galcheva-Gargova, Z., Konstantinov, K.N., Wu, I.H., Klier, F.G., Barrett, T., and Davis, R.J. (1996) Binding of zinc finger protein ZPR1 to the epidermal growth factor receptor. *Science* **272**, 1797-1802.
- Galcheva-Gargova, Z., Gangwani, L., Konstantinov, K.N., Mikrut, M., Theroux, S.J., Enoch, T., and Davis, R.J. (1998) The cytoplasmic zinc finger protein ZPR1 accumulates in the nucleolus of proliferating cells. *Mol. Biol. of the Cell* **9**, 2963-2971.
- Gargano, N., Levi, A., and Alema, S. (1997) Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA receptors. *J. Neurosci. Res.* **50**, 1-12.
- Gentry, J.J., Casaccia-Bonnel, P., Carter, B.D. (2000a) Nerve growth factor activation of nuclear factor kappa B through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 7558-7565.
- Gentry J.J., Rutkoski N.J. and Carter B.D. (2000b). The p75 Neurotrophin Receptor Interacting Factor, NRIF, is a substrate for JNK. *Soc. Neurosci. Abstr.* **26**, 1866.

- Gerlai, R. (1996) Gene-targeting studies of mammalian behaviour-is it the mutation or the background genotype. *Trends Neurosci.* **19**, 177-181.
- Gillardon, F., Spranger, M., Tiesler, C., and Hossmann, K.A. (1999) Expression of cell death-associated phospho-c-Jun and p53-activated gene 608 in hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *Mol. Brain Res.* **73**, 138-143.
- Golemis, E.A. and Brent, R. (1992) Fused protein domains inhibit DNA binding by LexA. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3006-3014.
- Golemis, E.A., Gyuris, J., and Brent, R. (1994) Interaction Trap/Two-Hybrid System to identify interacting proteins. *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.) Ch. 13.14.
- Grewal, S.S., York, R.D., and Stork, P.J. (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. [Review]. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 544-553.
- Hall, J., Thomas, K.L., and Everitt, B.J. (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nature Neurosci.* **3**, 533-535.
- Hallböök, F., Ibanez, C.F., and Persson, H. (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* **6**, 845-858.
- Hamanoue, M., Middleton, G., Wyatt, S., Jaffray, E., Hay, R.T., and Davies, A.M. (1999) p75-mediated NF-kappa B activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol. Cell. Neurosci.* **14**, 28-40.
- Hanahan, D. (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanna-Rose, W. and Hansen, U. (1996) Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. [Review]. *Trends Genet.* **12**, 229-234.
- Harbour, J.W., and Dean, D.C. (2000) Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. [Review]. *Nature Cell Biol.* **2**, E65-E67.
- Heldin, C.H., Miyazono, K., and Ten Dijke, P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. [Review]. *Nature* **390**, 465-471.
- Helin, K. (1998) Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. [Review]. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **8**, 28-35.
- Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., and Chao, M.V. (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* **350**, 678-683.
- Hengartner, M.O. and Horvitz, H.R. (1994) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* **76**, 665-676.
- Herrup, K. and Busser, J.C. (1995) The induction of multiple cell cycle events precedes target-related neuronal death. *Development* **121**, 2385-2395.
- Heuer, J.G., Fatemie-Nainie, S., Wheeler, E.F., and Bothwell, M. (1990) Structure and developmental expression of the chicken NGF receptor. *Development. Biol.* **137**, 287-304.
- Heumann, R., Korsching, S., Bandtlow, C., and Thoenen, H. (1987) Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J. Cell Biol.* **104**, 1623-1631.
- Hofer, M.M. and Barde, Y.A. (1988) Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature* **331**, 261-262.

- Hofmann, K. and Tschopp, J. (1995) The death domain motif found in Fas (Apo-1) and TNF receptor is present in proteins involved in apoptosis and axonal guidance. *FEBS Lett.* **371**, 321-323.
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., and Barde, Y.A. (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* **344**, 339-341.
- Hoovers, J.M., Mannens, M., John, R., Blik, J., van Heyningen, V., Porteous, D.J., Leschot, N.J., Westerveld, A., and Little, P.F. (1992) High-resolution localization of 69 potential human zinc finger protein genes: a number are clustered. *Genomics* **12**, 254-263.
- Horvath, C.M. (2000) STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. [Review]. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 496-502.
- Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D.V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495-504.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., and Fesik, S.W. (1996) NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* **384**, 638-641.
- Huang, Z., Philippin, B., O'Leary, E., Bonventre, J.V., Kriz, W., and Witzgall, R. (1999) Expression of the transcriptional repressor protein Kid-1 leads to the disintegration of the nucleolus. *J. Biol. Chem.* **274**, 7640-7648.
- Huber, L.J. and Chao, M.V. (1995a) A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation. *J. Neurosci. Res.* **40**, 557-563.
- Huber, L.J. and Chao, M.V. (1995b) Mesenchymal and neuronal cell expression of the p75 neurotrophin receptor gene occur by different mechanisms. *Developm. Biol.* **167**, 227-238.
- Huebner, K., Druck, T., Croce, C.M., and Thiesen, H.J. (1991) Twenty-seven nonoverlapping zinc finger cDNAs from human T cells map to nine different chromosomes with apparent clustering. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 726-740.
- Humbert, P.O., Verona, R., Trimarchi, J. M., Rogers, C., Dandapani, S., and Lees, J.A. (2000) E2f3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes & Dev.* **14**, 690-703.
- Huo, L. and Scarpulla, R.C. (1999) Multiple 5'-untranslated exons in the nuclear respiratory factor 1 gene span 47 kb and contribute to transcript heterogeneity and translational efficiency. *Gene* **233**, 213-224.
- Ibanez, C.F. (1998) Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. [Review]. *Trends Neurosci.* **21**, 438-444.
- Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Yamamoto, K., Thierfelder, W.E., Kreider, B., and Silvennoinen, O. (1994) Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. [Review]. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 222-227.
- Ihle, J.N. and Kerr, I.M. (1995) JAKs and STATs in signaling by the cytokine receptor superfamily. [Review]. *Trends Genet.* **11**, 69-74.
- Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., and Yamamoto, T. (2000) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: Adapter proteins that mediate cytokine signaling. [Review]. *Exp. Cell Res.* **254**, 14-24.
- Ip, N.Y., Ibanez, C.F., Nye, S.H., McClain, J., Jones, P.F., Gies, D.R., Belluscio, L., Le Beau, M.M., Espinosa, R., and Squinto, S.P. (1992) Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3060-3064.
- Ip, Y.T. and Davis, R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. [Review]. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 205-219.

- Irie, S., Hachiya, T., Rabizadeh, S., Maruyama, W., Mukai, J., Li, Y., Reed, J.C., Bredesen, D.E., and Sato, T.A. (1999) Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappa B activation. *FEBS Lett.* **460**, 191-198.
- Ishida, T., Mizushima, S., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Aizawa, S., Watanabe, T., Mosialos, G., Kieff, E., Yamamoto, T., and Inoue, J. (1996) Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J. Biol. Chem.* **271**, 28745-28748.
- Israeli, D., Tessler, E., Haupt, Y., Elkeles, A., Wilder, S., Amson, R., Telerman, A., and Oren, M. (1997) A novel p53-inducible gene, PAG608, encodes a nuclear zinc finger protein whose overexpression promotes apoptosis. *EMBO J.* **16**, 4384-4392.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233-243.
- Itoh, N. and Nagata, S. (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* **268**, 10932-10937.
- Iwabuchi, K., Li, B., Massa, H.F., Trask, B.J., Date, T., and Fields, S. (1998) Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2. *J. Biol. Chem.* **273**, 26061-26068.
- Jackson, R.J. and Standart, N. (1990) Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation?. [Review]. *Cell* **62**, 15-24.
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., and Chao, M. (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* **47**, 545-554.
- Johnson, E.M., Jr., Gorin, P.D., Brandeis, L.D., and Pearson, J. (1980) Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure in utero to maternal antibody to nerve growth factor. *Science* **210**, 916-918.
- Johnson, E.M., Jr., Osborne, P.A., Rydel, R.E., Schmidt, R.E., and Pearson, J. (1983) Characterization of the effects of autoimmune nerve growth factor deprivation in the developing guinea-pig. *Neurosci.* **8**, 631-642.
- Jones, K.R. and Reichardt, L.F. (1990) Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8060-8064.
- Jones, K.R., Farinas, I., Backus, C., and Reichardt, L.F. (1994) Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell* **76**, 989-999.
- Kaisho, Y., Yoshimura, K., and Nakahama, K. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding a novel human neurotrophic factor. *FEBS Lett.* **266**, 187-191.
- Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V., and Parada, L.F. (1991) The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* **252**, 554-558.
- Kaplan, D.R. and Miller, F.D. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. [Review]. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 381-391.
- Kendall S.E., Goldhawk D.E., McDougall K., Kubu C., Barker P. and Verdi J.M. (2000). Expression analysis of NRAGE: A MAGE gene signalling an NGF-dependent p75-apoptosis. *Soc. Neurosci. Abstr.* **26**, 847.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. [Review]. *Brit. J. of Cancer* **26**, 239-257.
- Khursigara, G., Orlinick, J.R., and Chao, M.V. (1999) Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J. Biol. Chem.* **274**, 2597-2600.

- Kim, S.S., Chen, Y.M., O'Leary, E., Witzgall, R., Vidal, M., and Bonventre, J.V. (1996) A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15299-15304.
- Klein, M., Pieri, I., Uhlmann, F., Pfizenmaier, K., and Eisel, U. (1998) Cloning and characterization of promoter and 5'-UTR of the NMDA receptor subunit epsilon 2: evidence for alternative splicing of 5'-non-coding exon. *Gene* **208**, 259-269.
- Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E., and Barbacid, M. (1991a) The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* **65**, 189-197.
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S. A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K.R., Reichardt, L.F., and Barbacid, M. (1991b) The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* **66**, 395-403.
- Klein, R., Smeyne, R.J., Wurst, W., Long, L.K., Auerbach, B.A., Joyner, A.L., and Barbacid, M. (1993) Targeted disruption of the *trkB* neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell* **75**, 113-122.
- Klein, R., Silos-Santiago, I., Smeyne, R.J., Lira, S.A., Brambilla, R., Bryant, S., Zhang, L., Snider, W.D., and Barbacid, M. (1994) Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene *trkC* eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature* **368**, 249-251.
- Klevit, R.E. (1991) Recognition of DNA by Cys2,His2 zinc fingers. *Science* **253**, 1367.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136.
- Klug, A. and Schwabe, J.W. (1995) Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J.* **9**, 597-604.
- Kolodziej, P.A. and Young, R.A. (1991) Epitope tagging and protein surveillance. *Methods Enzym.* **194**, 508-519.
- Kong, H., Kim, A.H., Orlinick, J.R., and Chao, M.V. (1999) A comparison of the cytoplasmic domains of the Fas receptor and the p75 neurotrophin receptor. *Cell Death and Differ.* **6**, 1133-1142.
- Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., and Seeburg, P.H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* **269**, 1737-1740.
- Kornau, H.C., Seeburg, P.H., and Kennedy, M.B. (1997) Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. [Review]. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 368-373.
- Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. [Review]. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8125-8148.
- Kroemer, G. (1997) The proto-oncogene *bcl-2* and its role in regulating apoptosis. [Review]. *Nature Med.* **3**, 614-620.
- Kuner, P. and Hertel, C. (1998) NGF induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line expressing the neurotrophin receptor p75(NTR). *J. Neurosci. Res.* **54**, 465-474.
- Ladiwala, U., Lachance, C., Simoneau, S.J.J., Bhakar, A., Barker, P.A., and Antel, J.P. (1998) P75 neurotrophin receptor expression on adult human oligodendrocytes - signaling without cell death in response to NGF. *J. Neurosci.* **18**, 1297-1304.
- Laird P.W., Zijderfeld A., Linders K., Rudnicki M.A., Jaenisch R., and Berns A. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4293.
- Lamballe, F., Klein, R., and Barbacid, M. (1991) *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* **66**, 967-979.

- Lange, R., Christoph, A., Thiesen, H.J., Vopper, G., Johnson, K.R., Lemaire, L., Plomann, M., Cremer, H., Barthels, D., and Heinlein, U.A. (1995) Developmentally regulated mouse gene NK10 encodes a zinc finger repressor protein with differential DNA-binding domains. *DNA & Cell Biol.* **14**, 971-981.
- Large, T.H., Weskamp, G., Helder, J.C., Radeke, M.J., Misko, T.P., Shooter, E.M., and Reichardt, L.F. (1989) Structure and developmental expression of the nerve growth factor receptor in the chicken central nervous system. *Neuron* **2**, 1123-1134.
- Lathe, R. (1996) Mice, gene targeting and behaviour-more than just genetic background-commentary. *Trends Neurosci.* **19**, 183-186.
- Le Douarin, B., Nielsen, A.L., Garnier, J.M., Ichinose, H., Jeanmougin, F., Losson, R., and Chambon, P. (1996) A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* **15**, 6701-6715.
- Lee, H.J., Hammond, D.N., Large, T.H., Roback, J.D., Sim, J.A., Brown, D.A., Otten, U.H., and Wainer, B.H. (1990) Neuronal properties and trophic activities of immortalized hippocampal cells from embryonic and young adult mice. *J. Neurosci.* **10**, 1779-1787.
- Lee, K.F., Li, E., Huber, L.J., Landis, S.C., Sharpe, A.H., Chao, M.V., and 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**, 737-749.
- Lehmann, M., Fournier, A., Selles-Navarro, I., Dergham, P., Sebok, A., Leclerc, N., Tigyi, G., and McKerracher, L. (1999) Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *J. Neurosci.* **19**, 7537-7547.
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., and Barde, Y.A. (1989) Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* **341**, 149-152.
- Levi-Montalcini, R. und Hamburger, V. (1953). A diffusible agent of mouse sarcoma, producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology* **123**, 233-278.
- Levi-Montalcini, R., und Booker, B. (1960). Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve growth protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **46**, 384-391.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. [Review]. *Cell* **88**, 323-331.
- Lewin, B. (1998) Molekularbiologie der Gene. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*.
- Li, H. and Yuan, J. (1999) Deciphering the pathways of life and death. [Review]. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 261-266.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Liepinsh, E., Ilag, L.L., Otting, G., and Ibanez, C.F. (1997) NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* **16**, 4999-5005.
- Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H., and Ke, N.J. (1999) Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 712-717.
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V., and Karin, M. (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappa B activation prevents cell death. *Cell* **87**, 565-576.
- Lo, D.C. (1995) Neurotrophic factors and synaptic plasticity. [Review]. *Neuron* **15**, 979-981.

- Lo, R.S., and Massague, J. (1999) Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated Smad2. *Nature Cell Biol.* **1**, 472-478.
- Lohrum, M.A. and Vousden, K.H. (2000) Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. [Review]. *Trends Cell Biol.* **10**, 197-202.
- Lovering, R. and Trowsdale, J. (1991) A gene encoding 22 highly related zinc fingers is expressed in lymphoid cell lines. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2921-2928.
- MacPhee, M., Chepenik, K.P., Liddell, R.A., Nelson, K.K., Siracusa, L.D., and Buchberg, A.M. (1995) The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the Mom1 locus, a major modifier of ApcMin-induced intestinal neoplasia. *Cell* **81**, 957-966.
- Maggirwar, S.B., Sarmiere, P.D., Dewhurst, S., and Freeman, R.S. (1998) Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappa B contributes to survival of sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **18**, 10356-10365.
- Mahadeo, D., Kaplan, L., Chao, M.V., and Hempstead, B.L. (1994) High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J. Biol. Chem.* **269**, 6884-6891.
- Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M., and Yancopoulos, G.D. (1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* **247**, 1446-1451.
- Margolin, J.F., Friedman, J.R., Meyer, W.K., Vissing, H., Thiesen, H.J., and Rauscher, F.J. (1994) Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4509-4513.
- Martin-Zanca, D., Hughes, S.H., and Barbacid, M. (1986) A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* **319**, 743-748.
- Martin-Zanca, D., Barbacid, M., and Parada, L.F. (1990) Expression of the trk proto-oncogene is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development. *Genes & Dev.* **4**, 683-694.
- Massague, J., and Wotton, D. (2000) Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. [Review]. *EMBO J.* **19**, 1745-1754.
- Mayer, U., Poschl, E., Nischt, R., Specks, U., Pan, T.C., Chu, M.L., and Timpl, R. (1994) Recombinant expression and properties of the Kunitz-type protease-inhibitor module from human type VI collagen alpha 3(VI) chain. *Eur. J. Biochem.* **225**, 573-580.
- Mazarakis, N., Michalovich, D., Karis, A., Grosveld, F., and Galjart, N. (1996) Zfp-37 is a member of the KRAB zinc finger gene family and is expressed in neurons of the developing and adult CNS. *Genomics* **33**, 247-257.
- McAllister, A.K., Katz, L.C., and Lo, D.C. (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. [Review]. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 295-318.
- McDonald, N.Q., Lapatto, R., Murray-Rust, J., Gunning, J., Wlodawer, A., and Blundell, T.L. (1991) New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* **354**, 411-414.
- McDonald, N.Q. and Hendrickson, W.A. (1993) A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. [Review]. *Cell* **73**, 421-424.
- Miller, F.D. and Kaplan, D.R. (1998) Life and death decisions: a biological role for the p75 neurotrophin receptor. *Cell Death and Differ.* **5**, 343-345.
- Miller, F.D., Pozniak, C.D., and Walsh, G.S. (2000) Neuronal life and death: an essential role for the p53 family. [Review]. *Cell Death and Differ.* **7**, 880-888.

- Montagutelli, X. (2000) Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, S101-S105.
- Moosmann, P., Georgiev, O., Le Douarin, B., Bourquin, J.P., and Schaffner, W. (1996) Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4859-4867.
- Moosmann, P., Georgiev, O., Thiesen, H.J., Hagmann, M., and Schaffner W. (1997) Silencing of RNA polymerases II and III-dependent transcription by the KRAB protein domain of KOX1, a Kruppel-type zinc finger factor. *Biol. Chem.* **378**, 669-677.
- Morrison, R.S., and Kinoshita, Y. (2000) The role of p53 in neuronal cell death. [Review]. *Cell Death and Differ.* **7**, 868-879.
- Mukai, J., Hachiya, T., Shoji-Hoshino, S., Kimura, M.T., Nadano, D, Suvanto, P., Hanaoka, T., Li, Y., Irie, S., Greene, L.A., and Sato, T.A. (2000) NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J. Biol. Chem.* **275**, 17566-17570.
- Müller, H. and Helin, K. (2000) The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. [Review]. *Biochim. Biophys. Acta* **1470**, M1-12.
- Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. [Review]. *Cell* **88**, 355-365.
- Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A. (1997) Caspases - killer proteases. [Review]. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 299-306.
- Obermeier, A., Lammers, R., Wiesmuller, K.H., Jung, G., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1993) Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J. Biol. Chem.* **268**, 22963-22966.
- Obermeier, A., Bradshaw, R.A., Seedorf, K., Choidas, A., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1994) Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *EMBO J.* **13**, 1585-1590.
- Odeberg, J., Rosok, O., Gudmundsson, G.H., Ahmadian, A., Roshani, L., Williams, C., Larsson, C., Ponten, F., Uhlen, M., Asheim, H.C., and Lundberg, J. (1998) Cloning and characterization of ZNF189, a novel human Kruppel-like zinc finger gene localized to chromosome 9q22-q31. *Genomics* **50**, 213-221.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawancka, V., Dellus, H., Massague, J., and Niehrs, C. (1999) Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**, 480-485.
- Oppenheim, R.W. (1991) Cell death during development of the nervous system. [Review]. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**, 453-501.
- Ouchi, T., Lee, S.W., Ouchi, M., Aaronson, S.A., and Horvath, C.M. (2000) Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5208-5213.
- Park, D.S., Farinelli, S.E., and Greene, L.A. (1996) Inhibitors of cyclin-dependent kinases promote survival of post-mitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* **271**, 8161-8169.
- Park, S.H., Liu, X., Hennighausen, L., Davey, H.W., and Waxman, D.J. (1999) Distinctive roles of STAT5a and STAT5b in sexual dimorphism of hepatic P450 gene expression. Impact of STAT5a gene disruption. *J. Biol. Chem.* **274**, 7421-7430.
- Payen, E., Verkerk, T., Michalovich, D., Dreyer, S.D., Winterpacht, A., Lee, B., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F., and Galjart, N. (1998) The centromeric/nucleolar chromatin protein ZFP-37 may function to specify neuronal nuclear domains. *J. Biol. Chem.* **273**, 9099-9109.

- Pengue, G., Calabro, V., Bartoli, P.C., Pagliuca, A., and Lania, L. (1994) Repression of transcriptional activity at a distance by the evolutionarily conserved KRAB domain present in a subfamily of zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2908-2914.
- Pengue, G. and Lania, L. (1996) Kruppel-associated box-mediated repression of RNA polymerase II promoters is influenced by the arrangement of basal promoter elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1015-1020.
- Peralta, E.G., Winslow, J.W., Peterson, G.L., Smith, D.H., Ashkenazi, A., Ramachandran, J., Schimerlik, M.I., and Capon, D.J. (1987) Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. *Science* **236**, 600-605.
- Persson, H., Ayer-Le Lievre, C., Soder, O., Villar, M.J., Metsis, M., Olson, L., Ritzen, M., and Hokfelt, T. (1990) Expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in Sertoli cells downregulated by testosterone. *Science* **247**, 704-707.
- Plagge, A., Kelsey G., and Allen, N.D. (2000) Directed mutagenesis in embryonic stem cells. In: Jackson, I. J. and Abbott C. M. (Editors): *Mouse Genetics and Transgenics, A Practical Approach. Oxford University Press.* 247-289.
- Powers, M.A. and Forbes, D.J. (1994) Cytosolic factors in nuclear transport: what's importin?. [Review]. *Cell* **79**, 931-934.
- Prickett, K.S., Amberg, D.C., and Hopp, T.P. (1989) A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques* **7**, 580-589.
- Proudfoot, N. (2000) Connecting transcription to messenger RNA processing. [Review]. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 290-293.
- Pucci, B., Kasten, M., and Giordano, A. (2000) Cell cycle and apoptosis. [Review]. *Neoplasia* **2**, 291-299.
- Purves, D. (1988) *Body and brain: a trophic theory of neural connections. Harvard University Press, Cambridge, MA.*
- Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L.T., Yang, J., Bitler, C.M., Butcher, L.L., and Bredesen, D.E. (1993) Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* **261**, 345-348.
- Radeke, M.J., Misko, T.P., Hsu, C., Herzenberg, L.A., and Shooter, E.M. (1987) Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* **325**, 593-597.
- Reynolds, K., Zimmer, A.M., and Zimmer, A. (1996) Regulation of RAR beta 2 mRNA expression: evidence for an inhibitory peptide encoded in the 5'-untranslated region. *J. Cell Biol.* **134**, 827-835.
- Riccio, A., Pierchala, B.A., Ciarallo, C.L., and Ginty, D.D. (1997) An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. *Science* **277**, 1097-1100.
- Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C.M., Blendy, J.A., and Ginty, D.D. (1999) Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* **286**, 2358-2361.
- Rodriguez-Tébar, A. and Barde, Y.A. (1988) Binding characteristics of brain-derived neurotrophic factor to its receptors on neurons from the chick embryo. *J. Neurosci.* **8**, 3337-3342.
- Rodriguez-Tébar, A., Dechant, G., and Barde, Y.A. (1990) Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* **4**, 487-492.
- Rohrer, H., Hofer, M., Hellweg, R., Korsching, S., Stehle, A.D., Saadat, S., and Thoenen, H. (1988) Antibodies against mouse nerve growth factor interfere in vivo with the development of avian sensory and sympathetic neurones. *Development* **103**, 545-552.

- Rosati, M., Marino, M., Franze, A., Tramontano, A., and Grimaldi, G. (1991) Members of the zinc finger protein gene family sharing a conserved N-terminal module. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5661-5667.
- Rosenthal, A., Goeddel, D.V., Nguyen, T., Lewis, M., Shih, A., Laramée, G.R., Nikolics, K., and Winslow, J.W. (1990) Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* **4**, 767-773.
- Ross, A.H., Daou, M.C., McKinnon, C.A., Condon, P.J., Lachyankar, M.B., Stephens, R.M., Kaplan, D.R., and Wolf, D.E. (1996) The neurotrophin receptor, gp75, forms a complex with the receptor tyrosine kinase TrkA. *J. Cell Biol.* **132**, 945-953.
- Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., and Goeddel, D.V. (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**, 681-692.
- Roux, P.P., Colicos, M.A., Barker, P.A., and Kennedy, T.E. (1999) p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *J. Neurosci.* **19**, 6887-6896.
- Roy, N., Laflamme, G., and Raymond, V. (1992) 5' untranslated sequences modulate rapid mRNA degradation mediated by 3' AU-rich element in v-c-fos recombinants. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5753-5762.
- Ryan, R.F., Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Singh, P.B., Friedman, J.R., Fredericks, W.J., and Rauscher, F.J. (1999) KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4366-4378.
- Salehi, A.H., Roux, P.P., Kubu, C.J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L.L., Verdi, J.M., and Barker, P.A. (2000) NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* **27**, 279-288.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory press.*
- Saragovi, H.U., und Gehring, K. (2000) Development of pharmacological agents for targeting neurotrophins and their receptors. [Review]. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 93-98.
- Sariola, H., Saarma, M., Sainio, K., Arumae, U., Palgi, J., Vaahtokari, A., Thesleff, I., and Karavanov, A. (1991) Dependence of kidney morphogenesis on the expression of nerve growth factor receptor. *Science* **254**, 571-573.
- von Schack, D. (1998). Einfluß von NGF und NT3 auf die Entwicklung sympathischer Neuronen des Huhns. Klonierung und Charakterisierung einer neuen Spleißvariante des p75 Neurotrophinrezeptors. Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- von Schack, D., Casademunt, E., Schweigreiter, R., Meyer, M., Bibel, M. and Dechant, G. (2001) A novel targeted mutation of the neurotrophin receptor p75 causes defects both in the nervous and the vascular systems. (Eingereicht zur Publikation).
- Schechter, A.L. and Bothwell, M.A. (1981) Nerve growth factor receptors on PC12 cells: evidence for two receptor classes with differing cytoskeletal association. *Cell* **24**, 867-874.
- Schuh, R., Aicher, W., Gaul, U., Cote, S., Preiss, A., Maier, D., Seifert, E., Nauber, U., Schroder, C., and Kemler, R. (1986) A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Kruppel, a Drosophila segmentation gene. *Cell* **47**, 1025-1032.
- Schumacher, C., Wang, H., Honer, C., Ding, W., Koehn, J., Lawrence, Q., Coulis, C.M., Wang, L.L., Ballinger, D., Bowen, B.R., and Wagner, S. (2000) The SCAN domain mediates selective oligomerization. *J. Biol. Chem.* **275**, 17173-17179.

- Schuman, E.M. (1999) Neurotrophin regulation of synaptic transmission. [Review]. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 105-109.
- Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Urbanek, P., Busslinger, M., and Gruss, P. (1997) Conserved biological function between Pax-2 and Pax-5 in midbrain and cerebellum development: evidence from targeted mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14518-14523.
- Sedel, F., Bechade, C., and Triller, A. (1999) Nerve growth factor (NGF) induces motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 3904-3912.
- Segal, R.A. and Greenberg, M.E. (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. [Review]. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 463-489.
- Shannon, M., Ashworth, L.K., Mucenski, M.L., Lamerdin, J.E., Branscomb, E., and Stubbs, L. (1996) Comparative analysis of a conserved zinc finger gene cluster on human chromosome 19q and mouse chromosome 7. *Genomics* **33**, 112-120.
- Shannon, M. and Stubbs, L. (1998) Analysis of homologous XRCC1-linked zinc-finger gene families in human and mouse: evidence for orthologous genes. *Genomics* **49**, 112-121.
- Shen, S.J., Daimon, M., Wang, C.Y., Jansen, M., and Ilan, J. (1988) Isolation of an insulin-like growth factor II cDNA with a unique 5' untranslated region from human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1947-1951.
- Shieh, P.B., Hu, S.C., Bobb, K., Timmusk, T., and Ghosh, A. (1998) Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* **20**, 727-740.
- Sibilia, M. and Wagner, E.F. (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor [published erratum in *Science* (1995) **269**, 909]. *Science* **269**, 234-238.
- Silver, P.A. (1991) How proteins enter the nucleus. [Review]. *Cell* **64**, 489-497.
- Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A., and Barbacid, M. (1994) Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* **368**, 246-249.
- Snider, W.D. (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. [Review]. *Cell* **77**, 627-638.
- Sobol, R.W., Horton, J.K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R.K., Prasad, R., Rajewsky, K., and Wilson, S.H. (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair [published errata in *Nature* (1996) **379**, 848 and (1996) **383**, 457]. *Nature* **379**, 183-186.
- Soilu-Hänninen, M., Ekert, P., Bucci, T., Syroid, D., Bartlett, P.F., and Kilpatrick, T.J. (1999) Nerve growth factor signaling through p75 induces apoptosis in Schwann cells via a Bcl-2-independent pathway. *J. Neurosci.* **19**, 4828-4838.
- Soppet, D., Escandon, E., Maragos, J., Middlemas, D.S., Reid, S.W., Blair, J., Burton, L.E., Stanton, B.R., Kaplan, D.R., and Hunter, T. (1991) The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* **65**, 895-903.
- Spengler, D., Villalba, M., Hoffmann, A., Pantaloni, C., Houssami, S., Bockaert, J., and Journot, L. (1997) Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain. *EMBO J.* **16**, 2814-2825.
- Spiegel, S., Foster, D., and Kolesnick, R. (1996) Signal transduction through lipid second messengers. [Review]. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 159-167.
- Squinto, S.P., Stitt, T.N., Aldrich, T.H., Davis, S., Bianco, S.M., Radziejewski, C., Glass, D.J., Masiakowski, P., Furth, M.E., and Valenzuela, D.M. (1991) trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* **65**, 885-893.

- Stephens, R.M., Loeb, D.M., Copeland, T.D., Pawson, T., Greene, L.A., and Kaplan, D.R. (1994) Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* **12**, 691-705.
- Stoss, O., Schwaiger, F.W., Cooper, T.A., Stamm, S. (1999) Alternative splicing determines the intracellular localization of the novel nuclear protein Nop30 and its interaction with the splicing factor SRp30c. *J. Biol. Chem.* **274**, 10951-10962.
- Stubbs, L., Carver, E.A., Shannon, M.E., Kim, J., Geisler, J., Generoso, E.E., Stanford, B.G., Dunn, W. C., Mohrenweiser, H., Zimmermann, W., Watt, S.M., and Ashworth, L.K. (1996) Detailed comparative map of human chromosome 19q and related regions of the mouse genome. *Genomics* **35**, 499-508.
- Stucky, C.L. and Koltzenburg, M. (1997) The low-affinity neurotrophin receptor p75 regulates the function but not the selective survival of specific subpopulations of sensory neurons. *J. Neurosci.* **17**, 4398-4405.
- Sun, X.H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Baltimore, D. (1991) Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5603-5611.
- Sutter, A., Riopelle, R.J., Harris-Warrick, R.M., and Shooter, E.M. (1979) Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J. Biol. Chem.* **254**, 5972-5982.
- Taniuchi, M., Clark, H.B., and Johnson, E.M., Jr. (1986) Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4094-4098.
- Taniuchi, M., Clark, H.B., Schweitzer, J.B., and Johnson, E.M., Jr. (1988) Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *J. Neurosci.* **8**, 664-681.
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., and Greenberg, M.E. (1998) Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* **20**, 709-726.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H., and Goeddel, D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**, 845-853.
- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., and Ihle, J.N. (1998) Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* **93**, 841-850.
- Thoenen, H. (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. [Review]. *Science* **270**, 593-598.
- Thomson, T.M., Rettig, W.J., Chesa, P.G., Green, S.H., Mena, A.C., and Old, L.J. (1988) Expression of human nerve growth factor receptor on cells derived from all three germ layers. *Exp. Cell Res.* **174**, 533-539.
- Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., and Harris, R.C. (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* **269**, 230-234.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., and Persson, H. (1993) Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* **10**, 475-489.
- Tommerup, N. and Vissing, H. (1995) Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNAs identify putative candidate genes for developmental and malignant disorders. *Genomics* **27**, 259-264.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**, 1097-1099.

- Tsujimoto, Y., Jaffe, E., Cossman, J., Gorham, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1985) Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* **315**, 340-343.
- Upadhyaya, P., Churchill, G., Birkenmeier, E.H., Barker, J.E., and Frankel, W.N. (1999) Genetic modifiers of polycystic kidney disease in intersubspecific KAT2J mutants. *Genomics* **58**, 129-137.
- Vaillant, A.R., Mazzoni, I., Tudan, C., Boudreau, M., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (1999) Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J. Cell Biol.* **146**, 955-966.
- Varrault, A., Ciani, E., Apiou, F., Bilanges, B., Hoffmann, A., Pantaloni, C., Bockaert, J., Spengler, D., and Journot, L. (1998) hZAC encodes a zinc finger protein with antiproliferative properties and maps to a chromosomal region frequently lost in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8835-8840.
- Vaux, D.L. and Korsmeyer, S.J. (1999) Cell death in development. [Review]. *Cell* **96**, 245-254.
- Verdi, J.M., Birren, S.J., Ibanez, C.F., Persson, H., Kaplan, D.R., Benedetti, M., Chao, M.V., and Anderson, D.J. (1994) p75LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron* **12**, 733-745.
- Wallach, D. (1997) Cell death induction by TNF - a matter of self control. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 107-109.
- Williams, A.J., Khachigian, L.M., Shows, T., and Collins, T. (1995) Isolation and characterization of a novel zinc-finger protein with transcription repressor activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 22143-22152.
- Williams, A.J., Blacklow, S.C., and Collins, T. (1999) The zinc finger-associated SCAN box is a conserved oligomerization domain. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8526-8535.
- Witzgall, R., O'Leary, E., Leaf, A., Onaldi, D., and Bonventre, J.V. (1994) The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4514-4518.
- Wolf, I. and Rohrschneider, L.R. (1999) Fiz1, a novel zinc finger protein interacting with the receptor tyrosine kinase Flt3. *J. Biol. Chem.* **274**, 21478-21484.
- Wood, M.W., VanDongen, H.M., and VanDongen, A.M. (1996) The 5'-untranslated region of the N-methyl-D-aspartate receptor NR2A subunit controls efficiency of translation. *J. Biol. Chem.* **271**, 8115-8120.
- Xiang, H., Kinoshita, Y., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J., Schwartzkroin, P.A., and Morrison, R.S. (1998) Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. *J. Neurosci.* **18**, 1363-1373.
- Xie, Y.M., Tisi, M.A., Yeo, T.T., and Longo, F.M. (2000) Nerve growth factor (NGF) loop 4 dimeric mimetics activate ERK and AKT and promote NGF-like neurotrophic effects. *J. Biol. Chem.* **275**, 29868-29874.
- Yamashita, T., Tucker, K.L., and Barde, Y.A. (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* **24**, 585-593.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., and Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-1132.
- Yang, M., May, W.S., and Ito, T. (1999) JAZ requires the double-stranded RNA-binding zinc finger motifs for nuclear localization. *J. Biol. Chem.* **274**, 27399-27406.
- Yano, K., Ueki, N., Oda, T., Seki, N., Masuho, Y., and Muramatsu, M. (2000) Identification and characterization of human ZNF274 cDNA, which encodes a novel kruppel-type zinc-finger protein having nucleolar targeting ability. *Genomics* **65**, 75-80.

Yao, R. and Cooper, G.M. (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* **267**, 2003-2006.

Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J.J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C.A., Reed, J.C., and Bredesen, D. E. (1999) TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J. Biol. Chem.* **274**, 30202-30208.

Yoon, S.O., Casaccia-Bonnel, P., Carter, B., and Chao, M.V. (1998) Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J. Neurosci.* **18**, 3273-3281.

Zhou, C., Yang, Y., and Jong, A.Y. (1990) Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**, 172-173.

Zindy, F., Quelle, D.E., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1997) Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* **15**, 203-211.

## Danksagung

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Herrn Prof. Dr. Yves-Alain Barde danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein Interesse an meiner Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine guten Ideen. Ich bin ihm auch sehr dankbar, daß er viel Verständnis dafür hatte, wenn Experimente nicht so schnell wie erhofft funktionierten und für seine Motivationsfähigkeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Elisabeth Casademunt, von der ich in den letzten Jahren viel gelernt habe, für die Betreuung dieser Arbeit. Sie war jederzeit unmittelbare Ansprechpartnerin bei praktischen und theoretischen Problemen, gab mir viele Ratschläge und ließ mich dennoch sehr frei meine eigenen Ideen entwickeln.

Olusegun Momoh, der viel zum reibungslosen Ablauf des Laboralltags beitrug, danke ich für seine zuverlässige Unterstützung bei der Arbeit mit Mäusen.

Allen Mitgliedern der Abteilung Neurobiochemie und der Nachwuchsgruppen möchte ich für die große Hilfsbereitschaft, interessante Gespräche und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Besonderer Dank gilt Dr. Georg Dechant, von dem ich das Arbeiten mit iodierten Neurotrophinen und die „Crosslinking“-Experimente lernte, Dr. Roland Friedel für Hilfe und Anregungen bei Experimenten und Computerproblemen sowie Dr. Harry Schnürch, Tim Hucho, Dr. Miriam Bibel und Lothar Lindemann für Ratschläge bezüglich Molekularbiologie, Proteinchemie und Zellkultur-Techniken. Außerdem danke ich Dr. Toshihide Yamashita, Dr. Stefan Grimm und Dr. Bruce Carter, der gemeinsam mit Elisabeth die Grundlage für dieses Projekt schuf, für Plasmide und Zelllinien.

Den Mitgliedern der Zeichenstelle, James Chalcraft und Robert Schorner, danke ich für ihre Hilfe bei Problemen mit Graphikprogrammen und „Scannern“, den Mitgliedern der EDV-Gruppe für das Instandhalten von Computern und Druckern.

Vielen Dank auch an meine Freunde für viele schöne Aktivitäten außerhalb des Laboralltags sowie speziell an Anja Jestel, Dr. Jean Hani, Marion Thellmann und Pinar Sirim für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit und an Dr. Claus Weigand, der mich in die Geheimnisse von „Microsoft Word“ einweihte. Dr. Andreas Goppelt danke für die Durchsicht dieser Arbeit, für seine Ratschläge (die ich nicht immer befolgt habe), sich auf die wichtigen Fragen eines Projekts zu konzentrieren und Rückschläge im Labor nicht zu schwer zu nehmen und für viel Verständnis und Geduld.

Zuletzt möchte ich noch ganz herzlich meinen Eltern danken, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich auch sonst auf vielfältige Weise unterstützten.

## Lebenslauf

Name: Isabel Marjolaine Benzel  
Geburtsdatum: 04. September 1971  
Geburtsort: Karlsruhe  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1977 bis 1979 Grundschule in Stutensee-Blankenloch  
1979 bis 1981 Grundschule in Karlsbad-Auerbach  
1981 bis 1990 Gymnasium Karlsbad in Karlsbad-Langensteinbach  
05/1990 Allgemeine Hochschulreife

### Studium

10/1990 bis 02/1996 Studium der Biochemie (Diplom) an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen (Vordiplom 03/1993)  
11/1993-03/1994 Praktikum am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen  
(Abt. Genetik)  
04/1994-03/1995 Praktisches Jahr am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried  
03/1996 bis 11/1996 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen bei Prof.  
Dr. Overath (Abt. Membranbiochemie)  
Thema: „Sortierung von Membranproteinen in *Leishmania*: Deletion  
und Mutagenese des Gens der membrangebundenen sauren  
Phosphatase“  
12/1996 bis 01/1997 Wissenschaftliche Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Biologie in  
Tübingen  
04/1991 bis 09/1996 Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes  
ab 04/1997 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried  
bei Prof. Dr. Yves-Alain Barde (Abt. Neurobiochemie)