

**Untersuchungen über die funktionelle Rolle
des Neurotrophinrezeptors p75 basierend
auf embryonalen Stammzellen der Maus**

Inauguraldissertation

zur

**Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel**

von

**Christine Annaheim
Lostorf, Schweiz**

Basel, 2008

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag von

Prof. Markus Rüegg und Prof. Yves-Alain Barde

Basel, den 18. September 2007

Prof. Hans-Peter Hauri
Dekan

Zusammenfassung

Neurotrophine sind für das sich entwickelnde und adulte Nervensystem von Vertebraten unabdingbar. Sie wirken über zwei Arten von Rezeptoren, die Trk-Rezeptoren und den Neurotrophin-Rezeptor p75 (p75^{NTR}). Während die Wirkungsweise und Signalwege der Trk's mittlerweile gut verstanden sind, so ergab die Untersuchung von p75^{NTR} gerade in den letzten Jahren überraschende, teilweise auch widersprüchliche Resultate. Ein Grund dafür liegt darin, dass p75^{NTR} keine eigene enzymatische Funktion besitzt, sondern für die Signaltransduktion zelluläre Interaktoren benutzt und somit je nach zellulärem Kontext unterschiedliche und sogar gegensätzliche Funktionen ausüben kann wie Zellüberleben oder Zelltod. Darüber hinaus liessen auch die bisher angewendeten zelluläre Systeme aussagekräftige Analysen selten zu.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, durch die Etablierung neuer Systeme eine weiterführende Aufklärung der Funktionsweise von p75^{NTR} zu ermöglichen. Zu Beginn stand die Generierung von Mauslinien im Vordergrund, welche es erlauben würden, p75^{NTR} gewebe- und zeitspezifisch auszuschalten. Dieser Ansatz sollte offene Fragen um p75^{NTR} angehen, so z.B. die Frage nach der Funktion von p75^{NTR} im cholinergen System des basalen Vorderhirns im adulten Organismus. Die dafür erforderlichen embryonalen Stammzellen mit entweder einer konditionalen Mutation von p75^{NTR} oder einer Insertion einer induzierbaren Cre-Rekombinase im *tau*-Lokus (*tau*-CreERT2) wurden generiert, die Zellen kolonisierten jedoch nicht die Keimbahn.

Diese Schwierigkeit führte zu einem Wechsel von dem genannten *in vivo*-Ansatz zu einem äusserst attraktiven *in vitro*-System, nämlich die ES-Zell-basierte Differenzierung in Neurone, welche parallel in der Arbeitsgruppe etabliert worden ist. Dieses System ermöglichte einerseits, die Wirkungsweise des induzierbaren-Cre-Systems promoterspezifisch und in Neuronen - der Zielpopulation dieses Ansatzes - *in vitro* zu testen. Andererseits wurde es für die Untersuchung von p75^{NTR} genutzt, indem ES-Zellen mit einer Deletion von p75^{NTR} Exon IV in beiden Allelen generiert wurden (*p75^{NTR}-/-*). p75^{NTR} erwies sich in den aus ES-Zellen differenzierten Neuronen als Neuriteninhibitor, indem in der Deletionsmutante vermehrte Neuritenverzweigungen, hingegen in einer Überexpressionsmutante (*tau;p75^{NTR}*) verminderte Neuritenverzweigungen gezählt wurden. Als zweites Phänomen wurde eine erhöhte Zelltodrate interessanterweise sowohl in Abwesenheit als auch bei einer Überexpression von p75^{NTR} beobachtet. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen hingegen sind völlig verschieden. Die Überexpression von p75^{NTR} führte zu einer Hochregulation von Galectin-1, welches sich als ein neuer Effektor in der Degeneration von Neuriten herausstellte (Plachta et al., 2007). Die erhöhte Zelltodesrate in den *p75^{NTR}-/-* Neuronen hingegen erwies sich als Folge einer verminderten Aktivierung von NF-κB. Eine Genexpressionsanalyse bildete den Abschluss der Untersuchungen um p75^{NTR} und eröffnet mit interessanten unterschiedlich regulierten Genen die Möglichkeit, diese als neue Zielgene von p75^{NTR} zu verifizieren und möglicherweise die molekularen Erklärungen für die oben genannten phänotypischen Ausprägungen zu erweitern.

Um das Potential der differenzierten ES-Zellen auch in einem *in vivo*-Kontext zu explorieren, wurden diese in hippocampale Schnittkulturen transplantiert. Die noch vorläufigen Ergebnisse zeigen, dass eine gute Integration der Neurone in das lokale Gewebe erfolgt und funktionelle Netzwerke ausgebildet werden. Zukünftige Experimente werden zeigen, ob diese beobachtete Integration auch von Bedeutung für die Funktion im lebenden Organismus ist. Dies wird momentan durch Transplantationen in Läsionsmodelle der Maus in Zusammenarbeit mit dem Labor von M. Schwab, Zürich CH, untersucht.

Danksagung

Als erstes möchte ich Yves ganz herzlich danken für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und der Überlassung eines Themas, welches auf mein Interesse perfekt zugeschnitten war. Besonders geschätzt habe ich seine individuelle und sorgfältige Art zu Denken und die unübliche Gewährung von grossen Freiheiten in der Gestaltung des Projektes. Er hat mein Thema stets wachsam verfolgt und die Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen vermittelt und gefördert, wodurch bereichernde Begegnungen entstehen konnten.

Weiter möchte ich Yong Ho Che ganz herzlich danken für seine hervorragende Vorarbeit mit der Generierung des Konstruktes für die konditionale $p75^{NTR}$ -Mutation und seine Einführung in die praktische Laborarbeit während der ersten zwei Monate, was mir den Sprung ins kalte Wasser wesentlich erleichtert hat. Ebenfalls dazu beigetragen haben Rüdiger Schweigreiter mit seinem grossen Wissen über $p75^{NTR}$, Lothar Lindemann mit seinen guten Ratschlägen bzgl. Klonierung und Mausearbeit und Kerry Tucker, welcher nicht nur die Grundarbeit zum *tau*-Lokus und -Promoter geleistet hat, sondern auch viele Protokolle vermittelt hat, welche bis heute unverändert in Gebrauch sind.

Ganz herzlichen Dank möchte ich Christian Kaltschmidt, Barbara Kaltschmidt und Aljoscha Kaus aussprechen für die fruchtbare Zusammenarbeit, für die Bereitschaft, ihre grosse Erfahrung bzgl. NF- κ B mit uns zu teilen und auch für die schöne Gastfreundschaft, mit der sie mich während der paar Tage in Witten aufgenommen haben.

Besonderer Dank gilt auch Michael Frotscher für seine Zusammenarbeit und Interesse bzgl. der Transplantationsexperimente in hippocampale Schnittkulturen. Dabei hat Sandra Dieni bereitwillig das Protokoll für die Schnittkulturen zur Verfügung gestellt und Oliver Kretz die elektronenmikroskopischen Bilder dafür angefertigt. Ganz herzlich danken möchte ich auch Imre Vida, der mich während mehrerer Tage in die Geheimnisse der Elektrophysiologie eingeführt hat und mit viel Geduld die transplantierten Zellen gepatcht und analysiert hat.

Weiter dankend erwähnen möchte ich:

Annick Werner, welche mir bei der Generierung der $p75^{NTR-/-}$ ES-Zellen zur Seite gestanden ist und Melanie Rittirsch, welche den Transfer von tau-GFP in die $p75^{NTR-/-}$ Zellen gemacht hat. Daniela Nebenius-Oosthuizen und ihrer Arbeitsgruppe, welche mit grossem Effort unzählige Injektionen von ES-Zellen in Blastozysten ausgeführt hat und Frank Zimmermann, welcher dieselbe Arbeit in Heidelberg, DE gemacht hat. Philippe Demougin ist mir bei der Durchführung der Genexpressionsanalyse mit professioneller Hilfe zur Seite gestanden.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinen ehemaligen und jetzigen Kolleginnen und Kollegen, Katrin Schrenk, Miriam Bibel, Siro Perez, Sumudhu Walmsley-Perera, Rita Andraos, Nicolas Plachta, Ulrike Wenzler, Stephanie Rauskolb, Tomoya Matsumoto, Vassiliki Nikoletopoulou, Rubén Deogracias, Mihai Ionescu, Morteza Yazdani und Vincent Bischoff für die vielen interessanten Gespräche über Wissenschaft und Anderes.

<u>1. Einleitung</u>	1
1.1 Der Neurotrophin Rezeptor p75	2
1.1.1 Struktur von p75 ^{NTR}	2
1.1.2 Signalwege von p75 ^{NTR}	5
1.1.3 Funktion von p75 ^{NTR}	8
1.2 Embryonale Stammzellen	13
1.2.1 Herkunft und Eigenschaften von Embryonalen Stammzellen	13
1.2.2 <i>In vitro</i> -Differenzierung von ES-Zellen in neuronale Zellen	17
1.2.3 Radiale Gliazellen als neuronale Vorläuferzellen	19
<u>2. Material und Methoden</u>	21
2.1 Material	21
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	21
2.1.2 Plasmide	22
2.1.3 Enzyme	22
2.1.4 Kits	22
2.1.5 Oligonukleotide	22
2.1.6 Neurotrophine	23
2.1.7 Zellkulturmedien	23
2.1.8 Lösungen	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	26
2.2.2 Proteinchemische Methoden	28
2.2.3 Immunzytochemische Methoden	30
2.2.4 Zellbiologische Methoden	31
2.2.5 Hippocampale Schnittkulturen	34
<u>3. Ergebnisse</u>	37
3.1. Generierung mutanter Mauslinien zur zelltyp- und zeitspezifischer Deletion von p75^{NTR}	37
3.1.1 Generierung einer konditionalen p75 ^{NTR} -ES-Zelllinie	37
3.1.1.1 Design und Klonierung des Rekombinationskonstruktes	38
3.1.1.2 Homologe Rekombination in ES-Zellen	39
3.1.1.3 Entfernung der Selektionskassette mit Cre-Plasmid	41
3.1.2 Generierung einer ES-Zelllinie mit einem induzierbaren Cre-System	43
3.1.2.1 Klonierung des Rekombinationskonstruktes <i>tau</i> -CreERT2	44
3.1.2.2 Homologe Rekombination von pTAU-CreERT2 in ES-Zellen	46
3.1.3 Karyotypisierung der rekombinierten ES-Klone	48
3.1.4 Erzeugung von Chimären mittels Blastozysteninjektion	49
3.2 In vitro-Analyse des induzierbaren Cre-System mittels Differenzierung von ES-Zellen in Neuronen	51
3.2.1 Generierung einer ES-Linie mit einer konditionalen p75 ^{NTR} -Mutation und CreERT2-Expression vom <i>tau</i> -Lokus	52
3.2.2 Expression von CreERT2 in Neuronen auf RNA-Ebene	52
3.2.3 Translokation von CreERT2 vom Zytoplasma in den Zellkern nach Applikation von 4-hydroxy-Tamoxifen	53
3.2.4 Exzision von ExonIV nach Applikation von 4-hydroxy-Tamoxifen	55
3.3 Untersuchung der Rolle von p75^{NTR} basierend auf einem ES-Zell-Differenzierungssystem	56
3.3.1 Generierung der p75 ^{NTR} ^{-/-} ES-Zelllinie	57
3.3.2 Vollständige Abwesenheit von p75 ^{NTR} auf Proteinebene in den p75 ^{NTR} ^{-/-} Neuronen	61
3.3.3 Charakterisierung der neuronalen Vorläuferzellen und Neuronen in Hinblick auf den zellulären Subtyp	62

3.3.4 Analyse des Zellzyklus in p75 ^{NTR} -/- neuronalen Vorläuferzellen	63
3.3.5 Zellautonomer Effekt von p75 ^{NTR} auf die Verzweigungen der Neuriten	65
3.3.6 Neuritendegeneration durch p75 ^{NTR}	67
3.3.7 Die Rolle von p75 ^{NTR} im Überleben	69
3.3.8 p75 ^{NTR} und NF-κB	73
3.3.9 Genexpressionsanalyse in ES-Zell-Neuronen	79
3.4 Integrationspotential von neuronalen Vorläuferzellen nach Transplantation in hippocampale Schnittkulturen	98
3.4.1 Integration und Projektion der transplantierten Zellen	99
3.4.2 Elektrophysiologische Untersuchung der transplantierten Zellen	101
<u>4. Diskussion</u>	107
4.1 <i>In vivo</i>-Modell mit zell-und zeitspezifischer Deletion von p75^{NTR}	107
4.2 <i>In vitro</i>-Analyse des induzierbaren Cre-System mittels Differenzierung von ES-Zellen in Neuronen	109
4.3 Untersuchung der Rolle von p75^{NTR} basierend auf einem ES-Zell-Differenzierungssystem	111
4.4 Integrationspotential von neuronalen Vorläuferzellen nach Transplantation in hippocampale Schnittkulturen	122
4.5 Ausblick	126
<u>5. Abkürzungen</u>	127
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	131

1. Einleitung

Die ausserordentliche Komplexität des Nervensystems von Wirbeltieren erfordert ein fein abgestimmtes Zusammenspiel der zugrundeliegenden Mechanismen sowohl während der Entwicklung, als auch im Adulten. Das menschliche Gehirn umfasst beispielsweise ca. 8.5 Billionen Neuronen und nicht nur diese Zahl von Neuronen, sondern auch deren örtliche Spezialisierung und Projektionen sollen sich während der Embryonalentwicklung und im Verlauf des Wachstums den Bedürfnissen des Körpers und der Umwelt anpassen können. Die Regulierung dieser Vorgänge erfolgt einerseits über das intrinsische Programm der Transkription und andererseits über extrinsische Signale von anderen Zellen. Zudem wird in Wirbeltieren eine hohe Flexibilität dadurch erreicht, dass das Nervensystem aus einem ursprünglich grossen Überschuss von Neuronen moduliert werden kann, wobei nur diejenigen Neuronen überleben, welche funktionelle Kontakte etablieren konnten. Dabei spielen neurotrophe Faktoren eine Schlüsselrolle, indem sie je nach Kontext das Überleben fördern oder auch gezielt Zellen durch Auslösen von Apoptose zum Absterben bringen. Wie der Name nahelegt, regulieren sie aber auch das Wachstum der Nervenzelle selbst, die Länge der Neuriten und deren Verzweigungen. Darüber hinaus modulieren neurotrophe Faktoren im adulten Organismus auch die synaptische Transmission und tragen so zu einer Besonderheit der Nervensystemen von Wirbeltieren bei, nämlich der synaptischen Plastizität.

Eine neurotrophe Funktion wird Proteinen aus verschiedenen Genfamilien zugeschrieben, unter anderen 'Glial-derived neurotrophic factor' (GDNF) oder den neurotrophen Cytokinen einschliesslich 'ciliary neurotrophic factor (CNTF), 'leukemia inhibitory factor (LIF), cardiotrophin-1 (CT-1) und interleukin-6 (IL-6). Die am besten untersuchten neurotrophen Faktoren sind jedoch die Neurotrophine, welche in Sequenz und Struktur grosse Ähnlichkeiten untereinander aufweisen (für eine Übersicht siehe Barde, Y.-A., 1990, Bibel and Barde, 2000, Huang and Reichardt, 2001). Sie bilden eine Genfamilie, welche in Säugetieren 4 Mitglieder umfasst: 'Nerve growth factor' (NGF), 'Brain-derived neurotrophic factor' (BDNF), 'Neurotrophin 3' (NT3) und 'Neurotrophin 4' (NT4). Ihre Funktion üben sie hauptsächlich über zwei Typen von Rezeptoren aus, den Trk-Rezeptoren (Tropomyosin-receptor-kinase) und den Neurotrophinrezeptor p75 (p75^{NTR}). Dieses duale System erlaubt die Übertragung von vielen verschiedenen Signalen, welche von Überleben durch die Trk-Rezeptoren bis hin zum Auslösen von Zelltod über p75^{NTR} gehen kann. Dadurch, dass die beiden Rezeptoren physikalisch und funktionell interagieren können (Huber and Chao, 1995; Gargano, et al., 1997; Bibel et al., 1999), besteht die Möglichkeit von 'Feintuning' und

'Crosstalk'. Da der Fokus dieser Arbeit vorallem auf p75^{NTR} liegt, sollen hier die Trk-Rezeptoren nur kurz beschrieben werden:

Die Trk-Rezeptoren gehören zu der Familie der Tyrosinkinase und es existieren in Wirbeltieren 3 verschiedene Gene: TrkA wurde zuerst als der Rezeptor für NGF beschrieben (Kaplan et al., 1991; Klein et al., 1991), gefolgt von TrkB und TrkC (für eine Übersicht siehe Barbacid, 1994). NGF bindet vorzugsweise an TrkA, BDNF und NT-4 an TrkB und NT-3 an TrkC, wobei diese Spezifitäten nicht absolut sind, indem NT-3 auch an TrkA und TrkB binden kann. Während die extrazellulären Domänen der Trks Unterschiede in der Sequenz aufweisen, zeigen die Tyrosin-Kinase-Domänen eine hohe Homologie (ca. 80% der Aminosäuren identisch). Die Aktivierung der Trks erfolgt über Neurotrophin-Dimere, welche eine Dimerisierung der Rezeptoren bedingen und damit eine Autophosphorylierung von drei Tyrosinresten im so genannten 'activation loop'. Die dadurch bedingte Strukturänderung exponiert zwei weitere Tyrosinreste, die ebenfalls phosphoryliert werden. Diese beiden Tyrosinreste dienen als Binde- und Aktivierungsstelle für Andockproteine, welche über weitere Adapterproteine schliesslich drei grosse Signalkaskaden auslösen können: den Ras-Raf-MEK-MAPK-Weg, den PI3K-Akt-Weg sowie den PLC γ -PKC-Weg. Je nach zellulärem Kontext ermöglichen diese Signalwege verschiedene Effekte wie neuronale Differenzierung und Neuritenwachstum, neuronales Überleben bis hin zur Modulation der synaptischen Plastizität.

Die Vermutung, dass durch die hohe Homologie der Tyrosin-Kinase-Domäne der Trks auch weitgehend dieselben Signalwege rekrutiert werden, scheint sich nur teilweise zu bewahrheiten. Ein Beispiel mit sympathischen Neuronen zeigte, dass die Aktivierung von TrkA durch NGF einen anderen Effekt zeigte als die Aktivierung von TrkC mit NT-3 (Belliveau et al., 1997). Sogar die Aktivierung desselben Trk-Rezeptors mit unterschiedlichen Liganden scheint verschiedene Antworten auszulösen (Fan et al., 2000). Die unzähligen Spleissvarianten der Trk-Rezeptoren, insbesondere zwei trunkierte Spleissvarianten von TrkB, T1 und T2 (Klein et al., 1990; Middlemas et al., 1991) erhöhen die Komplexität der Funktionsweise der Trks.

1.1 Der Neurotrophin-Rezeptor p75

1.1.1 Struktur von p75^{NTR}

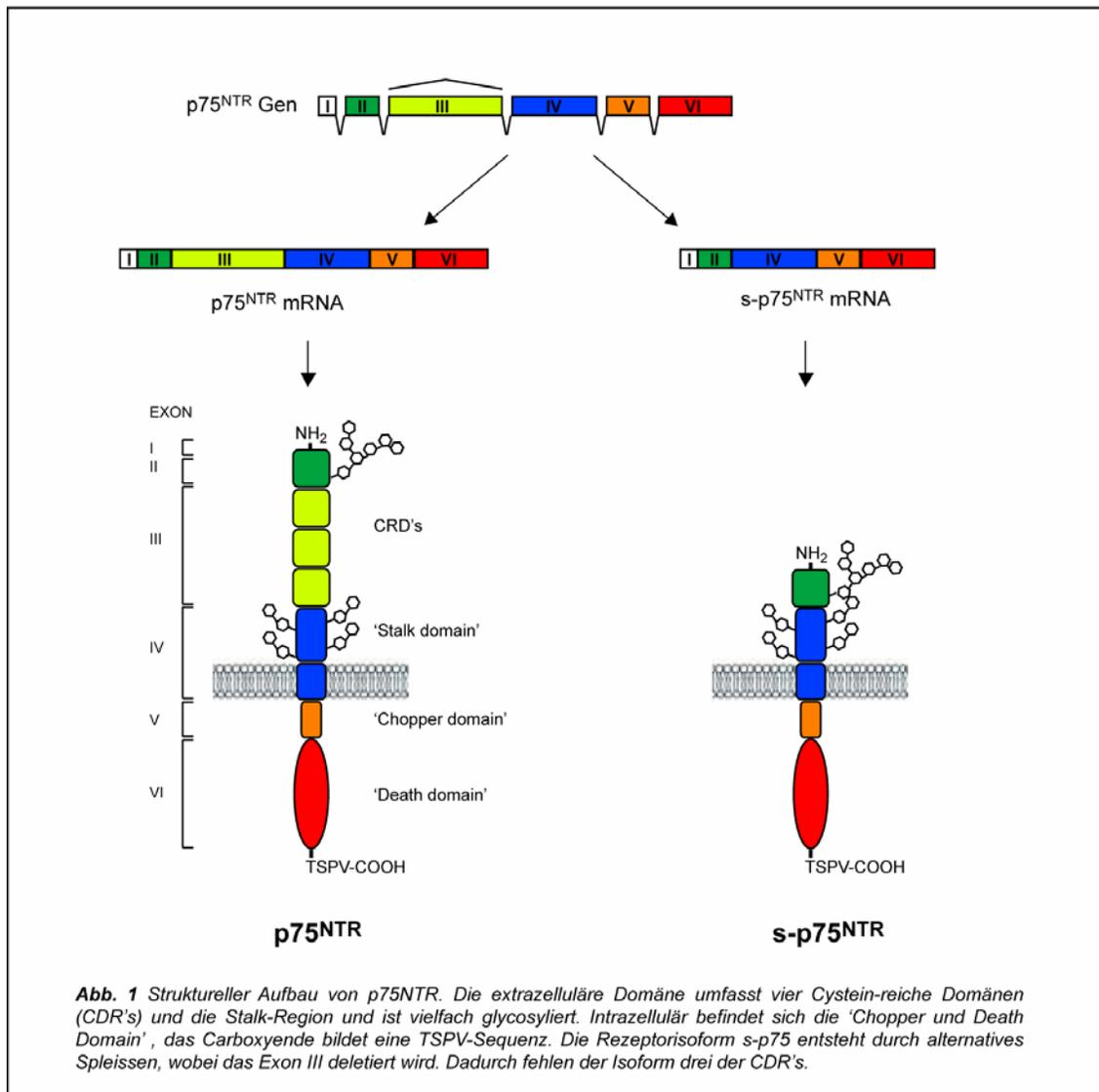
p75^{NTR} ist der erste klonierte Neurotrophinrezeptor (Johnson et al., 1986; Radeke et al., 1987) und wurde zunächst als Rezeptor für NGF identifiziert. Es stellte sich jedoch heraus,

dass p75^{NTR} alle Neurotrophine mit derselben Affinität bindet, nämlich von rund 10⁻⁹M (Rodriguez-Tébar et al., 1990). Dies entspricht nicht derjenigen Affinität, welche für die Bindung von Neurotrophinen in Neuronen typischerweise gemessen wurde (10⁻¹¹M). Der Unterschied kann nicht durch die alleinige Bindung an Trk-Rezeptoren erklärt werden, da für die Neurotrophin-Bindungsstellen der Trk meistens ebenfalls eine tiefere Affinität gemessen wurde. Somit scheinen die hochaffinen Bindungsstellen am ehesten durch die Assoziation von p75^{NTR} mit Trks erklärt werden zu können (Mahadeo et al., 1994). Die Kristallstruktur von NGF zusammen mit der extrazellulären Domäne von p75^{NTR} wurde erst kürzlich aufgelöst und zeigte eine ungewöhnliche 2:1 NGF:p75-Stöchiometrie, welche eine Seite von NGF offen lässt (He and Garcia, 2004). Diese offene Seite lässt vermuten, dass andere Rezeptoren involviert würden, um einen Dreier-Komplex zu bilden, z.B. p75-NGF-TrkA. Ein solcher Dreier-Komplex konnte bisher jedoch kristallographisch nicht bestätigt werden (Wehrmann et al. 2007).

p75^{NTR} ist auch das erstklonierte Mitglied der 29 Mitglieder umfassenden Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie, zu der auch Fas (Apo-1/CD95), TNFR1, TNFR2 und andere gehören (für eine Übersicht siehe Locksley et al, 2001). Das definierende Motiv dieser Familie sind Cystein-reiche Domänen (CRDs) im extrazellulären Bereich, von denen p75^{NTR} vier besitzt. Wie auch einige andere TNFR-Mitglieder weist p75^{NTR} intrazellulär eine sogenannte 'Death domain' auf. Kürzlich wurde gezeigt, dass nicht die 'Death Domain' (wie der Name nahelegt), sondern die frei bewegliche juxtamembranäre Domäne, die sogenannte 'Chopper domain' hauptsächlich für das Auslösen von Zelltod verantwortlich ist (für eine Übersicht siehe Coulson et al., 2004). Weiter besitzt p75^{NTR} ein kurzes Sequenzstück mit hoher Homologie zu dem Wespengift Mastoparan, welches G-Proteine aktivieren kann (Dostaler et al., 1996). Der C-Terminus "TSPV-C" ist ein typisches PDZ-Domänen bindendes Sequenzmotiv. Tatsächlich weist p75^{NTR} wie alle TNFR-Mitglieder keine eigene katalytische Aktivität auf, sondern benötigt intrazelluläre Interaktoren für die Signaltransduktion (siehe 1.1.2).

Die extrazelluläre Domäne (ECD) von p75^{NTR} ist vielfach O- und N- glycosyliert. Sie ist längst nicht nur Bindungsstelle für die Neurotrophine, sondern für zahlreiche andere Liganden: das aus der Schnecke *Lymnaea stagnalis* isolierte CRNF (für 'cystein-rich neurotrophic factor) (Fainzilber et al., 1996), ein Glykoprotein des Tollwutvirus (Tuffereau et al., 1998), ein Proteinfragment des Prionenproteins PrP (Della-Bianca et al., 2001), das β -Amyloidpeptid (Yaar et al, 2002) sowie das Gangliosid GT1b (Yamashita et al., 2002). Lectine wie z.B. WGA ('weight-germ agglutinin') wurden häufig labortechnisch benutzt, um

glycosyliertes p75^{NTR} anzureichern. Kürzlich wurde in unserem Labor gezeigt, dass das Lectin Galectin-1, ebenfalls an p75^{NTR} bindet (Plachta et al., 2007). Neurotrophine werden als Pro-Neurotrophine synthetisiert und intrazellulär proteolytisch gespalten und sezerniert, wobei sie Dimere bilden. Die Sequenz der Pro-Form lässt vermuten, dass sie wichtig ist für die Ausbildung der Tertiärstruktur der maturen Form (Rattenholl et al., 2001a,b). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Pro-Neurotrophine mit hoher Präferenz und Affinität (K_d = 10⁻¹¹ M) an p75^{NTR} und nicht an Trks binden und Zelltod auslösen können. In dieser Funktion scheint Sortilin, ein Mitglied der 'Vps10p-domain'-Rezeptorfamilie, als Ko-Rezeptor von p75^{NTR} eine Rolle zu spielen (Nykjaer et al., 2004). Eine solche Auswirkung der Pro-Neurotrophine dürfte vorallem in pathologischen Situationen eine Rolle spielen (Beattie et al., 2002; Harrington et al., 2004), erhöhte Werte für pro-NGF wurden im Gehirn von Alzheimer-Patienten gefunden (Fahnestock et al., 2001).



Bisher wurde eine Spleissvariante von p75^{NTR} (sogenanntes s-p75^{NTR}) beschrieben (von Schack et al., 2001). Sie entsteht durch einen alternativen Spleissvorgang, in dem das Exon III, welches für die CDRs kodiert, übersprungen wird. Das 38 kDa-Protein verliert dabei die Fähigkeit, Neurotrophine zu binden, während die transmembranäre und die intrazelluläre Domäne völlig intakt bleiben. Interessanterweise wurde die erste KO-Maus von p75^{NTR} durch eine Deletion von Exon III generiert (Lee et al., 1992), sodass das s-p75^{NTR} dadurch nicht tangiert wird. Tatsächlich wurde im Gehirn und Rückenmark dieser KO-Maus auch s-p75 detektiert. Die später generierte Exon IV-Mutante (von Schack et al., 2001) inaktivierte dann beide Formen von p75^{NTR}. Die Tatsache, dass die intrazelluläre Domäne von s-p75 intakt ist und auch eine Interaktion mit den Trks nachgewiesen worden ist, lässt eine funktionelle Bedeutung dieser Form vermuten. Durch vergleichende Untersuchungen der beiden KO-Mäuse konnten Hinweise für eine Funktionalität gefunden werden. So zeigt sich für die Exon III-Mutante einen intermediären Phänotyp, indem die Anzahl sensorischer Neuronen der Spinalganglien stärker reduziert ist in der Exon IV-Mutante als in der Exon III-Mutante (von Schack et al., 2001). Im ZNS zeigt sich ebenfalls ein stärkerer Phänotyp durch die Exon IV-Mutante, indem die Anzahl cholinergischer Vorderhirnneuronen im Vergleich zum Wildtyp deutlich mehr zunimmt als bei der Exon III-Mutante (Naumann et al., 2002). Die strukturellen Einheiten von p75^{NTR} sind in Abb. 1 zusammengefasst.

1.1.2 Signalwege von p75^{NTR}

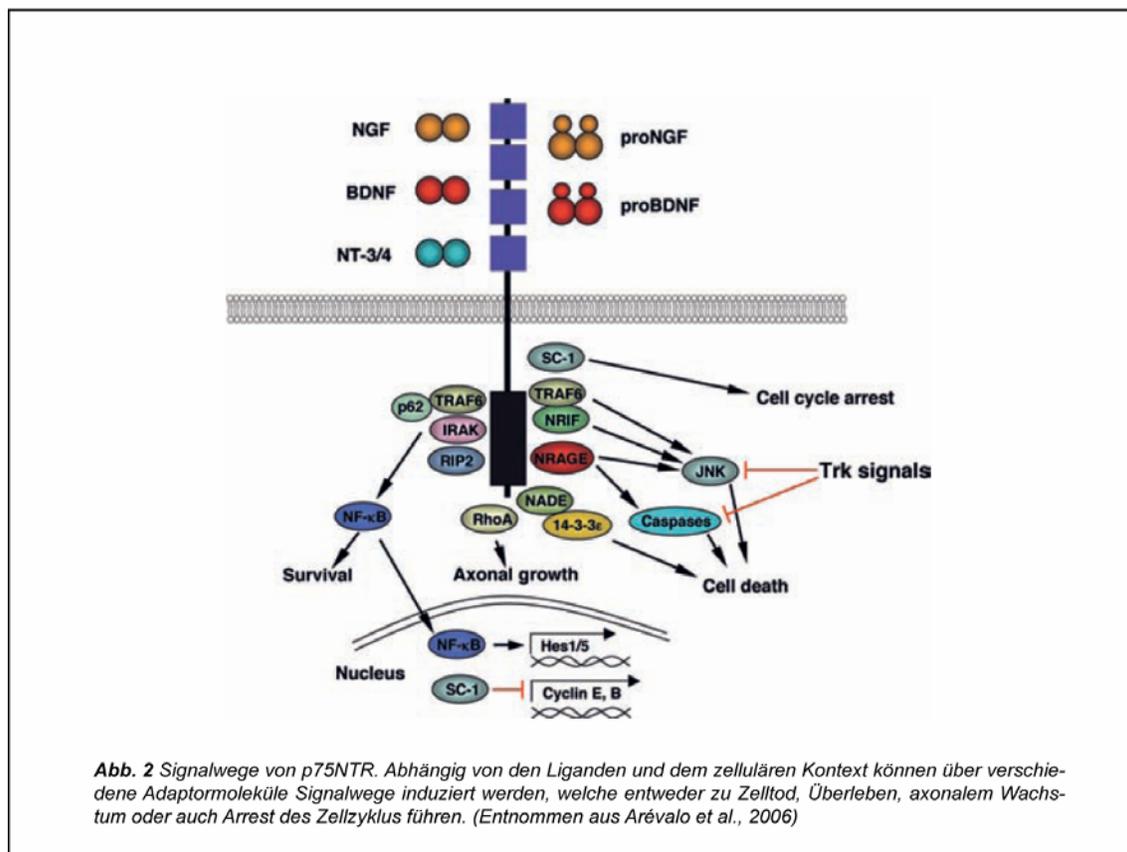
Da p75^{NTR} wie alle TNF-Rezeptoren keine eigene katalytische Aktivität aufweist, erfolgt die Signaltransduktion durch die Interaktion mit Proteinen, welche entweder konstitutiv assoziiert sind oder durch Rezeptoraktivierung rekrutiert werden. Die immer grösser werdende Liste von Interaktionsmolekülen zusammen mit der Entdeckung, dass p75^{NTR} mit verschiedenen anderen Rezeptoren interagieren kann, mag die grosse Wirkungsvielfalt von p75^{NTR} erklären.

Nur für einen Teil der mit dem Yeast-Two-Hybrid-System identifizierten Interaktoren sind auch die von ihnen ausgelösten Signalwege bekannt (siehe Abb. 2). Im folgenden sollen einige wichtige Signalwege vorgestellt werden:

NF-κB

Die Zugehörigkeit von p75^{NTR} zu den TNF-Rezeptoren und die Beobachtung, dass p75^{NTR} durch Sphingomyelin-Hydrolyse Ceramidproduktion induzieren kann (Dobrowsky et al., 1994), liess eine Verbindung zu NF-κB vermuten. Tatsächlich konnte erstmals in Schwannzellen gezeigt werden, dass NGF über p75^{NTR} NF-κB aktivieren kann (Carter et al.

1996), was im folgenden in mehreren anderen Systemen bestätigt werden konnte. Zudem wurden einige Interaktionspartner für p75^{NTR} gefunden, welche bekannterweise die Aktivität von NF-κB modulieren können. Diese sind TRAF1 (Duckett et al., 1997), TRAF2 (Rothe et al., 1994), TRAF3 (Devergne et al., 1996), TRAF5 (Nakano et al., 1996), TRAF6 (Cao et al., 1996), RIP2 (McCarthy et al., 1998) FAP-1 (Nakai et al., 2000) und IRAK (Cooke et al., 2001). Für TRAF6 wurde eine NF-κB-Aktivierung durch die Bindung von NGF an p75^{NTR} direkt gezeigt (Khursigara et al., 1999). Normalerweise führt die Assoziation von TRAF2 oder TRAF6 mit dem TNF-Rezeptor zur Aktivierung der 'NF-κB -inducing kinase' (NIK) via Aktivierung der 'TAT-associated kinase-1' (TAK1). NIK wiederum phosphoryliert und aktiviert die IκB-Kinase (IKK), welche die inhibitorische Untereinheit von NF-κB (IκB) phosphoryliert, welche dadurch ubiquitiniert und degradiert wird, sodass NF-κB frei wird und in den Zellkern transloziert.



JNK

Ein wesentlicher Signalweg, welcher über p75^{NTR} aktiviert werden kann, ist der JNK-Signalweg. Dabei wurde die Aktivierung dieser MAP-Kinase über verschiedene Wege postuliert: Ceramid scheint nebst NF-κB auch JNK, die beiden p75^{NTR}-Interaktoren ERK1 und ERK2 (Susen et al., 1999), als auch die GTPase Rac zu aktivieren. In sympathischen

Neuronen konnte die Aktivierung von JNK über die beiden Interaktionsmoleküle von p75^{NTR}, NRIF und TRAF6 gezeigt werden (Casaccia-Bonofil et al., 1996; Yeiser et al., 2004; Linggi et al., 2005). Cdc42, ASK1, MKK7 scheinen ebenfalls in der Aktivierung von JNK involviert zu sein (Bazenet et al., 1998, Kanamoto et al., 2000). Die Aktivierung des JNK-Signalweges kann das Tumorsuppressorprotein p53 hochregulieren und Zelltod auslösen (Aloyz et al., 1998). So viele p75^{NTR}-Interaktoren auch gefunden wurden, welche Zelltod vermitteln können, sind die Signalwege nicht vollständig geklärt.

RhoA

Ein wichtiger Signalweg wurde durch die Verbindung von p75^{NTR} mit der GTPase RhoA mittels der 'Yeast-two-hybrid'-Methode entdeckt (Yamashita et al., 1999). RhoA ist eine kleine GTPase, welche den Zustand der Aktin-Polymerisierung reguliert. In seiner GTP-gebundenen (aktiven) Form stabilisiert Rho das Zytoskelett und wirkt inhibitorisch auf das Neuritenwachstum. Es zeigte sich, dass Ligandenbindung an p75^{NTR} RhoA in cerebellären Neuronen inaktiviert und somit das Neuritenwachstum fördert, eine Überexpression von p75^{NTR} in 293 Zellen jedoch RhoA aktiviert (Yamashita et al., 1999). In seiner inaktiven Form bildet RhoA einen Komplex mit Rho-GDI, wodurch es im Zytoplasma lokalisiert wird. Es stellte sich später heraus, dass p75^{NTR} nicht direkt an RhoA, sondern an Rho-GDI bindet. Diese Bindung lässt RhoA von Rho-GDI dissoziieren, durch Rho-GEF's aktivieren und über zahlreiche weitere Faktoren das Wachstum von Neuriten inhibieren (Yamashita and Tohyama, 2003). Die Aktivierung von p75^{NTR} durch NGF unterbricht hingegen die Interaktion mit Rho-GDI und inhibiert so RhoA.

Assoziation mit NogoR

Die Verbindung von p75^{NTR} und RhoA führte zu weiteren Erkenntnissen, nämlich dass p75^{NTR} auch involviert ist in der Inhibition von axonalem Wachstum durch Myelin. Eine Hauptkomponente von Myelin ist 'myelin-associated glycoprotein' (MAG), dessen inhibitorischen Effekt auf das Neuritenwachstum durch p75^{NTR} moduliert werden kann (Yamashita et al., 2002). Weitere inhibitorische Komponenten von Myelin sind 'oligodendrocyte myelin glycoprotein' (OMgP) und Nogo, welche alle an den Nogo-Rezeptor (NogoR) binden. Da NogoR jedoch keine eigene intrazelluläre Signalkomponente besitzt, lag die Vermutung nahe, dass die Signale der drei Myelin-assoziierten Inhibitoren durch einen Rezeptorkomplex vermittelt werden. Tatsächlich wurde p75^{NTR} als das Hauptsignalelement zusammen mit NogoR identifiziert (Wang et al., 2002; Wong et al., 2002). Zusätzlich scheint ein weiterer Rezeptor, Lingo-1, in diesem Komplex funktionell relevant zu sein (Mi et al., 2004). Dabei führt die Bindung von Nogo oder MAG an den Rezeptorkomplex zur

verstärkten Assoziation von p75^{NTR} mit Rho-GDI und RhoA und daher zu einer Aktivierung von RhoA, wie oben beschrieben (Yamashita and Tohyama, 2003).

Spaltung von p75^{NTR}

Ein weiterer spannender Signalweg zeigte sich mit der Entdeckung, dass p75^{NTR} proteolytisch gespalten werden kann in einer Weise, wie das für andere Proteine wie Notch, APP und ErbB4 beschrieben worden ist, nämlich durch sogenanntes RIP ('regulated intramembrane proteolysis') (DiStefano et al., 1988; Kanning et al., 2003; Jung et al., 2003). Die erste Spaltung erfolgt im extrazellulären Bereich durch die Metalloproteinase α -Sekretase, während die zweite Spaltung in der intramembranären Domäne durch γ -Sekretase ausgeführt wird. Die Translokation der abgespaltenen intrazellulären Domäne von p75^{NTR} in den Zellkern wurde zwar nachgewiesen (Frade, J.M., 2005), ob sie jedoch auch die Transkription von bestimmten Genen beeinflussen kann, so wie dies für die übrigen durch RIP gespaltenen Proteine beschrieben worden ist, bleibt noch ungeklärt. Zusätzlich wird eine Rolle in der Zusammensetzung eines Rezeptorkomplexes zwischen p75^{NTR} und Trk diskutiert (Jung et al., 2003).

Assoziation mit Trk-Rezeptoren

Zunächst galt p75^{NTR} vor allem als Modulator der Trk-Rezeptoren. Die beiden Rezeptoren sind nicht nur oft ko-exprimiert, sondern interagieren auch physikalisch, wie mit allen drei Trks gezeigt wurde (Bibel et al., 1999). An der Interaktion sind sowohl die intrazellulären, als auch die transmembranären Domänen beteiligt. Diese Rezeptorassoziation ist aus mehreren Gründen funktionell relevant. Erstens sind die Komplexe hochaffine Bindungspartner für die Neurotrophine (Hempstead et al., 1991) und als solche entscheidend, wenn Neurotrophine in limitierten Mengen vom Zielgewebe produziert werden. Zweitens konnte in sympathischen Neuronen eindrücklich gezeigt werden, wie p75^{NTR} die Spezifität der Trk-Rezeptoren, im speziellen von TrkA für NT-3, beeinflussen kann (Brennan et al., 1999).

1.1.3 Funktion von p75^{NTR}

Die zahlreichen Signalwege von p75^{NTR} bedingen eine vielfältige Wirkungsweise. Die Generierung von KO-Mäusen sowie weitere Deletions- und Überexpressionsstrategien des Rezeptors haben einige Erkenntnisse gebracht über die Funktion von p75^{NTR} in ganz bestimmten Zellpopulationen. Die Funktionen mit den Signalwegen direkt zu korrelieren, ist jedoch problematisch, da in den KO-Tieren die Interaktoren von p75^{NTR} für andere Proteine verfügbar werden, was das Verständnis der funktionellen Rolle von p75^{NTR} weiter erschwert.

Expressionsmuster

p75^{NTR} ist exprimiert in den meisten Teilen des sich entwickelnden Nervensystems (Chao and Hempstead, 1995), die Expression ist jedoch stark entwicklungsabhängig (Bothwell, M., 1995). Viele Zellen exprimieren p75^{NTR} zu einer Zeit, wenn sie postmitotisch werden oder während der Migration, so wie beispielsweise die Zellen aus der Neuralleiste (Fariñas et al., 1998). Die starke Expression während der Axon-Bildung impliziert die Funktion von p75^{NTR} im axonalen Wachstum (Yamashita et al., 1999). Im adulten Nervensystem ist p75^{NTR} normalerweise herunterreguliert, mit wenigen Ausnahmen wie die cholinergen Neuronen des Septums. In pathologischen Situationen wie Nervenverletzung (Gage et al., 1989; Rende et al., 1993), Hirninsult (Kokaia et al., 1998), Epilepsie (Roux et al., 1999), Alzheimerkrankheit (Mufson and Kordower, 1992) und Amyotropher Lateralsklerose (Lowry et al., 2001) wird p75^{NTR} jedoch wieder von den Neuronen exprimiert. In einigen Fällen konnte eine klare Korrelation der Hochregulation von p75^{NTR} und Zelltod dokumentiert werden (Giehl et al., 2001; Oh et al., 2000).

p75^{NTR} ist jedoch nicht nur in Neuronen exprimiert, sondern in vielen anderen Zellpopulationen, so in vielen embryonalen Geweben wie Haut-Mesenchym, Somiten und Muskelanlagen, Hoden und Nieren (Persson et al., 1990; Heuer et al., 1990; Wyatt et al., 1990; Sariola et al., 1991), aber auch in Endothelzellen und in hohem Mass in Schwann-Zellen (Johnson et al., 1988). Letzteres hat funktionelle Relevanz, indem p75^{NTR} für die Migration der Schwannzellen entlang von peripheren Nerven benötigt wird (Anton et al., 1994; Bentley and Lee, 2000).

Zelltod

Aktives Auslösen von Zelltod ist die erstbeschriebene Funktion von p75^{NTR} (Rabizadeh et al., 1993). Eine Reihe von Experimenten mit Primärkulturen und *in vivo* bestätigten diesen Befund für bestimmte Zellpopulationen. Die Aktivierung von p75^{NTR} durch NGF und teilweise auch durch BDNF konnte Zelltod in sympathischen Neuronen (Bamji et al., 1998), sensorischen Neuronen (Barrett and Bartlett, 1994), hippocampalen Neuronen (Friedman et al., 2000), Oligodendrozyten (Casaccia-Bonofil et al., 1996) sowie Schwannzellen (Soilu-Hanninen et al., 1999) *in vitro* auslösen. *In vivo* zeigt sich in den ExonIV-Mutanten von p75^{NTR} eine deutlich erhöhte Anzahl an cholinergen Vorderhirnneuronen im Vergleich zum Wildtyp (Naumann et al., 2002). Zudem ist die Anzahl an apoptotischen retinalen Ganglienzellen wie auch von apoptotischen Zellen im Rückenmark von embryonalen Mäusen deutlich reduziert sowohl in NGF- als auch p75^{NTR}-ExonIII-Mutanten (Frade and Barde, 1999). Diese Befunde und die hohe embryonale Expression haben zu der Vermutung

geführt, dass p75^{NTR} eine zentrale Rolle in der physiologischen Elimination von im Überschuss produzierten Neuronen spielt. Das heisst jedoch nicht, dass p75^{NTR}-Expression gleichbedeutend mit Zelltod ist, denn viel mehr Neuronen exprimieren p75^{NTR} als Zelltod vorkommt. Ein bemerkenswertes Beispiel dafür ist die hohe Expression von p75^{NTR} in sogenannten Subplatte-Neuronen des sich entwickelnden Neocortex, welche *in vitro* für deren Überleben durch BDNF sogar notwendig ist (DeFreitas et al., 2001). Seit einiger Zeit wird diskutiert, dass auch das Zusammenspiel mit den Trk-Rezeptoren die apoptotische Funktion von p75^{NTR} verhindert (Yoon et al., 1998; Friedman, W.J., 2000).

Überexpression der intrazellulären Domäne von p75^{NTR} in einem transgenen Mausmodell führte zu ausgedehntem Zelltod sowohl von kortikalen, sensorischen als auch sympathischen Neuronen (Majdan et al., 1997). Somit wird klar, dass p75^{NTR} auch ohne Aktivierung durch Neurotrophine Zelltod auslösen kann, dies wahrscheinlich durch Multimerisierung und dabei Autoaktivierung des Rezeptors.

Zell-Zyklus

Die ersten Hinweise auf eine mögliche Rolle von p75^{NTR} in der Regulation des Zellzyklus stammen von *in vitro*-Studien mit intrazellulären Interaktoren von p75^{NTR}. Die Überexpression von SC1, NRAGE und NRIF1/2 in PC12-, COS- oder 293-Zellen gehen einher mit einem Verlust an BrdU-Inkorporation (Benzel et al., 2001, Chittka et al., 1999, Salehi et al., 2000). Für SC1 wurde zudem gezeigt, dass der Wachstumsarrest über die Repression von Cyclin E vermittelt wird (Chittka et al., 2004). Necdin, wie NRAGE ebenfalls ein Mitglied der MAGE-Proteinfamilie und ein Interaktor von p75^{NTR} (Tscherpakov et al., 2002), ist exprimiert vorallem in postmitotischen Neuronen und interagiert mit dem Transkriptionsfaktor E2F-1, einem zentralen Regulator des Zellzyklus (Taniura et al., 1998). Kürzlich wurde ein neuer p75^{NTR}-Interaktor identifiziert, Bex1 (Vilar et al., 2006). Überexpression von Bex1 in PC12-Zellen verhinderte die Differenzierung unter NGF oder nach Serum-Depletion. Andere Effektoren wie RIP2 sind indirekt involviert über die Interaktion mit NF- κ B, welches sowohl das Überleben, als auch den Zellzyklus beeinflussen kann. Interessanterweise kompetitiert Bex1 mit RIP2 um die Bindungsstelle von p75^{NTR}, und die Überexpression von Bex1 verhindert die durch NGF induzierte Aktivierung von NF- κ B (Vilar et al., 2006).

Die Interpretation der *in vivo*-Daten die p75^{NTR} KO-Maus betreffend, ist weitaus schwieriger, da Zelltod und Zellzyklus-Arrest nicht immer klar getrennt werden können. In der Tat werden den beiden Molekülen NRIF und NRAGE beide Funktionen, Zelltod wie Zellzyklus, zugeschrieben und es wird die Möglichkeit diskutiert, dass der apoptotische Effekt von p75^{NTR} sekundär bedingt sei durch sich widersprechende Signale für Zellteilung und

Wachstumsarrest (O'Connor et al, 2000; Frade, J.M., 2000). Experimente mit Neurosphenen ergaben, dass die durch BDNF induzierte Differenzierung im p75^{NTR}KO verunmöglicht ist und die Zellen proliferativ bleiben (Hosomi et al., 2003). Allerdings steht dies im Kontrast mit der Beobachtung, dass die Subplatte-Neuronen von p75^{NTR}KO-Mäusen keine erhöhte BrdU-Inkorporation zeigen (McQuillien et al., 2002). Wichtige indirekte Hinweise für die Bedeutung von p75^{NTR} im Zellzyklus sind auch dessen hohe Expression in sich teilenden Zellen der subventrikulären Zone in neugeborenen und adulten Ratten (Giuliani et al., 2004) sowie ein kürzlich entdeckter neuer Signalweg von p75^{NTR}, nämlich die nukleäre Translokation von p75^{NTR} ICD nach Bindung von NGF (Frade, J.M., 2005).

Überleben

Aus der Analyse der p75^{NTR}-Deletionsmutanten wurde klar, dass p75^{NTR} je nach Zellpopulation nicht als Zelltod-Rezeptor wirkt, sondern auch Überleben fördern kann. Kultivierte Motoneuronen vom Rückenmark von p75^{NTR} Exon III-Mutanten benötigen in Kultur 5x höhere BDNF-Dosen im Vergleich zum Wildtyp für eine 50%ige Überlebensrate. Die Anzahl der Motoneuronen im Nucleus facialis ist deutlich reduziert in Abwesenheit von p75^{NTR} (Wiese et al., 1999). Auch die Anzahl an sensorischen Neuronen in den Spinalganglien ist in beiden Deletionsmutanten deutlich reduziert (Lee et al., 1992; von Schack et al., 2001), während die sympathische Innervation keine Unterschiede zeigte. Auch die Anzahl der Schwanzzellen in der ExonIV-Mutante ist deutlich verringert. Bis heute ist es ungeklärt, ob der fehlende Support der Schwanzzellen, ein fehlendes Überlebenssignal durch p75^{NTR} in den Neuronen selber oder auch eine blockierte Migration der Zellen aus der Neuralleiste in Abwesenheit von p75^{NTR} den Verlust an sensorischen Neuronen in den Spinalganglien begründet. Eine weitere breit diskutierte Möglichkeit eines Beitrages von p75^{NTR} zum Überleben ist die Assoziation mit den Trk-Rezeptoren, wobei hochaffine Bindungsstellen für die Neurotrophine geschaffen werden (siehe auch 1.1.1 und 1.1.2).

Die bekannten Signalwege von p75^{NTR} geben jedoch auch deutliche Hinweise, dass p75^{NTR} direkt Überlebenssignale vermitteln kann. Einerseits wurde mehrmals gezeigt, dass die p75^{NTR}-vermittelte Ceramid-Produktion nicht nur Zelltod, sondern auch Überleben fördert (DeFreitas et al., 2001; Song and Posse de Chaves, 2003). Andererseits ist die Aktivierung von NF- κ B über p75^{NTR} als Signalweg gut dokumentiert (siehe 1.1.2). Es wurde erstmals in Schwanzzellen gezeigt, dass NGF über p75^{NTR} NF- κ B aktivieren kann (Carter et al., 1996). Die antiapoptotische Funktion von NF- κ B konnte inzwischen in mehreren *in vitro*- und *in vivo*-Modellen gezeigt werden (für eine Übersicht siehe Mattson et al., 2000). So weisen die Ganglia nodosa von p65^{-/-} Mäusen eine 30%ige Reduktion in der Anzahl Neuronen auf

(Middleton et al., 2000). Dass p75^{NTR}-vermittelte NF-κB-Aktivierung zum Überleben beiträgt, wurde aus *in vitro*-Studien mit sympathischen und sensorischen Neuronen klar (Maggirvar et al., 1998, Hamanoue et al., 1999). Dabei konnte nur NGF, aber nicht BDNF oder NT-3 über p75^{NTR} die NF-κB-Antwort auslösen.

Modulation des Neuritenwachstums

Als weitere Funktion von p75^{NTR} wurde die Modulation des Zytoskeletts in Neuronen und Gliazellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben. Die Aktivierung von p75^{NTR} beschleunigt das Neuritenwachstum sowohl von dissoziierten hippocampalen (Brann et al., 1999) als auch von Ciliarneuronen (Yamashita et al., 1999). Die Untersuchung der Subplatte-Neuronen des sich entwickelnden ZNS zeigte *in vitro* eine veränderte Wachstumskegel-Morphologie und in den KO-Mäusen einige ektopische Projektionen (McQuillen et al., 2002). Die Analyse der Exon III-Mutante zeigte, dass die Abwesenheit von p75^{NTR} das Auswachsen von sensorischen und motorischen Neuronen während der Embryonalentwicklung hemmt (Yamashita et al., 1999). Die Mobilität der Schwanzzellen ist in Abwesenheit von p75^{NTR} ebenfalls verringert (Bentley and Lee, 2000). Umgekehrt gibt es die Beobachtung, dass im myelinisierten ZNS das Wachstum von sympathischen Axonen in den Exon III-Mutanten verstärkt ist (Walsh et al., 1999). Die oben erwähnte Assoziation von p75^{NTR} mit dem NogoR ist eine naheliegende Erklärung für die durch p75^{NTR} vermittelte Wachstumsblockade von Axonen im ZNS-Myelin.

Kürzlich konnte der Effekt von p75^{NTR} nicht nur auf das Neuritenwachstum, sondern auch auf deren Verzweigungen und die Ausbildung von Spines detailliert untersucht werden mittels der 'gene gun'-Methode, wobei einzelne Neuronen von hippocampalen Schnittkulturen mit GFP markiert wurden (Zagrebelsky et al., 2005). In den Exon IV-Mutanten zeigte sich ein deutlich grösserer und öfters verzweigter Dendritenbaum sowie eine höhere Spine-Dichte von markierten Pyramidenzellen. Bei einer Überexpression von p75^{NTR} hingegen wurden weniger Verzweigungen und weniger Spines gezählt als im Wildtyp. Ob dies auf die Modulation des Zytoskeletts durch Rho (siehe 1.1.2) zurückzuführen ist oder ob auch andere Mechanismen involviert sind, bleibt noch ungeklärt. Eine interessante Querverbindung ist auch die Tatsache, dass NF-κB das Neuritenwachstum modulieren kann, wobei die Effekte für verschiedene Zelltypen wiederum gegenteilig sein können (Gutierrez et al., 2005; Alun Davis, persönliche Mitteilung)

Synaptische Transmission

Die Rolle der Neurotrophine in der synaptischen Transmission und in der Induktion von LTP via TrkB ist seit einiger Zeit bekannt. Erkenntnisse über die Rolle von p75^{NTR} in synaptischer

Transmission sind hingegen relativ neu. Die Blockierung von p75^{NTR} mit Antikörpern zeigte keinen Effekt auf LTP (Xu et al., 2000). Jedoch scheint die Deletion von p75^{NTR} das räumliche Lernen zu verbessern (Greferath et al., 2000). In sympathischen Neuronen vermittelt p75^{NTR} durch Aktivierung mit BDNF die Ausschüttung von Acetylcholin, während NGF über TrkA die Ausschüttung von Noradrenalin stimuliert, wobei ein schneller Wechsel von einer schnellen zur langsamen Kontraktionsfrequenz der Kardiomyozyten ermöglicht wird (Yang et al., 2002). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die LTD im Hippocampus durch die Abwesenheit von p75^{NTR} gestört wird. Der Effekt erwies sich als eine Folge einer veränderten Expression von AMPA-Rezeptor-Untereinheiten (Rösch et al., 2005). Weiter ist ein neuer Signalweg von p75^{NTR} charakterisiert worden, welcher für das Verhältnis von inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen in hippocampalen Neuronen wichtig ist: Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von p75^{NTR} durch NGF via NF- κ B die Transkriptionsfaktoren Hes1 und 5 aktiviert, welche wiederum neurogene Proteine wie Neurogenin-3 regulieren. Hes1 und 5 sind auch Zielgene von Notch, somit ergibt sich eine Konvergenz dieser beiden Wege. Die durch p75^{NTR} und Notch vermittelte Expression von Neurogenin-3 scheint die inhibitorische (GABAerge) Synaptogenese von hippocampalen Neuronen zu favorisieren (Salama-Cohen et al., 2005, Salama-Cohen et al., 2006).

1.2 Embryonale Stammzellen

Die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) und ihre Progenitoren bildeten in der vorliegenden Arbeit das zentrale zelluläre System, um p75^{NTR} näher zu untersuchen. Da es sich um ein in unserem Labor entwickeltes neuartiges System handelt, werden die Besonderheiten der *in vitro* Differenzierung von embryonalen Stammzellen eingeführt.

1.2.1 Herkunft und Eigenschaften von Embryonalen Stammzellen

Embryonale Stammzellen sind bemerkenswerte Zellen, welche zwei Hauptmerkmale aufweisen, nämlich die Eigenschaft, sich unlimitiert teilen zu können und die Pluripotenz, welche sie befähigt, sich in alle Zellen eines Organismus zu differenzieren. Es ist umso erstaunlicher, dass diese Zellen gewonnen und in Kultur gehalten werden können, da *in vivo*, im embryonalen Frühstadium, solche pluripotenten Zellen nur über eine ganz kurze Zeitspanne proliferieren und sich dann zu mehr differenzierteren Zellen entwickeln. Während der frühen Maus-Embryogenese ist ein erster Differenzierungsschritt die Teilung in den extraembryonalen und embryonalen Anteil. Der embryonale Teil wird 'innere Zellmasse' (ICM)

genannt und ist Quelle für alle entstehenden Gewebe der Maus. Diese innere Zellmasse ist auch der Ursprung von ES-Zellen (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; für eine Übersicht siehe Smith, A., 2001). Dass sich die ES-Zellen ebenfalls in alle Gewebe differenzieren können, wird offensichtlich, wenn diese Zellen wiederum in Blastozysten eingeführt werden und daraus sogenannte Chimären entstehen, welche Gewebeanteile sowohl von der Empfänger-Blastozyste, als auch von den eingeführten ES-Zellen enthalten. Wenn die ES-Zellen auch die Keimbahn kolonisieren, kann ihre genetische Information auf die weitere Generation übertragen werden (Bradley et al., 1984). Diese Eigenschaft ist der stärkste Beweis für die Pluripotenz der ES-Zellen.

Teratokarzinome und ES-Zellen

Dass die Isolierung und Kultivierung von ES-Zellen gelang, ist einer intensive Vorarbeit und Beobachtungen mit Keimzelltumoren, sogenannten Teratokarzinomen, zuzuschreiben. Diese sind maligne Tumoren, welche aus männlichen Keimzellen entstehen können und sowohl undifferenzierte als auch differenzierte Zellen von allen drei Keimblättern enthalten. Es zeigte sich nun, dass auch die ektopische Transplantation von Embryonen im Prä-Gastrulationsstadium Teratokarzinome erzeugen konnte (Solter et al., 1970; Stevens, L.C., 1970) und daraus isolierte individuelle, undifferenzierte Zellen wiederum sekundär Teratokarzinome ergeben konnten (Kleinsmith and Pierce, 1964). Diese undifferenzierten Zellen wurden auch in Kultur genommen und 'embryonic carcinoma cells' (EC-Zellen) genannt (Finch and Ephrussi, 1967). Diese EC-Zellen waren jedoch meistens aneuploid und ihre Fähigkeit, Chimären zu bilden, war limitiert, dagegen entstanden oft Tumoren. Eine wichtige Erkenntnis war jedoch, dass EC-Zellen in Anwesenheit von mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten (MEF's) besser proliferierten und auch die Differenzierung erleichtert war (Martin and Evans, 1997). Diese Kultivierungsmethode erlaubte schliesslich auch die Gewinnung und Erhaltung von Maus-ES-Zellen (Evans and Kaufman, 1981; Martin, G.R., 1981).

Extrinsische Regulatoren der Stammzell-Eigenschaften

Die Beobachtung, dass durch MEF's konditioniertes Medium ebenfalls die Differenzierung der ES-Zellen verhinderte, liess einen dafür verantwortlichen Faktor vermuten, der sich als 'leukemia inhibitory factor' (LIF) erwies (Smith et al., 1988, Williams et al., 1988). LIF gehört zur IL6-Familie der Cytokine, welche über einen Rezeptorkomplex einschliesslich dem Transmembranrezeptor gp130 wirken. LIF bindet direkt an den LIFR, welcher eine intrazelluläre Domäne ähnlich derjenigen von gp130 enthält. Der LIF-LIFR-Komplex rekrutiert dann gp130, um einen Dreierkomplex zu bilden. Die Aktivierung führt zur Translokation des Transkriptionsaktivator STAT3 in den Zellkern (für eine Übersicht des

Signalwegs siehe Burdon et al., 1999). LIF kann effizient die Differenzierung der ES-Zellen in Kultur verhindern, reicht allein jedoch nicht aus für die Erhaltung der Stammzellen (Ying et al., 2003). Diese wird im Zusammenspiel mit Faktoren aus der BMP-Familie und der Wnt-Familie erreicht. Der BMP-Signalweg führt zur Expression von Id-Proteinen, welche Transkriptioninhibitoren darstellen, der Wnt-Signalweg involviert GSK-3, beide scheinen die neuronale Differenzierung zu verhindern (Norton, J.D., 2000; Aubert et al., 2002).

Intrinsische Regulatoren der Stammzeleigenschaften

Wie extrinsische Signale wie LIF, BMP's und Wnt's intrinsische Determinanten der Stammzeleigenschaften kontrollieren, bleibt noch Gegenstand der Forschung. Oct-4 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen kontinuierliche Expression für die Erhaltung der Pluripotenz notwendig ist (Niwa et al., 2000). Die Deletion von Oct-4 führte *in vitro* zu differenzierten Kolonien, welche vollständig aus trophektodermalen Zellen bestanden. Die Überexprimierung von Oct-4 hingegen führte ebenfalls zu Differenzierung, jedoch in endodermale und mesodermale Zellen. Somit scheint eine bestimmte Expressionmenge von Oct-4 notwendig zu sein, um die Differenzierung zu verhindern. Zwei weitere Transkriptionsfaktoren, Sox2 und FoxD3 wurden ebenfalls für ihre Rolle in der Erhaltung der Pluripotenz beschrieben. Dabei spielt vor allem Sox2 eine essentielle Rolle in der Transkription von Zielgenen von Oct-4 und arbeitet so synergistisch mit Oct-4. Ein kürzlich identifizierter intrinsischer Faktor von Pluripotenz ist Nanog. Die Expression von Nanog ist sehr dynamisch und mehr eingeschränkt als diejenige von Oct-4. So erscheint Nanog erstmals im Morulastadium, ist deutlich exprimiert in der frühen Blastozyste und geht rasch zurück vor der Implantation des Embryos. Einzig die 'primordial germ cells' (PGC's) exprimieren Nanog während der Migration und Verbleib in der Genitalfalte zwischen Tag 9 und 13 der Gestation (Chambers et al., 2003). Nanog erwies sich als ein vom LIF-Signalweg unabhängiger und ausreichender Faktor, um Pluripotenz zu erhalten, der LIF-Signalweg wirkt jedoch synergistisch, indem die Effizienz der Erhaltung der ES-Zellen deutlich gesteigert wird (Chambers et al., 2003). Um seine Funktion ausüben zu können, ist Nanog zudem auf die Expression von Oct-4 angewiesen.

Weitere Charakteristika von ES-Zellen

Bei der Erforschung und Anwendung von Stammzellen wird es immer wichtiger, dass Stammzell-Marker gefunden werden, welche in einfacher Weise die Stammzellen als solche definieren. Dies ist in besonderem Masse wichtig für humane Stammzellen, wo die Möglichkeit eines Nachweises durch die Injektion in Blastozysten und Erzeugung von Chimären fehlt. Nebst den etablierten Markern Oct-4 und Nanog sollen hier weitere

Charakteristika genannt werden, welche mögliche Kandidaten für eine (noch längst nicht abgeschlossene) Definitionsliste darstellen könnten.

In den meisten Zellen ist deren unendliche Teilungsfähigkeit durch die Verkürzung der Telomere verunmöglicht, ein Prozess, wo die Chromosomenenden bei der Zellteilung progressiv verloren gehen durch inkomplette Replikation. ES-Zellen inklusive multipotente Stammzellen und Keimzellen, jedoch auch Tumorzellen, zeigen eine hohe Expression der Telomerase, ein Enzym, welches Telomer-Repeats an die Chromosomen-Enden anhängt und somit die Verkürzung der Telomere verhindert. So könnte die Messung der Telomerase-Aktivität zur Definition der Stammzellen beitragen (Flores et al., 2006).

Um weitere molekulare "Stammzell-Faktoren" zu identifizieren, wurden ausgedehnte Expressionsanalysen unternommen (Ramalho-Santos et al., 2002; Ivanova et al., 2002). Enttäuschend war jedoch die fehlende Übereinstimmung zwischen mehreren Studien. Der limitierte Nutzen von Expressionsanalysen könnte auch darin liegen, dass diese keine Aussage geben über die Gene, welche nicht aktiv transkribiert sind, welche aber den grössten Teil in ES-Zellen ausmachen. Epigenetische Studien haben ergeben, dass Stammzellen ein einzigartiges, charakteristisches epigenetisches Profil zeigen. Dieses umfasst die Häufigkeit von modifizierten Histonen, 'Polycomb group' (PcG)-Protein-Bindungsmuster, 'replication-timing' und die Chromatin-Beschaffenheit. Es zeigte sich, dass die Gene, welche Entwicklung induzieren, sich epigenetisch in einem Gleichgewicht zwischen aktiven als auch inaktiven Chromatin-Status befinden. Das heisst, sie sind inaktiviert, jedoch jederzeit aktivierbar (für eine Übersicht siehe Spivakov and Fisher, 2007).

Korrelat *in vivo*

Wie oben erwähnt, können ES-Zellen nur während einer ganz kurzen Phase der embryonalen Entwicklung aus der ICM gewonnen werden. Somit stellt sich die Frage, ob ES-Zellen *in vivo* überhaupt existieren oder diese Zellen ihre besonderen Eigenschaften erst durch Isolation und die Kultivierungsumgebung entfalten. Dass ICM-Zellen in der Lage sind, *in vivo* ihre Differenzierung zu stoppen, weiss man von den sogenannten Diapause-Embryos, bei denen die normale Implantation um 3-4 Wochen verzögert wird. Dabei scheint die Expression von gp130 und LIF essentiell zu sein. Während die Deletion von diesen Genen vor der Gastrulation keinen wesentlichen Phänotyp zeigt, beeinträchtigt sie massiv die Erhaltung von Diapause-Embryos (Nichols et al., 2001). Interessanterweise ist auch die Gewinnung von ES-Zellen aus Diapause-Embryos erleichtert (Gardner and Brook, 1997). Daher könnten die *in vitro* proliferierenden ES-Zellen vergleichbar sein mit ICM-Zellen von Diapause-Embryos und auch die Benutzung von Faktoren wie LIF, welches die Differenzierung verhindert, könnte ein natürlicher Mechanismus sein, der von diesen Zellen genutzt wird.

Unumstritten ist jedoch die Isolation von ES-Zellen ein seltenes Ereignis, da sie in keinem Fall *in vivo* in grosser Zahl und mit hoher Proliferationsrate vorkommen. Dies mag auch erklären, dass die Gewinnung von ES-Zellen in anderen Mausstämmen als Sv129 und C57Bl/6 oder in anderen Spezies wie z.B. Ratten schwierig bis unmöglich war. In diesem Kontext ist es auch relevant, dass Unterschiede gefunden wurden zwischen Maus-ES-Zellen und menschlichen Zellen, welche aus der Blastozyste isoliert wurden (Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000). Kürzlich gelang die Isolation von pluripotenten 'spermatogial stem cells' (SSC's) aus dem Hoden von adulten Mäusen, welche sogar Keimbahntransmission zeigen und molekulare Eigenschaften von ES-Zellen aufweisen (Guan et al., 2006). Dies wirft erneut die Frage über eine "Einheit" der ES-Zellen auf.

1.2.2 *In vitro*-Differenzierung von ES-Zellen in neuronale Zellen

Seit der Isolation von ES-Zellen und der Erkenntnis ihrer Pluripotenz *in vivo*, wurden unzählige Anstrengungen unternommen, diese Pluripotenz auch *in vitro* nutzbar zu machen. So entstanden Protokolle, um ES-Zellen mittels Zugabe von Pro-Differenzierungsfaktoren in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, z.B. Haut, Muskel, Knochen und Zellen des Immunsystems (für eine Übersicht siehe Guan et al., 2001). Wenn ES-Zellen ohne LIF kultiviert wurden, beobachtete man interessanterweise, dass immer eine kleine Anzahl an Zellen spontan in Neurone differenzierten (Ying et al., 2003). Um dieses neurogene Potential zu verstärken, wurden verschiedenartige Methoden entwickelt. Grundsätzlich wird die Fähigkeit zur Differenzierung erhöht, wenn ES-Zellen in nicht-adhärenenden Schalen kultiviert werden und dabei Aggregate bilden, sogenannte 'Embryoid bodies' (EB's). Unter den extrinsischen Signalen, welche bekannterweise die Differenzierung in die neuronale Richtung treibt, erwies sich Retinsäure (RA) als besonders nützlich. Retinsäure ist eine lipophile Substanz und ein biologisch aktiver Metabolit von Vitamin A. Sie bindet an RA-Rezeptoren, welche dimerisieren und im Zellkern die Transkription von Zielgenen moduliert. Durch die Zugabe von Retinsäure zu den Aggregaten und anschliessender Dissoziation konnten mehrere Forschungsgruppen Neurone gewinnen (Bain et al., 1995; Okabe et al., 1996; Renoncourt et al., 1998; Li et al., 1998). Diese Kulturen erwiesen sich jedoch als eine heterogene Population von verschiedenen neuronalen Subtypen als auch vielen nicht-neuronalen Zellen. Durch die Zugabe eines weiteren Faktors, Sonic hedgehog, gelang es, Motoneuronen zu generieren und somit die Kultur mit einem spezifischen neuronalen Typus anzureichern (Wichterle et al., 2002). Durch Sortierung mittels FACS oder durch die Selektion mit Resistenzgenen unter einem gewünschten Promoter konnten ebenfalls Neuronen angereichert werden. Eine weitere Methode macht Gebrauch von endogenen Faktoren, welche bekannterweise die neuronale Differenzierung fördern, indem solche Gene

konstitutiv in den ES-Zellen exprimiert werden. So konnten durch Überexprimierung des Transkriptionsfaktors *Nurr1* dopaminerge Neuronen erzeugt werden (Kim et al., 2002). Kürzlich wurde das Potential von Notch untersucht. Die Überexprimierung in ES-Zellen führte unter normalen ES-Kultivierungsbedingungen zu keinen Veränderung, unter Serum-Entzug jedoch zu synchronem Eintritt in die neuronale Differenzierung (Lowell et al., 2006). Dabei entstand eine mehrheitlich homogene Kultur von BLBP-positiven neuronalen Vorläuferzellen, die End-Differenzierung in Neurone war jedoch durch die konstitutive Expression von Notch verhindert. Eine robuste Differenzierung von ES-Zellen in eine homogene Population von Neuronen in grosser Zahl ist ein wichtiges Thema, da die direkte Isolation von neuronalen Zellen aus Maus-oder Rattenembryonen für manche Aspekte unbefriedigend bleibt. So sind genetische Modifikationen erheblich aufwendiger, die Anzahl isolierter Neurone limitiert und die Population naturgegeben heterogen. Naheliegend war auch die Isolation von neuronalen Vorläuferzellen aus dem adulten Gehirn, den sogenannten adulten neuronalen Stammzellen, welche im Hippocampus und in der subventrikulären Zone vorkommen. Diese Zellen können in Kultur expandiert werden in sogenannten Neurosphaeren. Doch die asynchrone Differenzierung in Neurone sowie die Heterogenität der Zellen sind störende Faktoren. Zudem sind Unterschiede zwischen verschiedenen Kulturen festgestellt worden, da die Population dieser adulten Stammzellen selber heterogen erscheint und bisher noch nicht genügend charakterisiert ist.

Kürzlich wurde in unserem Labor eine Methode entwickelt, welche die synchrone Differenzierung von ES-Zellen in eine homogene Population von Neuronen erlaubt (Bibel et al., 2004). Dabei werden die ES-Zellen zunächst wie üblich auf einer Zellschicht aus MEF's kultiviert, dann erfolgt eine 3-5 Passagen umfassende Kultivierung ohne MEF's, welche die Differenzierung vorbereiten soll, gefolgt von der Bildung von ES-Zell-Aggregaten durch die Benützung von nicht-adhrierenden Schalen, wobei LIF entfernt wird. Nach vier Tagen wird Retinsäure (5 μ M) zu den Aggregaten für weitere vier Tage zugegeben. Die Untersuchung von diesen Aggregaten am Ende dieser Phase zeigt, dass die meisten Zellen typische Marker für neuronale Vorläuferzellen aufweisen wie Nestin, Pax6, BLBP und RC2. Die letzteren sind ebenfalls Marker für radiale Gliazellen, welche später erwähnt werden. Sie exprimieren auch den Marker Emx-2, dessen Expression während der normalen Entwicklung auf das Diencephalon und Telencephalon beschränkt ist. Wenn die Aggregate dissoziiert und auf entsprechend mit Poly-Ornithin und Laminin beschichteten Platten ausgesät werden, entstehen daraus innerhalb der ersten zwei Tage zur grossen Mehrheit Neurone. Diese sind zu 95% glutamaterg, mit ca. 5% GABAergen Neuronen. Nur vereinzelt können Acetylcholin und Tyrosinhydroxylase detektiert werden. Im Kontext der vorliegenden Arbeit ist es wichtig zu erwähnen, dass p75^{NTR} in hohem Mass schon in den RA-behandelten Aggregaten und in den ersten Tagen nach Dissoziation exprimiert ist, dann

jedoch mit der Zeit herunterreguliert wird. Von den Trk-Rezeptoren wurde einzig TrkB in diesen Neuronen nachgewiesen, dessen Expression erstmals am Tag 3 nach Dissoziation detektiert wird und mit der Zeit zunimmt. Die elektrophysiologische Untersuchung zeigte bezüglich intrinsischer Eigenschaften grosse Ähnlichkeit mit glutamatergen kortikalen Neuronen.

1.2.3 Radiale Gliazellen als neuronale Vorläuferzellen

Zu Beginn der Neurogenese im ZNS von Säugetieren entsteht ein Wechsel von symmetrischer Zellteilung in Neuroepithelzellen zu asymmetrischer Zellteilung (Kosodo et al., 2004). Dies ist der Zeitpunkt, wenn die Expression von Nestin beginnt, und auch wenn radiale Gliazellen (RG-Zellen) entstehen (Misson et al., 1988). RG-Zellen teilen einige Charakteristika mit Neuroepithelzellen wie die Expression von Intermediärfilamenten Nestin und RC2, die radiale Ausdehnung durch das gesamte Epithel und die baso-apikale Polarität. Andererseits zeigen sie Marker für Astrozyten wie Glycogen-Granula und die Expression von GLAST, BLBP, Vimentin, Tenascin-C und GFAP (nicht in Nagern) (für eine Übersicht siehe Kriegstein und Götz, 2003). Die erste beschriebene Funktion der RG-Zellen ist die Wegweiser-Funktion ihrer radialen Prozesse für die neugeborenen migrierenden Neuronen (Rakic, P., 2003). Zunächst dachte man, dass sie dann in Astrozyten differenzieren würden, es stellte sich jedoch heraus, dass sie die Vorläufer von vielen Neuronen darstellen (Malatesta et al., 2003; für eine Übersicht siehe Götz and Barde, 2005). Dabei scheint das neurogene Potential von RG-Zellen in unterschiedlichen Gehirnregionen zu differenzieren. So sind die meisten Progenitoren von RG-Zellen im dorsalen Telencephalon Neurone, hingegen diejenigen der RG-Zellen im ventralen Telencephalon Oligodendrozyten. Somit sind die RG-Zellen Vorläufer für fast alle kortikalen Pyramidenneuronen, hingegen nicht von Interneuronen, welche im ventralen Telencephalon entstehen und auch nicht von den Neuronen der Basalganglien. Diese entstehen wahrscheinlich aus den 'basal progenitors', welche definiert sind durch den fehlenden Ventrikel-Kontakt, ihre Lokalisation und molekulare Kriterien wie die Expression von Tbr2 (Englund et al., 2005) und Ngn2 (Miyata et al., 2004). Die "neurogenen" RG-Zellen jedoch unterscheiden sich schlüssigerweise von den RG-Zellen im ventralen Telencephalon durch die Expression des neurogenen Transkriptionsfaktors Pax6.

RG-Zellen sind nicht nur die Hauptquelle von lang projizierenden ZNS-Neuronen während der Entwicklung, sondern auch die adulte Neurogenese scheint von ihnen auszugehen. Den neurogenen Zellen in der subventrikulären/subependymalen Zone und in der subgranulären Zone des Hippocampus (Gage, F.H., 2000) wurden Charakteristika von Astrozyten zugewiesen (Doetsch et al., 1999; Laywell et al., 2000; Seri et al., 2001). Eine *in vivo*-Studie

identifizierte schliesslich teilungsfähige GFAP-positive Zellen in der subependymalen und subgranulären Zone als die neuronalen Stammzellen im adulten ZNS (Garcia et al., 2004). RG-Zellen exprimieren zwar in der neurogenen Phase der Entwicklung kein GFAP, erwerben GFAP-Expression jedoch im Verlauf der Entwicklung und ein Teil von ihnen differenziert in Astrozyten (Imura et al., 2003). Ein logisches Modell wäre demnach, dass ein Teil der RG-Zellen ihre Multipotenz als neurogene Stammzelle beibehält - in den Regionen, welche ein dafür geeignetes Umfeld, eine sogenannte Nische bilden (Alvarez-Buylla and Lim, 2004).

Gemessen an der wichtigen Rolle, welche RG-Zellen *in vivo* spielen, ist es von Bedeutung, dass es gelungen ist, *in vitro* durch Differenzierung von ES-Zellen neuronale Vorläuferzellen zu generieren, welche durch ihre Charakteristika zu den RG-Zellen zu zählen sind (Bibel et al., 2004). Wie in 1.2.2 ausgeführt, exprimieren diese Zellen auch Pax6, ein Merkmal, welches die oben beschriebenen "neurogenen" RG-Zellen aufweisen, und differenzieren weiter in Neurone, welche den pyramidalen Neuronen des Kortex oder Hippocampus ähnlich sind.

2. Material und Methoden

2. 1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

[α -³²P] dCTP (Hartmann Analytic)
 40% Acrylamid/Bis Soution (Biorad)
 Agarose (Sigma)
 Ammoniumpersulfat (Biorad)
 Ampicillin (Sigma)
 Aqua ad inject. (Braun)
 Aqua Poly/Mount (Polysciences)
 BSA, Fraktion V (Sigma)
 Bromo-desoxy-Uridin (Sigma)
 Borsäure (Riedel de Haen)
 Colcemid (Sigma)
 Cryotubes (Nunc)
 DMSO (Sigma)
 DNA-molekulargewichtsmarker: 1 kb, 100 bp (Promega)
 DTT (Fluka)
 dNTP Set, 100mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Amersham Biosciences)
 Dulbecco's PBS (Gibco)
 ECL Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences)
 Elektroporationskuvette (Biorad)
 Entellan Einbettmittel für Mikroskopie (Merck)
 Ethidiumbromidlösung 1% (Sigma)
 Filter 0.22 μ m Stericup™ (Millipore)
 G418 (Sigma)
 Gancyclovir (Sigma)
 Gelatine (Sigma)
 Giemsa-Färbelösung (Gibco)
 Hybond-XL Nylonmembran (Amersham)
 Immobilon™-P Transfer Membrane (PVDF) (Millipore)
 Laminin (Roche)
 NuPAGE® Novex® Tris-Acetate Mini Gels (Invitrogen)
 NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x) (Invitrogen)
 NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) (Invitrogen)
 Petri-Schalen 100mm (Greiner)
 Poly-DL-Ornithin Hydrobromid (Sigma)
 ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences)
 Proteinmarker SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)
 Retinsäure (Sigma)
 TEMED (Sigma)
 Tissue-Tek (Miles)
 TritonX100 (Sigma)
 Trypsin-EDTA 1x (Gibco) (für Passagieren von Zellen)
 Trypsin 0.05% in 0.05% EDTA/PBS (Sigma) (für Dissoziation von Aggregaten)
 Tween 20 (Sigma)
 Zellfilter 40 μ m nylon cell strainer (BD Falcon)
 Zellkulturplatten 100mm (Corning)
 Zellkulturplatten 60mm, 6 Well, 24 Well, 96 Well (Nunc)

2.1.2 Plasmide

Name	Quelle	Vektor	Verwendung
pBSGDNA	G. Dechant	pBST KS+	p75NTR homologe Sequenz
neoTK	U. Müller	pBST KS+	Klonierung pBST14
pBST14	YH. Che	pBST KS+	Rekombinationskonstrukt

pML	U. Müller	β-actin	Cre-Plasmid mit NL
pGTEV Cre-ERT2	L. Vallier	pGTEV	Klonierung pT-CreERT2
pTIBFmyc	L. Lindemann	pBST II-SK	Klonierung pT-CreERT2
<i>tau</i> BRI	L. Lindemann	pBST II-SK	Matrize für 5'-Sonde <i>tau</i>
<i>tau</i> SRI	L. Lindemann	pBST II-SK	Matrize für 3'-Sonde <i>tau</i>
mock-Vektor	Invitrogen	pDEST	Leer-Vektor
κB-luc	Bachelerie et al.	pUC18	Luziferase-Assay
Renilla-luc	Promega	pRL-TK	Referenzvektor Luziferase-Assay
IκBα1	T. Henkel	Rc/CMV	IκB-Superrepressor
pmaxGFP	Amaxa	pCMV	GFP-Expression
IKK2	Ilja Mikenderg	pLenti4/V5Dest	exprimiert konstitutiv aktives IKK2

2.1.3 Enzyme

DNase I, RNase frei (Roche)
 Pfu DNA Polymerase (Promega)
 Proteinase K (Roche)
 Restriktionsenzyme und Puffer (Roche, New England Biolabs)
 Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen)
 T4 DNA Ligase und Puffer (Roche)
 Taq Polymerase und Puffer (Invitrogen)
 Trypsin/EDTA (Gibco)

2.1.4 Kits

Hybridisation Wash and Stain Kit (Affymetrix)
 IVT labeling Kit (Affymetrix)
 One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix)
 Random Hexanucleotide Labeling Kit (Roche)
 Rat NSC nucleofector™ Kit (Amaxa)
 Renilla Luciferase Assay Kit (Promega)
 RNeasy® Mini Kit (Qiagen)
 QIAquick™ PCR Purification Kit (Qiagen)
 QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen)
 QIAprep® Spin Miniprep/Maxiprep Kit (Qiagen)

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden bei Microsynth, CH, bestellt.

Name	T _m	Sequenz	Kommentar
TK139	53°C	ATT TGC CTG CAT TAC CGG TC	Amplifiziert ein 350 bp Fragment in Cre
TK141	53°C	ATC AAC GTT TTC TTT TCG G	
StartCre	55°C	AGC TTT GTT TAA ACC GCC ACC ATG TCC AAT TTA CTG ACC G	Amplifiziert gesamte cDNA CreERT2 integrierte Pme I-Schnittstelle und
StopCre	55°C	TTT TCC TTT TGC GGC CGC TCA AGC TCT GC AGG GAA ACC C	Not I Schnittstelle, Kozak und Start- und Stop-Codon.
Cre 413		GTT TCA CTG GTT ATG CGG CG	Sequenzierungs-Primer
Cre665F		AGC GAT GGA TTT CCG TCT CTG G	Sequenzierungs-Primer
ERT2 1219		CAG TGC CTT GTT GGA TGC TGA GC	Sequenzierungs-Primer
ERT2 1760		CCC TGC AGC AGC AGC ACC AGC	Sequenzierungs-Primer
ERT2 1727		CCT CAT CCT CTC CCA CAT CAG GC	Sequenzierungs-Primer
ERT2 1361		CCT GAT GAT TGG TCT CGT CTG GC	Sequenzierungs-Primer
TKO2V7	63°C	GTC AGA TCA CTA GAC TCA GCA TCC	Lokalisation in pTAU-CreERT2, 60 bp vor Pme I-Schnittstelle

KHBRIU1	59°C	GGA TCC ATT GAG TAG AAG AAA TCA AG	3'-Sonde für den tau-Lokus
KHBRID1	59°C	GAA TTC CAC ACA GCT AGT CC	
KVSRIU1	61°C	CCC GGG TCT CAA AAG TAC AAT G	5'-Sonde für den tau-Lokus
KVSRID1	59°C	GAA TTC ACA GAG ATC CAC TTG TTT C	
G3PDH-F	57°C	ACCACAGTCCATGCCATCAC	Primer amplifizieren ein
G3PDH-R		TCCATCACCCCTGTTGCTGTA	452 bp Fragment
1852F	63°C	AGT GGG GGG TGT CAG GCG TTA CAA	Detektion der loxP
2382R	63°C	ATC ATG AGC CTC CAG GCA CAC AGG	(siehe Abb. 15)
1852F	63°C	AGT GGG GGG TGT CAG GCG TTA CAA	Detektion Exzision Exon IV
3708R	55°C	GCA AGG GTG ACT TAG GAA GA	(siehe Abb. 15)
U Sph Kpn- LOX Sph		GGT ACC ATA ACT TCG TAT AGC ATA CAT TAT ACG AAG TTA TCA TG	Primer beinhalten die Sph- flankierte loxP, inklusive
L Sph Kpn- LOX Sph		ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TGG TAC CCA TG	Kpn I Schnittstelle
P13910F	64.5	TAG CCT CCT GCC CTG GAC TTC TAG G	Primer amplifizieren
P14488R	61.4	TAT ATG CTC CGG CTG GTA GCC C	die PA-Sonde
P6501F	60	CTG TGC CTG CAA GTG TCT CC	Primer amplifizieren
P7054R	55	CAC GGG CAT GTG AAT ACA GG	die AB-Sonde
G2236F	63	TCT CTA GAT GGG GAA GTC GAG GCC	Primer amplifizieren
G2841R	64.5	ACA CAC ACG GAT ACA CCC CAG AGG G	die Kpn I-Sonde

2.1.6 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.

2.1.7 Zellkulturmedien

ES-Medium

DMEM with NaPyruvat w/o L-Glutamine (Gibco)
15% FCS (Gibco)
2 mM L-Glutamine (Gibco)
1 x nicht essentielle Aminosäuren (Gibco)
1000 U/ml LIF (Juro, ESG1107)
5 µl/500ml β-Mercaptoethanol (Sigma)

EB-Medium/MEF-Medium

DMEM with NaPyruvat w/o L-Glutamine
10% FCS
2 mM L-Glutamine
1 x nicht essentielle Aminosäuren
5 µl/500ml β-Mercaptoethanol
Gleiche Hersteller wie bei ES-Medium.

2 x Freezing Medium

50% DMEM
30% FCS
20% DMSO
Gleiche Hersteller wie bei ES-Medium.

N2-Medium

50% DMEM with NaPyruvat w/o L-Glutamine (Gibco)
50% F-12 (Gibco)
25 µg/ml Insulin (Sigma)
50 µg/ml humanes Transferrin (Sigma)

20 nM Progesteron (Sigma)
 100 nM Putrescine (Sigma)
 50 µg/ml BSA (Sigma)
 2 mM L-Glutamin (Gibco)
 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco)
 30 nM Sodium Selenite (Sigma)

Complete Medium

DMEM with NaPyruvat w/o L-Glutamine (Gibco)
 2 µg/ml L- Alanin
 0.1 µg/ml Biotine
 2 µg/ml L- Carnitin
 1 µg/ml Ethanolamin
 15 µg/ml D+ Galactose
 100 µg/ml L- Proline
 16.1 µg/ml Putrescine
 0.016 µg/ml Na-Selenite
 0.34 µg/ml Vit. B12
 0.194 µg/ml Zink Sulfat
 2.56 µg/ml Katalase
 1 µg/ml Glutathion
 2.5 µg/ml Superoxid Dismutase
 1 µg/ml Linoleic acid
 1 µg/ml Linolensäure
 6.3 ng/ml Progesteron
 100 ng/ml all-trans-Retinol
 100 ng/ml Retinylacetat
 1 µg/ml Tocopherol
 1 µg/ml Tocopherolacetat

Frisch abwägen für 400 ml Medium:
 1 g BSA
 2 mg Transferrin
 1.6 mg Insulin

Vor Gebrauch frisch dazugeben:
 2 mM L-Glutamin (Gibco)

Wenn nicht anders angegeben, stammen alle Substanzen von Sigma.

Präparationsmedium für hippocampale Schnittkulturen

50 ml MEM (2x)
 49 ml H₂O
 1 ml L-Glutamin (200mM)
 (1ml) 1N NaOH (pH 7.3)

Kulturmedium für hippocampale Schnittkulturen

50 ml MEM 2x (Gibco, Pulverform)
 40 ml H₂O
 2 ml L-Glutamin 200mM
 2 ml Penicillin/Streptomycin
 50 ml Pferde-Serum, hitzeinaktiviert (Boehringer Mannheim)
 6.25 ml Glucose 20%
 50 ml BME (Gibco)
 (600 µl) 1N NaOH (pH 7.2)

2.1.8 Lösungen

DNA-Lysispuffer

100 mM Tris pH 8.5
 5 mM EDTA
 0.2% SDS
 200 mM NaCl
 100 µg/ml Proteinase K Proteinase K wurde immer frisch dazugegeben.

Denaturierungspuffer für Southern Blot

0.5 N NaOH
 1.5M NaCl
 in H₂O.

Neutralisierungspuffer für Southern Blot

1 M Tris pH 7.4
1.5 M NaCl
in H₂O

Church-Puffer

5% SDS
0.5 M Na-Phosphat (pH 7.15)*
1% BSA
* 1 M Na-Phosphat = 68.4 ml 1M Na₂HPO₄, 31.6 ml 1M NaH₂PO₄

20 x SSC pH 7.0

3 M NaCl
0.3 M Natriumcitrat
in H₂O

RIPA-Puffer

50 mM Tris-HCl pH 7.4
150 mM NaCl
37.2 mg/100ml EDTA
1% TritonX100
1g/100ml Na-Deoxycholat
0.1% SDS
Proteinase-Inhibitoren immer frisch zugeben (1 Tablette Complete™ (Roche) pro 7 ml Puffer)

Phosphatase-Inhibitor 10 x Stock

100 mM β-Glycerolphosphat
100 mM Natrium-Fluorid
100 mM Natriumazid
100 mM p-Nitrophenylphosphat
100 mM Natriumpyrophosphat
Aufbewahren bei -80°C und immer frisch zum RIPA-Puffer geben.

TE

10 mM Tris pH 7.4
1 mM EDTA pH 8.0

TBS 10x

0.2476 M Tris Base
1.369 M NaCl
26.8 mM KCl
In H₂O, mit HCl auf pH 7.4

TBST

TBS 1x
0.1% Tween

Transfer-Puffer

39 mM Glycin
48 mM Tris Base
0.0037% SDS
20% Methanol
pH 8.3

2.2 Methoden

Grundlegende molekularbiologische Methoden wie Plasmidpräparation, DNA-Purifikation, Restriktionsverdau, Ligation, Transformation von Bakterien wurden gemäss Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook and Russell)

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen aus Plasmid-DNA, genomischer DNA oder cDNA zum analytischen Nachweis oder Klonierung verwendet.

Für einen typischen Ansatz mit 25 µl Reaktionsvolumen wurden 1 x Reaktionspuffer, je 0.2 µM Primer, 0.2 mM dNTPs und 2 U Taq-Polymerase und 1 µl DNA eingesetzt. Die Reaktion wurde nach folgendem Grundschemata durchgeführt:

3 min.	94°C	} n Zyklen
30s	94°C	
30s	T _a	
t _e	72°C	
7 min.	72°C	
4°C	∞	

Für die Amplifikation der CreERT2-cDNA und anschliessender Klonierung wurde eine PCR mit der Pfu-Polymerase (Promega) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden zwecks Überprüfung des Rekombinationskonstruktes erfolgte durch Microsynth (www.microsynth.ch)

Isolierung von genomischer DNA aus Zellen

Für die Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zellen wurde das Medium abgesaugt und 400 µl DNA-Extraktionspuffer pro Well einer 24 Well-Platte direkt auf die Zellen gegeben. Über Nacht wurden die Platten wieder in den Inkubator gestellt und am nächsten Morgen das Lysat mit der gleichen Menge an Isopropanol versetzt und auf dem Schüttler bei RT inkubiert, bis die präzipitierte DNA sichtbar wurde. Der DNA-Faden wurde dann mit einer Pipettenspitze direkt in ein vorbereitetes Eppendorf-Gefäss mit 60 µl TE übertragen, wobei möglichst wenig Isopropanol mitgebracht werden sollte. Die DNA-Proben wurden dann bei 55°C ü/n inkubiert, damit sie sich lösen konnte. Gegebenfalls musste bei zähflüssigen Proben nochmals TE dazugegeben werden.

Southern Blotting

Für die Überprüfung einer korrekten homologen Rekombination in ES-Zellen erfolgte eine Southern Blot-Analyse. Zunächst wurde bei sämtlichen genomischen DNA-Proben die DNA-Konzentration gemessen. Für den anschliessenden Enzym-Verdau wurden 10 µg DNA eingesetzt. Normalerweise erfolgte der Enzym-Verdau ü/n, im Falle von BamHI wurde der Verdau auf 7h limitiert, mit nachfolgender Enzym-Inaktivierung bei 4°C. Die Proben wurden mittels Agarosegel bei 80-120 V aufgetrennt und die Markerlängen unter UV-Kontrolle mechanisch markiert für eine spätere Übertragung auf die Membran. Das Gel wurde für 45 Min. mit Denaturierungspuffer auf dem Schüttler inkubiert und anschliessend für weitere 45 Min. mit Neutralisierungspuffer versetzt, wobei nach 20 Min. der Puffer gewechselt wurde.

Danach wurde einmal kurz mit H₂O gewaschen. Anschliessend erfolgte ü/n bei RT der Transfer der DNA mittels Kapillarkraft und unter alkalischen Bedingungen (10 x SSC-Puffer) auf eine Hybond-N⁺ Nylon-Membran (Amersham Biosciences). Am folgenden Tag wurden die Markergrössen mit Bleistift auf die Membran übertragen und diese zweimal mit 2 x SSC-Puffer gespült und getrocknet. Es erfolgte ein 'Cross-Linking' mit UV-Licht.

Für die Herstellung einer radioaktiven Sonde wurden DNA-Fragmente mit einer Länge von 0.5-1 kb verwendet, die aus Plasmiden mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten wurden. Die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem Random Hexanucleotide Labeling Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von [α -³²P] dCTP (Hartmann Analytic). Nach der Markierung wurden nicht inkorporierte Nukleotide mit Hilfe von Probe-Quant G-50 Micro Columns (Amersham) gemäss Hersteller-Angaben abgetrennt. Die Membran wurde nun für 1-2h mit Church Hybridisierungspuffer bei 65°C prähybridisiert. Nun wurde die Sonde für 10 Min. im Heizblock bei 96°C denaturiert, auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und dem Church Puffer in die Hybridisierungsröhre zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte ü/n. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst in wenig stringentem Waschpuffer (1% SSC, 1% SDS) und anschliessend in stringentem Waschpuffer (0.1% SSC, 0.1% SDS) gewaschen, bis nur noch eine minimale Radioaktivität zu messen war. In einer Plastikfolie eingeschweisst, erfolgte die Exponierung der Membran auf eine Phosphoimager-Expositionsplatte in der Kassette für mind. 2 Tage.

RNA-Isolierung aus ES-Zellen oder Neuronen

Die RNA-Isolierung aus ES-Zellen und Neuronen erfolgte mit dem RNeasy Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei wurde ein DNase-Verdau (Roche) auf der "RNeasy spin"-Säule integriert.

Reverse Transkription

Für die Synthese von cDNA aus RNA wurden 1-5 µg RNA in einem Volumen von 11 µl mit 1 µl Oligo(dT)-Primern (0.5 µg/µl, Invitrogen) versetzt und für 10 min. bei 70°C inkubiert und anschliessend für 5 min. auf Eis gebracht. Auf Eis wurden dann pro Ansatz 2 µl 10 x Reaktionspuffer, 2 µl MgCl₂ (25mM), 1 µl dNTPs (10mM), 2 µl DTT (0.1M) und 0.5 µl RNAsin (Invitrogen) zugegeben und für 5 min. bei 42°C inkubiert. Anschliessend wurde 1 µl des Enzyms Superscript II RT (Invitrogen) direkt in die Proben im Heizblock zugegeben und die Reaktion bei 42°C für 50 min. inkubiert. Bei 70°C für 5 min. wurde die Reaktion gestoppt.

Genexpressionsanalyse

Zur Gewinnung der RNA wurden die Zellen (eine 60mm-Platte pro Probe) mit 600 µl RLT-Puffer (Qiagen) lysiert und auf einer QIAshredder-Säule (Qiagen) homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand bei -80°C eingefroren. Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Kit (Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop-Gerät (Agilent) gemessen und die Qualität auf RNA Nano 6000 Chips (2100 Bioanalyzer, Agilent) kontrolliert. Doppelsträndige cDNA wurde mit dem One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) ausgehend von 5 µg RNA synthetisiert. Das Material wurde mit dem Sample Cleanup Module (Affymetrix) aufgereinigt. Die gereinigte cDNA wurde für eine Transkriptionsreaktion mit dem IVT labeling Kit (Affymetrix) benutzt, um cRNA mit Biotin-konjugierten Ribonukleotiden zu synthetisieren. Ungefähr 50 µg der markierten cRNA wurde mit dem Sample Cleanup Module gereinigt und die RNA-Qualität wiederum auf RNA Nano 6000 Chips (2100 Bioanalyzer, Agilent) bestimmt. Die cRNA-Proben wurden bei 94°C für 35 min. in Fragmentation buffer (Affymetrix) inkubiert und die resultierenden Fragmente von 50-150 Nukleotiden wiederum auf dem Bioanalyzer kontrolliert. Alle Syntheseschritte wurden in einer PCR-Maschine (T1 Thermocycler, Biometra, Göttingen, DE) ausgeführt, um die bestmögliche Temperaturkontrolle zu garantieren.

Die Hybridisierungsreaktion (200 µl) bestehend aus der fragmentierten, Biotin-markierten cRNA (Endkonzentration 0.05 µg/µl) wurde in einen Affymetrix Mouse Genome 2.0 Chip transferiert und im rotierenden Hybridisierungssofen (Affymetrix) bei 45°C und 60rpm für 16h inkubiert. Die Arrays wurden gewaschen und hybridisiert in einer Fluidics Station 450 (Affymetrix) mit dem Hybridisation Wash and Stain Kit (Affymetrix). Um das Signal zu erhöhen wurde das Antikörper-Amplifizierungs-Protokoll benutzt. Die Chips wurden mit einem Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) gelesen und DAT image-Files mit der GeneChip Operating Software (GCOS 1.4; Affymetrix) generiert. Die Daten wurden anschliessend mit der GeneSpring Software analysiert. Nach dem Import der Daten wurden diese normalisiert und diejenigen Transkripte herausgefiltert, welche bei allen Arrays keine Expression zeigten.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

Protein-Isolierung aus Zellen

Zellen wurden einmal (wenn möglich auf Eis) mit kaltem PBS gewaschen, wobei möglichst alles PBS wieder entfernt wurde, und mit 30 µl RIPA-Puffer/cm² lysiert. Falls Phospho-Proteine detektiert werden sollten, erfolgte ein Zusatz mit Phosphatase-Inhibitor. Anschliessend wurde das Lysat gevortext und für 10 min. auf Eis inkubiert. Um Zellreste zu entfernen, wurde das Lysat für weitere 10 min. bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in mehrere neue Eppendorf-Gefässe verteilt und sofort bei -80°C gelagert. Jedes Aliquot wurde nur einmal aufgetaut.

SDS-PAGE

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der BCA-Methode (Biorad) durch das Photometer nach den Angaben des Herstellers. Die entsprechenden Proteinmengen (in 16.25 µl RIPA-Puffer) wurden mit 6.25 µl Sample Buffer (4x) und 2.5 µl DTT (100 µM) versetzt (totales Volumen 25 µl) und bei 70°C für 10 min. inkubiert. Für die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht mittels denaturierender diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden entweder Precast-Gele (NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels, Invitrogen) oder selbsthergestellte Gele mit dem XCell Shure Lock™-System von Invitrogen verwendet. Die Zusammensetzung der selbsthergestellten Gele war wie folgt:

	Trenngel		Fokussiergel
	10%	15%	
ddH ₂ O	2.5 ml	1.6 ml	1.565 ml
40% Acryl/Bis solution (1x)	1.75 ml	2.625 ml	0.375 ml
1 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.6 ml	2.6	-
375 mM Tris-HCl (pH 6.8)	-	-	1 ml
10% SDS	70 µl	70 µl	30 µl
10% APS (2x)	70 µl	70 µl	30 µl
TEMED	5.6 µl	5.6 µl	3 µl

Western Blotting

Für die in dieser Arbeit gezeigten Western Blots wurde der Transfer der Proteine auf die Membran mit der Wet-Blotting-Methode durchgeführt. Es wurde mit der Apparatur von Invitrogen (XCell II™ Blot Module) gearbeitet. Dazu wurde auf der Bodenplatte (der Anode) 2 Blätter in Transfer-Puffer eingeweichtes Whatman-Papier, das Gel, dann die mit Methanol behandelte und in Transfer-Puffer gespülte PVDF-Membran, und schliesslich wieder 2 Whatman-Papiere wie zuvor aufgeschichtet. Der Transfer erfolgte bei 30 V je nach Grösse des gefragten Proteins 45-85 min. Anschliessend wurde die Membran für 1h bei RT in

Blockierlösung (10% Trockenmilch in TBST oder PBST) auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in der geeigneten Blockierlösung (gemäß Herstellerangaben) bei 4°C ü/n inkubiert. Es wurden folgende Antikörper verwendet:

p75 ^{NTR} ICD (Freund I)	Tim Hucho	rabbit	1:2000
p75 ^{NTR} ECD	Chemicon (AB1554)	rabbit	1:2000
TrkB	BD (610101)	mouse	1:1000
Phospho-TrkA (Tyr 490)	Cell signaling #9141	rabbit	1:1000
Phospho-CREB (Ser 133)	Cell signaling #9191	rabbit	1:1000
CREB	Cell signaling #9104	mouse	1:1000
Phospho-Akt	Cell signaling #4058	rabbit	1:1000
Akt	Cell signaling #9272	rabbit	1:1000
Cyclin E	Santa Cruz (M-20)	rabbit	1:200

Nach mind. dreimaligem Waschen mit TBST für 10-15 min. wurde der jeweilige HRP-konjugierte Zweitantikörper in Blockierlösung (10% Trockenmilch in PBST) in einer Verdünnung von 1:2000 für 1h bei RT zugegeben. Nach erneutem Waschen (4 x 30 min.) wurde die Membran mit einer ECL-Lösung (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers benetzt und anschliessend auf einem SuperRX-Film (Fujifilm) exponiert.

2.2.3 Immunzytochemische Methoden

Immunzytochemie von Neuronen

Für eine spätere Färbung wurden die Neuronen auf mit 65% Salpetersäure behandelten Glas-Deckgläsern kultiviert (siehe auch Bibel et al., 2007). Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd bei 37°C für 25 min. fixiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 0.2% Triton für 10 min. permeabilisiert und mit 3% BSA oder 10% Serum in PBS geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in geeigneter Verdünnung in der Blockierlösung für 1h bei RT. Die folgenden Antikörper wurden in dieser Arbeit benutzt:

Cre	Emilio Casanova	rabbit	1:3000
TuJ1	Covance (MMS-435P)	mouse	1:2000
vGAT	SYSY (131011)	mouse	1:750
vGLUT1	SYSY (135003)	rabbit	1:10000
ChAT	Chemicon (AB144P)	goat	1:100
Isl-1	Hybridoma Bank	mouse	1:500
NF-κB p65	Chemicon (MAB3026)	mouse	1:1000

Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit entsprechenden Zweitantikörper, welche konjugiert waren mit entweder Alexa Fluor®488 oder Alexa Fluor®568 (Molecular Probes 1:1000), für 1h bei RT inkubiert. Gegebenfalls wurde der nukleäre Marker Hoechst (10 µg/ml, Sigma) mit dem Zweitantikörper kombiniert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und einmal in H₂O gespült und eingebettet mit Aqua Poly/Mount (Polysciences). Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axioplan2-Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet.

Immunzytochemie von ES-Zell-Aggregaten

ES-Zell-Aggregate wurden mit Paraformaldehyd bei 4°C für 1h fixiert, und anschliessend zwecks Kryoprotektion für 12-24h in 30% Sucrose gebracht. Die Aggregate wurden in Tissue-Tek (Miles) eingebettet, auf Trockeneis gefroren und bei -80°C gelagert. 16 µm-Schnitte davon wurden in PBS gewaschen und für 30 min. in Blockierlösung (10% Serum, 0.2% Triton in PBS) gebracht. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper folgte für 12h bei 4°C:

BLBP	Hybridoma Bank	mouse	1:750
Nestin	Hybridoma Bank (Rat 401)	mouse	1:500
Glast	Chemicon	Guinea pig	1:1000
Pax6	Hybridoma Bank	mouse	1:1000
MnR2	Hybridoma Bank (81.5 C10)	mouse	1:500

Nach mehrmaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden fluoreszenzgekoppelten 2. Antikörper (Molecular Probes, 1:1000), welcher mit Hoechst (10 µg/ml, Sigma) kombiniert wurde. Die Schnitte wurden gewaschen und eingebettet.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

ES-Kultivierung

Die Kultivierung von ES-Zellen erfolgte normalerweise (J1- und R1-ES-Zellen) in der Gegenwart von embryonalen Fibroblasten (MEF's) und ES-Medium mit 'Leukemia inhibitory factor' (LIF). Die MEF's wurden solange in MEF-Medium kultiviert, bis sie zu etwa 80% konfluent waren und spindelförmige Wellen in der Schale bildeten. Anschliessend wurden sie für 1-2 Std. mit Mitomycin C (10 µg/ml) inaktiviert. Danach wurde 3-malig mit PBS gewaschen und für die Kultivierung von ES-Zellen ES-Medium dazugegeben oder MEF-Medium, falls die MEF's in Reserve gehalten wurden. Solchermassen vorbereitete MEF's wurden höchstens weitere 4 Tage in Kultur gehalten, ältere MEF's wurden nicht mehr für die ES-Kultivierung verwendet. Im Falle der E14R1-ES-Zellen (D. Nebenius, transgenic mouse core facility, Biozentrum, Basel) wurden die ES-Zellen ohne MEF's kultiviert, da gemäss Erfahrung diese Zellen in der alleinigen Präsenz von LIF undifferenziert bleiben. Passagiert wurden diese Zellen, wenn sie ca. 70-80% Konfluenz erreichten. In Anwesenheit von MEF's wurden die ES-Zellen passagiert, wenn die einzelnen Kolonien eine gewisse Grösse und Höhe erreicht hatten, vergleichbar einer Kartoffel-ähnlichen Struktur. Ein Zusammenwachsen der Kolonien wurde durch eine genügend hohe Passagerate vermieden, da dies bekanntlich die Differenzierung der ES-Zellen fördert. Eingefroren wurden die ES-Zellen in ES-Medium mit 2 x Freezing-Medium in einem Verhältnis 1:1 zunächst bei -80°C und nach 2 Tagen in Flüssigstickstoff. Zur langsamen Adaptation an die Temperatur von -80°C wurde ein mit Isopropanol gefülltes Einfriergefäss verwendet.

Generierung mutanter ES-Linien mittels homologer Rekombination

Elektroporation von ES-Zellen:

Für jede Elektroporation wurden 5-10 x 10⁶ ES-Zellen verwendet, welche mindestens zweimal nach dem Auftauen auf MEF's passagiert worden sind. Die Zellen wurden trypsinisiert, zentrifugiert und anschliessend in ca. 650 µl PBS aufgenommen und in eine Elektroporations-Kuvette transferiert. Dazugefügt wurde 30 µg Vektor-DNA, welche zuvor linearisiert und durch Phenol-Chloroform-Extraktion und zweimaliger Ethanol-Präzipitation gereinigt worden war. Die Elektroporationsbedingungen waren 400 V und 25 µF. Dabei wurde ein Tau-Wert von 0.5-0.7 erwartet. Anschliessend wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes ES-Medium überführt und in verschiedenen Dichten auf 5-8 10cm-Schalen verteilt.

Für die E14R1-ES-Zellen wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet:

Die Elektroporation erfolgte mit 5 x 10⁷ ES-Zellen, welche zu 80% konfluent gewachsen und mindestens zweimalig passagiert worden waren. Es wurden ebenfalls 30 µg Vektor-DNA verwendet, welche zuvor linearisiert und durch einmalige Ethanol-Präzipitation und dreimaliges Waschen mit 70% Ethanol gereinigt worden war. Die Zellen wurden zusammen mit der DNA in eine Elektroporationskuvette transferiert und für 10 Min. bei 4°C gekühlt. Die Elektroporationsbedingungen waren 800V und 3 µF, erwartete Tau-Werte lagen bei 0.8-1.2. Nach der Elektroporation erfolgte eine erneute Kühlung bei 4°C für 10 Min., danach wurden die Zellen in verschiedenen Verdünnungen (1/8, 1/16, 1/32, 1/64) auf 20 Schalen ausplattiert.

Cre-Elektroporation:

Für die Cre-Elektroporation wurde 3 µg unlinearisierte Vektor-DNA verwendet. Die Elektroporationsbedingungen waren 200V und 975 µF, der erwartete Tau-Wert war entsprechend gross (20-25). Nach Elektroporation wurden die Zellen vorerst in 3 75cm²-Schalen ausgesät und 24-36h mit einem Mediumwechsel kultiviert. Danach wurden die Zellen trypsinisiert und die entsprechenden Verdünnungen angesetzt (5-7 x 10³ Zellen pro 10cm-Schale).

Selektion mit G418:

Da alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte eine Neomycin-Resistenz beinhalteten, erfolgte die Selektion mit G418 (Sigma). Dabei wurde mind. 24h nach Elektroporation mit der Selektion begonnen. Die für die Selektion geeignete G418-Konzentration wurde für die jeweiligen Zelllinien ausgetestet und betrug für die J1- und R1-ES-Zellen 350 µg/ml und für die E14R1-ES-Zellen 300 µg. Das frisch angesetzte Selektionsmedium wurde jeden Tag gewechselt, die Selektionsdauer betrug 8-11 Tage, die Selektion wurde jedoch für die anschließende Kultivierung der Klone beibehalten, um die Anzahl gemischter Klone niedrig zu halten.

Selektion mit Gancyclovir:

Nach der Cre-Elektroporation erfolgte eine negative Selektion mit Gancyclovir. Die Selektion wurde mit 2 µM Gancyclovir (Sigma) 72h nach Elektroporation begonnen und solange angewendet, bis keine Zellen mehr starben. Da Gancyclovir das Wachstum der ES-Zellen beeinträchtigen kann, wurde diese Selektion anschliessend nicht fortgeführt.

Nach der Selektion wurden Klone gepickt. Dazu wurde das ES-Medium mit PBS ersetzt und die Klone mit der Pipettenspitze gelöst und einzeln in 96 Well-Platten transferiert. Die Zellen wurden mechanisch oder bei Bedarf mit Trypsin vereinzelt und in mit MEF's vorbereitete 24 Well-Platten transferiert. Das ES-Medium (mit G418) wurde jeden Tag gewechselt. Wenn die ES-Zellen schöne Kolonien gebildet haben, wurde die Hälfte der Zellen eingefroren und der Rest für die spätere DNA-Extraktion in demselben Well weiterkultiviert, bis dieses ganz von ES-Zellen überwachsen war.

Im Falle der E14R1-Zellen erfolgte die Kultivierung der Klone in 96-Well-Platten. Wenn die meisten Klone gut gewachsen waren, wurde die gesamte Platte trypsiniert, je die Hälfte der Zellen in der 96 Well-Platte eingefroren und die übrigen Zellen in 24 Well-Platten transferiert und kultiviert für die spätere DNA-Extraktion.

Karyotypisierung von positiven ES-Klonen:

Positive Klone wurden aufgetaut und wie üblich kultiviert, expandiert und Reservezellen eingefroren. Sollten die Klone für eine Mausgenerierung verwendet werden, erfolgte eine Karyotypisierung. Die Zellen wurden am Vortag in 6 Well-Platten so passagiert, dass sie am nächsten Tag 80% Konfluenz zeigten. Dann wurde den Zellen Colcemid (Sigma) in einer Konzentration von 40 µg/ml in ES-Medium zugesetzt. Nach 4.5h wurden die Zellen "trocken" trypsiniert, d.h. das Trypsin wurde nach der Zugabe sofort wieder entfernt, die verbleibende Menge reichte gerade aus für die Trypsinierung. Die Zellen wurden in 3 ml PBS aufgenommen und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 2-3ml einer vorgewärmten KCl-Lösung (0.56%) tropfenweise und durch Schütteln vorsichtig resuspendiert und exakt 10 Min. bei RT inkubiert, um die Zellen aufzuquellen. Die Zellen wurden erneut pelletiert und ebenfalls tropfenweise mit 2ml der Fixierlösung, bestehend aus 75% Methanol und 25% Eisessig, versetzt und für 10 Min. bei RT inkubiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und die Zellen in Fixierlösung ü/n bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit einer Pipette auf entfettete, auf einem Kühlelement liegende Objektträger aus einer Höhe von ca. 2m getropft. Die bei RT getrockneten Objektträger wurden 1h lang in Giemsa-Färbelösung (Gibco) gefärbt und anschliessend mit Entellan (Merck) eingebettet. Für jeden Klon wurden mind. 20 gut aufgelöste Karyotypen photographiert und die Anzahl Chromosomen bestimmt. Die Karyotypen, welche unter 40 Chromosomen aufwiesen, wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Injektion von ES-Zellen in Blastozysten

Die Injektion von ES-Zellen in Blastozysten erfolgte entweder durch D. Nebenius-Oosthuizen, Biozentrum Basel oder durch Frank Zimmermann, Heidelberg DE.

ES-Differenzierung

Die Differenzierung in Neuronen aus ES-Zellen erfolgte unverändert nach dem Protokoll, welches in unserem Labor entwickelt wurde (Bibel et al., 2004; Bibel et al., 2007).

Elektroporation von neuronalen Vorläuferzellen

Neuronale Vorläuferzellen wurden mittels Elektroporation nach einem modifizierten Protokoll von Amaxa mit dem Rat NSC nucleofector™ Kit (Amaxa) transfiziert. Dabei wurde die Differenzierung der ES-Zellen in Neurone gemäss dem Protokoll (Bibel et al., 2004) bis zum Aggregatzustand am Tag 8 durchgeführt. Die Aggregate einer Schale wurden in ein 50 ml Falcon überführt und durch die Schwerkraft sich sinken gelassen. Das Pellet wurde mit 5 ml Accutase (PAA) aufgenommen und im Wasserbad bei 37°C für mind. 10 Min. inkubiert, bis die Aggregate durch vorsichtiges Pipettieren dissoziierten. Anschliessend wurden sie über ein Zellsieb gefiltert und gezählt. 3-5 x 10⁶ Zellen wurden pelletiert, in 100 µl Nucleofector-Lösung aufgenommen und mit je 1 µg Vektor-DNA versetzt. Anschliessend wurden die Zellen in eine Amaxa-Küvette transferiert, mit dem A-33 Programm (Amaxa) elektroporiert und sofort in vorgewärmtes N2-Medium gegeben. Nach Zentrifugation wurde das Pellet erneut in N2-Medium aufgenommen und auf wie üblich beschichtete Platten (1-3 Wells einer 12-Well-Platte) ausgesäht. Bei der Transfektion wurde darauf geachtet, dass möglichst schnell gearbeitet wurde, um die Todesrate klein zu halten.

Luziferase-Assay

Der Luziferase Assay wurde von A. Kaus, Witten DE, durchgeführt. Neuronale Vorläuferzellen wurden wie oben beschrieben mit κB-luc-Reporter-Vektor, Renilla-luc-Vektor und pmaxGFP zur Bestimmung der Transfektionseffizienz transfiziert. Gleichzeitig erfolgte auch ein Transfer mit Mock-Vektor oder aufsteigenden Mengen an IKK2-Vektor. Die Transfektionseffizienz wurde aus Triplikaten bestimmt durch die Anzahl GFP-positive Zellen verglichen mit der totalen Zellzahl. Für den Luziferase-Assay wurden die Zellen 48h nach Transfektion mit dem Renilla Luciferase Assay Kit (Promega) gemäss Herstellerprotokoll lysiert. Die Luziferase-Aktivität wurde mit dem Luminometer (Lumat LB9507 von Berthold Technologies) gemessen, indem zunächst die relative Lumineszenz von κB-luc bestimmt wurde, gefolgt von der Renilla-luc-Aktivität. Die effektive Luciferase-Aktivität wurde berechnet als Verhältnis des κB-luc-Wertes zu dem Renilla-luc-Wert. Alle Messungen erfolgten als Triplikate und wurden statistisch ausgewertet mit der Prisma-Software.

Bestimmung der Zelltodrate

Die Zelltodrate in nicht-transfizierten ES-Neuronen wurde bestimmt als Neurone mit pyknotischem Zellkern (Hoechst-Färbung) verglichen mit der Gesamtzahl an Neuronen (TuJ1-Färbung). Gezählt wurden 3 verschiedene Wells von 2 verschiedenen Differenzierungen. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test berechnet und die Daten erscheinen als mean ± standard error.

Für die Bestimmung der Zelltodrate von transfizierten neuronalen Vorläuferzellen (siehe oben) wurde ein Transfer von pmaxGFP, Mock-Vektor oder aufsteigenden Mengen an entweder IκBα1- oder IKK2-Vektor nach oben beschriebenem Protokoll durchgeführt. Die Zellen wurden 48h nach Transfektion mit DAPI (1 µg/ml) für 1h bei 37°C inkubiert. Sterbende Zellen wurde mikroskopisch bestimmt als GFP-positive, DAPI-positive Zellen mit pyknotischem Zellkern. Die Zelltodrate wurde berechnet als Verhältnis der sterbenden Zellen

im Vergleich zu allen GFP-positiven Zellen. Die statistische Analyse erfolgte basierend auf Triplikaten mit der Prisma-Software und der Two-way-anova-Methode.

2.2.5 Hippocampale Schnittkulturen

Präparation und Kultivierung von Hippocampus-Schnitten

Die Präparation und Kultivierung von Hippocampus-Schnitten erfolgte nach der Stoppini-Methode (Stoppini et al., 1991). Es wurden dazu Mäuse des C57Bl/6-Hintergrundes im Alter P7 verwendet. Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Dekapitation, anschliessend wurde das Gehirn entnommen und in eiskaltes Präparationsmedium überführt. Die Hippocampi wurden mit zwei geeigneten Scalpellen präpariert und dabei auf die Erhaltung aller Strukturen geachtet. Es wurden daraus 400 µm dicke Schnitte mittels einem "Tissue Chopper" (McIlwain) geschnitten. Im Präparationsmedium wurden die Schnitte unter Mikroskop beurteilt und nur die Schnitte erhaltenen Strukturen in Kultur gebracht. Dazu wurden die Wells einer 6 Well-Platte mit je 1 ml vorgewärmten Kulturmediums gefüllt und mit Millicell-Membranen (Millipore) ausgestattet. Auf die Oberfläche einer Millicell-Membran wurden 3-4 Schnitte transferiert, sodass sie auf der Unterseite mit Nährmedium versorgt und mit der Oberfläche mit der Inkubator-Luft in Kontakt waren. Die Inkubationsbedingungen waren 5% CO₂ und 37°C. Das Kulturmedium wurde am Tag nach der Präparation gewechselt und anschliessend alle 2-3 Tage.

Transplantation von neuronalen Vorläuferzellen

Es wurden immer gefrorene Röhrchen von neuronalen Vorläuferzellen für die Transplantation in Hippocampus-Schnitte (1 Tag nach Präparation) verwendet. Diese Zellen wurden wie üblich in EB-Medium aufgetaut und anschliessend in wenig (200 µl) N2-Medium aufgenommen und in eine kleine nicht-adhärierende Petri-Schale gebracht und während des Transplantationsprozederes im Inkubator gehalten. Die Transplantation erfolgte mittels Mundpipettierung und einer selbstgezogenen Glasnadel von Hand unter mikroskopischer Sichtkontrolle. Die Glasnadel wurde auf dem Heizapparat (Marishige, Japan, Modell PP-830) so gezogen, dass die Öffnung für die Zellen gross genug war und sie nicht gebrochen werden musste, um eine Verletzung der Zellen und anschliessende Verklebung der Nadel zu verhindern. Die Zellen wurden in den entsprechenden Regionen des Hippocampus auf der Oberfläche des Schnittes abgesetzt, ohne das Gewebe zu zerstören oder zuvor eine Läsion zu setzen. Die Transplantation der Zellen musste innerhalb 30-40 min. abgeschlossen sein, da die neuronalen Vorläuferzellen in Suspension nicht länger überleben konnten. Die weitere Kultivierung der Schnitte erfolgte unverändert wie oben beschrieben.

Immunzytochemische Färbung von Hippocampus-Schnitten

Die Schnitte wurden zunächst in 4% Paraformaldehyd (1 ml auf Membran, 1 ml in das Well) ü/n bei 4°C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Permeabilisierung mit 0.4% TritonX100 für 20h bei 4°C. Wiederum wurde dreimalig mit PBS gewaschen und die Schnitte in 20% BSA für 4h bei RT geblockt. Für die Inkubation mit den Antikörpern wurden die Membranen aus der Halterung ausgeschnitten, kurz mit 5% BSA gewaschen und auf Objektträger gebracht. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte in 5% BSA für 16h bei 4°C. Die Schnitte wurden anschliessend viermal mit 5% BSA für mind. 10 min. gewaschen und mit dem entsprechenden fluoreszenzgekoppelten 2. Antikörper (Molecular Probes, 1:2000) sowie Hoechst (10 µg/ml, Sigma) entweder bei 4°C für 16h oder bei RT für 4-5h inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit 5% BSA für je 10 min. und zwei Waschschrte mit PBS für 5 min. und die Einbettung mit Aqua Poly/Mount (Polysciences). Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axioplan2-Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 bearbeitet.

Folgende 1. Antikörper wurden eingesetzt:

GFP	Molecular Probes (A11120)	mouse	1:1000
GFP	Molecular Probes (A6455)	rabbit	1:1000
NeuN	Chemicon (MAB377)	mouse	1:500
Synaptophysin	Sigma (SVP-38)	mouse	1:250
vGAT	SYSY (131011)	mouse	1:750
vGLUT1	SYSY (135003)	rabbit	1:10000
Calbindin	SWANT (300)	mouse	1:5000
Calretinin	SWANT (6B3)	mouse	1:5000
Parvalbumin	SWANT (PV-28)	rabbit	1:5000

Elektronenmikroskopische und elektrophysiologische Untersuchung der Hippocampuschnitte

Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden von Oliver Kretz, alle elektrophysiologischen Untersuchungen von Imre Vida im Labor von Prof. M. Frotscher, Freiburg, DE durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung mutanter Mauslinien zur zelltyp- und zeitspezifischer Deletion von p75^{NTR}

Zu Beginn dieser Arbeit existierten 2 Deletionsmutanten von p75^{NTR} in der Maus, die ExonIII-Mutante (Lee et al., 1992) und die in unserem Labor generierte ExonIV-Mutante (von Schack et al., 2001). Da p75^{NTR} während der Entwicklung in den Zellen hoch exprimiert ist, hinterlassen die erwähnten Mutationen bereits zum Zeitpunkt der Geburt schwerwiegende Veränderungen im zentralen und peripheren Nervensystem. Im adulten Nervensystem ist p75^{NTR} in den meisten neuronalen Zelltypen herunterreguliert, eine Ausnahme bildet das cholinerge System im Septum, welches den Hippocampus und den zerebralen Kortex innerviert. Diese Nervengruppe ist besonders interessant, da sie funktionell eine zentrale Rolle bei selektiver Aufmerksamkeit spielt und den Zelltypus darstellt, welcher in der Alzheimer-Krankheit geschädigt wird. Um die Funktion von p75^{NTR} im adulten Nervensystem, im speziellen des Septums zu untersuchen, wählten wir als Strategie die Kombination einer konditionalen p75^{NTR} KO-Maus und einer transgenen Maus, welche ein induzierbares Cre-System neuronenspezifisch exprimiert.

3.1.1 Generierung einer konditionalen p75^{NTR}-ES-Zelllinie

Das Konstrukt mit den entsprechenden Mutationen für p75^{NTR} konnte ich dank der Vorarbeit von Yong Ho Che aus unserem Labor übernehmen. Die Arbeit mit dem Ziel eine konditionale p75^{NTR}-KO-Maus zu generieren, war schon relativ fortgeschritten, d.h. es existierten schon die ersten Chimären mit dieser Mutation. Da jedoch keine Keimbahn-Transmission gelang, war es meine Aufgabe, die ES-Zellen neu zu generieren.

Mäuse mit einer Mutation in einem bestimmten Locus werden normalerweise generiert aus ES-Zellen, in welchen ein Gen verändert wird durch homologe Rekombination eines Targeting-Konstruktes, welches die Mutation beherbergt. Eine Selektionskassette im Targeting-Konstrukt dient zur positiven Selektion der ES-Zellen, welche das Konstrukt integriert haben (Neomycin-, Puromycin- oder Hygromycin-Resistenzgen). Manchmal ist die Resistenzkassette von sogenannten loxP-Sequenzen flankiert, welche als Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase dienen. Die Elimination der Resistenzkassette durch Cre kann von Vorteil sein, wenn die ES-Zellen ein zweites Mal rekombiniert werden sollen oder wenn die Nähe des starken Promotors für das Resistenzgen die Expression der benachbarten Gene beeinflusst. Um eine negative

Selektion der Klone zu ermöglichen, welche nach Cre-Expression die Kassetten nicht rekombiniert, d.h. eliminiert haben, wird oft das Gen Thymidin-Kinase in derselben Kassetten benutzt. Die Selektion erfolgt in diesem Fall mit Gancyclovir, welches bei Anwesenheit von Thymidin-Kinase sich in ein toxisches Substrat umwandelt.

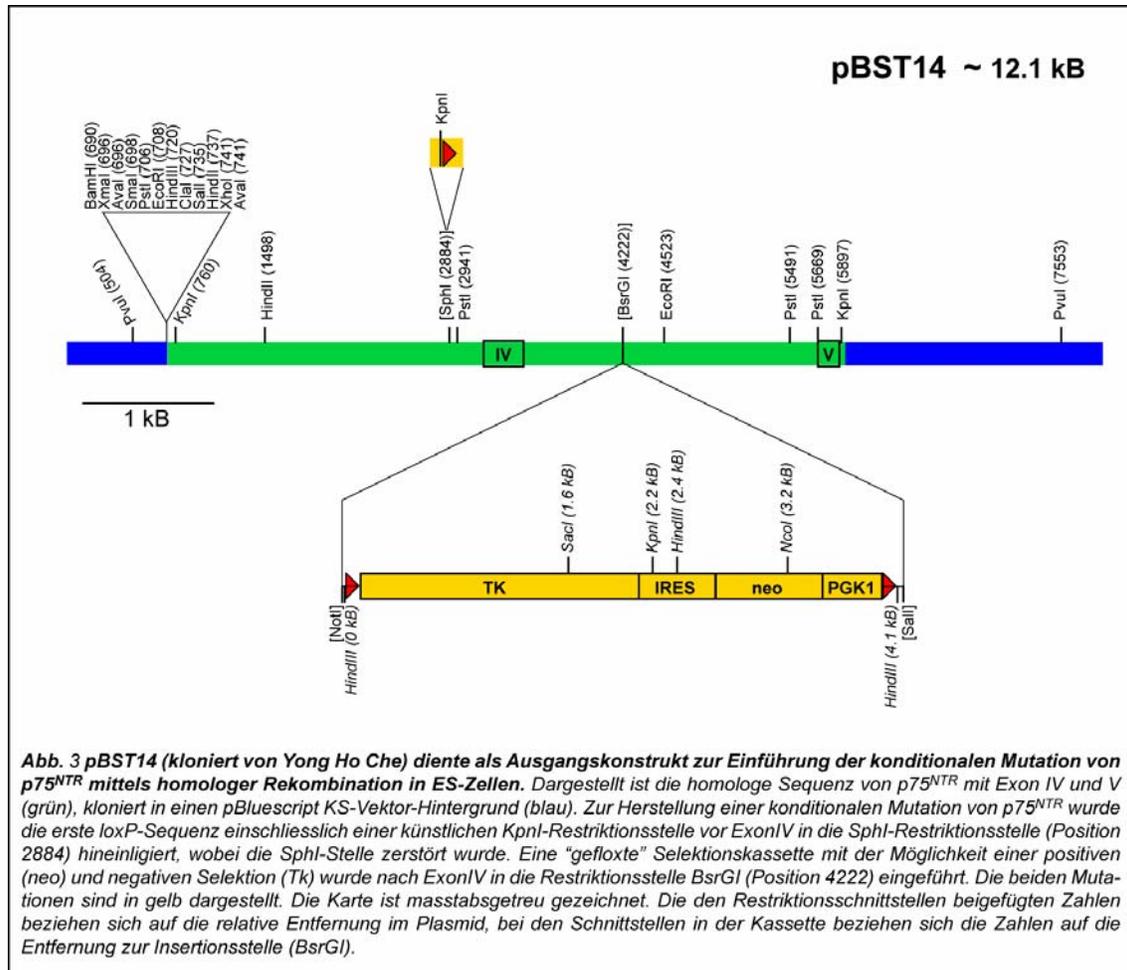
Um eine konditionale Mutation von p75^{NTR} zu realisieren, wurde folgende Strategie gewählt: Eine ausgewählte Region soll von loxP-Sequenzen flankiert werden, indem eine loxP einzeln eingeführt wird und die zweite loxP in Form einer geflochten Selektionskassetten, welche eine Neomycin-Resistenz sowie eine Thymidin-Kinase enthält, das Ende der Region markieren soll.

3.1.1.1 Design und Klonierung des Rekombinationskonstruktes

Für das Targeting von p75^{NTR} wurde das ExonIV ausgewählt, welches die Stalk-Region sowie die transmembranäre Domäne umfasst (siehe Abb. 1). Die Überlegungen waren, dass die transmembranäre Domäne für die Integration von p75^{NTR} in die Zellmembran und somit für seine Rezeptorfunktion unabdingbar ist und dass die existierende ExonIV-Mutante sich als KO-Maus schon bewährt hatte (Paul et al., 2004 war zu diesem Zeitpunkt noch nicht erschienen).

Als Basis für die Klonierung diente ein Plasmid (pBSGDNA von Georg Dechant), welches genomische DNA mit ExonIV und ExonV von p75^{NTR} enthielt. Diese homologe Sequenz war 5137bp lang. Die Sequenzierung ergab eine einmalig vorkommende Restriktionsstelle vor ExonIV (SphI) sowie eine solche nach ExonIV (BsrGI) zur Einführung einer loxP-Sequenz und einer geflochten Selektionskassetten.

Um später bei der Southern blot-Analyse die Wildtyp-Sequenz von einer Sequenz mit geflochtenem ExonIV unterscheiden zu können, wurde zusammen mit der loxP-Sequenz auch eine künstliche KpnI-Restriktionsstelle eingeführt. Für das Fragment mit der loxP-Sequenz, der KpnI-Restriktionsstelle sowie den passenden SphI-Enden wurden 2 Oligomere bestellt, annealed und in die SphI-Stelle hineinligiert, wobei die SphI-Restriktionsstelle zerstört wurde. Die geflochte Resistenzkassetten (PGK-neo-IRES-tk) wurde dem Plasmid neo-tk (von Uli Müller, FMI) entnommen. Zur Insertion der Kassetten nach ExonIV wurde pBGDNA mit BsrGI geschnitten und die Enden aufgefüllt. Die Resistenzkassetten wurde aus dem Plasmid neo-tk mit NotI und SalI herausgeschnitten, die Enden ebenfalls aufgefüllt und in pBGDNA hineinligiert. Dieser Targeting-Vektor wurde pBST14 benannt (siehe Abb. 3).



3.1.1.2 Homologe Rekombination in ES-Zellen

Für die homologe Rekombination wurden 30 µg des mit XhoI linearisierten Plasmids pBST14 in E14R1 ES-Zellen (von Daniela Nebenius-Ooisthuizen, TMCF Biozentrum) elektroporiert. Nach 24h wurde die Selektion mit G418 begonnen und nach 9 Tagen wurden während 3 Tagen 1300 Klone in 96-Well-Platten gepickt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden je 70% der Zellen eingefroren und die restlichen 30% weiterkultiviert, um später DNA für die Analyse zu extrahieren.

Die Detektion eines korrekten Rekombinationsereignis beruht normalerweise auf der Analyse von Unterschieden im Restriktionsmuster der genomischen DNA vor und nach homologer Rekombination mittels Southern Blot. Dabei müssen die Sonden für die Detektion der Restriktionsfragmente ausserhalb der homologen Sequenz liegen, um nicht eine zufällige Integration des Konstruktes ins Genom ebenfalls zu detektieren.

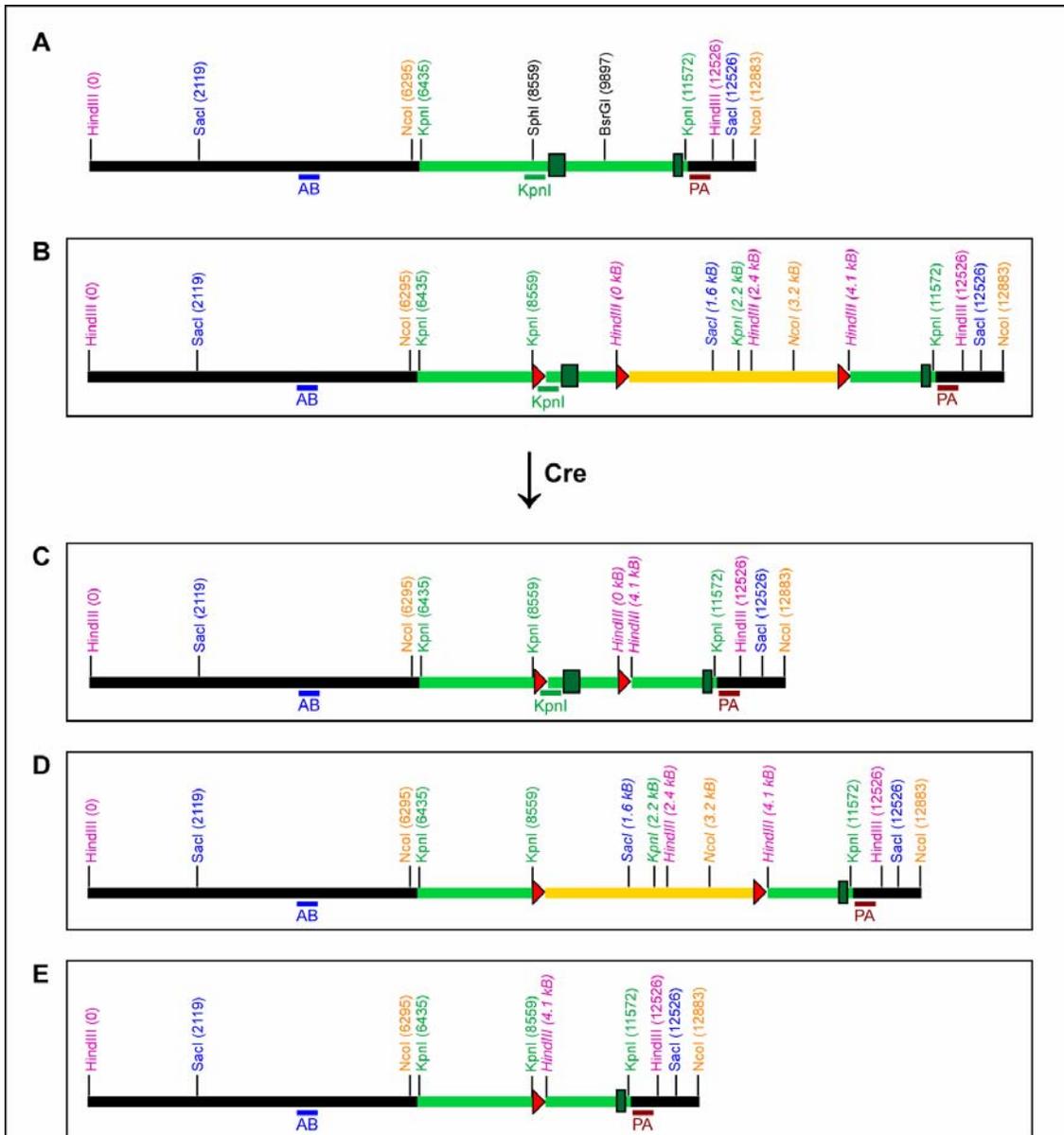


Abb. 4 Southern blot-Strategie zur Analyse der ES-Zellklone nach der Elektroporation mit pBST14 sowie nach der Elektroporation mit Cre-Plasmid. Die homologe Sequenz ist in grün dargestellt, in schwarz die WT-Sequenz ausserhalb der homologen Sequenz und in gelb die Selektionskassette. ExonIV und V erscheinen in dunkelgrün, die loxP in rot. Die gesamte Sequenz ist massstabgetreu gezeichnet. **A** Wildtyp, **B** Sequenz nach korrekter Integration von pBST14, **C** Sequenz nach Exzision der Selektionskassette durch Cre (konditionale Mutation von $p75^{NTR}$), **D** Sequenz nach Exzision von ExonIV durch Cre, **E** Sequenz nach Exzision von ExonIV und Selektionskassette durch Cre (Null-Mutation von $p75^{NTR}$). Es sind alle Restriktions-Schnittstellen aufgeführt, welche für die Southern Blot-Analyse wichtig waren (SacI, NcoI, HindIII und KpnI). Die den Enzymen beigefügten Nummern beziehen sich auf die Entfernung in der genomischen Sequenz zum Referenzpunkt HindIII (0). In der Selektionskassette beziehen sich die Zahlen auf die Entfernung zum Punkt der Insertion (in Kursivschrift). AB = 5'-Sonde, PA = 3'-Sonde, KpnI = KpnI-Sonde.

Im vorliegenden Fall wurden die Klone mit einer PCR-Strategie (Abb. 17 oben) vorgescreent und nur diejenigen Klone mit Southern Blot analysiert, bei welchen die Anwesenheit einer loxP mit der PCR gesehen wurde. Die Southern Blot-Strategie ist in Abb. 4 zusammengefasst, die erwarteten Fragmente sind in Abb. 5 angegeben.

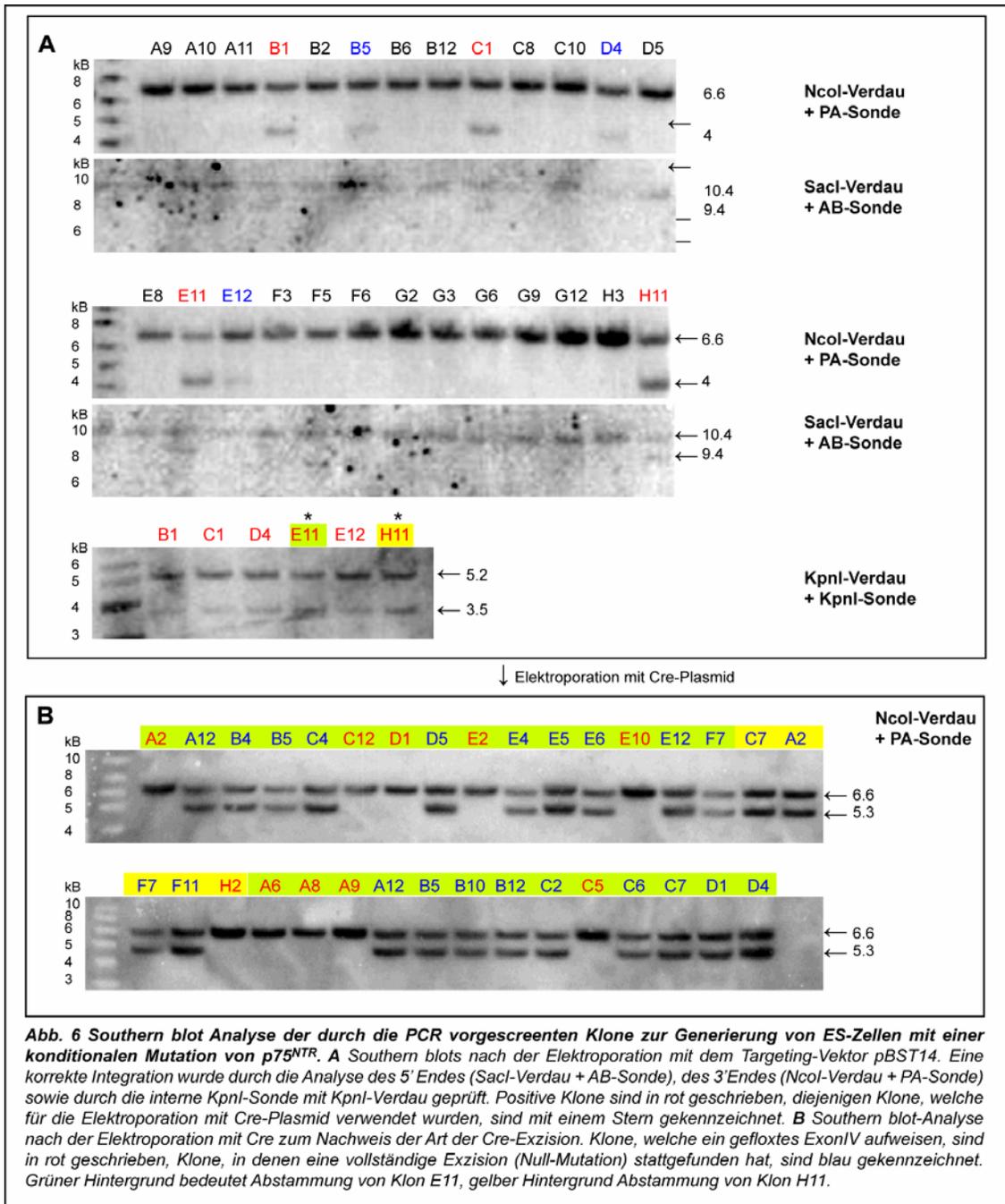
Verdau	Probe	Fragmentlängen				
		A	B	C	D	E
SacI	AB	10.4	9.4	10.4	8.1	9.1
HindIII	AB	12	9.9	9.9	12.5	8.5
NcoI	PA	6.6	4	6.6	4	5.3
KpnI	KpnI	5.2	3.5	3	-	-

Abb. 5 Angaben der erwarteten Fragmentlängen mit den verschiedenen Verdau und Sonden. A-E entsprechen den Angaben in Abb. 4

Von 200 analysierten Klonen zeigten 6 Klone die zwei erwarteten Banden für eine korrekte Integration sowohl am 5'- wie auch am 3'-Ende, und auch mit der internen KpnI-Sonde, welche die Anwesenheit der loxP detektiert (Abb. 6A). Bei 2 Klonen war jedoch die Bande für das rekombinierte Allel deutlich schwächer als für das WT-Allel, weshalb man von gemischten Klonen ausgehen muss. Die übrigen 4 Klone zeigten ein Bandenmuster für eine korrekte Integration, die Häufigkeit für diese homologe Rekombination beträgt somit 2%. Die Klone E11 und H11 wurden für die nachfolgende Elektroporation mit Cre-Plasmid weiterverwendet.

3.1.1.3 Entfernung der Selektionskassette mit Cre-Plasmid

Da die Rekombinationshäufigkeit mit der Konzentration an Cre einhergeht, wurde für die Elektroporation nur eine kleine Menge (3 µg) unlinearisiertes Cre-Plasmid verwendet, um das Ereignis einer vollständigen Rekombination und damit einer Null-Mutation gering zu halten. Die Selektion mit Gancyclovir (2 µM) erfolgte 72h nach der Elektroporation und nach 12 Tagen wurden 600 Klone in 96-Well-Platten gepickt und wie oben beschrieben verfahren. Wiederum wurden die Klone zunächst mit der erwähnten PCR-Strategie vorgescreent, diesmal mit 2 verschiedenen Primerpaaren zur Detektion der loxP im Fall der konditionalen Mutation und zur Detektion des Null-Allels. Mit dem Southern Blot am 3' Ende konnten die in der PCR positiven Klone für ein "gefloxtes" ExonIV oder für eine Null-Mutation bestätigt werden (Abb. 6B). Einzige Ausnahme bilden die Klone H2 und A6. Aus dieser Elektroporation gehen somit 8 Klone mit gefloxtem ExonIV und 23 Klone mit einer Null-Mutation hervor.



3.1.2. Generierung einer ES-Zelllinie mit einem induzierbaren Cre-System

Cre-Mauslinien werden oft unter einem bestimmten Promotor verwendet, um eine Exzision des gewünschten Gens nur in einer bestimmten Zellpopulation zu ermöglichen. Ein induzierbares Cre-System geht noch einen Schritt weiter, indem die Cre-Aktivität zu einem gewünschten Zeitpunkt ausgelöst werden kann. Dies ermöglicht die Untersuchung von

Genfunktionen auch im adulten Organismus, nach abgeschlossener, intakter Organentwicklung oder auch umgekehrt das Wiederanschalten eines Gens nach anfänglicher Deletion, dies mehr als therapeutischer Ansatz.

Das erste induzierbare Cre-System stammt aus der Immunologie und benutzt den Mx1-Promoter, welcher durch Injektionen von Interferon- α oder - β aktiviert werden kann (Kuhn et al., 1995). Die offensichtlichen Limiten dieses Systems wurden später auf zwei Wegen umgangen: durch das Kombinieren des Cre/loxP-Systems mit dem TetR-System oder indem Cre-Varianten benutzt wurden, welche nur in Anwesenheit von exogenen Inducern funktionierten. Bei den letzteren ist die Cre-kodierende Region mit der Ligand-bindenden Domäne von entweder Progesteron- oder Östrogen-Rezeptoren fusioniert. Es handelt sich hierbei um mutierte Formen der Rezeptoren, um eine Bindung von endogenen Liganden zu verhindern. Diese Cre-Rezeptor-Fusionsproteine werden in Abwesenheit des Liganden von HSP90 im Cytoplasma gebunden, bei der Bindung des Liganden (synthetische Steroide) an den Rezeptor findet eine Translokation des Fusionsproteins in den Zellkern statt. Dieses System wurde in den letzten Jahren laufend verbessert und erfolgreich in Zellsystemen sowie in der sich entwickelnden und adulten Maus (Danielian et al., 1998, Weber et al., 2001, Hayashi and McMahon, 2002, Guo et al., 2002) und speziell auch im adulten Gehirn (Casanova et al., 2002) angewendet.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten induzierbaren System handelt es sich um CreERT2, welches im Labor von Pierre Chambon entwickelt wurde (Feil et al., 1997). Die in diesem Konstrukt vorhandenen drei Mutationen (G400V/M543A/L544A) bedingen eine 10-fach stärkere Affinität für den Liganden 4-hydroxy-Tamoxifen als das vorherig benutzte CreERT (G521R) (Indra et al., 1999). Zudem ist für CreERT2 in keiner Publikation eine Hintergrundaktivität, d.h. eine Cre-Aktivität ohne Liganden beschrieben. Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit waren erfolgreiche Rekombinationen mit CreERT2 in der Haut, in Adipozyten, in Oligodendrozyten und Schwann-Zellen beschrieben (Indra et al., 1999, Imai et al., 2001, Leone et al., 2002). Wir haben uns deswegen für dieses Konstrukt entschieden. Allerdings gab es einige offene Fragen: Aus den genannten Experimenten ging auch immer klar hervor, dass in unterschiedlichen Zellpopulationen die Rekombinationsrate stark variiert, so wie das für die Cre-Aktivität bei unterschiedlichen Loci längst bekannt ist (Vooijs et al., 2001). Aus anderen Arbeiten wurde klar, dass Neurone eine besonders schwierige Zielpopulation für induzierbare Cre-Systeme sind, aufgrund ihrer Langlebigkeit und Unteilbarkeit sind sie besonders anfällig für eine schwache, aber stetige Hintergrundaktivität (Kellendonk et al., 1999, Casanova et al., 2002, Seibler et al., 2003). Zudem muss die Blut-Hirnschranke für die Inducer passierbar sein. Möglicherweise ist auch durch den Mitosearrest das Chromatin für die Cre-Rekombinase nicht in gleichem Masse zugänglich.

Aus diesen Gründen konnten wir nicht voraussehen, ob dieses System in Neuronen und für den p75^{NTR}-Locus wirklich funktionieren würde.

3.1.2.1 Klonierung des Rekombinationskonstruktes *tau*-CreERT2

Wahl des Genlokus

Für die Expression von CreERT2 wählten wir den Lokus *tau*, welcher für ein Mikrotubulin-binding Protein kodiert. *Tau* ist auf hohem Niveau vor allem in Neuronen und in geringeren Mengen auch in Oligodendrozyten und in manchen nicht-neuronalen Geweben exprimiert (LoPresti et al., 1995, Gu et al., 1996, Vanier et al. 1998). Die Generierung einer *tau*-EGFP-Maus in unserem Labor (Tucker et al., 2001) zeigte keine Unterschiede des EGFP-Signals mit einer Färbung gegen den Neuronen-spezifischen Marker β -Tubulin III. Ein weiterer entscheidender Vorteil dieses Lokus ist die mehrfach belegte Tatsache, dass die Deletion von *tau* keinen neuronalen Phänotyp zur Folge hat (Harada et al., 1994, Tucker et al., 2001). Als Alternative diskutierten wir auch den *Lhx8*-Lokus, welcher selektiv in den cholinergen Neuronen des Septums exprimiert zu sein scheint. Für das Ziel, p75^{NTR} selektiv in dieser Neuronenpopulation im adulten Nervensystem auszuschalten, genügte der *tau*-Lokus jedoch, da p75^{NTR} im adulten Nervensystem mit der Ausnahme dieser Population nicht mehr exprimiert ist. Zudem hielt der Ansatz mit *tau*-CreERT2 uns Optionen für die Untersuchung von anderen Neuronenpopulationen offen.

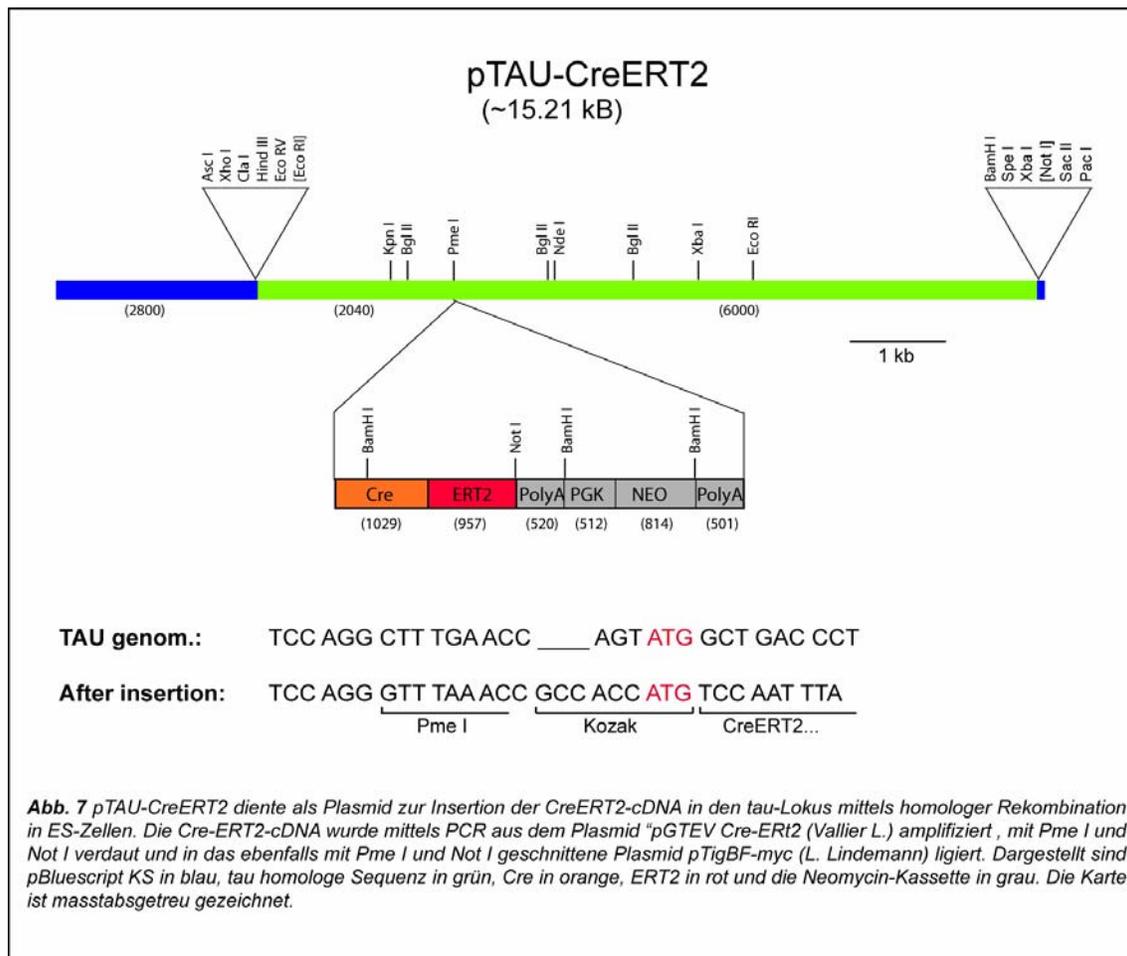
Klonierung von TAU-CreERT2

Als ersten Schritt erfolgte eine Sequenzierung des Plasmids "pGTEV Cre-ERT2" (Vallier L.), welches die cDNA von CreERT2 enthält und freundlicherweise vom Labor Pierre Chambon zur Verfügung gestellt wurde. Die Sequenzierung bestätigte die drei beschriebenen Mutationen in der Östrogen-LBD (G400V/M543A/L544A).

tau ist von einem einzigen Gen kodiert, seine Transkripte sind jedoch in komplexer Weise alternativem Splicing unterworfen. Da das Exon I von *tau* in allen Transkripten vorhanden ist, wurde es als Insertionsstelle für die Generierung der *tau*-EGFP-Maus ausgewählt. Für das TAU-CreERT2-Konstrukt wurde ebenfalls Exon I gewählt, für die Klonierung wurde mir freundlicherweise von Lothar Lindemann aus unserem Labor ein Plasmid zur Verfügung gestellt, welches die genomische Sequenz um das Exon I mit einer optimierten Kozak-Sequenz enthielt. Dieses Plasmid "pTIBFmyc" enthielt 8.3kb genomischer DNA aus dem Bereich um Exon I des *tau*-Lokus, das Insert (EphA5-Rezeptorkörper), ein SV40 Polyadenylierungssignal (pA) sowie einen positiven Selektionsmarker, welcher sich aus dem

Promotor PGK, der cDNA des Gens Neomycinphosphotransferase (neo) und wiederum einer SV40 pA zusammensetzte (siehe Doktorarbeit von Lothar Lindemann). Somit konnte pTAU-CreERT2 im wesentlichen durch das Austauschen von dem Insert EphA5-Rezeptorkörper mit der cDNA von CreERT2 kloniert werden:

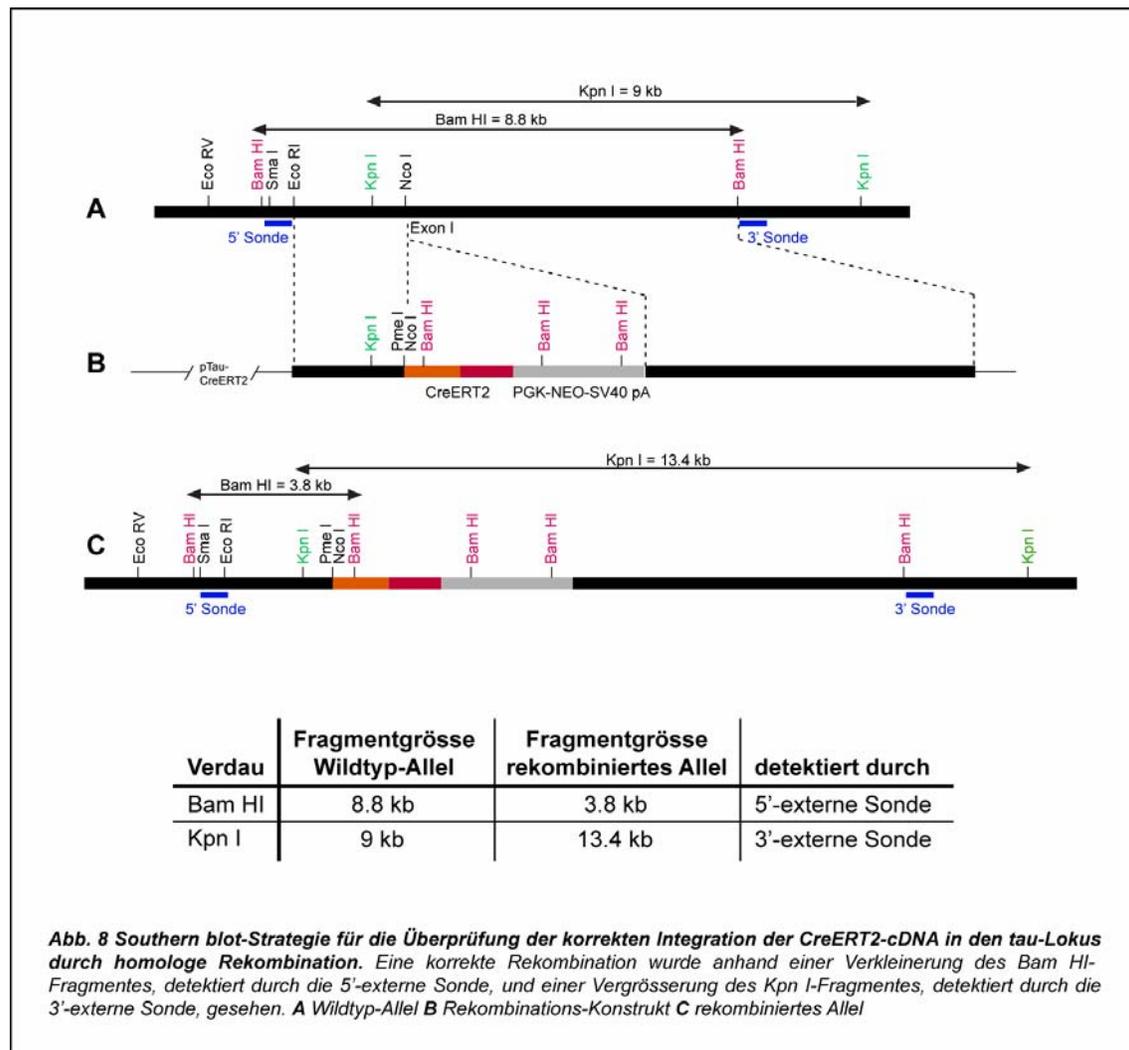
1. Aus dem Plasmid "pTIBFmyc" wurde mittels Verdau mit PmeI und NotI das Insert (EphA5-Rezeptorkörper) herausgeschnitten.
2. Die cDNA von CreERT2 wurde durch eine PCR-Reaktion aus dem Plasmid "pGTEV Cre-ERT2" amplifiziert und das Produkt anschliessend sequenziert, um allfällige Lesefehler der verwendeten Pfu-Polymerase zu detektieren. Die Primer waren so konzipiert, dass die PmeI- und NotI-Schnittstellen bereits darin enthalten waren. Das Produkt wurde anschliessend mit PmeI und NotI geschnitten und in das aus dem Schritt 1. resultierende Plasmid hineinligiert. Das Plasmid "pTAU-CreERT2" ist in Abb. 7 dargestellt.



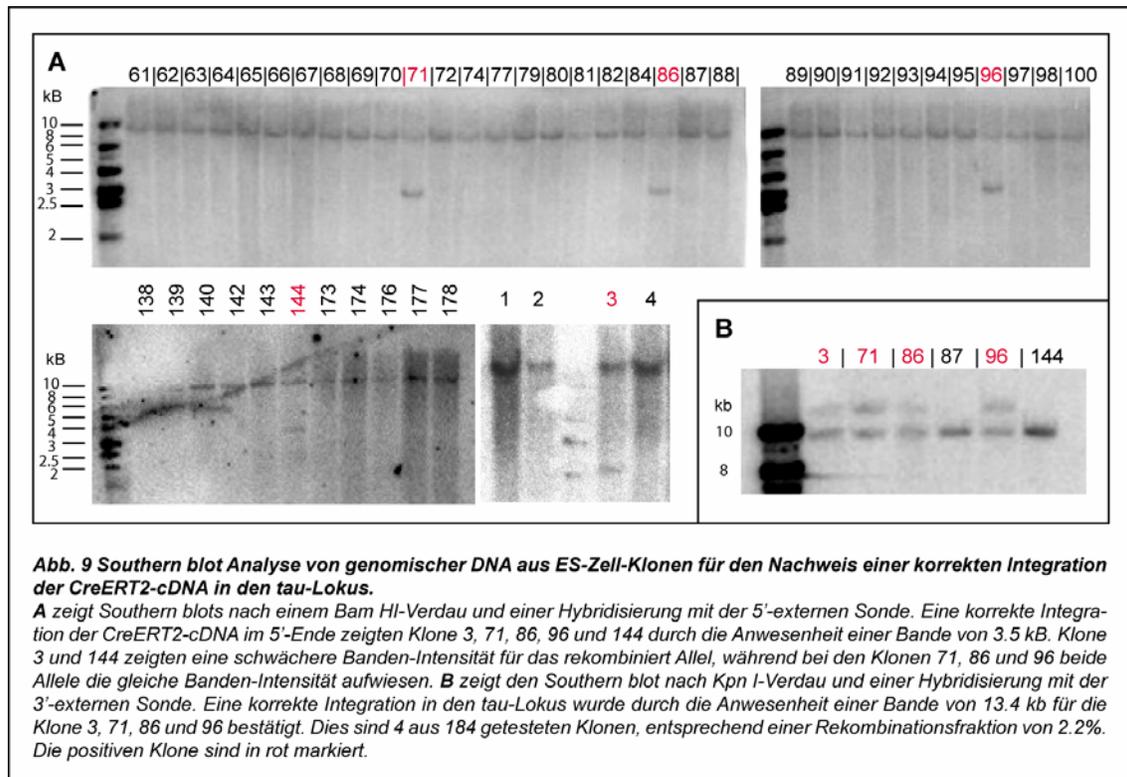
3.1.2.2 Homologe Rekombination von pTAU-CreERT2 in ES-Zellen

Für die homologe Rekombination wurde 30 µg des mit Ascl linearisierten Plasmids "pTAU-CreERT2" in J1 ES-Zellen elektroporiert. Nach 24h wurde mit der Selektion G418 (340 µg aktive Substanz/ml) begonnen, nach einer Woche konnten 200 Klone gepickt werden und dann wie oben beschrieben verfahren werden.

Für die Detektion eines korrekten Rekombinationsereignis wurde die im Labor bereits etablierte Southern blot-Strategie für den *tau*-Lokus angewendet. Nach korrekter homologer Rekombination kam es zu einer Verkleinerung eines mittels BamHI erzeugten, durch eine 5'-externe Sonde detektierten Fragmentes von 8.8 kb auf 3.5 kb, während es zu einer Vergrößerung eines durch Verdau mit KpnI erzeugten, durch eine 3'-externe Sonde detektierten Fragmentes von 9kb auf 13.4 kb kam (Abb. 8).



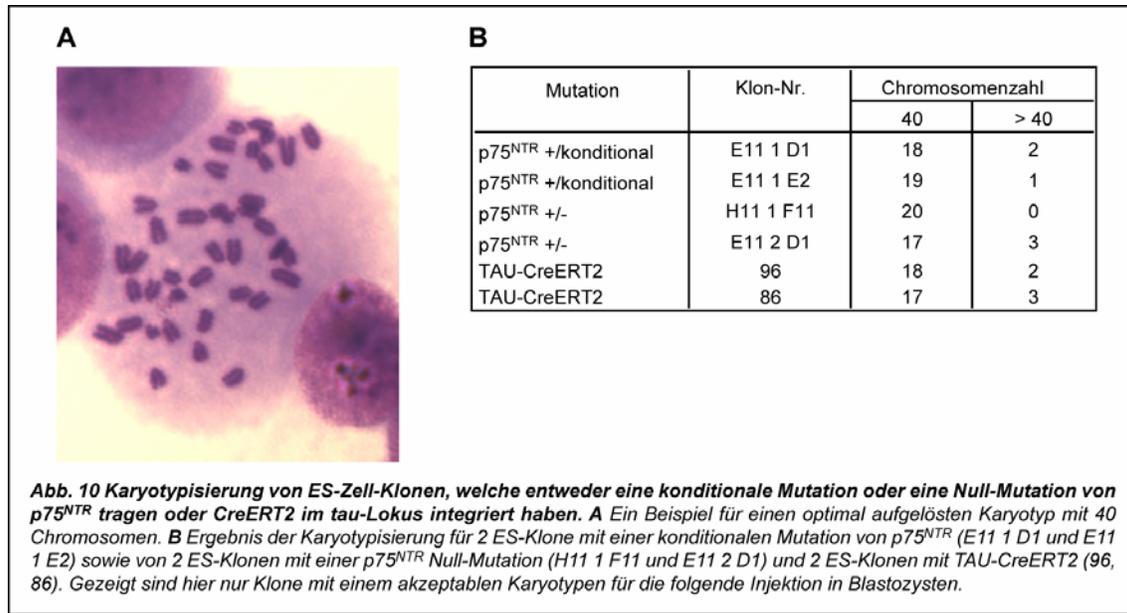
Von 181 getesteten Klonen zeigten 4 Klone eine korrekte Integration am 5'- sowie am 3'-Ende. Davon wurde die Nr. 71 ausgeschlossen, da ein Mycoplasma-Test für diesen Klon positiv war (Abb. 9).



3.1.1.4 Karyotypisierung der rekombinierten ES-Klone

Durch Manipulationen wie Elektroporation und durch das wiederholte Passagieren können chromosomale Anomalien entstehen, welche das Potential der ES-Zellen zur Keimbahntransmission herabsetzen. Um ES-Klone mit solchen Anomalien auszuschliessen, wurde eine Karyotypisierung durchgeführt.

Von Klonen mit gefloxtem ExonIV oder einer Null-Mutation von p75^{NTR} sowie von den Klonen mit CreERT2 im tau-Lokus wurden je 20 benutzbare Karyotypen ausgezählt. Als benutzbar wurden diejenigen Karyotypen befunden, welche eindeutig zu identifizierende Chromosomen aufwiesen sowie nicht weniger als 40 Chromosomen zeigten, da solche Zellen nicht lebensfähig gewesen wären. Klone welche nicht mehr als 20% Abweichung zu einer Chromosomenzahl von 40 zeigten, wurden für die nachfolgende Injektion in Blastozysten akzeptiert. Dies erfüllten 2 Klone mit gefloxtem ExonIV (E11 1 D1 und E11 2 E1) und 2 Klone für eine Null-Mutation (H11 1 F11 und E11 2 E1) und die Klone 86 und 96 von den TAU-CreERT2-Klonen (Abb. 10)



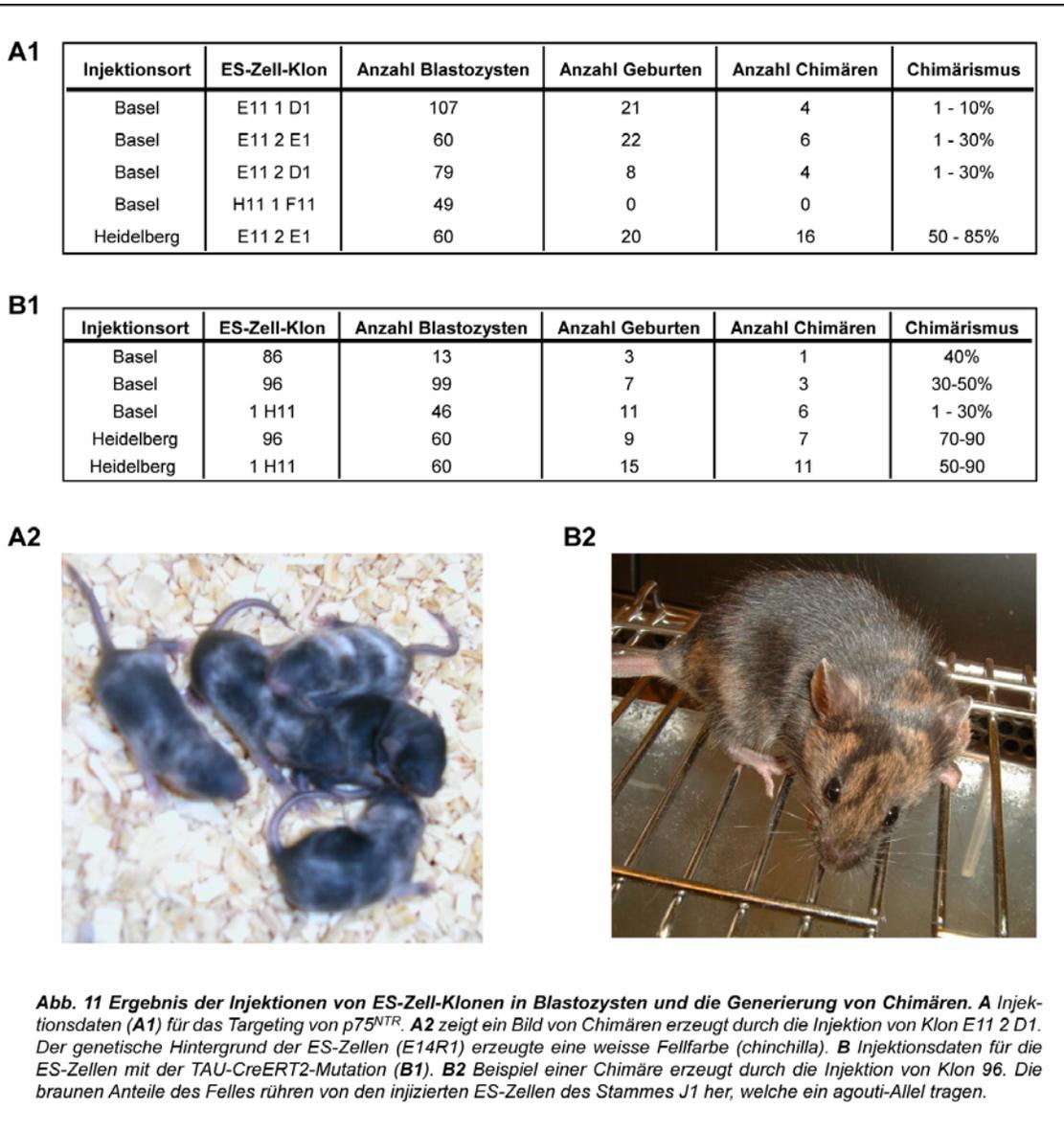
3.1.1.5 Erzeugung von Chimären mittels Blastozysteninjektion

Die Etablierung mutanter Mauslinien aus ES-Zellen erfolgt traditionellerweise über die Injektion von ES-Zellen in Blastozysten und Transplantation von diesen Blastozysten in scheinsschwangere Ammenmütter. Wenn die ES-Zellen überleben und sich in den Embryo integrieren, entstehen sogenannte Chimären, in denen Teile des Gewebes vollständig von den injizierten ES-Zellen abstammen. Die zur Injektion verwendeten ES-Zellen stammen meistens vom Mausstamm Sv129 (Simpson et al., 1997) und tragen deshalb immer ein agouti- und manchmal eine Albino- oder eine chinchilla-Mutation im Tyrosinase-Lokus, welches in brauner bzw. weisser oder weisslicher Fellfarbe resultiert im Gegensatz zu der schwarzen Fellfarbe des Mausstammes C57Bl/6, die Herkunft der verwendeten Blastozysten. Deswegen lässt sich der Chimärismus von der Fellfarbe ablesen und das Ausmass der von den injizierten ES-Zellen gebildeten Gewebeanteile grob schätzen.

Injektion in Blastozysten der ES-Klone mit gefloxtem ExonIV oder Null-Mutation von p75^{NTR}

Die für das p75^{NTR}-Targeting verwendeten ES-Zellen waren stammten von einem Sv129-Substamm, nämlich E14R1. Diese Zellen besitzen ein agouti- sowie ein chinchilla-Allel, die resultierende Fellfarbe kann braun bis weisslich sein. Die 4 obengenannten euploiden Klone wurden zunächst von der TMCF, Biozentrum, in Blastozysten injiziert. Daraus gingen insgesamt 10 Chimären für eine konditionale p75^{NTR}-Mutation hervor und 4 Chimären für eine p75^{NTR}-KO. Der Chimärismus war mit ca. 1-30% jedoch sehr gering. Da zum Zeitpunkt

der Injektionen grosse Schwierigkeiten im Mausstall auftraten, liessen wir die Zellen auch in Heidelberg (unter der Leitung von Frank Zimmermann) injizieren. Aus 60 injizierten Blastozysten mit dem Klon E11 1 E1 gingen 16 hochgradige Chimären hervor (Abb. 11A).



Hochgradige Chimären tragen mit hoher Wahrscheinlichkeit auch Keimzellen mit ES-Zell-Herkunft, was eine Voraussetzung zu Keimbahntransmission des mutierten Locus ist. Die Keimbahntransmission wird getestet durch Verpaarung der Chimären mit C57Bl/6-Tieren. Da das agouti-Allel dominant ist, wird sich im Fall einer Keimbahntransmission auch die braune Fellfarbe durchsetzen.

Von den erwähnten Chimären wurden alle Männchen und nur Weibchen mit hochgradigem Chimärismus verpaart. Weibliche Chimären werden oft nicht verwendet, da sie aufgrund des Beitrages von männlichen ES-Zellen zu ihren Keimzellen oft steril sind. Leider stellte sich heraus, dass auch nach über 10 Nachkommen-Generationen keines der Jungtiere eine braune Fellfarbe, d.h. Keimbahntransmission zeigte.

Injektion in Blastozysten der ES-Klone für TAU-CreERT2

Die ES-Klone, welche für die homologe Rekombination für TAU-CreERT2 verwendet wurden stammen von einer Maus des Sv129-Substammes J1. Diese Tiere tragen das *agouti*-Allel, weswegen die Fellfarbe braun ist und bei Chimären aus Blastozysteninjektionen mit diesen ES-Zellen eine braun-schwarz geschecktes Fell zu erwarten ist. Im ersten Anlauf wurden die Klone 86 und 96 wie oben beschrieben von der TMCF, Biozentrum in Blastozysten von C57Bl/6-Tieren injiziert. Zusätzlich wurde auch der Klon 1/H11, welcher ein gefloxtes ExonIV von p75^{NTR} trägt sowie positiv für TAU-CreERT2 ist (Beschreibung siehe unter 3.2) injiziert. Daraus gingen 1 40% Chimäre vom Klon 86, 3 30-50% Chimären vom Klon 96 und 6 1-30% Chimären vom Klon 1/H11 hervor. In Heidelberg wurden Klon 96 und 1/H11 ebenfalls injiziert, woraus 7 resp. 11 hochgradige Chimären entstanden (siehe Abb. 11B).

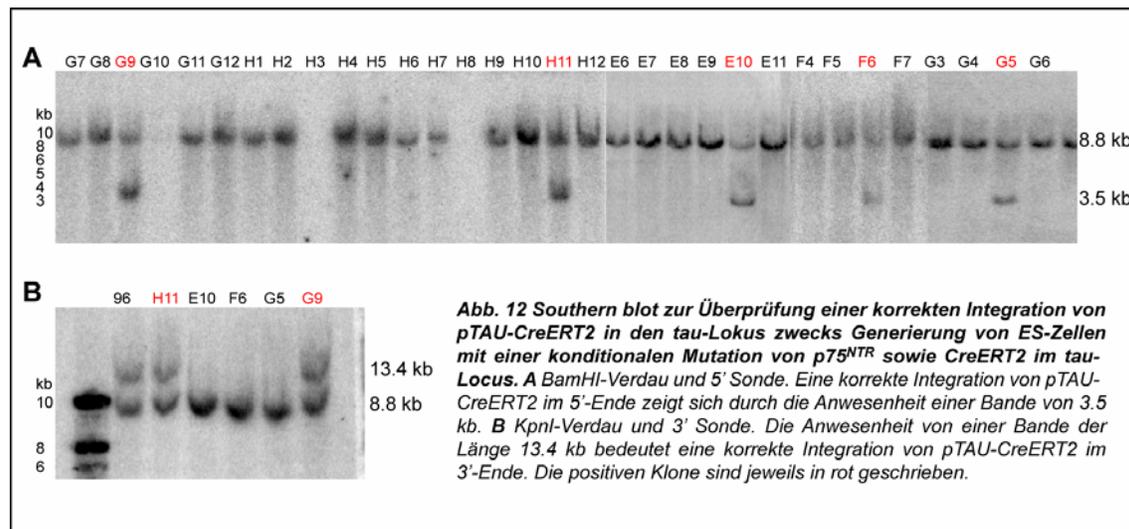
Alle Männchen sowie die höhergradig chimärischen Weibchen wurden mit C57Bl/6-Tieren verpaart. Auch für die TAU-CreERT2-Mutation konnte nach jeweils über 10 Würfen keine Keimbahntransmission erhalten werden.

3.2 *In vitro*-Analyse des induzierbaren Cre-Systems mittels Differenzierung von ES-Zellen in Neurone

Da das Generieren der TAU-CreERT2-Maus eine zeitintensive Angelegenheit war, wollten wir die Funktion dieses induzierbaren Cre-Systems *in vitro* testen. Dazu stand ein äusserst attraktives Tool zur Verfügung, nämlich die Differenzierung von ES-Zellen in Neurone. Dies war Voraussetzung, da CreERT2 im *tau*-Lokus integriert ist und somit hauptsächlich von Neuronen exprimiert ist. Wie oben erwähnt, ist die Rekombinationstätigkeit von Cre abhängig vom Lokus des zu rekombinierenden Gens. Aus diesem Grund wurde eine Doppelmутante mit einem gefloxtes ExonIV von p75^{NTR} und TAU-CreERT2 generiert, um die induzierbare Cre-Aktivität direkt für p75^{NTR} zu testen.

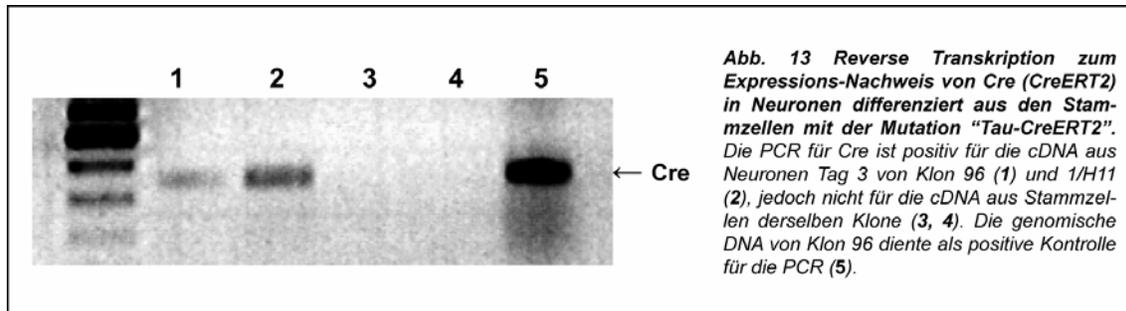
3.2.1 Generierung einer ES-Linie mit einer konditionalen p75^{NTR}-Mutation und CreERT2-Expression vom *tau*-Lokus

Für die Generierung der Doppelmutante wurde ein ES-Zellklon, welcher schon ein gefloxtes ExonIV von p75^{NTR} trägt (Klon E11 1 D1), mit dem Konstrukt TAU-CreERT2 elektroportiert. Die Elektroporation und Selektion der Klone erfolgte wie oben beschrieben. Von 400 gepickten Klonen waren initial 10 Klone positiv für die Integration am 5'-Ende, durch einen Fehler bei dem Auftauen der Klone konnten jedoch nur 2 korrekt rekombinierte Klone (H11 und G9) gewonnen werden (Abb. 12).



3.2.2 Expression von CreERT2 in Neuronen auf RNA-Ebene

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob die Transkription von CreERT2 intakt ist und sich wie die Transkription von endogenem *tau* verhält, d.h. eine mRNA in Neuronen zu detektieren ist im Gegensatz zu ES-Zellen. Dazu wurde Klon H11 (Doppelmutante) und Klon 96 (TAU-CreERT2) in Neurone differenziert, daraus RNA isoliert und mittels Oligo-dT Primern in cDNA revers transkribiert. Diese cDNA diente als Matrize für die PCR-Reaktion mit den Primern Tk139 und Tk141, welche innerhalb von Cre liegen. Die cDNA gewonnen aus RNA von ES-Zellen des Klons 96 diente als Negativkontrolle, die genomische DNA des Klons 96 als positive Kontrolle. Aus der Abb. 13 geht hervor, dass in Neuronen klar eine mRNA für Cre (CreERT2) detektiert werden konnte.



3.2.3 Translokation von CreERT2 vom Zytoplasma in den Zellkern nach Applikation von Tamoxifen

Das synthetische Steroid, welches als Liganden für den mutierten Östrogenrezeptor verwendet wird, ist 4-hydroxy-Tamoxifen. In der Literatur werden für *in vitro*-Experimente Konzentrationen von 10 pM bis maximal 1 µM beschrieben (Hayashi et al., 2002). Die *in vivo*-Daten legen nahe, dass auch die Dauer der Applikation einen wesentlichen Einfluss auf die Rekombinationsrate hat (Leone et al., 2003).

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Konzentrationen von 10 nM, 100 nM und 1 µM während 24h, 48h und 72h angewendet. Die Substanz 4-hydroxy-Tamoxifen wurde zunächst in 100% Ethanol gelöst und als Stocklösung eingefroren. Für die Applikation wurde die Stocklösung oder als Lösungsmittelkontrolle 100% Ethanol in DMEM entsprechend verdünnt und zu den Zellen gegeben. Nach Fixation konnte mittels Immunzytochemie die Lokalisation von Cre detektiert werden. Es zeigte sich eine klare Lokalisation von Cre im Zellkern nach Applikation von 4-hydroxy-Tamoxifen, wobei keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Tamoxifen-Konzentrationen auszumachen waren (Daten nicht gezeigt). Ein deutlicher Unterschied zeigte sich jedoch im Ausmass der Translokation mit unterschiedlicher Dauer der Behandlung, indem nach 24h in 92% der Zellen und nach 48h in 98% der Zellen eine Translokation zu beobachten war (Abb. 14 und 15). Ohne Zugabe von 4-hydroxy-Tamoxifen blieb Cre auch nach längerer Zeit der Kultivierung (nach 7 Tagen) zytoplasmatisch lokalisiert. Ob die zu beobachtende minimale Färbung der Zellkern-Gegend von einer Hintergrund-Aktivität oder von der Überlagerung des Zytoplasmas und des Zellkerns bei der Mikroskopie herrührt, kann aus diesem Experiment nicht geschlossen werden.

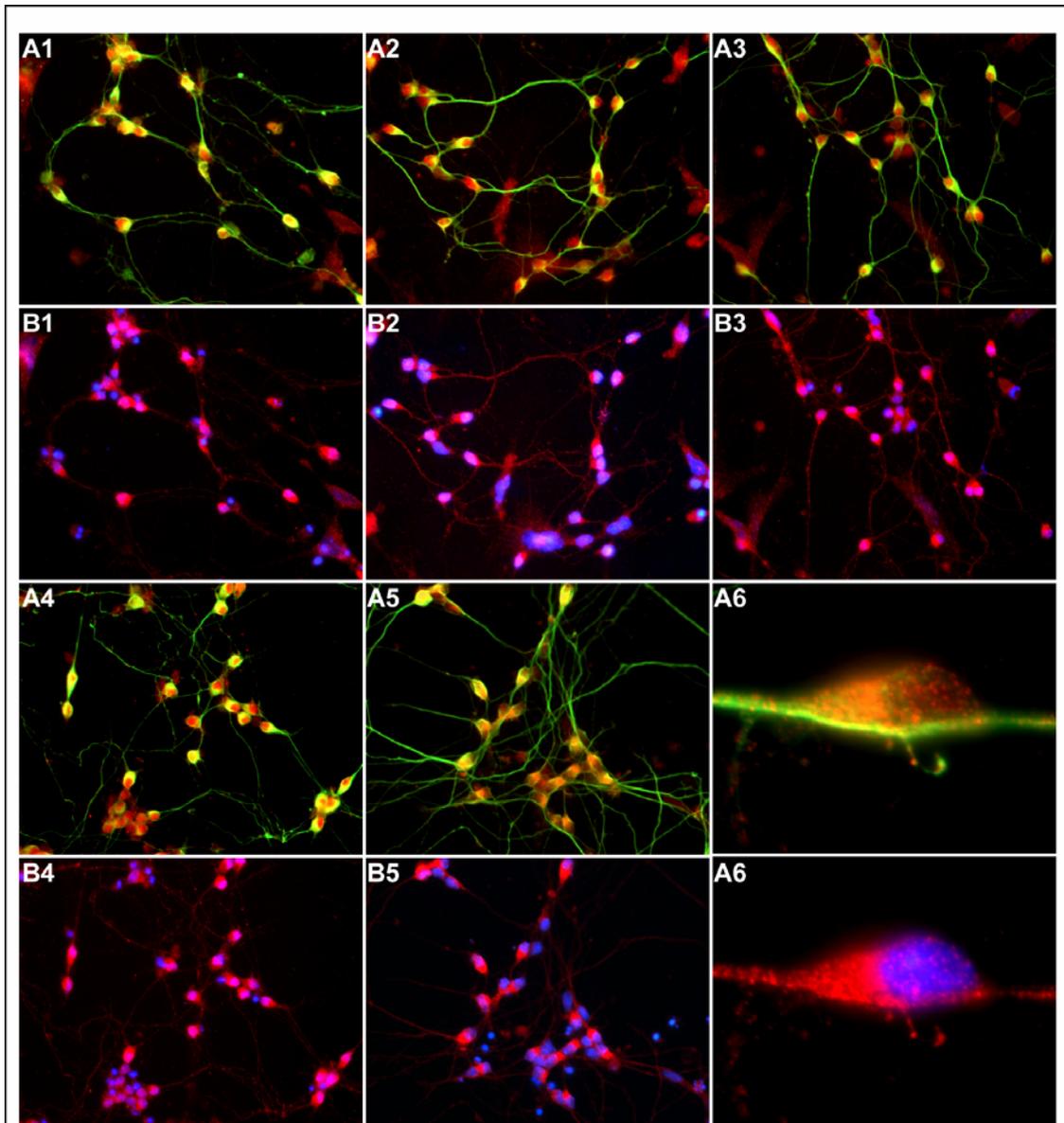
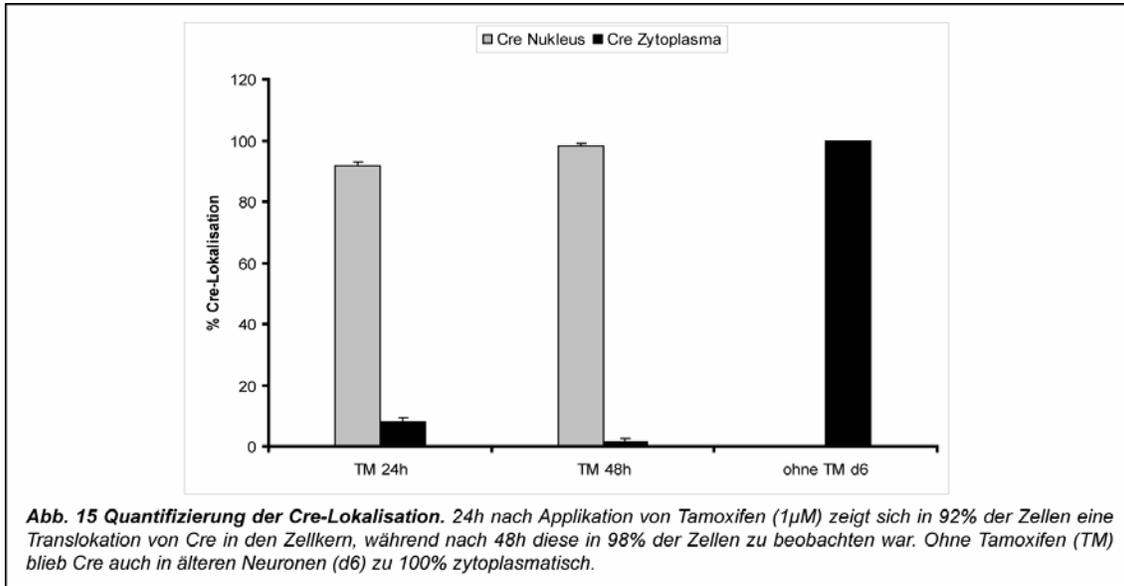
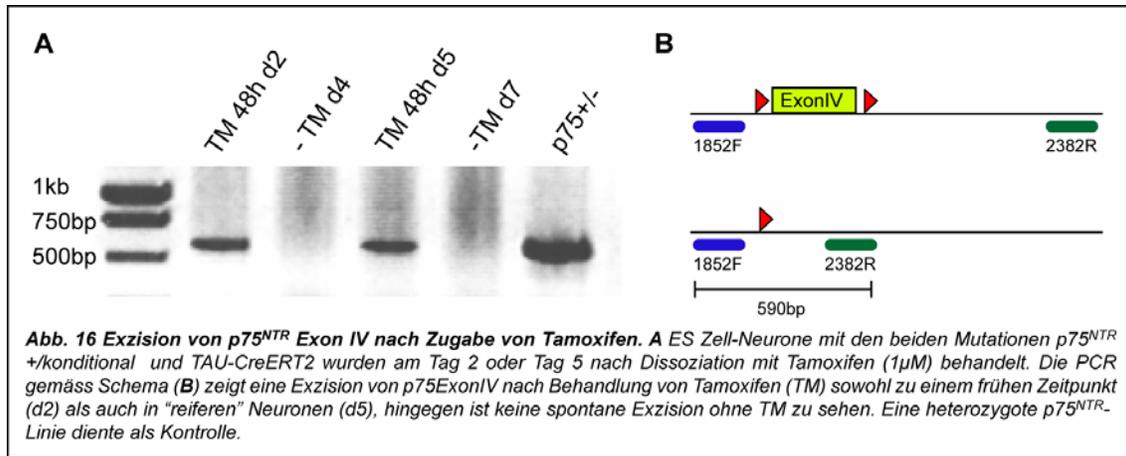


Abb. 14 Cre-Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern nach Zugabe von Tamoxifen. Rot = Cre, Grün = TuJ1, Blau = Hoechst. **A** = merge TuJ1 und Cre, **B** = merge Hoechst und Cre. Nach Zugabe von 10 nM (1), 100 nM (2), 1 μ M (3) Tamoxifen für 24 h und 1 μ M für 48 h (4) jeweils am Tag 2 ist eine Translokation von Cre in den Zellkern zu beobachten. Ohne Tamoxifen (5) und vergrößert in (6) ist Cre hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (Aufnahmen am Tag 7).



3.2.4 Exzision von p75^{NTR} ExonIV nach Applikation von 4-hydroxy-Tamoxifen

Um die induzierbare Cre-Aktivität direkt für den p75^{NTR}-Lokus zu testen, wurden die doppelmutanten ES-Zellen in Neurone differenziert und mit 4-hydroxy-Tamoxifen behandelt. Die Applikation erfolgte sowohl zu einem frühen Stadium (Tag 2), wo ein Teil der Zellen noch teilfähig sind, als auch zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 4), wo alle Zellen postmitotisch sind. Es wurde die von den obigen Experimenten resultierende optimale Dosierung von 1 µM 4-hydroxy-Tamoxifen für 48h angewendet. Aus den Neuronen wurde die DNA isoliert und mit der oben beschriebenen PCR-Reaktion mit den Primern 1852F und 3708R geprüft, welche eine Bande von 590 bp im Fall einer ExonIV-Exzision ergibt. Durch die Applikation des Liganden konnte eine Exzision von p75^{NTR} Exon IV sowohl zu einem frühen als auch zu einem postmitotischen Stadium der Neurone induziert werden, ohne Liganden jedoch war die Bande von 590 bp völlig fehlend (Abb. 16). Damit ist die aus den obigen immunzytochemischen Experimenten resultierende Vermutung, dass es keine Hintergrundaktivität von CreERT2 in diesem System gibt, untermauert.



Zusammenfassung:

Die *in vitro*-Analyse dieses induzierbaren Cre-Systems ergab folgende Ergebnisse: Die Insertion der cDNA CreERT2 in den *tau*-Lokus war insofern erfolgreich, als dass auf RNA-Ebene eine Expression in Neuronen zu detektieren war, hingegen nicht in ES-Zellen, und somit sich qualitativ wie die Expression von *tau* verhielt. Auf Proteinebene ergab sich eine gute Funktionalität des Fusionsproduktes, indem mittels zytochemischer Methoden eine Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern nach Applikation von 4-hydroxy-Tamoxifen in 98% der Zellen zu sehen war. Die Translokation führte auch zu einer Exzision von p75^{NTR} ExonIV. Es konnte weder immunzytochemisch, noch mittels PCR zur Detektion einer ExonIV-Exzision Hinweise auf eine Hintergrundaktivität des Systems gefunden werden. Somit kann man davon ausgehen, dass eine mutante Mauslinie mit CreERT2 im *tau*-Lokus zumindest für den p75-Lokus und im Nervensystem ein vielversprechender Ansatz ist.

3.3 Untersuchung der Rolle von p75^{NTR} basierend auf einem ES-Zell-Differenzierungssystem

Es ergab sich leider keine Keimbahntransmission für die beiden oben beschriebenen Mutationen einer konditionalen p75^{NTR}-Mutation sowie für das induzierbare Cre-System. Daher mussten andere Wege gefunden werden, offene Fragen für die Rolle von p75^{NTR} anzugehen. Die schon existierenden KO-Mäuse von p75^{NTR} erschienen ungeeignet, da weder eine zeitliche (Entwicklung versus adulte Maus), noch eine zelltypspezifische Differenzierung erfolgen kann. Die früher verwendeten *in vitro*-Systeme hatten den Nachteil, dass sie nicht die molekulare Maschinerie von Neuronen aufwiesen (z.B. PC12-Zellen) und somit oft mit Überexpression gearbeitet werden musste. In unserem Labor wurde jedoch ein Tool entwickelt, was die Möglichkeit bot, eine Brücke zwischen den Fragen der

Funktionalität aus der *in vivo*-Situation und den molekularen Mechanismen der *in vitro*-Analyse zu schlagen, nämlich die Differenzierung von ES-Zellen in Neurone. In diesem Prozess wird durch Retinsäure eine neuronale Differenzierung induziert und eine homogene Population an neuronalen Vorläuferzellen generiert, welche die Marker für Pax6, Sox2, BLBP, RC2, d.h. die Marker für radiale Gliazellen aufweisen. Die Neurone selber sind zu 95% glutamaterg und zu 5% GABA-erg und sind positiv für den Marker Emx-2. Diese Eigenschaften sprechen für die Ähnlichkeit zu kortikalen Neuronen. Ein erster Punkt machte dieses System für Fragen um p75^{NTR} attraktiv: Die "neugeborenen" Neurone exprimieren sehr hohe Mengen an p75^{NTR}, im Laufe der Maturierung geht die Expression jedoch auf geringe Mengen zurück und reflektiert insofern die Verhältnisse *in vivo*. Ein zweiter entscheidender Punkt ist die Absenz von Oligodendrozyten, Astrozyten, Schwann-Zellen und Myelin, womit der Beitrag dieser Anteile zum Phänotyp der Neuronen wegfällt und die Analyse der p75^{NTR}-vermittelten Effekte in Neuronen vereinfacht bzw. ermöglicht.

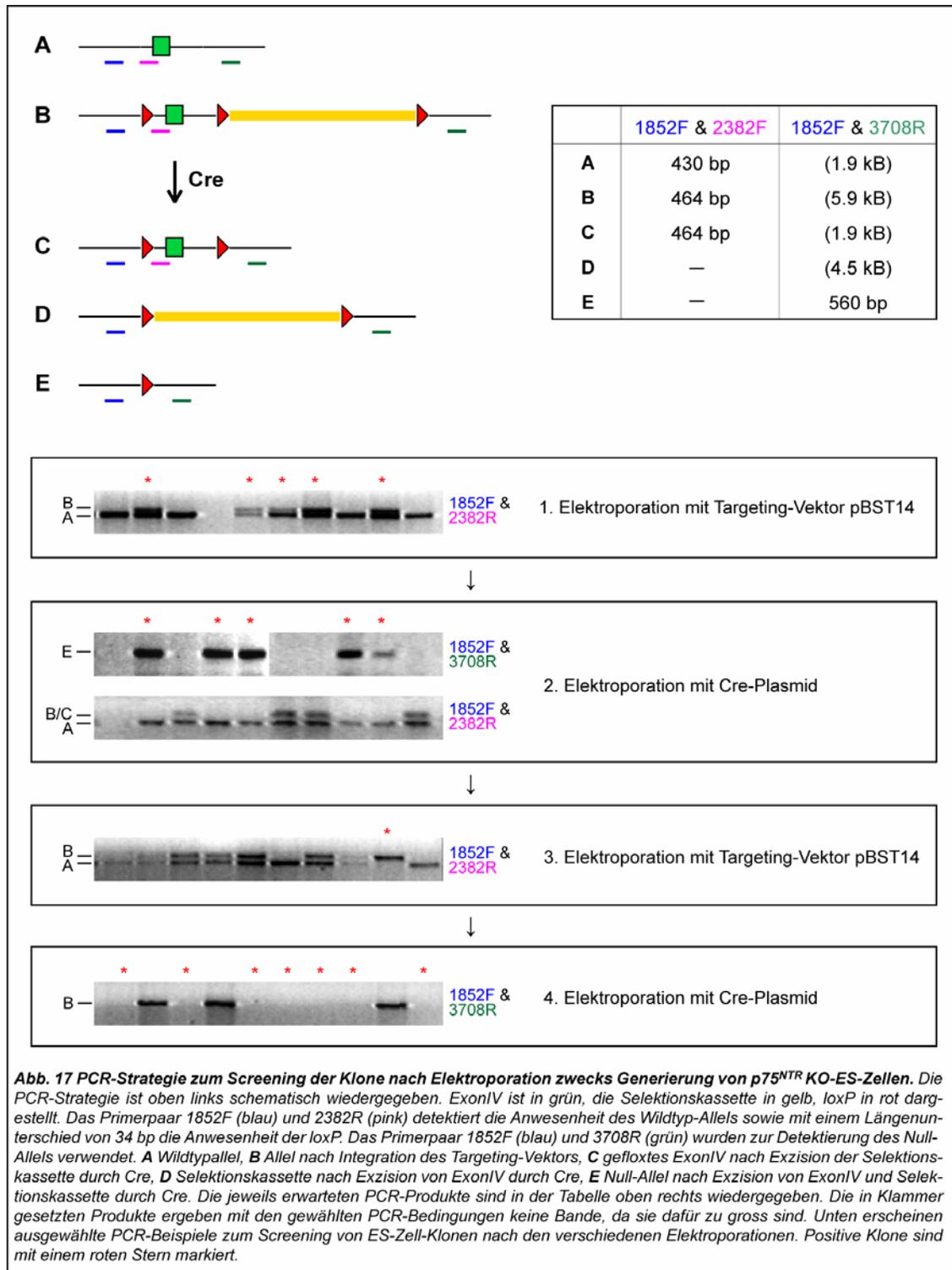
3.3.1 Generierung der p75^{NTR}^{-/-} ES-Zelllinie

Um die Auswirkungen von p75^{NTR} während der Differenzierung auf den Phänotyp der Neurone zu studieren, wurde eine ES-Zelllinie generiert, bei welcher beide Allele von p75^{NTR} entfernt wurden (im folgenden als p75^{NTR}^{-/-} benannt). Dazu wurde dasselbe Targeting-Konstrukt verwendet wie zur oben beschriebenen Generierung einer konditionalen Mutation von p75^{NTR}. Das Prinzip war, nach einer ersten Elektroporation mit pBST14 durch Cre-Elektroporation die geflochte Selektionskassette inklusive ExonIV zu entfernen, um im Anschluss danach das zweite Allel mit pBST14 zu rekombinieren und wiederum die Selektionskassette und ExonIV mit Cre zu entfernen.

Homologe Rekombination mit pBST14

Auswahl der zu rekombinierenden ES-Zellen: Die Erfahrungen mit dem Differenzierungsprotokoll in unserem Labor haben gezeigt, dass die Reinheit der neuronalen Kultur wesentlich von der Qualität der ES-Zellen vor der Differenzierung abhängt. Allgemein kann man annehmen, dass eine ES-Zelllinie, welche nur wenige Passagen nach der Isolierung aus Blastozysten in der Kultur war, eine gute Stammzell-Qualität aufweist, was für eine vielfach passagierte ES-Zelllinie nicht unbedingt gilt. Da für die Generierung von p75^{NTR}^{-/-} ES-Zellen 4 Elektroporationen, d.h. Manipulationen, welche die ES-Zellqualität vermindern könnten, notwendig waren, sollte von einer hochwertigen ES-Zelllinie ausgegangen werden. Dies war mit den für die Mauslinie generierten p75^{NTR} +/- ES-Zellen nicht der Fall, da keine Keimbahntransmission erreicht werden konnte und mittels

Differenzierung keine hochreinen neuronalen Kulturen gewonnen werden konnten. Aus diesem Grund entschlossen wir uns für R1 ES-Zellen (aus dem Labor von A. Nagy, Canada) mit niedriger Passagenzahl. Die Differenzierung in Neurone, welche als Test zunächst erfolgte, zeigte die angestrebte hochreine Kultur.



Für das Targeting des ersten Allels wurden 30 µg des mit Xho linearisierte Plasmids in R1 Zellen elektroporiert, nach 24h mit G418 (300 µg/ml) positiv selektioniert und nach 8 Tagen 700 Klone gepickt. 200 Klone wurden mit der PCR-Strategie, welche eine LoxP-Sequenz vor ExonIV detektiert (Abb. 17) vorgescreeent. Die für die PCR positiven Klone wurden anschliessend mit Southernblot auf eine korrekte Integration am 5' Ende (Sacl-Verdau + AB-Sonde), sowie am 3' Ende (NcoI-Verdau + PA-Sonde) geprüft. 11 Klone erwiesen sich als korrekt homolog rekombiniert, davon wurden 2 Klone (H3 und A3) für die nachfolgende Elektroporation mit Cre-Plasmid weiterverwendet (Abb. 18).

Elektroporation mit Cre-Plasmid

Da in diesem Fall die Rekombination möglichst vollständig, d.h. eine Exzision der Selektionskassette und von p75^{NTR} ExonIV, sein sollte, wurden die Klone H3 und A3 mit einer grossen Menge (30 µg) unlinearisierten Cre-Plasmids elektroporiert. Die negative Selektion mit Gancyclovir (2 µM) erfolgte 72h nach Elektroporation, nach 9 Tagen wurden 400 Klone gepickt. 200 Klone wurden mit der PCR-Strategie, welche eine Exzision von p75^{NTR} ExonIV detektiert, vorgescreeent. Von den 56 positiven Klone konnten mittels Southern blot 45 bestätigt werden.

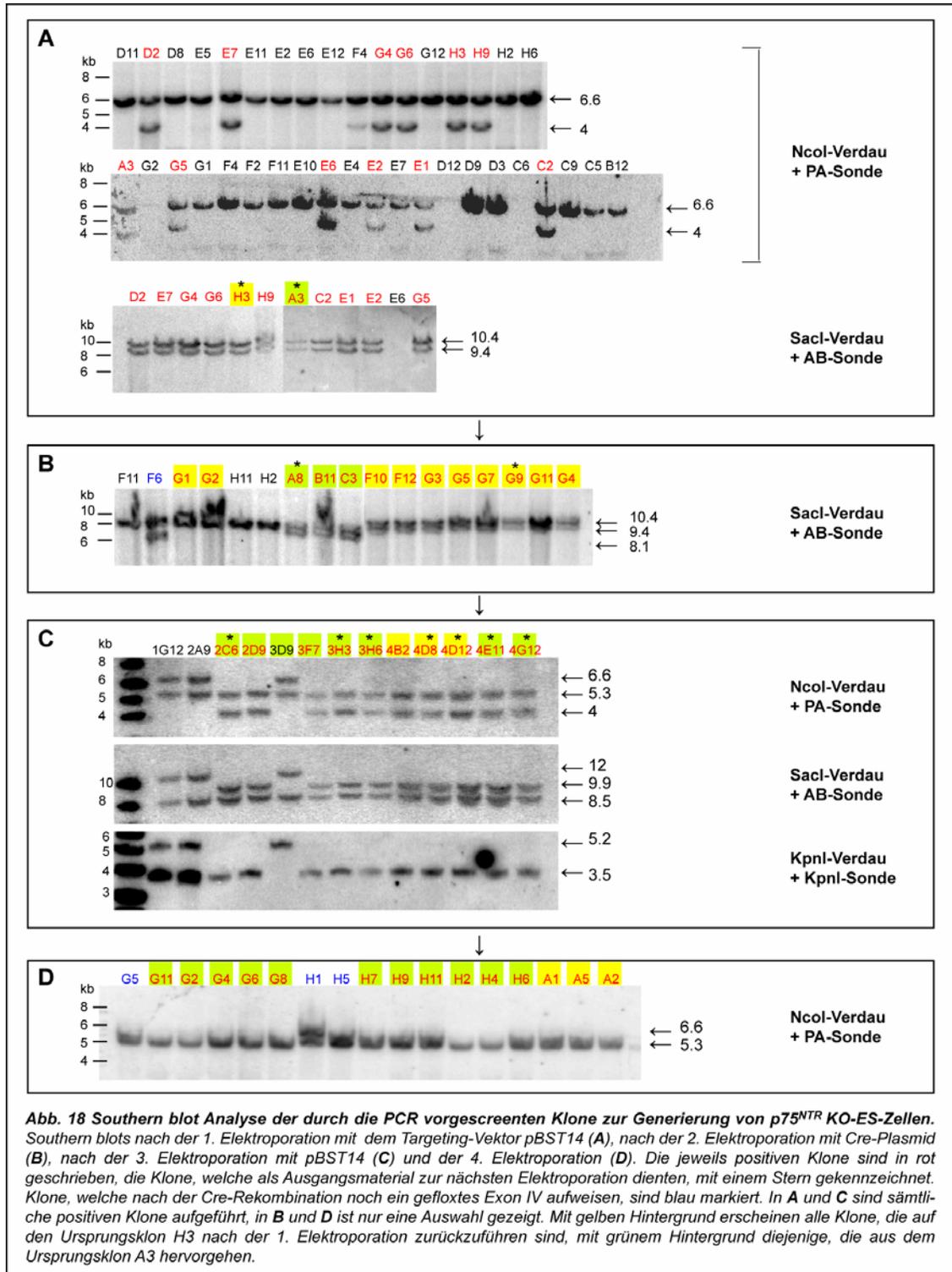
Targeting des 2. Allels mit pBST14

Bei der Auswahl der zu elektroporierende Klone wurde darauf geachtet, dass sie von den 2 verschiedenen Ursprungs-Klonen herrühren. Die Klone A8 (Ursprungsklon A3) und G9 (Ursprungsklon H3) wurden wie oben beschrieben mit pBST14 elektroporiert. Nach der Selektion wurden in diesem Fall für jeden Klon 350 Klone gepickt. Das PCR-Screening ergab 13 Klone, welche mit den Primern 1852F und 2382R nur eine Bande von 464 bp zeigte, d.h. eine Rekombination des 2. Allels, während unzählige Klone 2 Banden (Wildtyp-Allel und erneutes Targeting des Null-Allels) oder nur eine Wildtyp-Bande (kein Targeting) aufwiesen (Abb. 15). Die Southern blots für das 5' und das 3' Ende sowie mit der intern liegenden KpnI-Sonde bestätigten für 8 Klone eine erfolgreiche Rekombination des zweiten Allels (Abb. 18).

Cre-Elektroporation

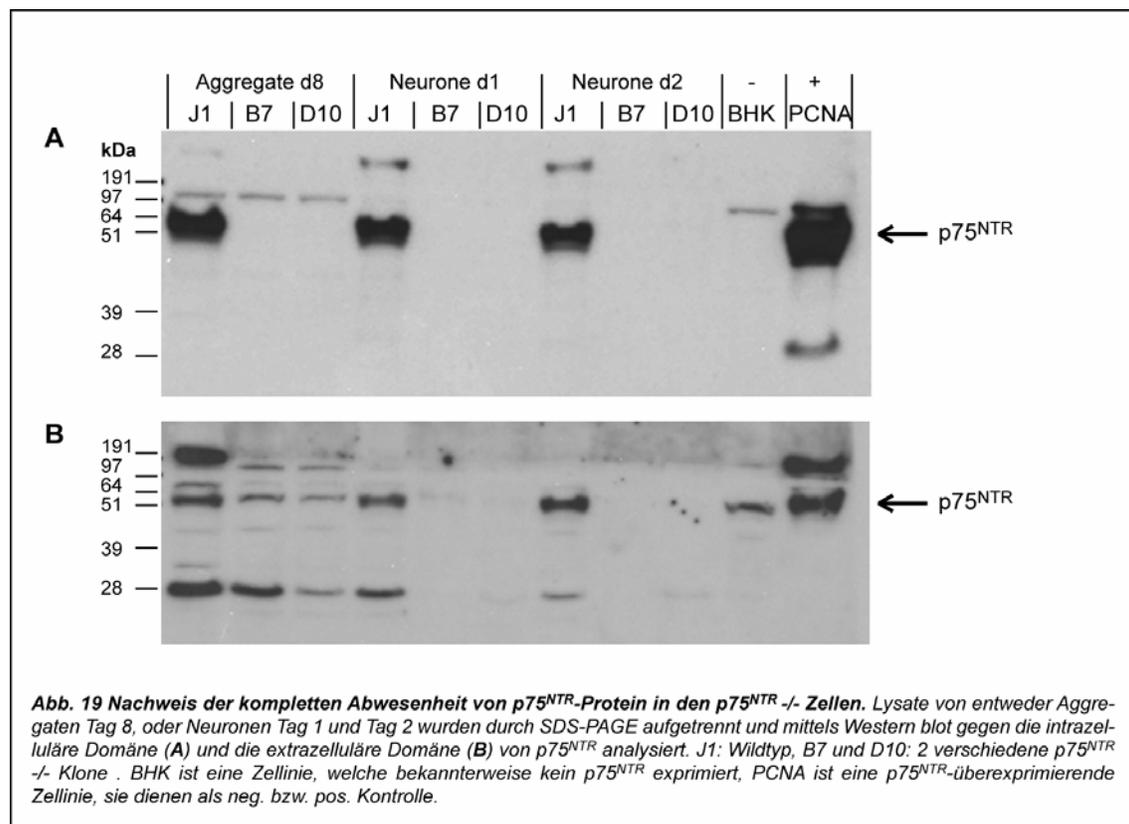
Die letzte Elektroporation erfolgte wiederum mit unlinearisiertem Cre-Plasmid wie oben beschrieben. Um möglichst klonale Effekte zu vermeiden, wurden sämtliche 8 Klone mit

korrekt rekombiniertem zweiten Allel dafür verwendet, für jeden Ursprungs-Klon 50 Klone gepickt und mittels PCR mit den Primern 1852F und 2382R gegen eine Anwesenheit einer Bande gescreent (Abb. 17). Der Southern blot bestätigte für 191 Klone die p75^{NTR} Null-Mutation für beide Allele (Abb 18).



3.3.2 Vollständige Abwesenheit von p75^{NTR} auf Proteinebene in den p75^{NTR}^{-/-} Neuronen

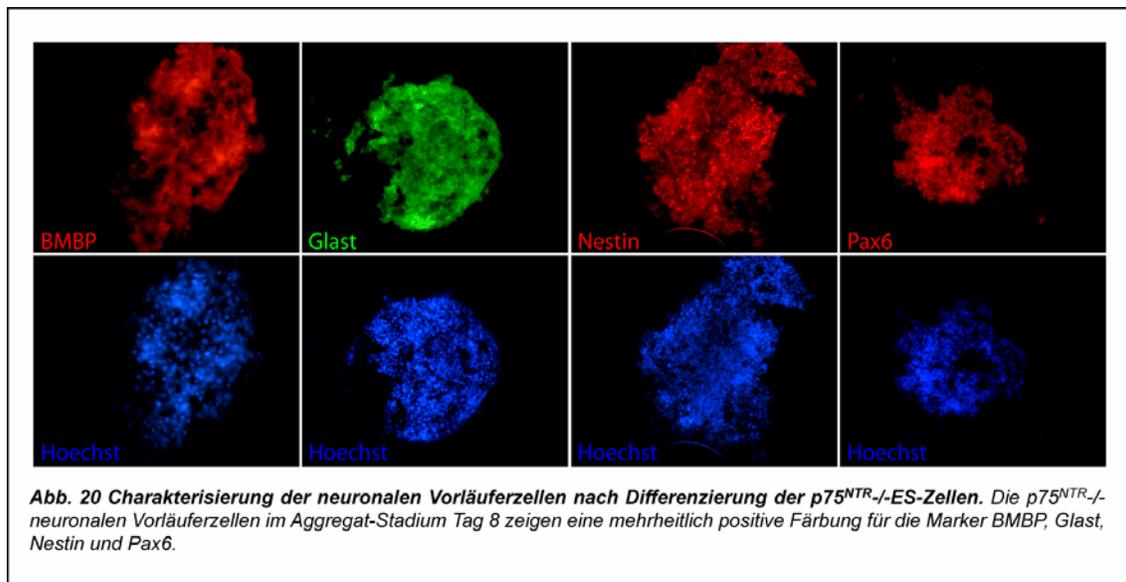
Die p75^{NTR}^{-/-} ES-Zellen liessen sich gemäss dem Protokoll (M. Bibel et al., 2004; M. Bibel et al., 2007) im Vergleich zu Wildtyp-ES-Zellen in unveränderter Weise in Neuronen differenzieren. Zur Analyse der p75^{NTR}-Expression wurden von zwei verschiedenen p75^{NTR}^{-/-} Klonen Lysate im Aggregatzustand nach Zugabe von Retinsäure (EB d8) und von Neuronen am Tag 1 und 2 nach Dissoziation genommen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western blot analysiert. Sowohl mit dem Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} (p75^{NTR} ICD, Freund I) als auch mit dem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne (p75^{NTR} ECD, Chemicon) konnte keine p75^{NTR}-Expression detektiert werden (Abb. 19). Insbesondere waren auch keine Produkte mit geringerem Molekulargewicht feststellbar, welche für kürzere Versionen von p75^{NTR}-Protein, ausgehend von den verbleibenden Exons I-III und V-VI, sprechen würden.



3.3.3 Charakterisierung der neuronalen Vorläuferzellen und Neuronen in Hinblick auf den zellulären Subtyp

Wie unter 3.3 erwähnt, weisen die neuronalen Vorläuferzellen, welche aus ES-Zellen gemäss unserem Protokoll gewonnen werden, die Charakteristika von radialen Gliazellen auf. Um diese Eigenschaften in den $p75^{NTR-/-}$ Zellen zu testen, wurden Aggregate nach Zugabe von Retinsäure (EB d8) fixiert, eingebettet, und die Schnitte immunhistochemisch für die entsprechenden Marker analysiert. Die $p75^{NTR-/-}$ Vorläuferzellen zeigten eine positive Färbung für die getesteten Marker Pax6, BLBP, RC2 und Nestin, so wie dies auch die Wildtyp-Vorläuferzellen aufweisen (Abb. 20).

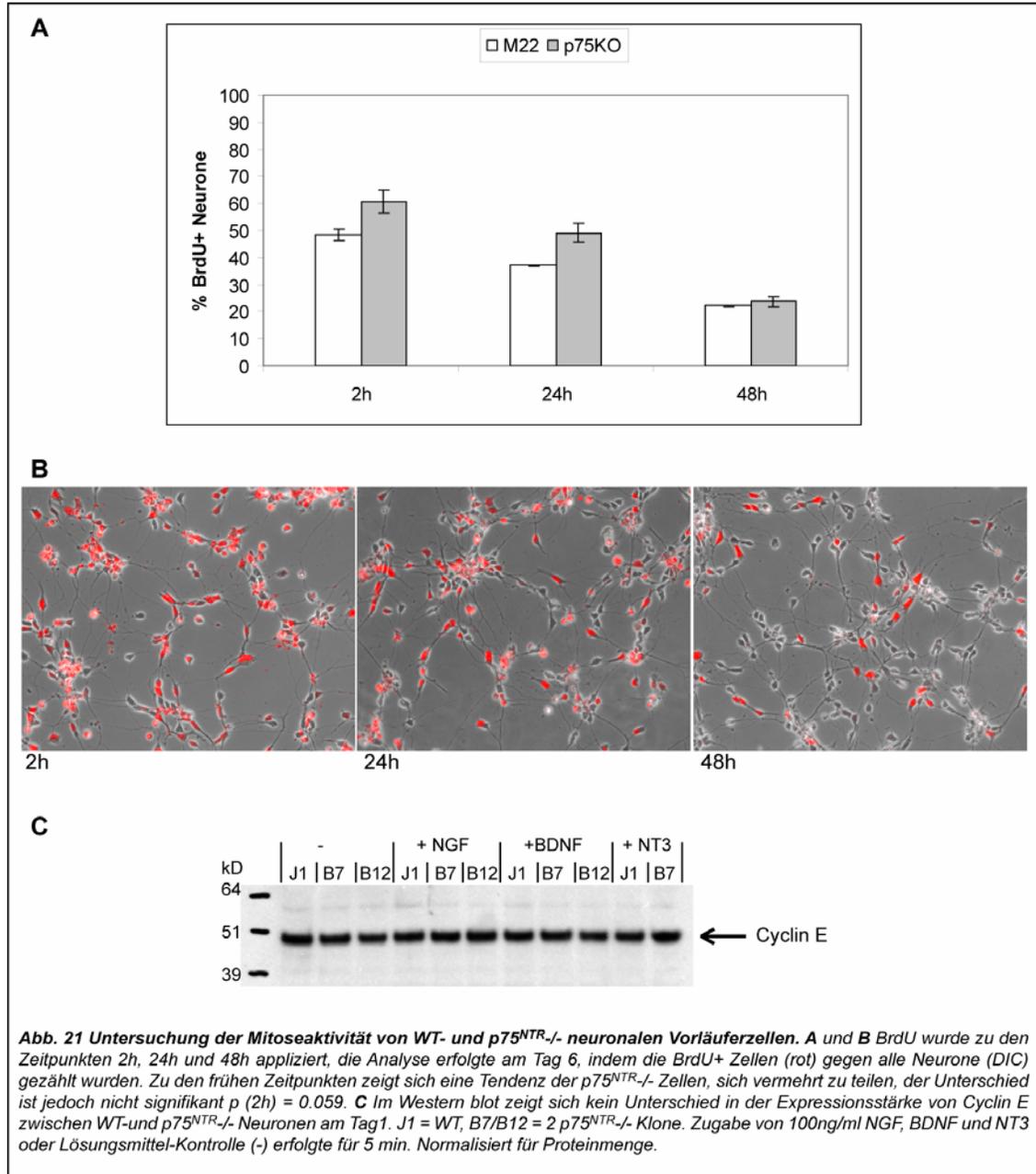
Die $p75^{NTR-/-}$ Neurone sollten auch bezüglich ihres neuronalen Subtyps charakterisiert werden. Eine Färbung gegen den vesikulären Glutamat-Transporter (vGlut-1) wies den grössten Teil der Neurone als glutamaterg aus, ein kleiner Teil zeigte eine positive Färbung für den vesikulären GABA-Transporter (vGAT), und nur vereinzelte Neurone färbten sich gegen Isl-1, Acetylcholin-Transferase (ChaT) oder Tyrosinhydroxylase (Daten nicht gezeigt). Die Absenz von $p75^{NTR}$ hat somit keinen Einfluss auf das Ergebnis dieses Differenzierungsprotokolles im Sinne des neuronalen Subtyps. Dies erstaunt nicht weiter, da bisher in der Literatur keine instruktive Rolle von $p75^{NTR}$ beschrieben worden ist.



3.3.4 Analyse des Zellzyklus in $p75^{NTR-/-}$ neuronalen Vorläuferzellen

Die unter 1.1.3 beschriebenen Hinweise, dass $p75^{NTR}$ in bisher noch ungeklärter Weise involviert zu sein scheint im Übergang von neuronalen Vorläuferzellen zu postmitotischen Neuronen, war Grund für die folgenden Experimente. Die *in vitro*-Differenzierung von ES-

Zellen in Neurone erschien für die Untersuchung dieses Überganges sehr geeignet, da sich diese Zeitspanne gut monitorieren liess. Zudem zeigte eine zuvor im Labor durchgeführte Genexpressionsanalyse über verschiedene Zeitpunkte der Differenzierung, dass das molekulare Muster desjenigen des sich entwickelnden Nervensystems *in vivo* weitgehend folgt (S. Perez, Novartis).



Zunächst wurde die BrdU-Inkorporation in neuronalen Vorläuferzellen gemessen, wobei BrdU in alle Zellen inkorporiert, welche sich in der Synthesephase befinden. BrdU (10 μ M) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (2h, 24h und 48h) nach Dissoziation der Aggregate appliziert, die Neurone am Tag 6 fixiert und analysiert. Zum Zeitpunkt von 2h waren 48.4%

der WT-Neurone und 60.6% der $p75^{NTR-/-}$ Neurone BrdU-positiv, der Unterschied war jedoch knapp nicht signifikant ($p = 0.059$). Nach 24h (37.1% für WT und 49.1% für $p75^{NTR-/-}$) und nach 48h (22.2% für WT und 23.7% für $p75^{NTR-/-}$) verkleinerte sich der Unterschied zunehmend (Abb. 21A,B).

Ein anderer Weg, den Zellzyklus zu analysieren, ist die Messung der Cycline. Da der Effekt von SC1 auf den Zellzyklus über die transkriptionelle Repression von Cyclin E vermittelt werden kann (Chittka et al., 2004), konzentrierten wir uns zunächst auf die Expression von Cyclin E. WT-Neurone und je zwei $p75^{NTR-/-}$ Klone wurden am Tag 1 nach Dissoziation entweder mit je 100 ng/ml NGF, BDNF, NT3 oder Lösungsmittelkontrolle für 5 min. stimuliert und anschliessend lysiert. Der Western blot zeigte für sämtliche Parameter dieselbe Expression von Cyclin E (Abb. 21C). Dieselbe Analyse für Cyclin D1 und D3 war ebenfalls ohne Unterschied für WT und $p75^{NTR-/-}$ (Daten nicht gezeigt).

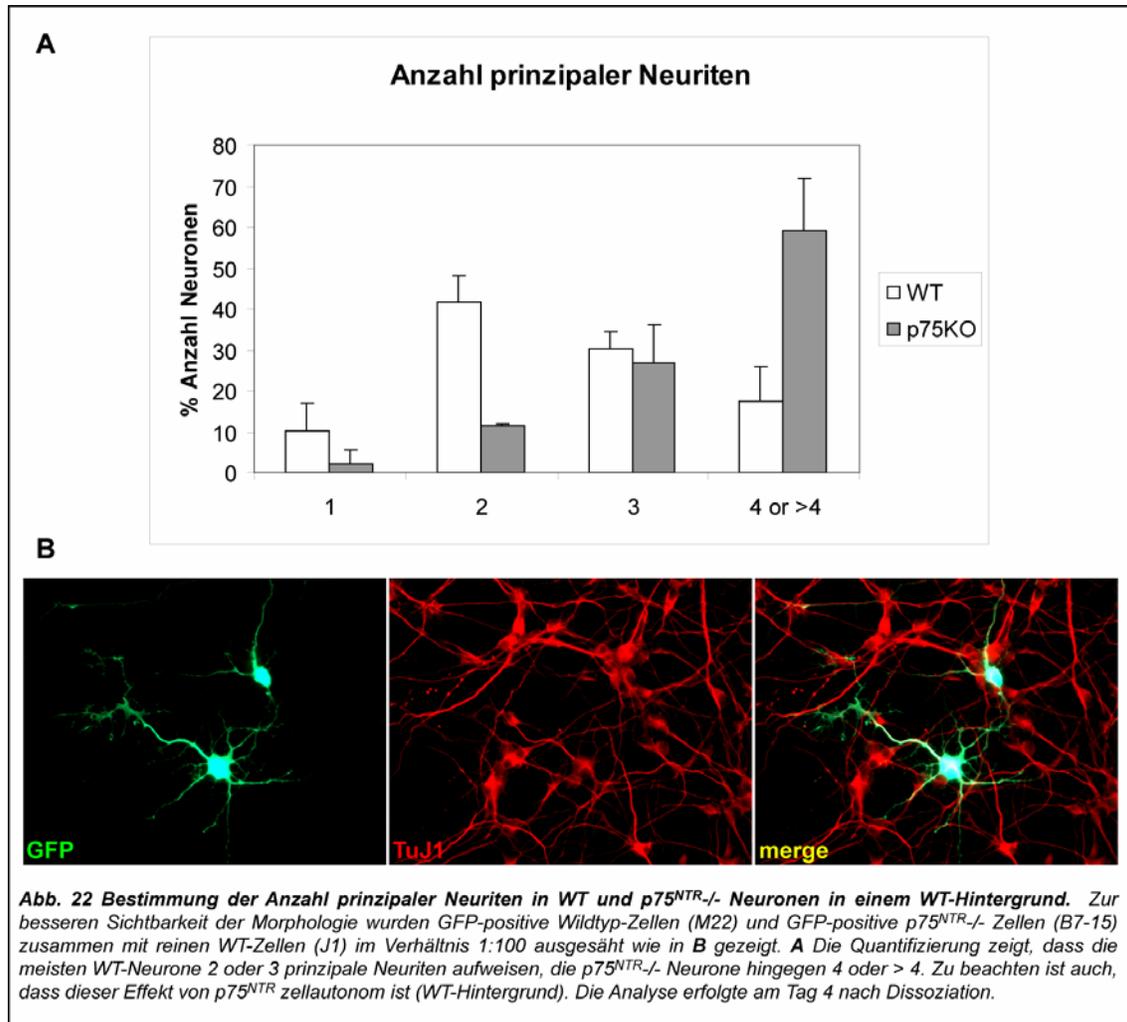
Somit zeigte sich in den aus $p75^{NTR-/-}$ ES-Zellen differenzierten Neuronen keine signifikanten Veränderungen der Zellzyklus-Parameter. Diese *in vitro*-Befunde lassen keine Rückschlüsse auf die *in vivo*-Situation zu, da der Prozess der Differenzierung grundsätzlich unterschiedlich erfolgt (in unserem System durch die Applikation von Retinsäure). Aufgrund der negativen Befunde in unserem System wurde jedoch die Analyse des Zellzyklus nicht weiterverfolgt.

3.3.5 Zellautonomer Effekt von $p75^{NTR}$ auf die Verzweigungen der Neuriten

Als nächstes sollte die Morphologie der $p75^{NTR-/-}$ Neurone untersucht werden. Ein inhibitorischer Effekt des aktivierten Rezeptors auf das Auswachsen von Axonen über die Aktivierung von RhoA ist bekannt (Yamashita et al., 1999). In Pyramidenzellen des Hippocampus von $p75^{NTR}$ KO-Mäusen wurde im Vergleich zum Wildtyp ein vergrößerter Dendritenbaum sowie eine höhere Dichte an Spines gemessen, mit dem gegenteiligen Effekt einer akuten Überexpression von $p75^{NTR}$ (Zagrebelsky et al., 2005). Ob dieser Effekt jedoch über die Modulation von RhoA vermittelt wird, ist ungeklärt. Ausserdem sind, wie das für $p75^{NTR}$ insbesondere bezüglich Zelltod üblich ist, in verschiedenen zellulären Systemen unterschiedliche phänotypischen Auswirkungen auch in Bezug auf das Neuritenwachstum beschrieben (Walsh et al., 1999, Yamashita et al., 1999, Tanaka et al., 2000).

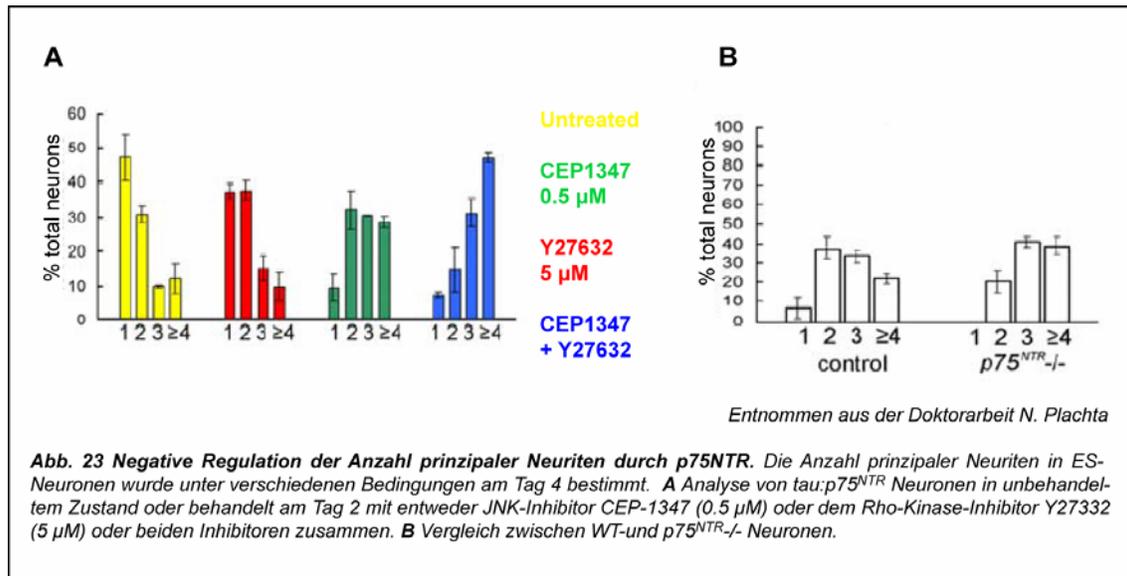
Um die Morphologie der $p75^{NTR-/-}$ Neurone in Kultur analysieren zu können, sollten einige wenige Neurone markiert werden. Dies gelang dadurch, dass im Labor durch die Arbeit von K. Tucker ein Plasmid zur Verfügung stand, welches den *tau*-Promotor und die cDNA von EGFP enthielt. Dadurch konnte eine $p75^{NTR-/-}$ ES-Zelllinie generiert werden, welche mehrere Kopien von EGFP transgen unter dem *tau*-Promoter exprimiert. Die daraus differenzierten

Vorläuferzellen wurden mit WT-Vorläuferzellen in einem Verhältnis von 1:100 in einer gemischten Kultur angesetzt. Die Analyse der Neuriten erfolgte am Tag 4. Es zeigte sich, dass der grösste Anteil der WT-Neurone (72%) 2-3 prinzipale Neuriten (Neuriten, welche direkt aus dem Zellkörper hervorgehen) aufweisen, während bei den meisten $p75^{NTR-/-}$ Neurone (59%) 4 oder >4 prinzipale Neuriten gezählt wurden (Abb. 22). Da die umgebenden Zellen der Kultur WT-Zellen waren, kann man von einem zellautonomen Effekt von $p75^{NTR}$ sprechen.



Diese Analyse wurde von Nicolas Plachta aus unserem Labor ergänzt, indem er bei Zellen, welche $p75^{NTR}$ vom *tau*-Lokus überexprimieren, weniger prinzipale Neuriten im Vergleich mit WT-Zellen fand. Eine Behandlung dieser Zellen mit einem Rho Kinase-Inhibitor (Y27632) oder einem Inhibitor, welcher den JNK-Signalweg blockiert, ergab eine Verteilung wie beim WT. Beide Inhibitoren zusammen appliziert, bewirkten ein vermehrtes Neuriten-Branching, ähnlich zur Situation ohne $p75^{NTR}$ (Abb. 23, siehe auch Doktorarbeit von N. Plachta). Zusammenfassend sprechen diese Daten für eine Rolle von $p75^{NTR}$ als negativer Regulator

in Neuriten-Branching in unserem Zellsystem. Der Signalweg über JNK könnte zusätzlich zu RhoA diesen Effekt vermitteln.

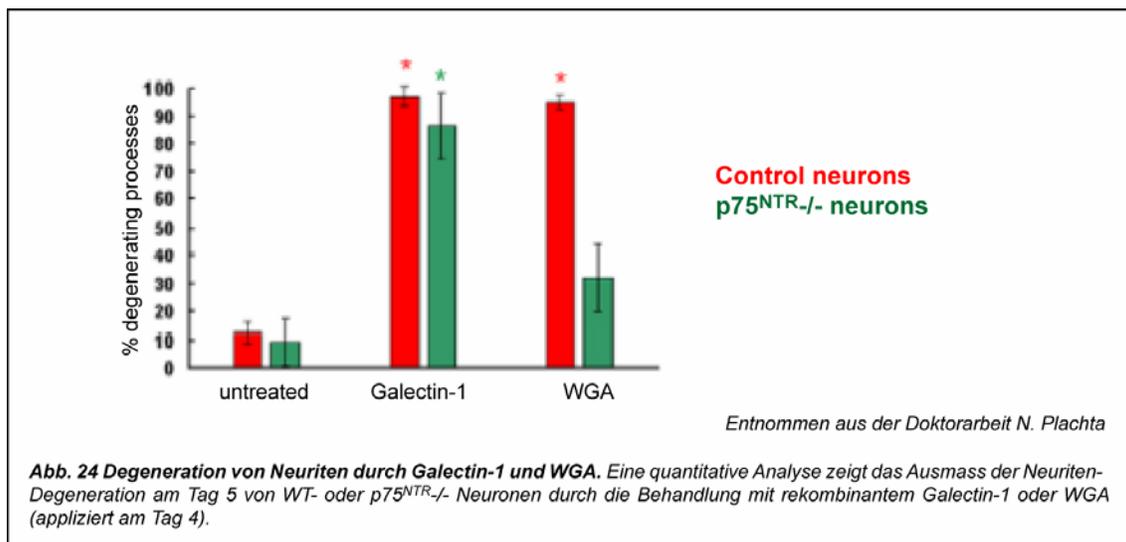


3.3.6 Neuritendegeneration durch p75^{NTR}

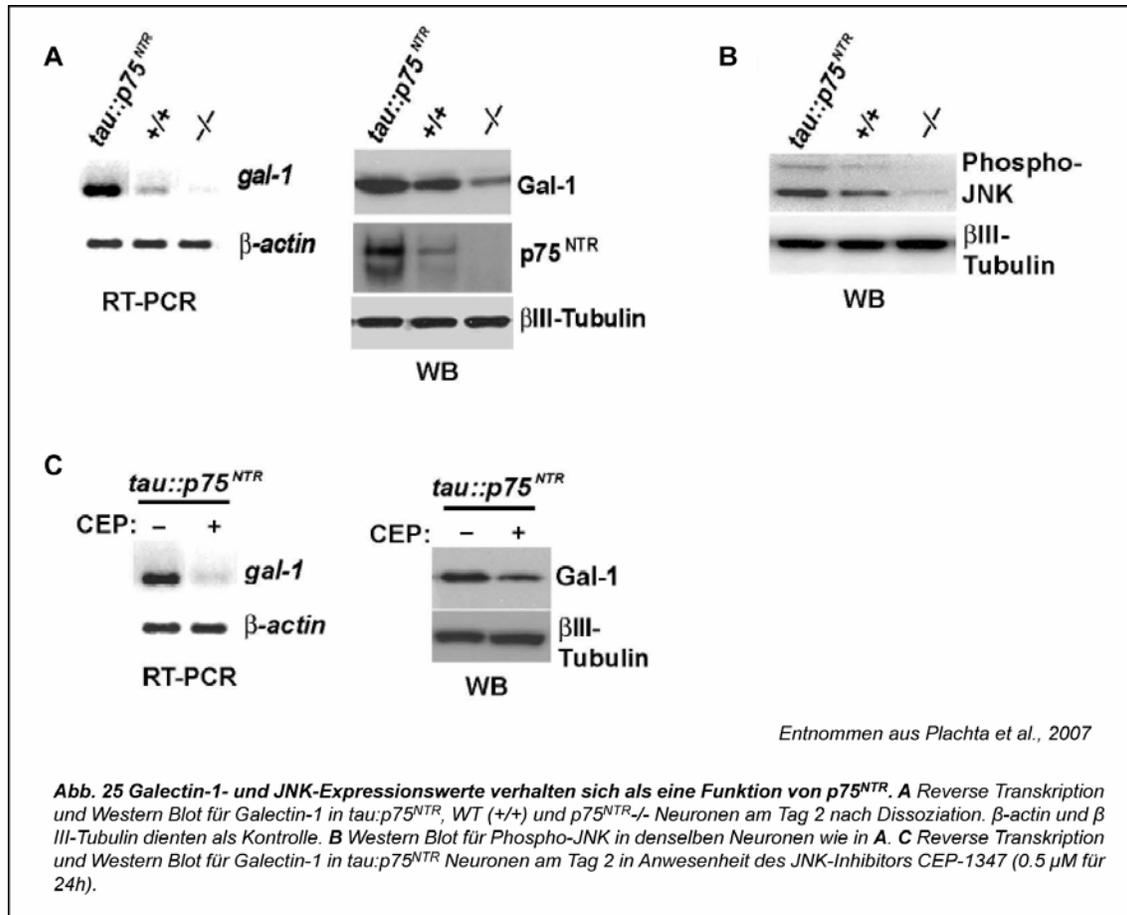
Das aktive Auslösen von programmierten Zelltod während der neuronalen Entwicklung war die erste beschriebene Funktion von p75^{NTR} (Rabizadeh et al., 1993) und vielfache Anstrengung wurde seither unternommen, um die Mechanismen *in vitro* und *in vivo* zu beleuchten. Durch das ES-Differenzierungsmodell konnten mittels der unter 3.3.5 beschriebenen tau::p75^{NTR}-Linie wesentliche neue Aspekte im Rahmen des p75^{NTR}-vermittelten Zelltodes gewonnen werden. Da die p75^{NTR}-/- ES-Zelllinie in dieser Arbeit zu wichtigen Erkenntnissen beigetragen und auch Eingang in eine Publikation gefunden hat (Plachta et al., 2007), werden hier die wesentlichen Aspekte dargestellt.

Wie oben beschrieben, ist die Expression von endogenem p75^{NTR} in unserem Zellsystem zum Zeitpunkt der Dissoziation der Aggregate hoch und wird dann nach der Differenzierung in Neurone in den nachfolgenden Tagen herunterreguliert. Die Prävention dieses natürlichen Expressionsrückgangs durch die Promoterelemente von tau (tau::p75^{NTR}-Linie) führte zunächst zu Neuritendegeneration und anschliessend zum Zelltod der Zellkörper. Interessanterweise waren die für p75^{NTR}-vermittelten Zelltod bereits vorgeschlagenen Signalwege über JNK und Caspasen beide involviert, jedoch JNK ausschliesslich in der Degeneration der Neuriten und Caspase-3 im Absterben des Zellkörpers. Durch eine Proteomic-Analyse wurde jedoch ein bisher nicht mit p75^{NTR}-assoziiertes Protein identifiziert, nämlich Galectin-1. Galectin-1 gehört zur Gruppe der Lectine, welche an Zuckerreste binden, in diesem Fall an O-glycosilierte β-Galactoseverbindungen. Die

physikalische Interaktion mit p75^{NTR} konnte mittels Ko-Immunopräzipitation gezeigt werden. Sowohl auf Proteinebene wie auch auf RNA-Ebene wurde eine Hochregulierung von Galectin-1 in den *tau::p75^{NTR}* Neuronen gesehen. Dass Galectin-1 aktiv an der Neurodegeneration beteiligt ist, wurde durch zwei komplementäre Ansätze klar: erstens konnte die Degeneration der *tau::p75^{NTR}* Neuronen durch exogene "Galectin-Fänger" grösstenteils verhindert werden, zweitens löste rekombinantes Galectin-1, appliziert in WT-Kulturen, ebenfalls Degeneration aus. Die Frage, ob Galectin-1 seine Zelltod-Funktion über die Bindung an p75^{NTR} ausüben würde, konnte durch Experimente mit den *p75^{NTR}*^{-/-} Neuronen geklärt werden. Die Applikation von Galectin-1 führte zum Absterben von WT- wie auch der *p75^{NTR}*^{-/-} Kulturen, somit benötigt Galectin-1 nicht die Expression von p75^{NTR} für seine Zelltod-Funktion. Dies im Gegensatz zu WGA, ein Lectin, welches ebenfalls an p75^{NTR} bindet und Zelltod in WT-, jedoch nicht in den *p75^{NTR}*^{-/-} Neuronen auslöst. (Abb. 24, siehe auch Doktorarbeit N. Plachta).



Um zu testen, ob die Expression von Galectin-1 eine Funktion der p75^{NTR}-Expression sei, wurden die Expressionswerte von Galectin-1 in *p75^{NTR}*^{-/-}, WT-, und *tau::p75^{NTR}* Neuronen auf RNA- und Proteinebene gemessen und damit diese Vermutung bestätigt. Bei der Frage, wie p75^{NTR} transkriptionell Galectin-1 regulieren könnte, lag der Fokus primär auf JNK. Es zeigte sich, dass die Expressionswerte für aktivierte (phosphorylierte) JNK ebenfalls als Funktion von p75^{NTR} variierten. Blockierung von JNK durch CEP-1347 verhinderte die Hoch-Regulierung von Galectin-1 in den *tau::p75^{NTR}* Neuronen (Abb. 25, siehe auch N. Plachta et al., 2007).

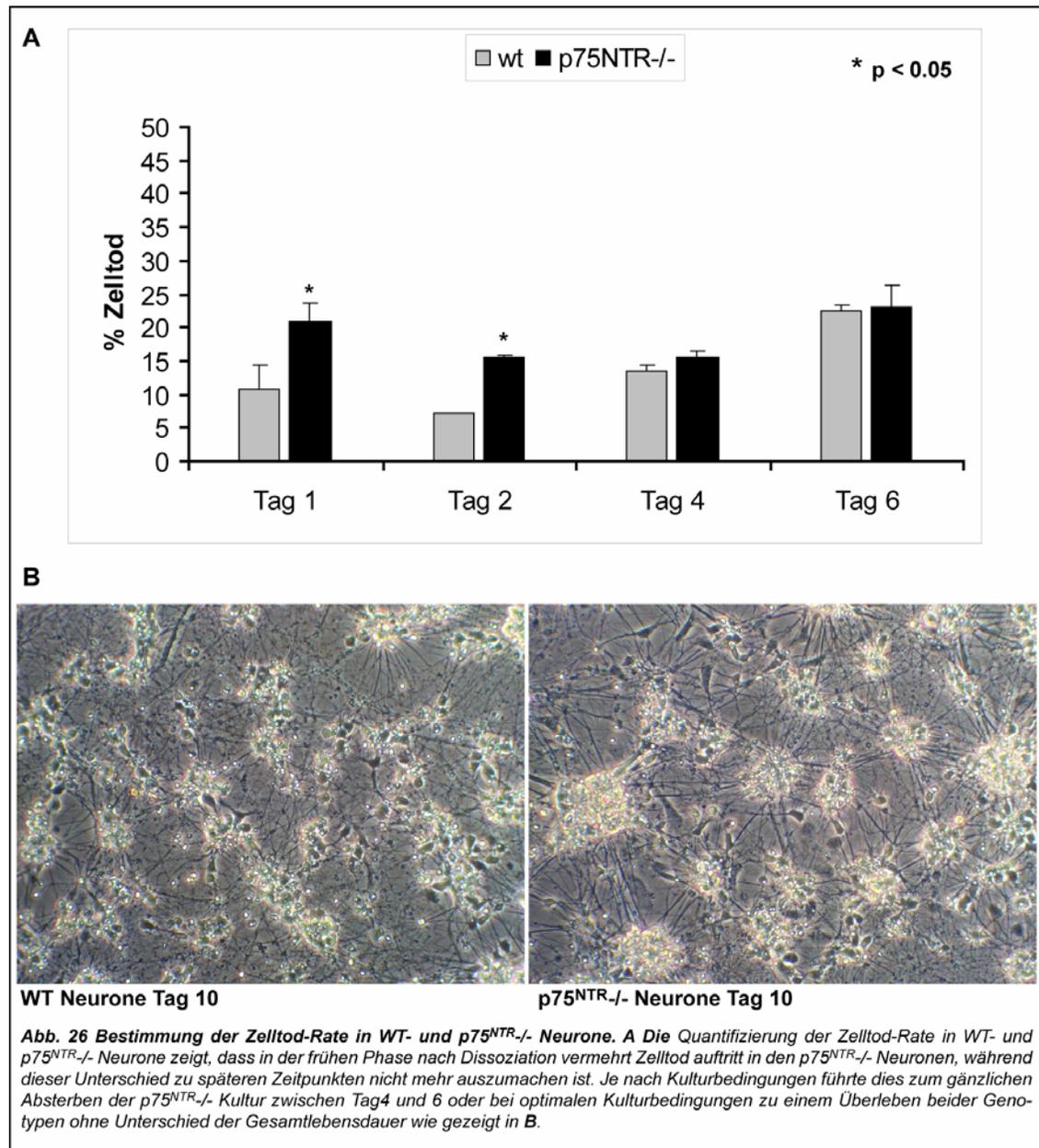


Zusammenfassend ergaben diese Untersuchungen ein tieferes Verständnis der Mechanismen um p75^{NTR}-vermittelten Zelltod im Rahmen einer p75^{NTR}-Überexpression, einer Situation, welche bekanntlicherweise in vielfältigen pathologischen Szenarien auftritt, um mit der Nervenverletzung, Alzheimer-Krankheit oder Epilepsie nur die wichtigsten zu nennen. Die Verwendung der *p75^{NTR}*^{-/-} ES-Zelllinie half dabei, zentrale Fragen zu klären.

3.3.7 Die Rolle von p75^{NTR} im Überleben

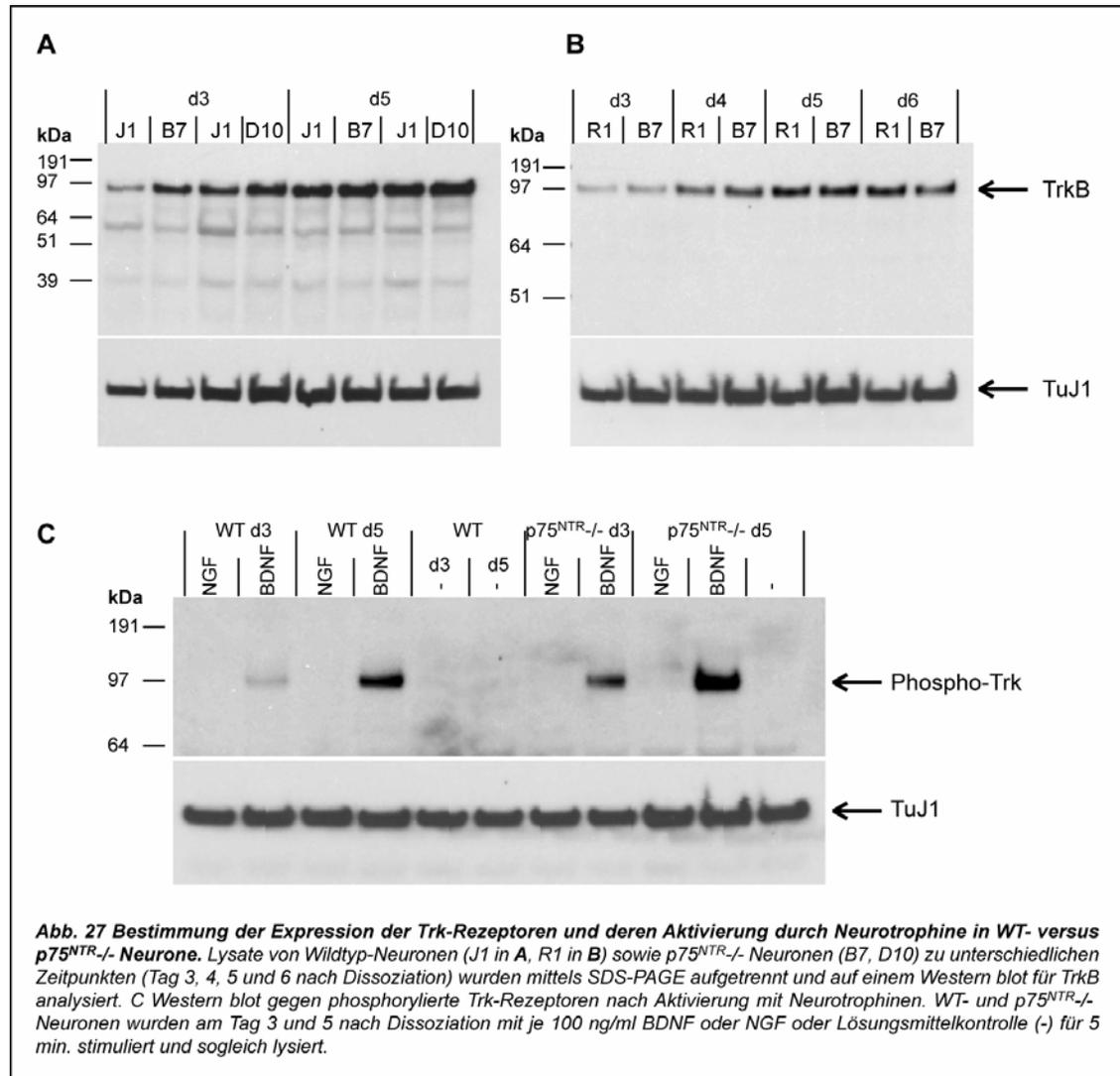
Da ein Übermass an p75^{NTR} Expression zum Absterben der aus ES-Zellen differenzierten Neuronen führte, stellte sich die Frage, wie die Überlebensrate ohne p75^{NTR} aussehen würde. Überraschenderweise deuteten viele anfänglichen Versuche darauf hin, dass das Fehlen von p75^{NTR} ebenfalls Zelltod auslösen würde, denn *p75^{NTR}*^{-/-} Kulturen konnten nicht länger als 4-6 Tage nach Dissoziation überleben, während WT-Kulturen mindestens 12 Tage hielten. Ein entscheidender Faktor für das Überleben von differenzierten ES-Zellen ist jedoch die Qualität oder Reinheit der neuronalen Kultur. Und diese wiederum ist abhängig von den ES-Zelleigenschaften der ES-Zelllinie. Aus diesem Grund wurde an der Optimierung

dieser Kultur gearbeitet, womit ein Überleben der $p75^{NTR-/-}$ Neurone über 12 Tage erreicht wurde (Abb. 26B).



Bei diesen Neuronen konnte dann die Überlebensrate bestimmt werden. Es stellte sich heraus, dass die Zelltodrate am Tag 1 und 2 rund doppelt so hoch war im Vergleich zu WT-Neuronen (21.0% vs. 10.8% für Tag1 und 15.6% vs. 7.0% für Tag 2), wohingegen zu späteren Zeitpunkten (Tag 4 und 6) keine signifikanten Unterschiede mehr gesehen wurden (Abb. 26A). Allgemein ist zum Zelltod in diesen Kulturen zu bemerken, dass aufgrund der mechanischen Dissoziation in der ersten Phase eine relativ hohe Zelltodrate zu beobachten ist und sich die Kultur in der Regel stabilisiert, wenn die Neurone ein Netzwerk ausgebildet haben.

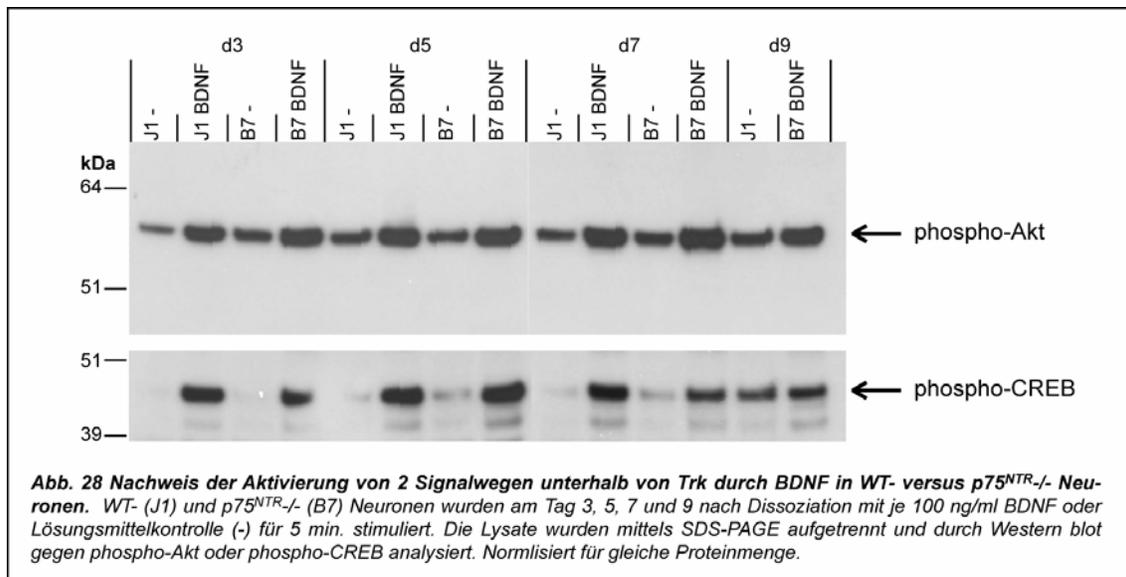
Expression und Aktivierung der Trk-Rezeptoren in Abwesenheit von p75^{NTR}



Da p75^{NTR} mit der anderen Gruppe von Neurotrophin-Rezeptoren, den Trk-Rezeptoren interagieren und damit deren Affinität für Neurotrophine modulieren kann, ist es nicht sinnvoll, die Überlebens-effekte von p75^{NTR} isoliert zu betrachten. Aus diesem Grund wurden auch die Trk-Rezeptoren in den p75^{NTR}-/- Neuronen untersucht. Aus vorgängigen Experimenten in unserem Labor war bekannt, dass in aus ES-Zellen differenzierten Neuronen einzig TrkB exprimiert ist, TrkA oder TrkC war nie detektiert worden. Ein Western blot mit dem Antikörper gegen TrkB zeigte einen kleinen Unterschied in der TrkB-Expression der WT (J1) - vs. p75^{NTR}-/- Neuronen (Abb. 27A). Kein Unterschied konnte jedoch mehr gesehen werden bei der Verwendung von R1-ES-Zellen, welche denselben genetischen

Hintergrund aufweisen wie die $p75^{NTR-/-}$ Zellen (Abb. 27B). Die Trk-Expression ist am Tag 3 schon schwach sichtbar und nimmt erwartungsgemäss mit der Zeit zu. Eine Stimulierung mit 100ng BDNF, jedoch nicht mit NGF oder Lösungsmittelkontrolle führte zu einem starken Signal für Phospho-Trk im Western blot (Abb. 27C). Damit können Trk-Rezeptoren sowohl in WT- als auch in $p75^{NTR-/-}$ Neuronen durch BDNF aktiviert werden. Das Ausmass der Aktivierung erschien in Abwesenheit von $p75^{NTR}$ eher stärker.

Um zu sehen, ob über TrkB-vermittelte Überlebenssignale in der Zelle auch weitergeleitet würden, wurde die Aktivierung von zwei downstream gelegenen Molekülen durch BDNF untersucht, die Phosphokinase B (Akt) und CREB. Beide Moleküle zeigten im Westernblot durch Antikörper gegen die aktive Form ein starkes Signal, sowohl für den WT als auch in Abwesenheit von $p75^{NTR}$ (Abb. 28).



Eine mögliche Erklärung für die oben beschriebene Zelltodrate ist somit, dass in frühen Stadien der Kultur durch das Fehlen von $p75^{NTR}$ ein Überlebenssignal nicht vermittelt werden kann, wobei zu späteren Zeitpunkten die beginnende Expression der Trk-Rezeptoren diese Funktion übernehmen kann.

3.3.8 $p75^{NTR}$ und NF- κ B

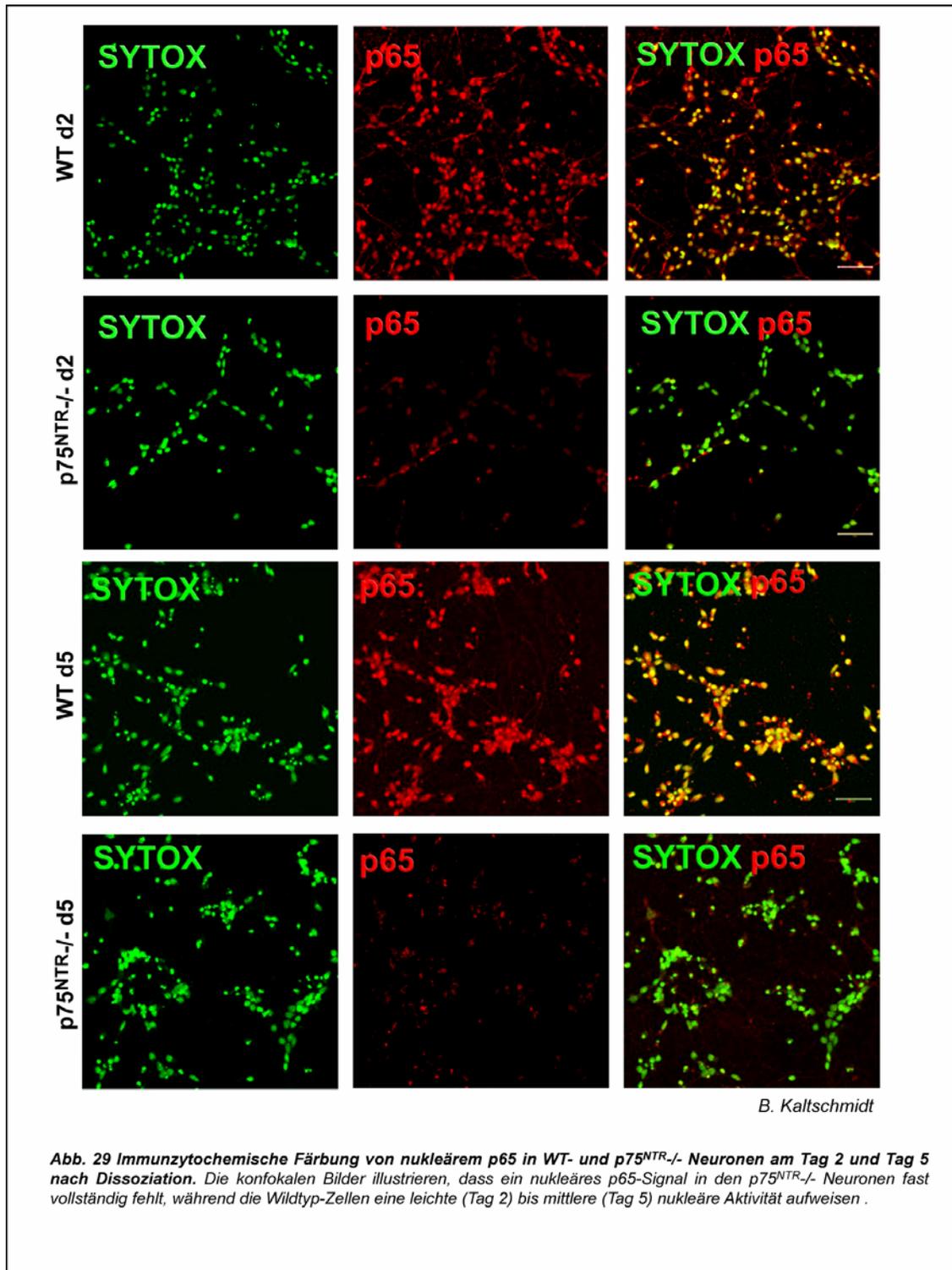
Die nächste Frage war also die Begründung der erhöhten Zelltodrate in den aus $p75^{NTR-/-}$ ES-Zellen differenzierten Neuronen. Dass $p75^{NTR}$ unter physiologischen Bedingungen das Überleben von Neuronen fördern kann, wird aus einer steigenden Literaturliste immer klarer. Die Analyse der existierenden $p75^{NTR}$ KO-Mäuse zeigt ein massiver Verlust von sowohl sensorischen Neuronen als auch Motoneuronen (Lee et al., 1993, Wiese et al., 1999). Allerdings ist es bezüglich der sensorischen Neurone bis heute ungeklärt, ob dieser Verlust

eine Folge der fehlenden p75^{NTR}-Aktivität in den Neuronen selber, einer gestörten Migration der Zellen aus der Neuralleiste in die sensorischen Ganglien, oder einer Störung der Schwann-Zell-Migration und somit eines Verlustes der supportiven Funktion dieser Gliazellen für die Neurone ist. Zweitens haben Affinitätsstudien als auch *in vivo*-Experimente gezeigt, dass p75^{NTR} die Affinität von TrkA für NGF wesentlich erhöhen kann und somit die Überlebenssignale der Trk-Rezeptoren begünstigen kann (Hempstead et al., 1991; Davies et al., 1993; Horton et al., 1997). Ein weiterer wichtiger Hinweis für die Überlebensfunktion von p75^{NTR} ist dessen Verbindung zum NF- κ B-Signalweg. Es wurde erstmals in Schwanzzellen gezeigt, dass NGF über p75^{NTR} NF- κ B aktivieren kann (Carter et al., 1996). Die antiapoptotische Funktion von NF- κ B in Neuronen konnte inzwischen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (Für eine Übersicht siehe Mattson et al., 2000). So weisen die Ganglia nodosa von p65^{-/-} Mäusen eine 30%ige Reduktion in der Anzahl Neuronen auf (Middleton et al., 2000). *In vitro* kann jedoch dieser Effekt durch BDNF (über die Aktivierung des TrkB-Signalweges) vollständig kompensiert werden. Dass p75^{NTR}-vermittelte NF- κ B-Aktivierung zum Überleben beiträgt, wurde aus *in vitro*-Studien mit sympathischen und sensorischen Neuronen klar (Maggirvar et al., 1998, Hamanoue et al., 1999).

NF- κ B wurde zuerst in B Zellen identifiziert (Sen et al., 1986), die Rolle im Immunsystem ist mittlerweile gut charakterisiert. NF- κ B ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor mit posttranslationell regulierter Aktivität. Er umfasst eine Gruppe von fünf DNA-bindenden Untereinheiten, welche homo-oder heterodimere Kombinationen bilden können: p50, p52, p65 (auch RelA), c-Rel und Rel B. Im zentralen Nervensystem besteht die transkriptionell aktive Form zumeist aus dem p50/p65-Heterodimer und ist im Nukleus lokalisiert. Die inaktive Form ist im Zytoplasma sequestriert durch seine Interaktion mit einem inhibitorischen Protein I κ B (I κ B α , I κ B β oder I κ B ϵ). Die Aktivierung im ZNS kann durch verschiedene Stimuli erfolgen wie Glutamat, Kainat, Amyloid- β -Peptid, Zytokine, Depolarisation, oxidativer Stress oder Hirnverletzung jeglicher Art. Sie benötigt die Phosphorylierung der inhibitorischen Untereinheit durch I κ B-Kinase und die nachfolgende Ubiquinierung und Degradation im Proteosom, wobei die Translokation des p50/p65-Heterodimers in den Zellkern und damit die transkriptionelle Aktivität ermöglicht wird. Die Erkennungssequenz in den 5' Regulatorischen Elementen besteht aus 10 Basen, nämlich 5'-GGGPuNNPyPyCC-3' (Pu, Purin; Py, Pyridin; N, unbestimmte Base).

Aus dem beschriebenen Signalweg folgen die gebräuchlichen labortechnischen Möglichkeiten zur Detektion von NF- κ B-Aktivität: Die Lokalisation der Untereinheiten im Zellkern durch immunzytochemische Färbung, die Detektion einer Bindung an die

Erkennungssequenz durch EMSA und einer transkriptionellen Aktivität durch Reporter-Assays.



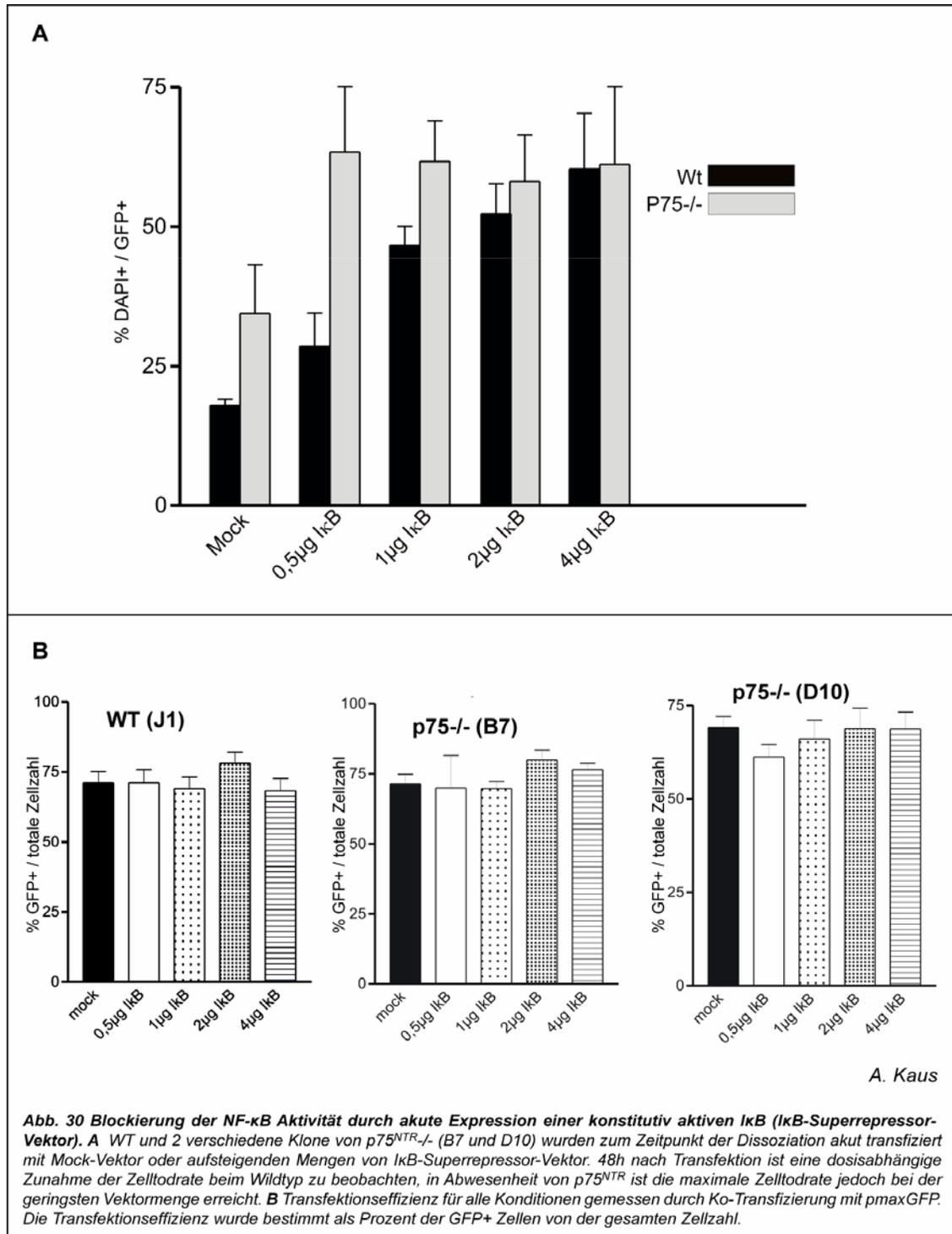
Die Messung der NF-κB-Aktivität in den p75^{NTR}-/- Neuronen erfolgte in enger Zusammenarbeit mit der Gruppe von C. Kaltschmidt in Witten, DE. Zur Detektion von

nukleärem NF- κ B wurden WT- und $p75^{NTR-/-}$ Neuronen an verschiedenen Tagen nach Dissoziation fixiert und mit einem Antikörper gegen diejenige Domäne von p65 gefärbt, welche im inaktiven Zustand mit der I κ B interagiert. Der Antikörper erkennt somit nur nukleäres p65. Die Analyse erfolgte mit konfokalem Mikroskop (durch B. Kaltschmidt). In den WT-Neuronen ergab sich am Tag 1 ein schwaches nukleäres Signal, am Tag 2-5 eine mittlere konstitutive NF- κ B-Aktivität. Die $p75^{NTR-/-}$ Neuronen hingegen zeigten zu allen Zeitpunkten eine sehr schwache bis fehlende NF- κ B-Aktivität (Abb. 29). Dies war ein erster deutlicher Hinweis, dass die $p75^{NTR-/-}$ Neuronen NF- κ B nicht in vergleichbarem Masse aktivieren können.

Transfer von I κ B Superrepressor-Vektor I κ Baa1

Als nächstes sollte getestet werden, ob eine verminderte bis fehlende NF- κ B-Aktivität den beobachteten Phänotyp der erhöhten Zelltodrate in Abwesenheit von $p75^{NTR}$ bedingen kann. Dazu sollte mittels Transfektionen mit der endogenen NF- κ B-Aktivität interferiert werden. Da es bislang keine befriedigende Transfektionsmethode für die aus ES-Zellen differenzierten Neurone gab, wurde ein Protokoll etabliert, welches eine 70-75%ige Transfektionsrate durch Elektroporation (siehe 2.2.4) erlaubte. Ein Nachteil dieses Prozederes war die durch die Elektroporation bedingte hohe Zelltodrate, welche das Absterben der Kultur innerhalb von 72 h bewirkte. In diesem Zeitfenster konnten jedoch Experimente analysiert werden. WT- als auch 2 Klone von $p75^{NTR-/-}$ Zellen wurden zum Zeitpunkt der Dissoziation mit einer konstitutiv aktiven I κ B (I κ B Superrepressor-Vektor I κ Baa1) transfiziert und die Zelltodrate 48h nach Transfektion bestimmt. Dabei wurden aufsteigende Mengen an I κ Baa1-Vektor-DNA verwendet sowie als Kontrolle ein inaktiver (Mock-) Vektor und zur Detektion der transfizierten Zellen GFP-Vektor. Bei der Transfektion mit Mock-Vektor zeigte sich eine ca. doppelte Zelltodrate bei den $p75^{NTR-/-}$ Zellen verglichen mit dem WT, was einhergeht mit der oben beschriebenen Situation ohne Transfektion. Im WT erhöhte sich die Zelltodrate proportional zu der I κ Baa1-Vektormenge. In Abwesenheit von $p75^{NTR}$ erhöhte sich die Zelltodrate im Vergleich zum Mock-Vektor mit der kleinsten I κ Baa1-Vektormenge maximal und stieg mit zunehmender Vektormenge nicht weiter an (Abb. 30).

Damit wurde klar, dass eine Inhibition der NF- κ B-Aktivität den Zelltod von WT-ES-Zell-Neuronen bedingen kann. Aus den Transfektionen der $p75^{NTR-/-}$ Zellen wurden folgende Schlussfolgerungen gezogen: Der Anstieg der Zelltodrate mit I κ Baa1 im Vergleich zum Mock-Vektor lässt eine Restaktivität von NF- κ B vermuten, der massive und maximale Anstieg der Zelltodrate schon durch die geringste Menge an I κ Baa1 zeigt, dass jedoch die "Toleranz" dieser Zellen gegen eine NF- κ B-Inhibition deutlich geringer ist als beim WT.

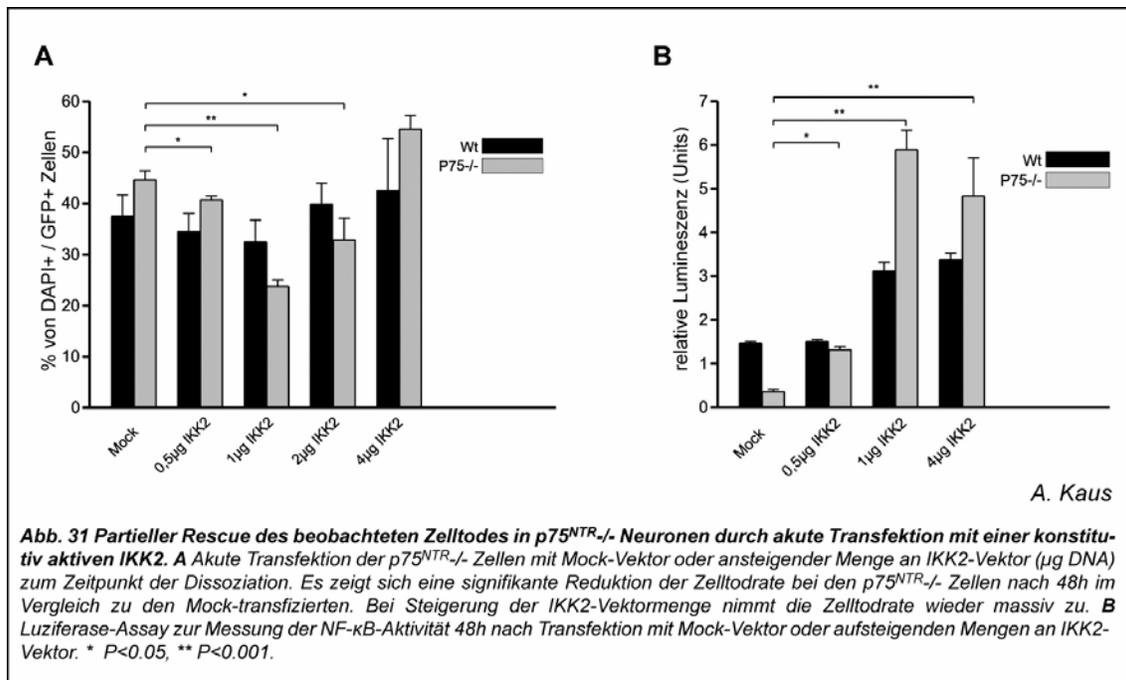


Transfer von IKK2

Als nächstes wollten wir sehen, ob die Wiedereinführung von NF-κB-Aktivität in die p75^{NTR}-/- Zellen die erhöhte Zelltodrate heruntersetzen kann. Dazu wurde ein Vektor verwendet,

welcher eine konstitutiv aktive IKK2 enthielt, das ist diejenige Kinase, welche die IκB phosphoryliert. Dieser Vektor wurde uns freundlicherweise von M. Schmidt-Supprian zur Verfügung gestellt. Zwei Mutationen (Ser177Glu und Ser181Glu) in der IKK-2-Sequenz führten zu einer hochaktiven IκBα-Kinaseaktivität *in vitro* (Mercurio et al., 1997), die korrespondierenden Mutationen in der IKK1-Sequenz, die zweite Untereinheit des IKK-Komplexes, hatten jedoch wenig Effekt auf die Kinaseaktivität. Diese konstitutiv aktive Form der IKK2 hat sich seither zur Aktivierung von NF-κB bewährt (Sasaki et al., 2006).

Für das Rescue-Experiment wurden WT- und *p75^{NTR}*- Zellen mit Mock-Vektor oder aufsteigenden Mengen an IKK2 wie oben beschrieben transfiziert. Um die NF-κB-Aktivität kontrollieren zu können, wurde gleichzeitig ein Luziferase-Reporter (κB-luc) und eine interne Kontrolle für den Luziferase-Assay, Renilla-luc, sowie GFP eingeführt.



Die mit Mock-Vektor transfizierten Zellen zeigten in Abwesenheit von *p75^{NTR}* eine deutlich geringere Luziferase-Aktivität, womit das oben beschriebene Experiment der geringeren nukleären p65-Färbung bekräftigt wird. Die Transfektion mit ansteigenden Mengen an IKK2-Vektor ging einher mit einer ansteigenden Luziferase-Aktivität. Auffallend dabei war, dass die IKK2 in den *p75^{NTR}*- Zellen zu einer ungleich viel höheren Luziferase-Aktivität führte als in den WT-Zellen (Abb. 31B).

Bezüglich Zelltodrate konnte in den WT-Zellen keine signifikante Änderung durch die IKK2 beobachtet werden. In Abwesenheit von *p75^{NTR}* ergab sich jedoch eine signifikante Verminderung der Zelltodrate, wobei ein optimales Dosierungsfenster bestand. Sehr hohe Mengen an IKK2 führten wiederum zu erhöhtem Zelltod (Abb. 31A). Diese Tendenz war in beiden Genotypen zu beobachten, jedoch im WT in abgemilderter und nicht signifikanter

Form, entsprechend des geringeren Anstieges der Luziferase-Aktivität. Da bekanntlich ein negativer Feedback-Mechanismus von NF- κ B besteht, könnte dieser entsprechend der höheren ausgehenden NF- κ B-Aktivität im WT den geringeren maximalen Anstieg durch die IKK2 erklären.

3.3.9 Genexpressionsanalyse in ES-Zell-Neuronen

Die Analyse der $p75^{NTR-/-}$ Neuronen zeigte zwei phänotypische Veränderungen: einerseits vermehrte Neuriten-Verzweigungen und andererseits eine erhöhte Zelltodrate zu einem frühen Zeitpunkt nach Dissoziation der Aggregate. Zudem konnte eine deutlich reduzierte NF- κ B-Aktivität in diesen Zellen nachgewiesen werden. Die Experimente der "gain of function" bzw. "loss of function" von NF- κ B unterstützten die Vermutung, dass die erhöhte Zelltodrate in kausalem Zusammenhang mit der reduzierten NF- κ B-Aktivität steht. Die molekularen Mechanismen, welche diesen beiden Phänotypen zugrunde liegen können, sind jedoch nicht geklärt. Die Überlegung war nun, mittels einer Genexpressionsanalyse Zielgene von $p75^{NTR}$ in unserem Zellsystem zu identifizieren. Durch den Vergleich zwischen WT- und $p75^{NTR-/-}$ Neuronen sollten Gene erfasst werden, welche von NF- κ B reguliert werden und verantwortlich sein könnten für die erhöhte Zelltodrate in Abwesenheit von $p75^{NTR}$. Die kürzlich beschriebenen Auswirkungen von NF- κ B auch auf das Neuritenwachstum (Gutierrez et al., 2005) machte die Analyse durch eine mögliche Querverbindung noch spannender. Ausserdem war eine Auswirkung von $p75^{NTR}$ auf transkriptioneller Ebene aus mehreren Quellen bekannt: Einerseits über die Regulation von RhoA, welches nicht nur das Zytoskelett modulieren kann, aber auch über die Veränderung des Genexpressionsmusters andere zelluläre Programme wie Apoptose/Überleben, Proliferation/Quieszenz, Differenzierung/Pluripotenz beeinflussen kann (Ridley, A.J., 2000). Andererseits konnte, ebenfalls durch eine Genexpressionsanalyse in unserem Labor, durch Aktivierung von $p75^{NTR}$ mit NGF einen Effekt auf die Transkription und Expression von Glutamatrezeptor-Untereinheiten in cerebellären Körnerzellen entdeckt werden (Rösch et al., 2005). Erwähnt werden soll auch die kürzlich gefundene Regulation auf transkriptioneller Ebene von Galectin-1 durch $p75^{NTR}$ (Plachta et al, 2007).

In der Analyse sollten nicht nur die Genotypen miteinander verglichen werden, sondern auch zeitliche Unterschiede erfasst werden. Einerseits nimmt die $p75^{NTR}$ -Expression mit fortschreitender Differenzierung und Maturierung der Neurone in unserem Zellsystem ab und zweitens haben wir gesehen, dass sich der Phänotyp des Zelltodes nur in der ersten Phase zeigt. Ausserdem waren in den ersten Tagen nach Dissoziation, also in der Phase, wo Vorläuferzellen zu Neuronen differenzieren, diese Neuriten und Synapsen ausbilden und

ihre Funktion der Neurotransmission etablieren, grosse Veränderungen des Genexpressionsmusters zu erwarten und damit wiederum der zellulären Komponenten, welche letztlich die Funktion von $p75^{NTR}$ bestimmen.

Die offensichtlichen Vorteile unseres Zellsystems für eine Genexpressionsanalyse sind die Homogenität der Zellen und die unlimitierten Mengen für eine ausreichende RNA-Menge. Die bereits durchgeführten Genexpressionsanalysen in diesem Zellsystem zeigten, dass eine sehr geringe Variabilität sowohl zwischen verschiedenen Proben von einem Differenzierungsansatz, als auch zwischen 2 verschiedenen Differenzierungsansätzen besteht (S. Perez, mündliche Mitteilung). Daher erschien ein Datensatz im Duplikat (mit 2 unterschiedlichen Differenzierungsansätzen) für die Signifikanz ausreichend.

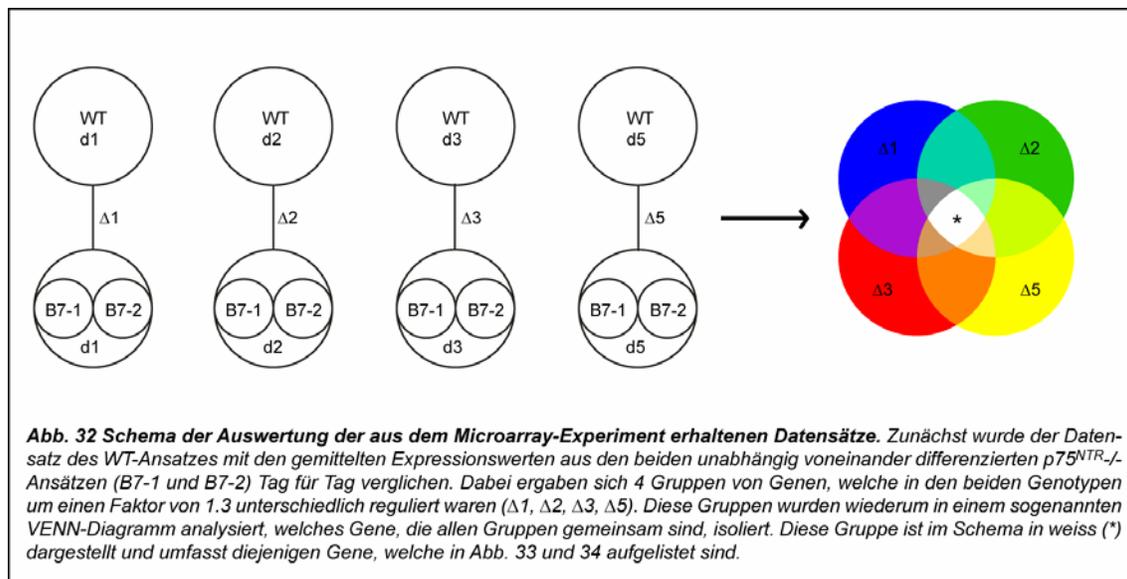
Das vorliegende Experiment wurde mit der Methode nach Affymetrix durchgeführt. Diese basiert auf sogenannten "High Density Oligonucleotide Arrays", mit denen die Expressionswerte unterschiedlicher Gene von zwei oder mehr biologischen Proben verglichen werden können. Dieser Ansatz erlaubt, die bis jetzt grösste Anzahl an Genen in der Maus parallel zu untersuchen. Im konkreten Fall waren dies rund 34000 gut charakterisierte Gene, insgesamt 39000 Transkripte, welche durch 45000 Probe-Sets erfasst wurden (GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array).

Für das Experiment wurden ES-Zellen mit demselben genetischen Hintergrund (R1) ausgewählt, und zwar ein Zellklon (A11), der in einem Allel mit pBST14 homolog rekombiniert worden war. Diese Mutation sollte sich theoretisch nicht auf die Expression von $p75$ auswirken und zugleich die bestmögliche Ähnlichkeit zu den $p75^{NTR-/-}$ Zellen ergeben. Dieser Klon und der Klon B7 ($p75^{NTR-/-}$) wurden als ES-Zellen kultiviert und danach in zwei unterschiedliche Ansätze für die Differenzierung aufgeteilt. Zur RNA-Gewinnung wurden am Tag1-6 nach Dissoziation je zwei 6 cm-Schalen pro Ansatz mit RLT-Puffer (Qiagen) lysiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Neurone der beiden Genotypen exakt zur gleichen Zeit nach Dissoziation lysiert wurden, um die gleiche Differenzierungsstufe zu erhalten. Die RNA-Isolierung ergab in allen Fällen eine ausreichende RNA-Menge, die Qualität wurde anschliessend mit der Methode von Agilent 2100 BioAnalyzer gemessen. In einem Fall zeigte sich eine Degradation, weswegen der Tag 4 nicht in die Analyse aufgenommen wurde.

Gene, welche unterschiedlich reguliert sind in WT- versus $p75^{NTR-/-}$ Neuronen

Die erhaltenen Datensätze sollten nun in einem ersten Experiment analysiert werden, um unterschiedlich regulierte Gene zwischen den beiden Genotypen zu erfassen. Als erstes wurden die Duplikate auf ihre Ähnlichkeit der Genexpression überprüft. Dabei fiel sofort auf,

dass die $p75^{NTR-/-}$ Duplikate fast identisch waren, die WT-Duplikate jedoch einige wenige, aber sehr ausgeprägte Unterschiede aufwiesen. Insbesondere zeigte sich in einem WT-Duplikat, dass die Expressionswerte von $p75^{NTR}$ in gleichem Masse reduziert waren wie bei den beiden $p75^{NTR-/-}$ Duplikaten. Das legte den Verdacht, nahe, dass ein WT-Ansatz mit $p75^{NTR-/-}$ Zellen vertauscht wurde, was mit einer RT-PCR bestätigt werden konnte. Somit mussten leider alle WT-Duplikate aus der Analyse entfernt werden. Der neue Datensatz bestand schliesslich aus einem WT-Wert und zwei $p75^{NTR-/-}$ Werten für die Tage 1, 2, 3 und 5, die Normalisierung wurde mit diesen Werten vorgenommen. Da sich mit einem WT-Wert keine statistische Signifikanz für einen Zeitpunkt errechnen lässt, erschien es am sinnvollsten, eine Liste von denjenigen Genen anzulegen, welche einen Unterschied zwischen den beiden Genotypen in allen Zeitpunkten aufwiesen. Für Microarray-Experimente im Nervensystem werden oft eher kleine Änderungsfaktoren angewendet, da schon kleine Unterschiede eine grosse Wirkung haben können (Pavlidis, 2003). Deswegen wurde in einem ersten Schritt diejenigen Gene ermittelt, deren Expression sich um einen Faktor von mindestens 1.3 im WT versus $p75^{NTR-/-}$ für Tag 1, 2, 3 und 5 unterscheidet. Die resultierenden Gruppen $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$ und $\Delta 5$ umfassten rund 700-1500 Gene. In einem zweiten Schritt wurden dann durch ein sogenanntes VENN-Diagramm die Gene ermittelt, welche in allen 4 Gruppen vorkamen. Die genaue Auswertung der Datensätze ist in Abb. 32 wiedergegeben.



In Abb. 33 und Abb. 34 ist das Ergebnis dieses Vergleichsmodus in Form von zwei Genlisten wiedergegeben. Es wurden mit oben genannter Methode 108 Gene gefunden, welche zu allen Zeitpunkten mind. 1.3 mal höher exprimiert sind im WT versus $p75^{NTR-/-}$ (Abb. 33), und 175 Gene mit erhöhter Expression in Abwesenheit von $p75^{NTR}$ (Abb. 34). Die

Reihenfolge der Gene erfolgte nach dem höchsten Unterschiedsfaktor am Tag 3. Die Höhe der Expressionswerte sind den Abb. 35 und Abb. 36 farbkodiert dargestellt.

Um die Genexpressionsdaten der 282 Gene umfassenden Liste in ein funktionelles Profil zu übersetzen, wurde eine "Gene Ontology"-Analyse angewendet. "Gene Ontology" stellt für jedes bekannte Gen eine organisierte Form von Begriffen zur Verfügung, die den biologischen Prozess, die zelluläre und die molekulare Funktion beschreiben (www.geneontology.org). Bei dieser Analyse wurden primär nur diejenigen Funktionen beachtet, welche schon in der phänotypischen Analyse der *p75^{NTR}-/-* Zellen untersucht worden sind, nämlich Zellzyklus, Neuritenwachstum und -Branching, Zelltod und NF- κ B-regulierte Gene. Interessant erschienen auch diejenigen Gene, welche für Transkriptionsfaktoren kodieren. Da die NF- κ B-regulierten Gene diesem Programm nicht zu entnehmen waren, wurden diese durch die im Internet zugängliche Liste von Hand ermittelt (www.nf-kb.org). Die einer Funktion zugeordneten Gene sind in Abb. 35 und 36 für Zellzyklus in grün, für Neuritenwachstum/-Branching in rot, für Transkription in blau und für NF- κ B-Targets in rosa markiert. Es konnten keine Gene gefunden werden, welche in der Regulation des Zelltodes eine Rolle spielen. Dies ist nicht weiter erstaunlich, da dieser Phänotyp von vorübergehender und nicht ausgeprägter Natur war und Zelltod häufig nicht über die Transkription, sondern über die Rekrutierung von zellulären Mediatoren vermittelt wird. Dagegen erscheinen in der Liste Gene, welche Effektoren für Neuritenwachstum sind wie Integrin alpha 8, Nik related kinase, LIM domain binding 2, Cdc42 GTPase-activating protein, Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF)17 und Semaphorin 5A.

Unabhängig von dieser Microarray-Analyse wurde im Rahmen der Zusammenarbeit auch im Labor von C. Kaltschmidt eine Genexpressionsanalyse gemacht, in kleinerer Form und mit dem Fokus auf NF- κ B. Dabei wurden J1 (Wildtyp), B7 (*p75^{NTR}-/-*) und mit IKK2 akut transfizierte *p75^{NTR}-/-* Neurone am Tag 3 bzgl. Genexpression verglichen. Es stellte sich heraus, dass zwei Gene sich exakt gleich verhielten wie in der hier durchgeführten Microarray-Analyse, d.h. in den *p75^{NTR}-/-* Neuronen deutlich geringer exprimiert als im WT, und in denen durch die IKK2-Überexprimierung ein Rescue-Phänomen zu beobachten war: der Insulin-like growth factor receptor 2 (IGF2R) und das Growth factor receptor bound protein 10 (Grb10). Bei vier weiteren Genen konnte ein Rescue-Phänomen beobachtet werden, jedoch erscheinen diese nicht in der hier erarbeiteten Genliste der Abb. 30 und 31: Defender against Death 1 (DAD1), Amyloid beta precursor protein (APP), Notch gene homolog 3 (Notch3) und RIKEN cDNA B430119L13 gene/Nlrr4. Diese 6 Gene erscheinen besonders interessant, da sie über *p75^{NTR}*-vermittelte NF- κ B-Aktivität reguliert zu sein scheinen. Alle 6 Gene sollen mittels real time-PCR überprüft werden (mündliche Mitteilung C. Kaltschmidt).

Affmetrix- Nummer	Änderungs-Koeffizient KO > WT					Expressionswerte					Gen-Symbol	Beschreibung		
	d1	d2	d3	d5	d5	WT d1	KO d1	WT d2	KO d2	WT d3			KO d3	WT d5
1425458_a_at	146	56.13	23.8	4.155	3368	23665	1352	50.87	895.6	38	802.6	193.35	Grb10	growth factor receptor bound protein 10
1435648_at	4.136	8.74	20.34	18.6	2867	13.1	239.8	26.77	208.3	10.187	184.2	16.875	B430118L13RK	RIKEN cDNA B430118L13 gene
1419033_at	1.86	3.154	8.992	22.67	216.6	116.55	114.4	72.99	196.2	21.93	376.2	16.61	2610018G03RK	RIKEN cDNA 2610018G03 gene
1424890_at	2.49	4.146	8.95	33.71	73.51	32.21	121.5	59.03	184.9	20.66	498	14.91	Bnc1	basonuclin 1
1425457_a_at	64.22	14.28	8.097	3.885	529	7.819	595.7	17.96	526.8	10.1165	604.1	17.52	Grb10	growth factor receptor bound protein 10
1450177_at	3.943	4.456	6.627	3.676	1893	52.515	1697	147.6	156.3	51.405	1463	23.82	Ncfr	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
1418688_at	2.931	2.649	5.352	12.53	28.01	9.727	35.24	27.19	44.7	8.3605	117.5	9.3805	Cacr	calcitonin receptor
1454903_at	3.959	4.682	5.197	4.959	695.9	180.65	1141	480.8	808.1	155.95	339.8	66.525	Ncfr	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
1456335_at	1.468	1.428	4.776	5.372	28.81	20.755	31.19	43.8	51.16	10.816	95.38	18.02	Gm106	gene model 106, (NCBI)
1416468_at	1.695	1.436	4.435	23.76	13.43	7.9215	8.629	12.018	31.42	7.094	183.6	7.732	Alph1a1	aldhyde dehydrogenase family 1, subfamily A1
1439606_at	1.979	3.616	4.427	12.18	242.1	77.14	166.6	92.33	169.8	51.835	121.1	39.255	Gm88	gene model 106, (NCBI)
1442153_at	4.278	3.998	3.575	2.157	429.1	100.35	509.5	255.7	521.7	146.3	313.1	145.15	Gm88	gene model 106, (NCBI)
1448668_at	1.336	2.014	3.474	4.39	486.4	373.55	479.4	476.2	892.3	236.85	1.266	288.3	Podxl	podocalyxin-like
1420387_s_at	1.658	1.431	3.315	3.194	35.37	14.2	51.39	25.28	35.71	11.054	66.46	21	Xir3a	X-linked lymphocyte-regulated 3A; ; 3B
1459565_at	5.749	4.069	3.107	3.982	81.61	22.295	25.49	36.71	34.15	12.559	43.65	12.245	RIKEN full-length enriched library, clone C030026M15	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)
1457429_s_at	1.7	1.397	2.868	4.738	13347	2685.5	13724	6881	7769	39.01	77.84	135.5	Gm106	gene model 106, (NCBI)
1428450_at	4.981	7.596	2.868	4.738	103.7	20.815	134.2	35.54	58.8	20.505	86.8	18.345	Gm106	gene model 106, (NCBI)
1424111_at	2.531	2.342	2.684	1.684	1.684	28.59	98.32	50.58	69.63	69.63	15.915	98.23	2610034B18RK	RIKEN full-length enriched library, clone C030026M15
1441972_at	1.451	1.371	2.459	1.413	25.29	17.605	26.9	40.74	66.78	27.19	49.67	52.935	Igf2r	insulin-like growth factor 2 receptor
1449347_a_at	1.347	1.328	2.412	7.522	7.316	5.4435	7.434	11.216	13.32	13.32	40.86	5.423	Xir4b	X-linked lymphocyte-regulated 4B; ; 4A
1448194_a_at	1.489	1.862	2.333	1.704	11542	7751	13225	14257	15382	6588.5	16098	9446	H19	H19 fetal liver mRNA
1418626_a_at	1.915	2.059	2.279	1.313	169.8	88.655	88.26	86.26	72.37	31.755	59.21	395	S100a6	S100 calcium binding protein A6 (calycalin)
1421375_a_at	1.556	1.368	2.256	3.183	491.9	319.95	441.9	647.7	594.4	268.7	1.257	53.985	Trim25	tripartite motif protein 25
1425974_a_at	1.805	2.072	2.193	3.679	183.2	107.62	168.3	162.44	166	75.755	197.7	68.49	Rab38	Rab38, member of RAS oncogene family
1417700_at	2.068	1.751	2.146	3.092	50.84	25.835	57.15	59.13	101.3	47.98	161.1	60.365	Ddc	doma decarboxylase
1426215_at	1.505	1.735	2.112	2.681	81.56	54.43	50.37	59.13	64.7	30.15	210.1	54.795	Ccbl1	cordón-bleu
1434917_at	1.351	2.474	2.086	1.361	8.957	6.637	22.31	18.038	29.73	14.88	110.9	83.345	Trim25	tripartite motif protein 25
1419879_s_at	2.026	2.032	2.079	2.46	177.1	87.765	141.6	139.59	145.2	69.83	134.7	54.795	Col4a5	collagen, type IV, alpha 5
1428476_at	1.314	1.562	2.072	2.103	1.062	506.35	486.9	632.1	561.3	273.55	938.4	7.2495	Car13	carbonic anhydrase 13
1421307_at	1.855	1.476	2.032	1.746	33.74	16.52	18.06	24.83	14.26	7.02	12.64	65.52	Rec8L1	REC8-like 1 (yeast)
1419147_at	1.801	1.616	2.031	3.964	217.8	121.55	192.4	238.5	250.2	123.2	233.2	3104	Tagln	expressed sequence A462171
1423505_at	1.968	1.701	2.018	1.384	1.957	1248.5	2998	3541	6075	3042.5	4288	37.315	AI662171	transforming growth factor, beta induced
1444536_at	1.321	1.33	1.994	1.433	69.88	54.455	74.35	111.92	78.34	39.3	53.26	72.18	Tgfb1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
1429060_at	1.327	1.752	1.958	5.099	263.9	196.85	346.8	396	263.3	137.45	364.5	125.1	Malat1	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 1 (muscle)
1417917_at	1.382	1.834	1.925	1.33	69.98	50.65	105.4	116.21	283.6	147.85	152	115.43	Cnn1	dishevelled associated activator of morphogenesis 2
1420682_at	1.358	1.353	1.922	1.335	42.45	31.275	42.36	62.74	59.02	30.87	37.98	28.9	Chrm1	clusterin
1455717_s_at	1.436	2.086	1.916	2.316	52.89	37.005	59.5	57.07	62.28	32.775	65.26	28.385	Daam2	cathepsin C
1454849_x_at	1.526	1.941	1.912	1.413	335.7	220.2	191.2	197.22	139.7	73.295	176.1	125.1	Cu	insulin-like growth factor 2 receptor
1416382_at	1.572	1.531	1.91	6.147	83.72	53.96	75.43	96.56	76.66	40.545	172.2	28.06	Cisc	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 2
1424112_at	2.786	2.301	1.9	1.819	438.8	158.3	299.9	260.8	317.5	167.2	252.7	139.8	Cu	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 2
1437689_x_at	1.99	2.156	1.89	2.481	480.2	245.15	260	241.4	197.4	107.035	335.8	135.6	Cu	F11 receptor
1452558_at	1.532	1.431	1.856	1.739	19.93	13.23	18.61	26.63	52.8	29.49	119.2	68.02	Konc2	coatomer protein complex, subunit gamma 2, antisense 2
1424595_at	1.303	1.414	1.794	2.235	244.8	187.95	197	278.5	269.1	150.55	301.5	135	F11r	hypothalamic LOC432607
1427122_at	1.788	1.462	1.794	1.559	89.3	50.53	294.4	415.3	714.8	405.35	943.9	613.35	Coag2a2	coagulation factor III
1442917_at	1.366	1.359	1.785	1.497	163.7	123.8	33.96	50.04	25.43	14.405	18.23	12.19	LCC432607	annexin A1
1417406_at	1.559	1.444	1.775	1.532	311.7	200	206.1	285.7	501.8	280.05	338	234.05	F3	even skipped homeotic gene 1 homolog
1448213_at	1.942	1.953	1.775	1.496	507.5	262.05	372.9	478.9	587.9	332.25	690.9	461.95	Annx1	parathyroid hormone receptor 2
1421627_at	2.332	2.118	1.774	1.768	118.3	50.75	89.57	84.76	64.69	37.775	50.31	28.385	Evr1	nuclear factor, erythroid derived 2, like 3
1452129_at	1.343	1.57	1.755	1.43	70.33	52.51	28.94	36.87	16.6	9.464	6.9	7.175	Phr2	Sft1 homolog, spindle assembly associated (yeast)
1417520_at	1.378	1.303	1.741	1.97	90.87	66.405	76.85	118.04	110.1	62.9	56.7	56.7	Sft1	RIKEN cDNA 2900012M01 gene
1452195_s_at	1.382	1.741	1.415	1.415	353.9	256.1	449.6	668.7	549.1	315.45	504.4	367.15	Sft1	Transcribed locus
1431482_at	2.087	1.364	1.724	1.524	23.43	11.3025	15.15	22.481	24.21	61.2	40.515	2900012M01	RIKEN cDNA 2900012M01 gene	
1457011_at	1.552	1.821	1.721	3.24	2175	1403.5	2231	2454	2932	1704.5	1602	499.8	RIKEN cDNA 5730469M10 gene	
1447774_x_at	1.759	1.609	1.717	2.772	71.49	40.65	71.31	89.06	93.79	54.725	169.5	61.45	5730469M10RK	

Abb. 33 Seite 1 Liste von Genen, welche zu den Zeitpunkten d1, d2, d3 und d5 um einen Faktor von 1.3 höher exprimiert sind in WT Neuronen als in p75NTR-/-

1454974_at	1.74	1.713	1.349	2236	1517.5	1546	1783.9	1740	1016.7	1392	1033.55	Nin1	nefrin 1
1454975_at	1.534	1.364	1.387	1132	75.835	72.84	106.95	81.95	48.72	63.35	45.815	Nin1	nefrin 1
1454976_at	1.349	1.658	2.074	475	352.3	541.1	890.4	757.2	457.45	987.3	157.75	5730469M10Rik	RIKEN cDNA 5730469M10 gene
1454977_at	1.425	1.462	2.403	139.1	98.785	145.9	199.73	241.9	148.1	377.9	18.315	Gucy1b3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3
1454978_at	1.846	1.537	1.638	2.291	17.625	25.12	32.765	39.5	18.025	41.95	18.315	Zm1	zinc finger, imprinted 1
1454979_at	2.025	2.071	1.629	1.768	73.805	196.8	190.67	306.8	191.25	539.3	305.55	Cygb1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1
1454980_at	1.35	1.369	1.627	2.295	90.62	73.51	107.44	91.56	68.72	215.6	94.55	A0143	adaptor-related protein complex AP-1, sigma 3
1454981_at	1.366	1.348	1.622	2.412	293.3	389.6	596.7	419.6	255.05	422.8	175.35	1500010G04Rik	RIKEN cDNA 1500010G04 gene
1454982_at	1.959	1.617	1.795	2.217	213.6	482.2	960.3	583.9	380.95	761.4	315.15	Cdrl1	CD1d1 antigen
1454983_at	1.358	1.434	1.595	1.952	141.85	215	1515.4	396	247.25	325.1	181.65	Anak3	aminoxidase, 23
1454984_at	1.347	1.693	1.852	130.8	880.85	1083	1515.4	396	889.45	1955	1259.5	Prss23	protease, serine, 23
1454985_at	1.599	1.453	1.918	232.6	146.6	203	380	280.3	166.95	249.6	375.7	1500041B16Rik	RIKEN cDNA 1500041B16 gene
1454986_at	1.791	1.493	1.56	1.728	92.045	250.9	336	382.9	245.55	636.8	369.9	Col5a2	collagen, type V, alpha 2
1454987_at	1.939	1.417	1.553	2.171	15.115	38.71	54.86	111.3	71.735	131.6	60.63	Gabrg2	gamma-aminobutyric acid (GABA)-A receptor, subunit gamma 2
1454988_at	1.308	1.441	1.552	1.807	385	683	963.9	764.8	485	643.3	356.5	Malat1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
1454989_at	1.335	1.626	1.543	1.391	105.48	162.3	195.65	208	135.25	155.8	112.3	Rnf128	ring finger protein 128
1454990_at	1.75	1.914	1.526	1.722	98.4	214.4	225.1	230.7	150.25	277.6	153.8	Cdrl1	CD1d1 antigen
1454991_at	1.507	1.433	1.519	1.485	19.055	53.83	73.42	64.99	43.05	50.33	23.715	Gbp2	guanylate nucleotide binding protein 2
1454992_at	2.23	1.687	1.516	2.175	13.93	16.32	24.075	20.18	10.525	22.05	14.89	Pag	Phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1
1454993_at	1.494	1.609	1.504	2.254	20.205	29.46	37.16	31.4	20.92	42.1	18.975	1110033F14Rik	RIKEN cDNA 1110033F14 gene
1454994_at	1.581	1.557	1.502	1.485	214.8	136.15	89.09	114.61	55.24	103.9	69.98	Fz66	frizzled homolog 6 (Drosophila)
1454995_at	1.591	1.607	1.491	2.138	246.15	353.1	441	82.7	55.24	103.9	165	Hmnpa1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Hmnpa1), mRNA
1454996_at	1.577	1.513	1.469	1.557	1449.5	1975	2614	2503	1751.5	3341	2148	Prss23	protease, serine, 23
1454997_at	1.313	1.811	1.484	1.303	24.85	44.51	49.51	62.35	42.09	153.8	118.65	Cdrl10	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1
1454998_at	1.625	1.505	1.448	1.352	142.2	241.1	320.7	484.7	328.7	666.4	493.65	Sicaa1	neprinectin
1454999_at	1.5	1.576	1.478	2.076	47.455	140.9	179.33	230	157.9	566.2	273.05	Nprnt	protease, serine, 35
1455000_at	1.392	1.388	1.471	2.652	31.08	22.335	31.76	57.4	39.05	138.4	52.19	Prss35	clusterin
1455001_at	2.025	2.253	1.459	1.572	225.1	249.6	222.6	191.2	131.2	272.9	174	Clu	vanin 1
1455002_at	1.533	1.769	1.448	1.323	60.395	197.1	223.2	192.5	133.8	87.27	65.98	Vnn1	kin of IRRE like 3 (Drosophila)
1455003_at	2.097	1.628	1.448	1.535	80.25	39.575	176.1	221.67	373.6	259.6	355.3	Kirrel3	RIKEN full-length enriched library, clone:9630014E16
1455004_at	2.192	1.568	1.444	1.595	62.9	89.72	118.45	221.9	153.65	287.9	185.7	Pavr	PRKC, apoptosis, WT1, regulator
1455005_at	1.421	1.339	1.436	1.514	1404	989.4	1448.4	1103	772.1	872	576.55	Acsl5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
1455006_at	1.371	1.655	1.43	1.876	326.4	238.5	202.8	475.5	119.3	205.3	109.45	Prss35	RIKEN cDNA 1110061A14 gene
1455007_at	1.334	1.407	1.419	1.637	670.3	502.6	335.8	487.7	344.45	571.9	349.45	Rgs17	regulator of G-protein signaling 17
1455008_at	1.408	1.354	1.416	1.3	121.9	86.735	288.9	426.6	735.3	519.5	1415	Cdrl1	protein tyrosine phosphatase, receptor type Z, polypeptide 1
1455009_at	1.869	1.874	1.415	1.429	788.75	1100	1175	1478	605.35	395.7	277.2	Ptpn21	microtubule-associated protein 7
1455010_at	2.067	1.654	1.384	1.817	85.99	114.3	140.73	137.6	99.49	271.2	149.35	Mtap7	adenosine deaminase, RNA-specific, B2
1455011_at	1.85	1.876	1.369	2.295	49.155	50.35	55.86	52.24	38.41	87	37.895	Atad2	ankyrin repeat domain 15
1455012_at	1.378	1.344	1.364	1.326	298.2	126.6	188.48	99.85	73.63	136.3	102.8	Ankrd15	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C
1455013_at	1.364	1.352	1.364	1.898	220.6	147.3	226.9	342.7	221.65	263.4	190.1	Dsg2	desmoglein 2
1455014_at	1.362	1.348	1.899	303.1	223.3	197.4	284.9	220.4	163.7	237.4	125.35	Ppp1r3c	RIKEN cDNA 9830147J24Rik
1455015_at	1.34	1.354	1.484	69.5	50.445	38.46	54.78	35.26	26.355	51.95	34.795	Dsg2	RIKEN cDNA 1110064F04Rik
1455016_at	1.656	1.316	1.327	1.427	265.05	289.1	458.6	217	163.7	95.89	67.245	Sicaa5	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 5
1455017_at	1.321	1.714	1.319	1.881	72.35	60.61	71.63	39.42	30.005	51.44	27.44	9830147J24Rik	RIKEN cDNA 9830147J24 gene (9830147J24Rik), mRNA
1455018_at	1.441	1.361	1.316	1.597	129.8	133.2	196.06	158.9	121.1	158.4	102.01	1110064F04Rik	RIKEN cDNA 1110064F04 gene
1455019_at	1.345	1.309	1.31	1.521	239.15	587.9	898.4	678.6	518.15	765.8	506.35	Sicaa5	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 5
1455020_at	1.338	1.338	1.307	1.874	70.46	53.61	48.37	70.84	37.765	62.09	33.3	1110021L09Rik	RIKEN cDNA 1110021L09 gene
1455021_at	1.546	1.509	1.307	1.457	58.44	38.31	73.49	97.72	172.4	440.8	302.65	Spon1	spondin 1, (I-spondin) extracellular matrix protein
1455022_at	2.281	2.745	1.303	4.134	29.16	50.11	36.7	29.14	22.37	94.88	22.985	Hpgd	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)

Abb. 33 Seite 2

Affimetrix-Nummer	Änderungs-Koeffizient KO > WT				Expressionswerte				Gen-Symbol	Beschreibung			
	d1	d2	d3	d5	WT d1	KO d1	WT d2	KO d2			WT d3	KO d3	WT d5
1418511_at	7,556	3,397	12,64	6,824	9,527	73,125	20	68,635	8,319	105,25	49,88	344,8	dermatopontin
1416413_at	1,673	2,035	10,54	2,292	15,14	25,41	36,91	82,26	14,62	158,5	32,53	76,205	cathepsin J
1448421_s_at	1,524	2,858	8,033	7,924	25,92	40,02	48,67	139,55	65,56	54,49	143,7	1164,65	aspirin
1460217_at	1,95	4,489	7,016	3,165	14,69	29,07	13,45	65,895	10,12	77,435	14,75	47,915	profilin related protein
1427489_at	2,402	4,943	5,862	3,094	19,95	48,28	7,947	39,405	9,032	53,085	18,97	58,725	integrin alpha 8
1451344_at	1,83	3,104	5,55	3,06	42,21	77,32	31,02	96,395	16,06	89,54	39,84	122	cDNA sequence, BC025600
1429679_at	2,474	3,515	5,138	5,031	19,28	47,705	37,79	132,95	50,45	269,86	89,7	454,05	leucine rich repeat containing 17
1427780_s_at	3,646	4,546	5,063	3,3	13,17	48,53	22,25	111,82	52,11	291,4	35,12	138,99	profilin 2, mitogen regulated protein, profilin 3
1419662_at	1,877	4,274	4,837	4,986	120,4	226,35	58,15	249,15	99,89	483,3	306	152,9	lumican
1438954_x_at	1,567	3,999	4,447	2,509	7,53	11,961	5,631	20,27	11,15	49,585	251,3	866,3	osteoglycin
1415808_at	2,139	2,462	4,191	1,617	26,42	56,63	53,81	133	40,87	179,35	21,75	54,74	osteoglycin
1448572_at	1,531	2,466	4,17	2,429	8,009	12,265	8,679	21,63	8,008	33,4	4,964	13,55555	trophoblast specific protein alpha
1448977_at	1,956	2,899	3,909	2,25	35,25	68,995	31,8	92,65	18,89	74,13	16,59	37,36	prolactin-like protein A
1419663_at	3,695	4,556	3,904	3,81	16,16	60,095	94,34	429,85	210,8	840,5	284,4	1084,5	transcription factor AP-2, gamma
1418422_at	5,143	1,927	3,715	3,252	8,31	42,74	31,36	60,83	17,59	65,39	19,77	67,02	osteoglycin
1452382_at	1,463	1,798	3,667	1,394	230	336,65	153,7	276,9	112,7	416,05	157,7	220,5	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9g
1417552_at	2,159	3,175	3,482	3,367	216,7	468,4	253,9	806,15	220,7	777,3	135,1	454,95	dynammin 3, opposite strand
1435022_at	2,639	2,542	3,415	2,189	98,05	258,9	96,57	246,85	63,96	219,2	41,58	91,925	fibroblast activation protein
1448228_at	1,448	3,399	3,36	2,434	18,14	28,065	22	75,6	71,67	242,45	319,5	778	cartilage homeo protein 1
1438658_a_at	1,756	2,584	3,333	1,828	965,6	1698	511	1320,5	620,2	2084,5	768,6	1407	lysyl oxidase
1425527_at	2,168	2,279	2,921	2,043	61,36	133,25	57,7	132,1	51,44	151,2	65,93	135,15	sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3
1418423_s_at	3,486	2,253	2,916	3,035	29,63	103,3	80,4	181,1	85,85	192	58,4	177,45	paired related homeobox 1
1437401_at	3,015	4,074	2,883	2,921	85,78	258,7	76,64	312,3	224,3	649,85	619,5	1809,5	serine peptidase inhibitor, clade B, member 9f; 9e; 9g
1437173_at	2,001	2,351	2,866	2,539	236,8	474,7	160,5	377,4	145,8	421,25	155,4	394,5	insulin-like growth factor 1
1438190_x_at	1,618	1,949	2,864	2,524	34,61	56,91	48,73	97,525	49,14	141,9	26,59	67,5	sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3
1424704_at	2,03	2,707	2,85	2,527	39,44	106,255	114,6	281,05	111,7	35,16	102,34	110,72	trophoblast specific protein alpha
1449597_at	2,037	2,45	2,779	3,013	51,8	106,255	114,6	281,05	112,4	316,4	156,8	473,4	run1 related transcription factor 2
1439774_at	1,686	3,174	2,779	1,742	78,29	132	79,38	252	96,64	280,85	117,7	205,4	protein tyrosine phosphatase, receptor type, Y
1442977_at	1,512	1,972	2,698	1,374	108,1	163,7	98,32	194,5	81,54	219,8	141,6	184,25	paired related homeobox 1
1419376_at	3,134	2,482	2,691	6,853	12,19	38,595	27,03	68,485	44,54	122,085	16,93	116,95	Procollagen, type III, alpha 1
1418805_at	3,537	1,888	2,669	3,849	23,47	83,51	51,11	96,895	45,03	120,65	28,21	108,9	RIKEN cDNA 1110018M03Rik
1420512_at	1,511	1,594	2,664	2,052	11,24	16,98	14,52	23,345	20,72	55,42	99,42	204,3	secretin
1419519_at	1,564	2,375	2,657	1,669	37,82	59,34	30,06	71,81	46,66	125,85	150,8	233,75	clckkopf homolog 2 (Xenopus laevis)
1419182_at	1,463	1,785	2,649	1,651	27,41	41,86	45,08	80,83	42,72	113,5	53,76	93,015	insulin-like growth factor 1
1451691_at	1,807	3,355	2,63	3,24	191	345,55	105,9	355,25	121,2	319,3	131,6	427,6	sushi, von Willebrand factor type A
1417553_at	2,759	2,755	2,61	1,506	17,95	49,565	23,15	64,625	26,3	68,695	122,7	465,65	endothelin receptor type A
1429210_at	1,934	2,868	2,599	3,767	168,1	325,3	114,4	328,15	126,5	329,4	122,7	465,65	endothelin receptor type A
1450079_at	1,543	1,603	2,561	1,304	79,31	122,65	105,7	172,05	99,28	254,6	157,9	207,65	procollagen, type XXIII, alpha 1
1460681_at	1,66	2,631	2,541	1,82	167,5	279,9	86,52	227,65	114,3	291,3	100,5	183,95	NK related kinase
1416121_at	1,392	1,733	2,495	2,603	26,33	36,66	63,34	110,2	150,5	363,75	467,1	1218,5	sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3
1449032_at	2,881	1,698	2,489	2,362	23,54	67,81	37,04	63,18	49,69	124,85	45,21	108,445	lysyl oxidase
1432129_a_at	2,029	2,679	2,432	3,003	23,01	50,77	19,6	52,72	20,79	50,98	17,74	53,755	procollagen-like protein M
1426808_at	1,555	1,875	2,369	2,112	95,79	149,35	99,91	191,95	89,3	213,95	75,66	163,4	paired related homeobox 1
1460513_a_at	1,902	4,961	2,396	3,831	29,83	57,18	15,15	69,35	21,48	50,6	19,14	75,135	lectin, galactose binding, soluble 3
1455688_at	2,204	2,435	2,329	2,087	84,16	165,55	75,9	184,8	113,6	267,2	112,2	234,5	endothelin receptor type A
1421917_at	2,12	1,939	2,324	1,384	139,9	286,55	119,7	232,2	101,6	335,35	206,2	285,35	hypothetical LOC98434
1418755_at	1,366	2,111	2,309	2,358	24,21	34,205	36,16	76,75	51,55	57,33	57,33	170,35	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide
1424095_at	1,573	1,887	2,299	1,938	140,7	221,45	109	184,1	83,7	192,4	86,16	273,2	T-box 15
1434413_at	2,556	2,501	2,292	2,435	66,27	169,45	78,71	196,9	192,7	443,2	533,9	1301,5	DNA segment, Chr 9, University of California at Los Angeles 1
1446590_at	1,339	2,354	2,29	2,788	65,28	102,08	92,31	217,85	153,6	363,15	475	1325	Transcribed locus
1454965_at	2,762	2,877	2,275	2,824	81,3	224,75	42,81	123,3	85,36	195,1	81,11	229,05	procollagen, type VI, alpha 1
1445421_at	1,942	2,121	2,243	1,428	8,041	15,66	12,95	27,585	15,15	34,05	38,8	56,555	Transcribed locus
1449368_at	1,739	2,26	2,234	2,51	261,8	465,15	509,6	1151,5	830,8	1855,5	2359	5928,5	integrin alpha 8
1416741_at	1,324	1,958	2,232	2,969	84,89	112,4	60,5	119,45	64,74	147,5	65,4	184,55	Transcribed locus
1425528_at	1,911	1,766	2,225	2,715	258,3	483,7	290,7	513,8	250,5	564,5	267,8	727,5	procollagen, type V, alpha 1
													paired related homeobox 1

Abb. 34, Seite 1 Liste von Genen, welche zu den Zeitpunkten d1, d2, d3 und d5 um einen Faktor von 1.3 höher exprimiert sind in p75NTR-/- Neuronen als im WT

1444387_at	1.595	1.455	2.216	1.454	20.69	33.47	27.45	39.94	25.06	55.545	25.76	37.505	BB337425
1427884_at	2.025	2.13	2.21	1.675	1.007	20.45	1.350	2.891	1.556	3.464	2.905	4.888	procollagen, type III, alpha 1
1435815_at	1.683	1.505	2.192	1.759	8.619	14.54	10.4	15.71	10.15	22.415	10.91	19.86	leucine zipper, down-regulated in cancer 1
1427550_at	1.973	2.083	2.16	1.983	11.94	2.37	123.7	259.35	114.6	247.65	118.3	234.75	paternally expressed 10
1447643_x_at	1.59	1.89	2.157	1.359	267.4	4.26	287.9	544.4	319.9	693.5	248.4	337.95	small homodimer 2 (Drosophila)
1424007_at	1.433	1.322	2.15	2.369	216.2	313.45	120.2	169.95	73.18	162.25	37.84	99.66	growth differentiation factor 10
1425566_a_at	1.678	2.204	2.144	2.373	63.37	140.25	74.84	164.6	71.7	155.45	65.84	156.35	paired related homeobox 1
1457042_at	1.349	1.869	2.119	1.963	42.24	58.557	62.94	118.05	85.98	165.15	137.5	271.05	EST AL259396
1422723_at	2.219	2.294	2.112	2.383	60.7	134.7	61.31	140.8	53.56	113.15	65	157	stimulated by retinoic acid gene 6
1437165_a_at	1.774	1.946	2.101	2.221	550.4	97.15	632	1230.5	697.6	1491.5	694.6	1544.5	procollagen C-endopeptidase enhancer protein
1434130_at	1.923	1.517	2.096	2.358	31.72	62.305	43.31	65.99	52.69	110.5	53.71	126.95	lipoma HMIGIC fusion partner-like 2
1434129_s_at	1.483	1.531	2.09	1.836	121.6	180.9	145.4	222.85	170.3	342.45	216.5	397.6	lipoma HMIGIC fusion partner-like 2
1449528_at	1.389	1.369	2.076	3.076	20.35	28.28	19.59	26.825	27.03	57.385	44.7	140.55	c-fos induced growth factor
1417148_at	1.547	1.499	2.07	2.243	76.74	118.7	108.1	162.1	81.11	167.95	53.41	119.9	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
1436392_s_at	1.869	1.908	2.068	1.756	168.3	319	168.3	322.45	152.9	319.95	56.15	98.89	transcription factor AP-2, gamma
1429313_at	2.112	1.931	2.044	2.414	135	286.2	126.7	244.75	126.1	257.7	85.56	205.05	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1
1421101_a_at	1.849	1.508	2.034	2.074	73.41	135.7	90.4	136.3	68.82	139.95	127.6	265.05	LIM domain binding 2
1423933_a_at	1.846	2.08	2.024	2.535	128.6	243.55	208.4	433.8	475.6	963.5	1511	3832.5	RIKEN cDNA 1600029D21 gene
1423606_at	1.529	1.355	2.013	1.473	146.8	224.55	218.2	299.65	148.2	298.4	216.7	322	periostin, osteoblast specific factor
1447395_at	1.444	2.011	2.009	2.103	39.34	56.855	32.8	66.15	35.84	73.285	51.31	108.15	imprinted and ancient
1415931_at	2.257	2.292	2.006	3.02	161.6	364.75	174	399.25	189	382.1	148.5	459.1	Kruppel-like factor 4 (gut)
1435275_at	1.461	1.548	1.984	2.021	923.8	1351	630.1	976.25	416.7	826.8	443.1	869.35	retinoid-like growth factor 2
1450333_a_at	1.653	1.328	1.98	1.359	60.58	100.395	70.75	93.955	42.07	84.4	54.92	74.76	cytochrome c oxidase subunit Vtb polypeptide 2
1427391_a_at	1.445	1.623	1.977	1.829	82.49	121	97.74	156.8	126.7	237.55	113.4	211.15	GATA binding protein 2
1451264_at	1.315	1.844	1.968	1.646	150.7	188.95	95.19	175.7	108.5	213.75	136.7	225	procollagen, type XII, alpha 1
1418733_at	2.269	2.516	1.948	2.692	114	259.45	108.8	278.65	119.5	234.15	93.09	250.8	FERM domain containing 6
1419237_at	1.402	1.657	1.948	2.086	135.9	190.85	352.7	585.1	842.1	1640.5	1188	247.9	twist gene homolog 1 (Drosophila)
1434479_at	1.323	1.55	1.943	2.358	329.6	436.25	285.8	446.05	324.8	636	346.8	819.95	ubiquitin specific peptidase 29
1433963_a_at	1.356	1.675	1.917	1.796	21.19	28.065	22.54	40.055	13.23	25.42	14.62	26.43	expressed sequence AH13331
1423493_a_at	1.908	1.774	1.914	2.191	42.91	82.045	75.45	133.85	109.8	210.35	260.4	570.8	cDNA sequence BC032204
1452014_a_at	2.221	2.675	1.907	1.943	27	60.44	17.47	46.86	37.65	72.045	71.23	140.1	nuclear factor I/X
1439557_s_at	1.388	1.372	1.899	1.472	114.4	158.7	117	162.35	101.6	195.45	195.6	288.05	nuclear factor I/X
1429209_at	1.333	1.96	1.875	1.616	53.76	72.3	26.13	51.325	18.77	35.35	39.13	63.555	LIM domain binding 2
1422167_at	2.1	2.668	1.856	2.856	5.407	12.61	19.16	52.37	26.64	48.645	53.38	101.295	RIKEN cDNA 5430406M13 gene
1431105_at	1.618	1.492	1.856	1.856	5.407	12.61	19.16	52.37	26.64	48.645	53.38	101.295	semaphorin 5A
1436364_x_at	1.49	2.026	1.836	1.718	73.18	109.1	84.67	171.6	149.2	32.4	20.61	58.94	procollagen, type XXIII, alpha 1
1423428_x_at	1.312	1.575	1.816	2.063	170.6	223.8	120.6	190.55	120.8	219.8	129.3	267.9	nuclear factor I/X
1422720_at	1.383	1.623	1.801	1.647	208.9	269.5	223.6	363.65	183.7	331.2	118.8	196	RIKEN cDNA 5430406M13 gene
1419018_at	1.57	1.771	1.756	2.242	111	174.25	118.9	210.6	107.8	103.85	57.06	127.95	semaphorin 5A
1422851_at	1.437	2.028	1.757	1.514	200.2	280.6	118.3	240.05	190.4	334.6	197.2	303.5	nuclear factor I/X
1423260_a_at	1.704	2.06	1.756	1.469	351.9	599.6	303.6	631.95	351.4	621.95	248.7	307.65	vomeromonal 2, receptor, 8; vomeronasal 2, receptor, 9
1434740_at	1.386	1.5	1.753	1.373	59.42	82.945	67.41	101.145	78.3	137.7	120.5	165.56	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
1450593_a_at	1.408	1.718	1.742	1.377	559	787.3	299.4	42	228.3	33.005	36.62	60.965	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain (let 1)
1427883_a_at	1.748	1.743	1.738	1.568	6215	10868.5	8708	15189.5	9344	16289.5	13114	20582.5	transforming growth factor, beta 2
1419573_a_at	1.436	1.764	1.734	1.709	4094	5880	4546	8021.5	5491	9541	7191	12287.5	scavenger/receptor class F, member 2
1422540_at	1.475	1.38	1.734	2.259	85.74	126.6	76.7	105.9	58.03	100.645	56.5	128.65	RIKEN cDNA 6332401O19 gene
1417505_s_at	1.417	1.327	1.712	2.075	107.6	144.15	100.1	132.85	89.67	154	112	232.6	procollagen, type III, alpha 1
1416414_at	1.426	2.035	1.712	1.445	9.64	13.925	10.15	21.38	9.696	16.66	9.258	13.415	lectin, galactose binding, soluble 1
1419417_at	1.302	1.483	1.699	1.72	1465	1910.5	921.6	1373.5	552.8	940.35	517.6	894.1	fibulin 1
1423380_s_at	1.548	1.59	1.695	1.926	262.6	406.58	241.3	384.5	219.2	372.8	265.7	511.85	interleukin 11 receptor, alpha chain 1; alpha chain 2
1449540_at	1.934	1.868	1.695	2.574	55.06	106.55	60.44	113.1	60.74	103.765	35.38	51.195	RIKEN cDNA 1600014K23 gene
1428432_at	1.573	1.78	1.694	1.691	72.85	114.8	66.09	117.6	80.63	137.55	111.6	240.3	RIKEN cDNA 2310047A01 gene
1450723_at	1.466	1.663	1.693	1.727	299.8	441.5	290.4	488.5	239.8	405.85	137.2	180.15	elastin microfibril interfacer 1
1419666_at	1.576	1.844	1.69	1.406	52.34	82.505	46.67	86.125	67.65	115.15	124.4	175.05	nuclear factor of activated T-cells, calcineurin-dependent 4
1448545_at	1.316	1.454	1.637	1.41	273.5	359.95	229.7	334.1	228.5	376.85	241.8	341.1	reproductive homeobox on X chromosome, 9
1448752_at	1.381	1.325	1.636	1.76	214.6	286.75	142.6	191.35	113.7	166.05	92.72	163.3	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain (let 1)
													pentaxin related gene
													syndecan 2
													carbonic anhydrase 2

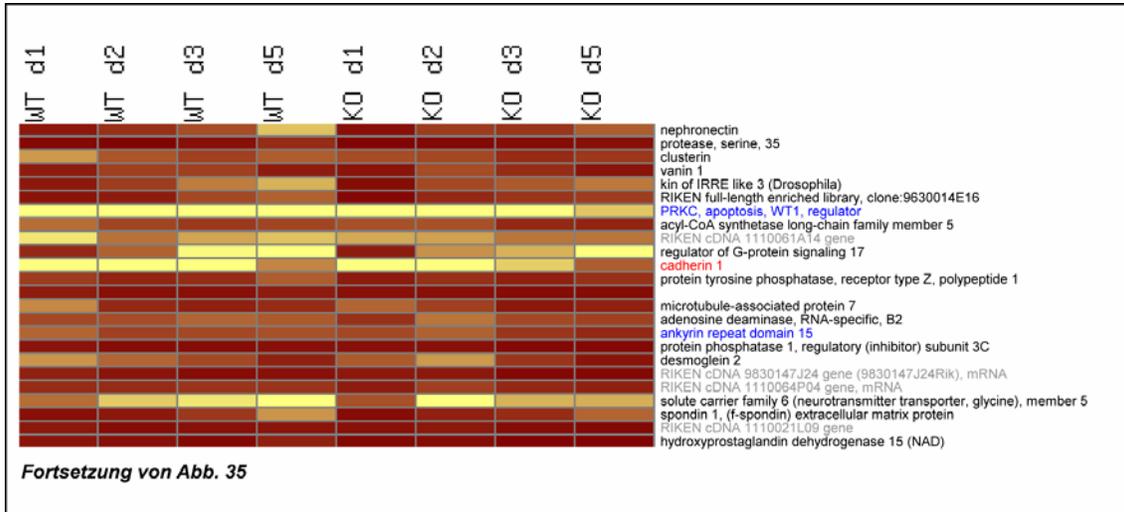
Abb. 34, Seite 2

1416716_at	1335	1542	1634	1586	452.7	605.5	193.5	298.55	158.7	259.5	119.1	189	embryonal Fyn-associated substrate
1417012_at	1519	1516	1632	1625	166.6	283.8	168.4	255.3	144.4	235.9	141.5	230.1	synecdin 2
1446842_at	1915	2032	1608	172	99.56	191.85	125.2	254.5	201.3	326.8	282.1	485.45	cysteine dioxygenase 1, cytosolic
1417356_at	1761	1899	1596	1325	2662	4689.5	3097	5867	4993	7365	6259	8306	paternally expressed 3
1436363_a_at	1323	1809	1596	1815	176.3	233.8	210.3	391	393	629.4	895.8	1626.5	nuclear factor I/X
1425604_at	1375	1386	1588	1937	144.8	199.6	93	130.55	54.51	87.225	36.37	70.64	Hb homeo box 2
1450462_a_at	1624	2014	1588	1471	166.2	289.9	96.72	194.85	72.63	115.95	75.26	110.75	paired-like homeodomain transcription factor 2
1446239_at	1443	1381	1586	169	377.9	546	413.4	575.8	398.2	632.35	317.6	537.95	heme oxygenase (decycling) 1
1421979_at	1331	1446	1568	1525	17.07	23.06	15.73	23.635	34.44	63.33	38.87	51.225	phosphate regulating gene
1421217_a_at	1951	1531	1561	1629	19.61	38.28	37.55	58.45	40.44	63.33	38.87	51.225	lectin, galactose binding, soluble 9
1446433_a_at	2055	1916	1553	2484	192.9	396.9	267.5	519.45	315.2	493	214.1	63.345	procollagen C-endopeptidase enhancer protein
1448152_at	1828	1679	1552	2484	494.5	9038.5	5701	9615.5	6075	9452.5	5356	13302.5	resulin-like growth factor 2
1416693_at	1891	1799	1549	1331	12.33	31.67	31.67	57	57	105.815	188.8	251.5	Transcribed locus
1416136_at	1487	1543	1545	2031	86.01	166.45	79.79	107.77	55.44	86.1	18.28	37.215	forkhead box C2
1417355_at	1667	1572	1538	1864	149	221.65	210.3	330.65	88.33	137.1	74.68	111.55	synaptotagmin XIII
1425926_a_at	1416	1479	1522	4441	5533	9237	6548	10298.5	8808	13552	11627	15897.5	matrix metalloproteinase 2
1428312_s_at	173	1454	1519	1314	24.12	41.72	13.66	20.195	13.57	20.685	12.63	66.3	paternally expressed 3
1446226_at	145	1592	1514	1532	143.2	208.1	131.4	209.7	199	39.84	24.51	32.245	orthodenticle homolog 2 (Drosophila)
1416235_at	1975	1732	1511	161	16.8	35.32	25.93	44.94	31.19	47.375	44.9	72.575	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1
1430162_at	2327	2067	1491	1803	177.2	234.3	257.9	399.7	238.2	357.3	233.9	423.3	nuclear factor I/C
1417014_at	145	131	1488	1744	27.15	63.49	39.56	84.87	38.28	57.73	32.3	44.925	argininosuccinate synthetase 1
1455164_at	147	1415	1487	1702	48.72	70.705	71.48	96.06	78.55	117.15	75.56	131.8	RIKEN cDNA 3830417A13.gene
1417143_at	1632	1918	1476	138	55.24	82.155	47.81	68.25	45.96	68.595	58.83	100.115	heat shock 27kDa protein 8
1434881_s_at	1529	1638	1474	1702	668	1021	1039	1703.5	1126	1663.5	1833	2395.5	Cdc42 GTPase-activating protein
1424214_at	1944	1475	1465	1917	395	768.15	631.5	948.6	422.7	625.2	277.7	532.6	lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2
1419938_s_at	1307	1446	1464	1377	125.6	164.3	76.45	111.26	67.51	98.815	63.67	88.485	potassium channel tetramerisation domain containing 12
1415818_at	136	2472	1454	1553	11.56	16.45	3.677	9.175	9.015	13.11	9.26	14.385	RIKEN cDNA 9130213B05.gene
1435294_at	1305	1517	142	131	77.21	258.85	230.6	318.5	277.1	403.45	368.9	522.45	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17
1419091_a_at	1604	1419	1419	1462	705	1131.5	880.8	1419	84.89	120.5	96.13	125.95	RIKEN cDNA 4930549C01.gene
1434776_at	2687	1924	1414	1423	1148	1636	1291	1840	1450	2060.5	1161	2316.5	annexin A6
1451119_s_at	1401	159	1411	2014	28.36	76.22	55.76	109.4	111.6	158.25	223	317.4	annexin A2
1442115_at	1306	1498	1408	2023	15.95	1007.85	431.7	686.75	334.3	471.85	298.7	602.4	seaxapherin 5A
1456752_at	134	1304	1407	1305	1237	1660	907.6	1164.5	14.54	20.51	17.01	35.055	fibulin 1
1439364_a_at	1546	142	1406	1667	214	332.65	301.2	427.9	684.5	967.1	422.1	357.4	RIKEN cDNA 9430028L06.gene
1448925_at	2433	4886	1404	2437	32.1	78.56	13.99	67.1	31.29	43.955	26.1	64.35	RIKEN full-length enriched library, clone D330038P10
1443989_at	1337	1548	1395	1525	62.13	83.095	37.15	57.555	26.63	37.21	23.67	36.135	matrix metalloproteinase 2
1416221_at	1324	1364	1392	1957	5307	7025	3868	5316.5	4559	6412	4745	9289	NIMA (never in mitosis gene a-related expressed kinase 2)
1428909_at	1305	1326	1391	1967	42.75	55.78	62.18	83.385	91.97	129.3	104.5	205.6	twist homolog 2 (Drosophila)
1454737_at	1533	1452	139	1445	124.6	191.65	100.5	146.2	85.51	119.3	43.54	63.045	folistatin-like 1
1427762_x_at	1339	1396	1376	1606	59.98	80.985	45.06	62.94	37.46	51.735	35.91	57.775	dual specificity phosphatase 9
1418424_at	1488	1646	1378	2064	109.4	166.6	117.1	195.85	109.4	156.05	87.41	180.95	histone 1, H2bp
1455241_at	1705	1358	136	1581	25.42	45.08	19.48	26.635	19.65	26.74	25.24	40.185	tumor necrosis factor alpha induced protein 6
1422738_at	2562	1884	1354	1863	46.53	119.3	63.47	119.65	96.12	130.35	74.28	138.35	cDNA sequence BC037703
1456891_at	1493	1857	1354	1357	34	51.62	45.68	85.97	55.77	75.585	58.96	80.415	discoidin domain receptor family, member 2
1420773_at	2053	1725	1338	1356	227.1	301	146.5	250.45	74.75	101.28	71.49	114.2	DENMAD0 domain containing 2C
1440911_at	1771	1513	1335	224	49.89	88.38	24.34	38.18	29.44	13.855	9.58	13.08	leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5
1418147_at	1677	1451	1329	1707	34.8	58.875	50.7	74.335	35.73	48.885	18.33	31.48	deubiquitinating enzyme 1
1419379_s_at	1829	168	1312	2301	224.2	410.85	204.6	343.9	257.5	339.1	181.8	418.9	collagen, type XXIII, alpha 1
1425310_a_at	1555	1475	1312	1542	224.2	348.65	253.9	374.45	236.2	310.15	267.4	413.2	transcription factor AP-2, gamma
1443007_at	1573	1391	1306	1501	202.6	319.1	134.3	187.45	154.5	232.45	114.9	172.55	G protein-coupled receptor 124
1425246_a_at	1469	1538	1301	1667	128.3	188.45	145	231.05	208.3	271.95	198.3	337.05	EM1 domain containing 2
1425666_at	1654	1427	1348	1348	117.7	194.55	105.7	151.6	74.28	95.575	54.1	73.1	GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) annexin A6 zinc finger protein of the cerebellum 5

Abb. 34, Seite 3



Abb. 35 Graphische Darstellung der Expressionswerte der Kandidatengene (mind. 1.3fach höher exprimiert in WT als p75^{NTR}-/-) zu allen Zeitpunkten. Die Auflistung erfolgt in der gleichen Reihenfolge wie in Abb. 33 angegeben, ebenso sind funktionelle Gruppen in denselben Farben markiert. Zur Farbkodierung der Expressionswerte wurde das online verfügbare Programm matrix2png (<http://www.bioinformatics.ubc.ca/matrix2png/>) verwendet.



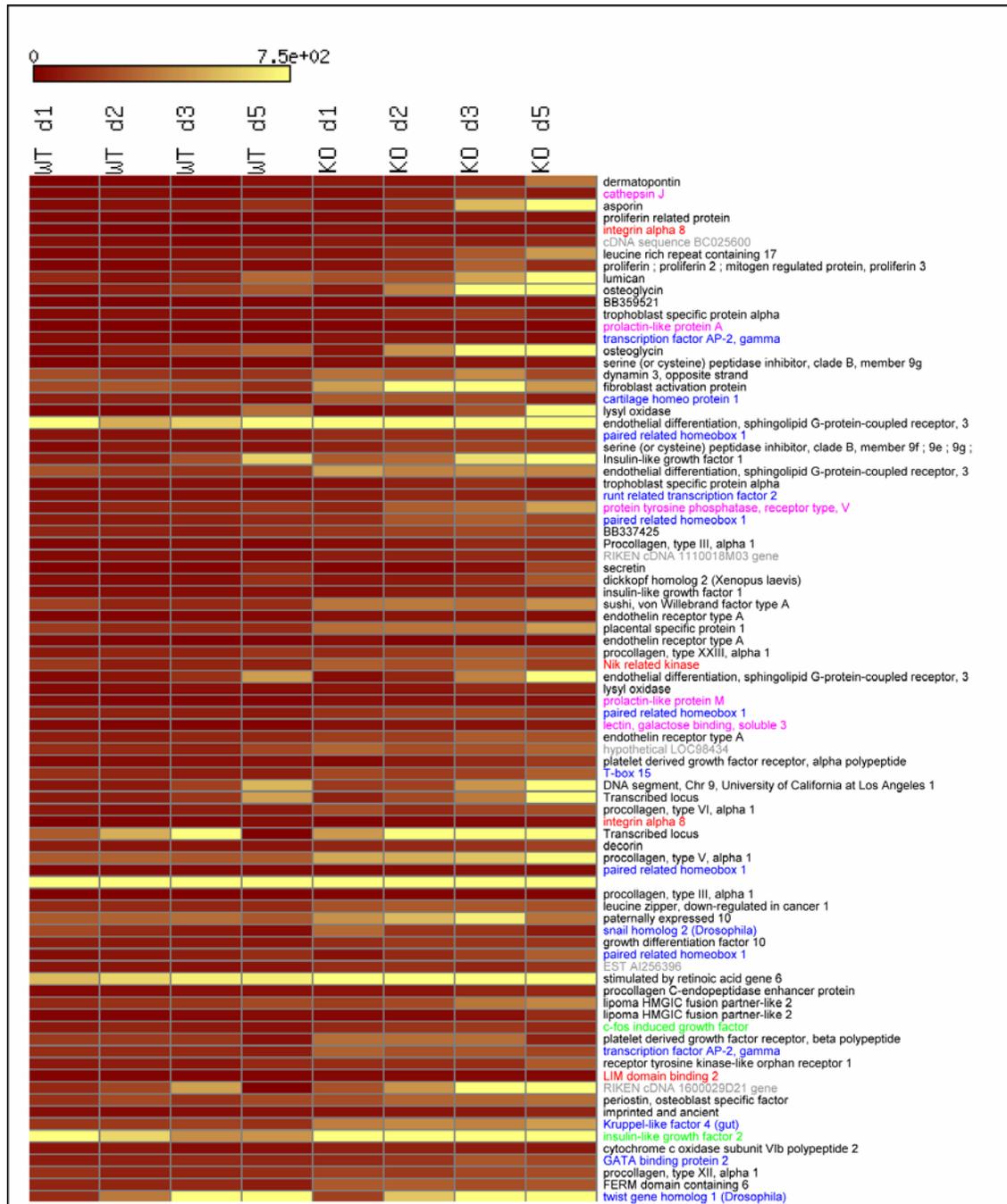
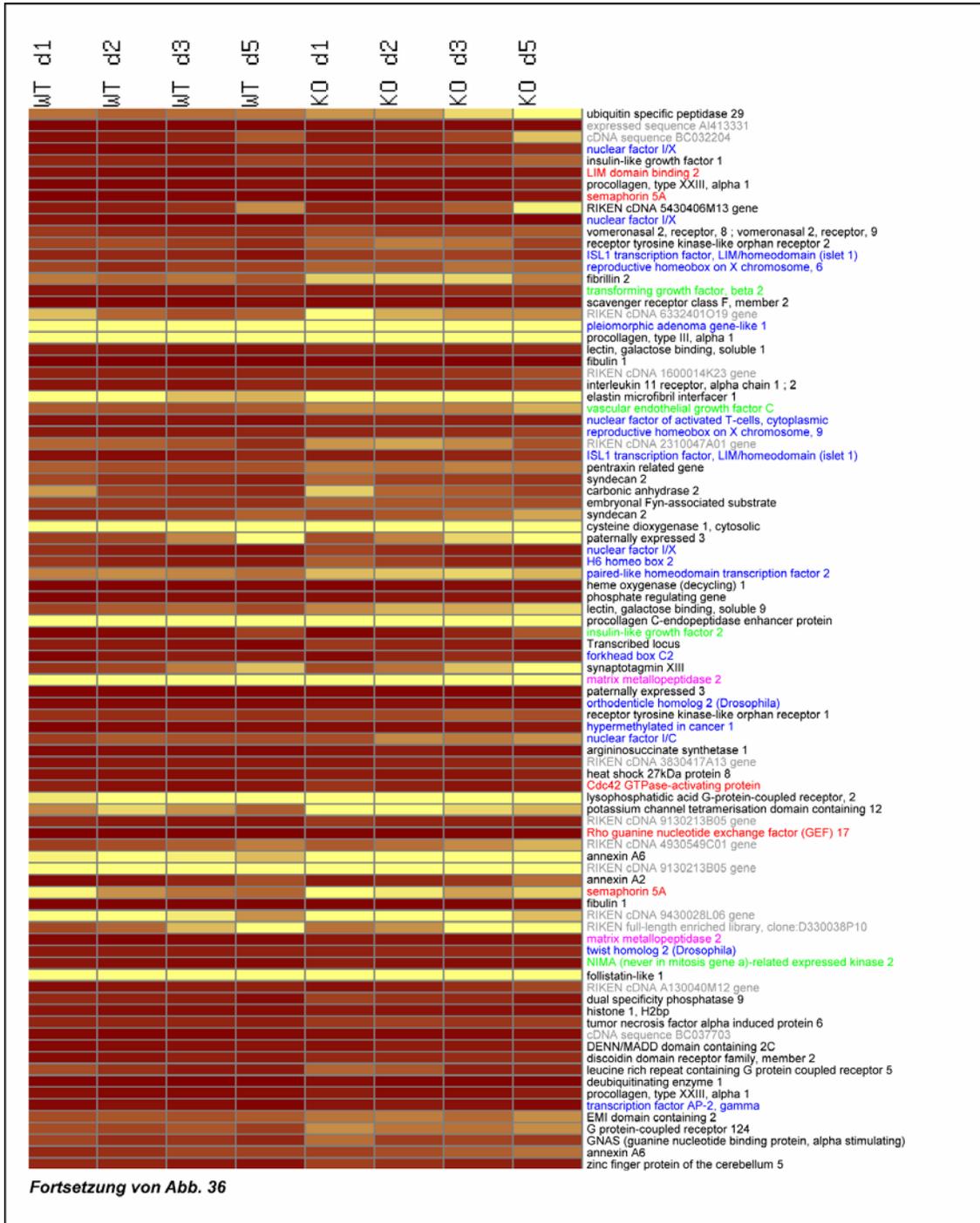
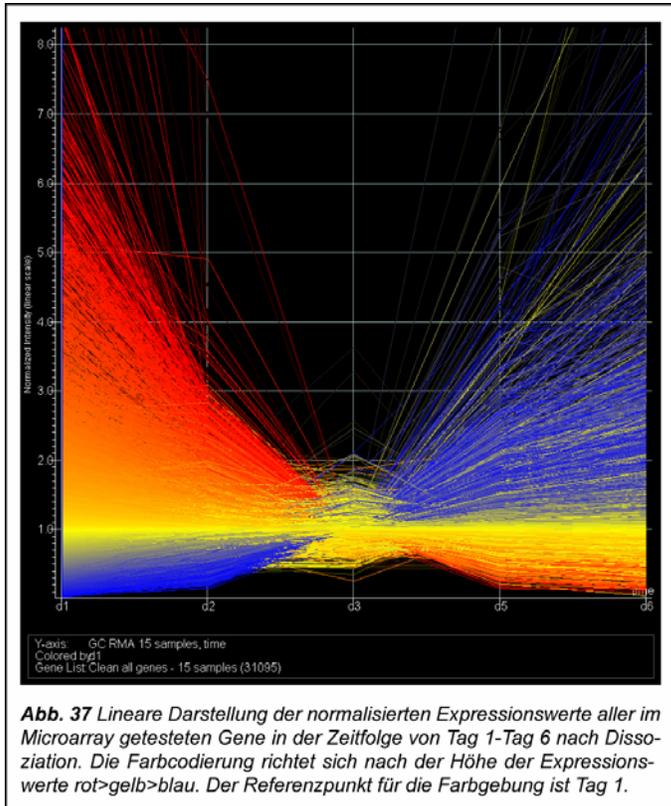


Abb. 36 Graphische Darstellung der Expressionswerte der Kandidatengene (mind. 1.3fach höher exprimiert in p75^{NTR}-/- als WT) zu allen Zeitpunkten. Die Auflistung erfolgt in der gleichen Reihenfolge wie in Abb. 34 angegeben, ebenso sind funktionelle Gruppen in denselben Farben markiert. Zur Farbkodierung der Expressionswerte wurde das online verfügbare Programm matrix2png (<http://www.bioinformatics.ubc.ca/matrix2png/>) verwendet.



Gene, welche unterschiedlich reguliert sind im Verlauf der Zeit

Die Zeitspanne dieses Microarray-Experiments umfasst Tag 1-Tag 6 nach Dissoziation unseres Differenzierungsprotokolles. Biologisch gesehen finden in dieser Zeit wichtige Prozesse in Richtung neuronaler Differenzierung und Maturierung statt. *In vivo* würden diese



Prozesse den Übergang proliferierender neuronaler Vorläuferzellen in postmitotische Neurone, deren Migration an die entsprechenden Gehirnlokalisationen und das Auswachsen von Dendriten und Axonen einschliesslich Synapsenbildung umfassen. Diese Prozesse sind abhängig von einem Zusammenspiel aus dem intrinsischen genetischen Programm, von löslichen Faktoren, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten. Es interessierte nun im Rahmen der vorliegenden Microarray-Analyse, inwiefern diese Prozesse auch in den aus ES-Zellen differenzierten

Neuronen abzulesen sind. Die Konsistenz der ermittelten zeitlichen Veränderungen mit den Daten aus früheren Genexpressionsanalysen mit diesem Differenzierungs-System sollte auch als eine Art "Qualitätskontrolle" über die Verlässlichkeit der Daten dienen, da innerhalb der Analyse wie oben erklärt keine Statistik erfolgen konnte. Die Veränderungen des Genexpressionsprofils wurden wie folgt erfasst: es wurden die gleichen Datensätze wie oben verwendet, d.h. ein WT- und zwei $p75^{NTR-/-}$ Werte, jedoch ungeachtet des Genotyps. Somit ergab sich pro Zeitpunkt ein aus 3 Werten gemittelter Wert.

Die Abb. 37 gibt eine Übersicht über die Expression aller Gene im Verlauf der Zeit in einer linearen Darstellung der normalisierten Expressionswerte. Dabei fällt ein hoch-synchrones Expressionsmuster auf, indem sämtliche zu Beginn hochexprimierte Gene gebündelt runtergehen, während andere Gene zeitgleich angeschaltet werden. Der Tag 3 scheint ein Punkt zu sein, wo sich die beiden Gruppen kreuzen.

Das Ziel der folgenden Analyse war, diese beiden Gruppen grob zu erfassen, die erste entsprechend den Genen, welche in neuronalen Vorläuferzellen eine Rolle spielen dürften und die letztere als neuronenspezifische Gene. Dazu wurde der Tag 1 mit dem Tag 5 bzgl. Expressionswerte verglichen und die Mindeständerung auf 4-fach festgelegt. Es ergaben sich 818 Gene, welche am Tag 1 mind. 4-fach höher exprimiert waren als am Tag 5 und 1269 Gene, welche am Tag 5 mind. 4-fach höher exprimiert sind als am Tag 1. Daraus wurden zwei Listen erstellt, welche keineswegs den Anspruch auf Vollständigkeit erheben,

jedoch zentrale Moleküle der neuronalen Differenzierung enthalten (Abb. 38 und Abb. 39). Die jeweiligen Expressionswerte sind wiederum farbkodiert dargestellt.

Die Gene, welche mit der Zeit runterreguliert werden, sind entweder bekannte Marker für neuronale Vorläuferzellen wie Pax6, Pax7, Neurog1/2, Sox2, sind involviert im Prozess der neuronalen Entwicklung wie die Wnt-Signalmoleküle, Notch1, Hoxb1/d1, die BMP-Signalmoleküle und Rbl1 oder sind im Zellzyklus involviert wie die Cycline, Cdk's oder Hes5. Interessanterweise erscheint darunter auch Prominin-1, eine Komponente der spezialisierten apikalen Membran, welche für die asymmetrische Zellteilung der neuronalen Stammzellen wichtig zu sein scheint (Corbeil et al., 1999).

Die mit der Zeit hochregulierten Gene kodieren für Neurotransmitter und ihre Rezeptoren (hauptsächlich Glutamat- und GABA-Rezeptoren, aber auch Glycin-, Serotonin- und Dopaminrezeptoren), wichtige Modulatoren des Zytoskeletts, Zelladhäsions- und Guidance-Moleküle der neuronalen Entwicklung, und Komponenten der Synapsen. Als einziger Tyrosin-kinase-Rezeptor erscheint TrkB, was sich deckt mit dem Befund, dass nur die Stimulation mit BDNF, jedoch nicht NGF oder NT-3 ein Signal für phosphoryliertes Trk in unserem Zellsystem hervorrufen kann.

Zusammenfassend kann man sagen, dass einige der wichtigsten molekularen Komponenten der neuronalen Differenzierung in der vorliegenden Analyse abzulesen sind. Die angelegte Liste deckt sich auch weitgehend mit der zeitlichen Analyse einer früher durchgeführten Genexpressionsanalyse mit demselben Zellsystem (S. Perez, Novartis), womit eine gewisse Konstanz unabhängig der ausführenden Person gegeben ist.

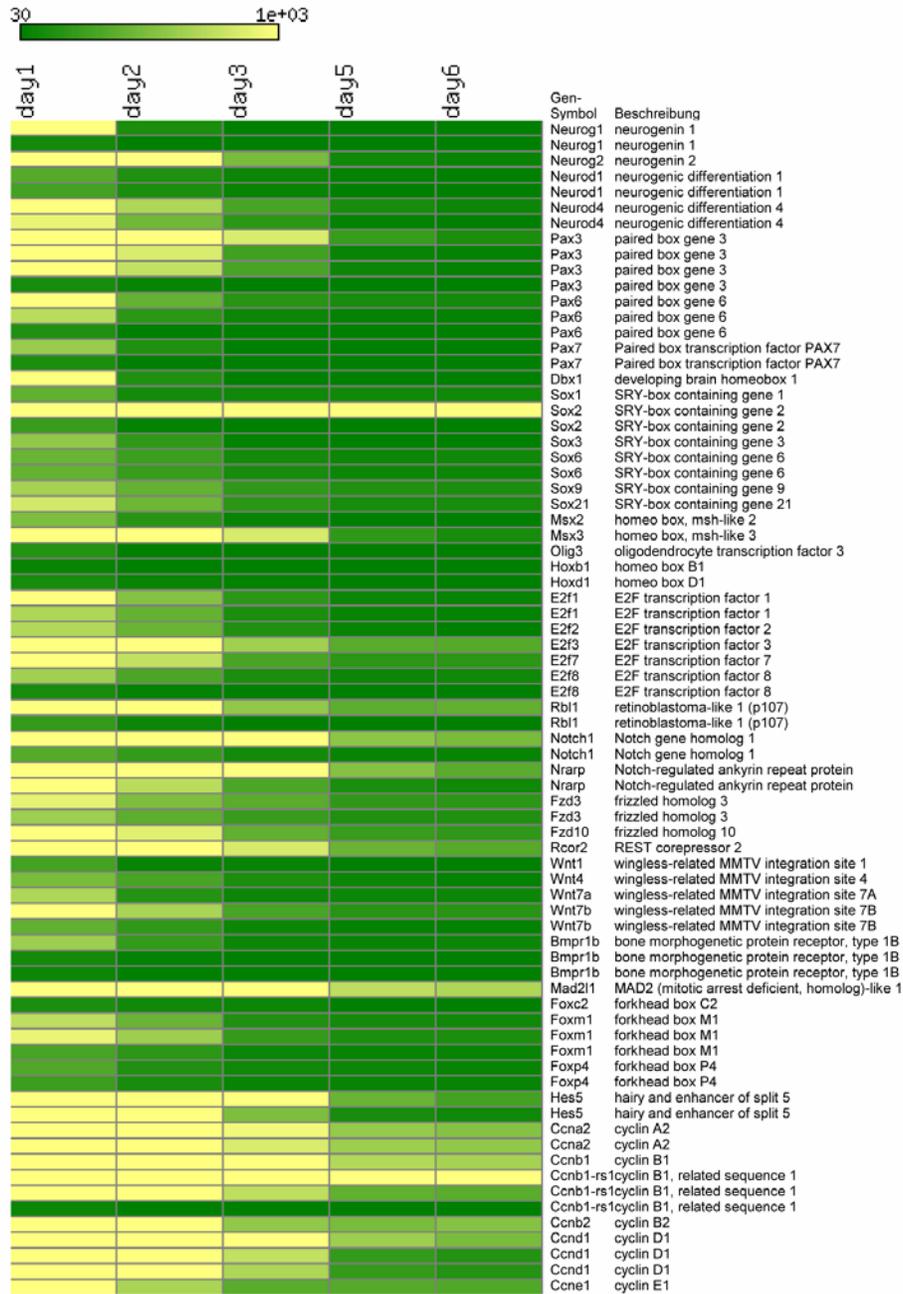
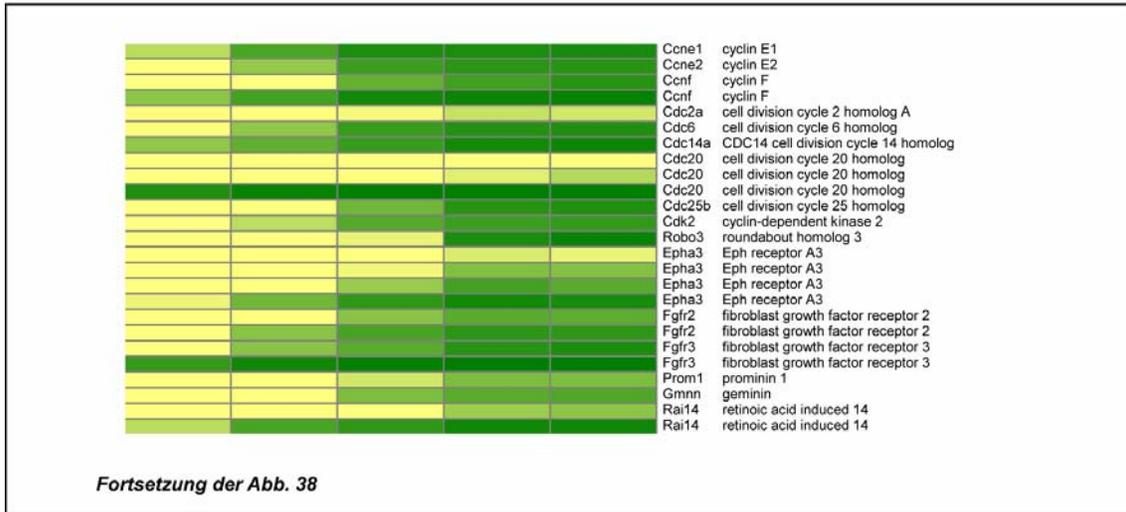


Abb. 38 Graphische Darstellung der Expressionswerte von Genen, welche mit der Zeit herunterreguliert werden. Es sind dies Gene, die ausgewählt sind aus der Gruppe der Gene (818), welche mind. eine 4-fach erhöhte Expression am Tag 1 verglichen mit Tag 5 aufweisen. Es wurden diejenigen Gene zur Darstellung ausgewählt, welche in irgendeiner Weise involviert sind im Prozess der Neurogenese sowie im Übergang neuronaler Vorläuferzellen hin zu postmitotischen Neuronen.



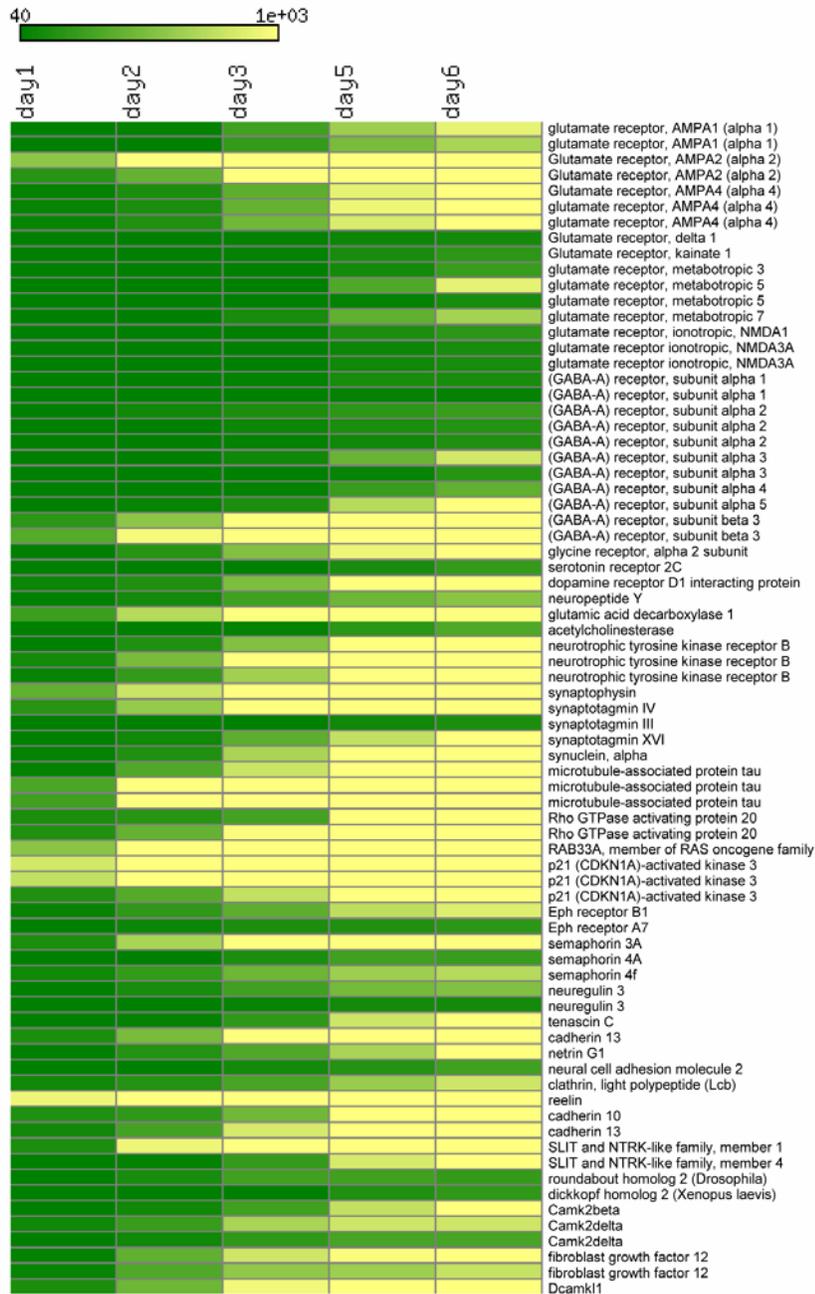


Abb. 39 Graphische Darstellung der Expressionswerte der Gene, welche mit der Zeit hochreguliert werden. Es handelt sich hier um ausgewählte Gene aus der Gruppe (1269 Gene), welche eine mind. 4-fache erhöhte Expression am Tag 5 verglichen zum Tag 1 zeigen. Ausgewählt zur Darstellung wurden diejenigen Gene, welche in irgendeiner Weise zu den speziellen Bedürfnissen von Neuronen beitragen, insbesondere zum Neuritenwachstum und die Neurotransmitter-Rezeptoren, Neurotransmitter selber und ihre Enzyme.

3.4 Integrationspotential von neuronalen Vorläuferzellen nach Transplantation in hippocampale Schnittkulturen

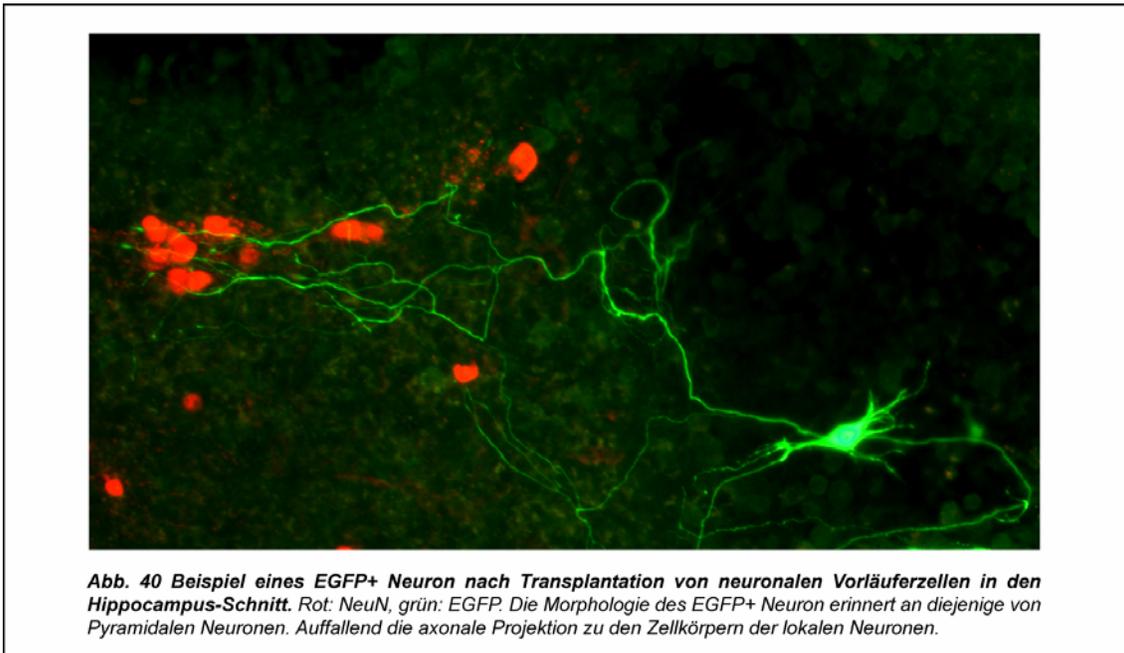
Sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Rolle von p75^{NTR} basierten auf der von M. Bibel in diesem Labor entwickelten Methode, ES-Zellen in Neurone zu differenzieren. Die *in vitro*-Charakterisierung zeigte wie oben beschrieben, dass die Vorläuferzellen die Charakteristika von radialen Gliazellen aufweisen, die Expression von Emx-2 in den Neuronen gehört zu den Eigenschaften von kortikalen Neuronen. Rund 95% der Neurone sind glutamaterg, während die übrigen 5% vor allem GABAerge Neurone darstellen, die Neurotransmitter Acetylcholin und Dopamin werden nur vereinzelt benutzt (> 1%). Elektrophysiologische Untersuchungen sprechen für die Ähnlichkeit zu pyramidalen Neuronen des Kortex oder Hippocampus.

Transplantationsversuche im Huhnembryo zeigten, dass die transplantierten Vorläuferzellen in der Lage sind, sowohl im Rückenmark, als auch in den DRG Neurone zu bilden, dass jedoch ihr Entwicklungspotential insofern limitiert ist, als dass Motoneurone, aber keine sensorischen Neurone entstehen können (Plachta et al., 2004).

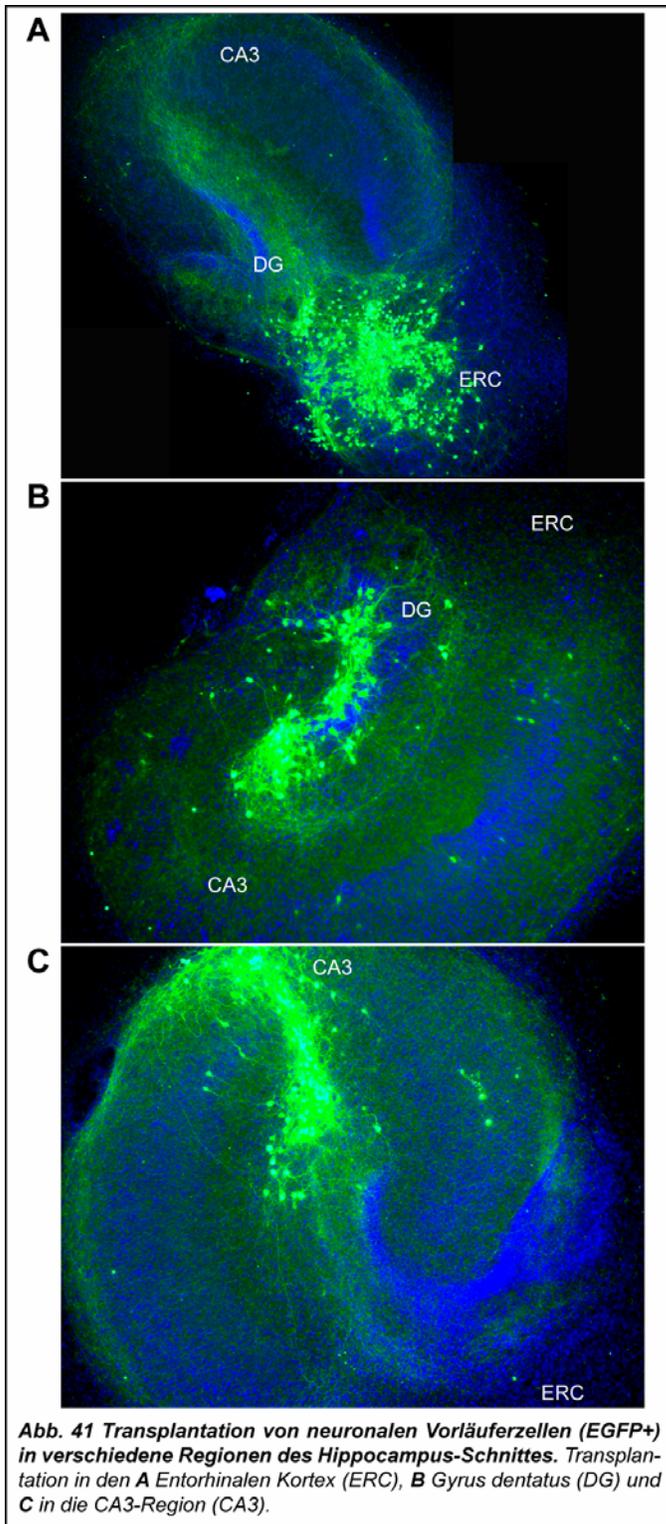
Es interessierte nun die Frage, wie sich die Vorläuferzellen verhalten würden in einem *in vivo*-Kontext, der ihren Charakteristika weitgehend entspricht, z.B. der Hippocampus. Der Hippocampus hat den Vorteil, dass ein ganzer neuronaler Schaltkreis, der die Umschaltung von entorhinalen Axonen in die Körnerzellen des Gyrus dentatus, deren Projektion auf die CA3-Pyramidenzellen und wiederum deren Projektionen auf die CA1-Pyramidenzellen umfasst, in einer planaren Weise darin enthalten ist. Das macht ihn zu einer vielfach untersuchten Struktur und dessen Schnittkulturen zu einem etablierten System. Die Transplantation der neuronalen Vorläuferzellen in postnatale hippocampale Schnittkulturen der Maus erschien aus mehrerlei Hinsicht interessant: inwiefern sind diese *in vitro*-differenzierten Neuronen den *in vivo*-Neuronen ähnlich und inwiefern lassen sich die *in vitro*-Experimenten gewonnenen Erkenntnisse auf die Vorgänge *in vivo* ableiten? Zweitens werden Versuche unternommen, die Stammzellen für therapeutische Zwecke zu nutzen. Das hier angewendete Differenzierungssystem hat den einmaligen Vorteil, dass eine homogene, definierte Vorläuferpopulation gewonnen werden kann. Die Transplantation von neuronalen Vorläuferzellen versus Stammzellen ist zudem ein wichtiger Schritt zur Vermeidung von Tumorentstehung aus den transplantierten Zellen. Die Erfassung der morphologischen Integration der neuronalen Vorläuferzellen in den neuronalen Schaltkreis des Hippocampus-Schnitt sowie eine elektrophysiologische Untersuchung sollten eine Aussage über den Wert von solchen Transplantationen ermöglichen. Es war klar, dass nur funktionelle Tests am Tier mit einer zuvor erfolgten Läsion die Frage voll beantworten könnte.

Für die Präparation von hippocampalen Schnittkulturen (nach Stoppini et al., 1991) wurden Wildtyp-Mäuse (C57/Bl6) im Alter von P7 verwendet. Einen Tag nach der Präparation erfolgte die Transplantation von neuronalen Vorläuferzellen der oben erwähnten Linie M22 (exprimiert EGFP transgen unter dem *tau*-Promoter) in Zellsuspension mittels einer selbstgezogenen Glasnadel und Mundpipettierung. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen entweder in der Region des Gyrus dentatus, der CA3 oder im entorhinalen Kortex platziert, ohne vorausgehende Läsion der Schnittkulturen. Anschliessend wurden die Schnittkulturen für 2-4 Wochen bis zur Analyse unter normalen Schnittkultur-Bedingungen weiterkultiviert.

3.4.1 Integration und Projektion der transplantierten Zellen



Unabhängig des Transplantationsortes war eine Integration von EGFP-positiven Zellen zu beobachten, welche sowohl durch die *tau*-spezifische EGFP-Expression als auch durch eine Färbung mit NeuN, einem nukleären neuronalen Marker eindeutig als Neurone zu identifizieren waren. Morphologisch war eine gewisse Variabilität festzustellen, welche nicht näher untersucht wurde. Manche dieser Neurone erinnerten morphologisch jedoch eindeutig an Pyramidale Neurone (Abb. 40) und es fiel eine Komplexität des Dendritenbaumes und eine Ausdehnung der Axone in Millimeterlänge auf, welche nie *in vitro* beobachtet wurde. Die transplantierten Neurone konnten mindestens 34 Tage im Hippocampus-Schnitt überleben (solange dauerte das längste Experiment).



Als nächstes interessierte die Frage, inwiefern die transplantierten Neurone sich wie die lokalen Neurone in Bezug auf ihre Projektion verhielten. Da man von einer gemischten Population der Neurone (glutamaterge und GABA-erge Neurone) ausgehen musste, war die Untersuchung der Projektion einzelner Neurone nicht sinnvoll. Deswegen erfolgte die Transplantation von vielen Vorläuferzellen in eine bestimmte Region und die Projektion wurde grob, d.h. in kleiner Vergrößerung angeschaut. Es stellte sich heraus, dass die Neurone, welche im entorhinalen Kortex, im Gyrus dentatus und auch in der CA3-Region transplantiert worden waren, immer in das Stratum molekulare des Gyrus dentatus projizierten, wobei mindestens 6 Schnitte pro Region analysiert wurden (Abb. 41). Es konnte also keine ortsspezifische Projektion ausgemacht werden. Mögliche Begründungen könnten einerseits in der Oberflächenbeschaffenheit des Hippocampus liegen, welche nicht der *in vivo*-Situation entsprechen dürfte oder darin, dass die neuronalen Vorläuferzellen in

ihrem Entwicklungspotential limitiert sind und dementsprechend sich nicht in alle neuronalen Subtypen des Hippocampus differenzieren können. In diesem Sinne würde die Projektion in das Stratum molekulare des Gyrus dentatus für eine kortikale Zuordnung sprechen.

3.4.2 Elektrophysiologische Untersuchung der transplantierten Zellen

Dass die transplantierten Zellen sich als Neuronen in den hippocampalen Schnitt integrierten, war aus den obigen Versuchen klar. Als nächstes sollte getestet werden, ob sich die Neurone auch funktionell in das Empfängergewebe eingliedern würden, d.h. ob axonale und dendritische Synapsen zu den lokalen Neuronen ausgebildet würden und ob diese auch eine elektrische Aktivität zeigen würden. In Zusammenarbeit mit Imre Vida, Freiburg, DE wurden die GFP-positiven Neurone 2-3 Wochen nach Transplantation mittels Patch-Clamp-Methode elektrophysiologisch analysiert und gleichzeitig mit Biocytin gefüllt, um eine elektronenmikroskopische Darstellung zu ermöglichen.

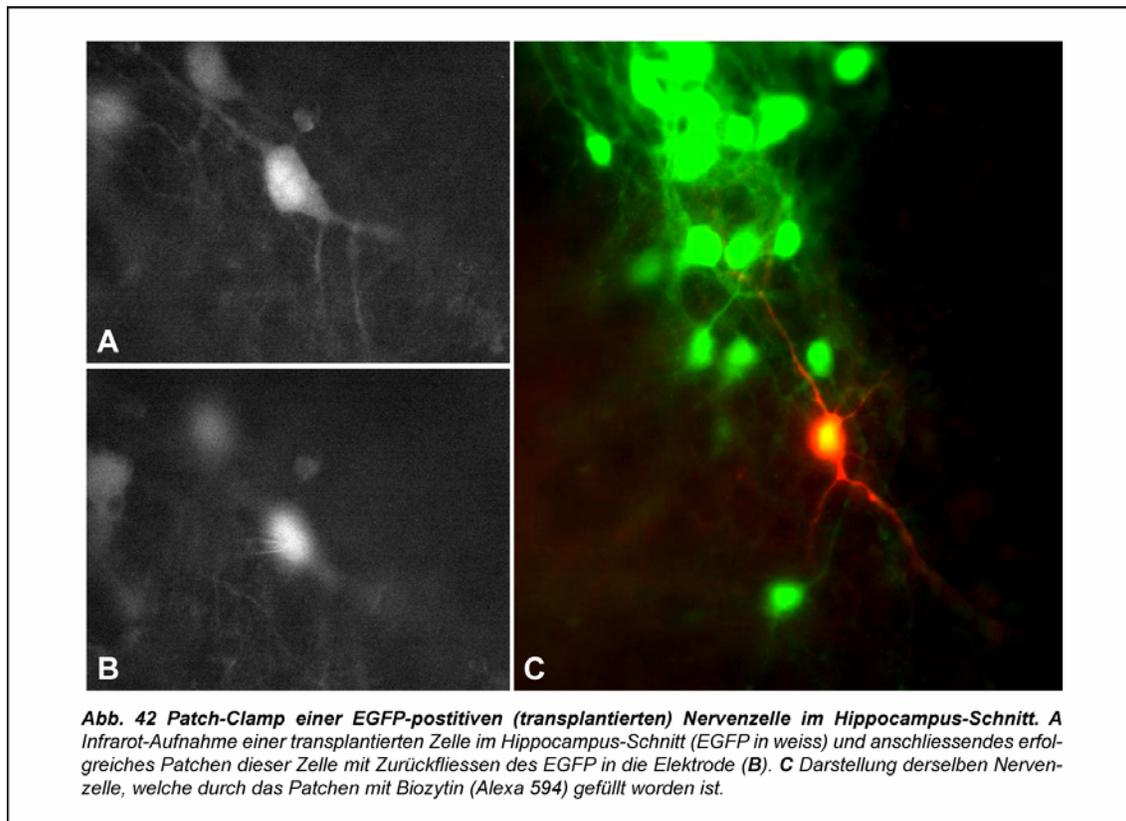
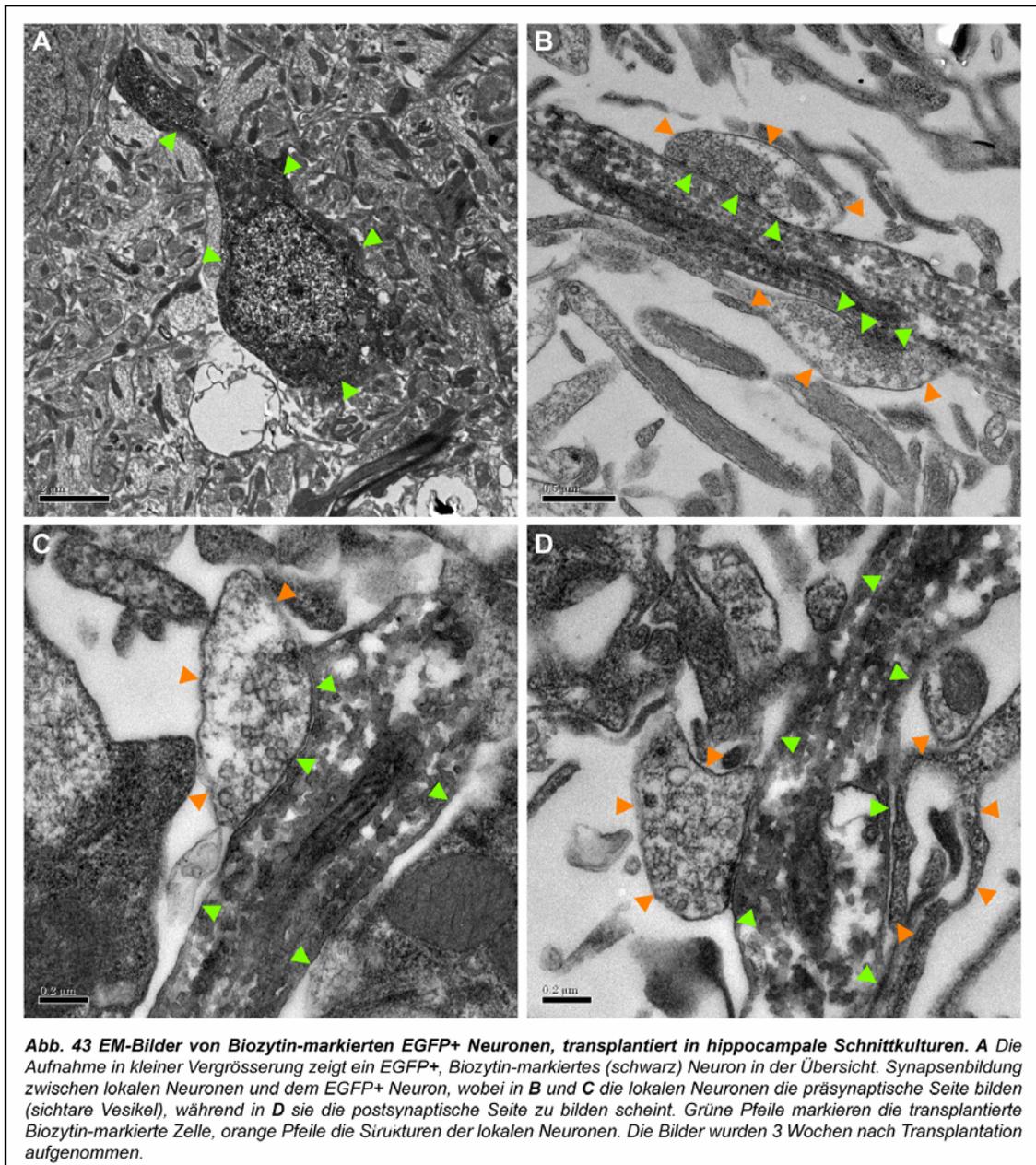
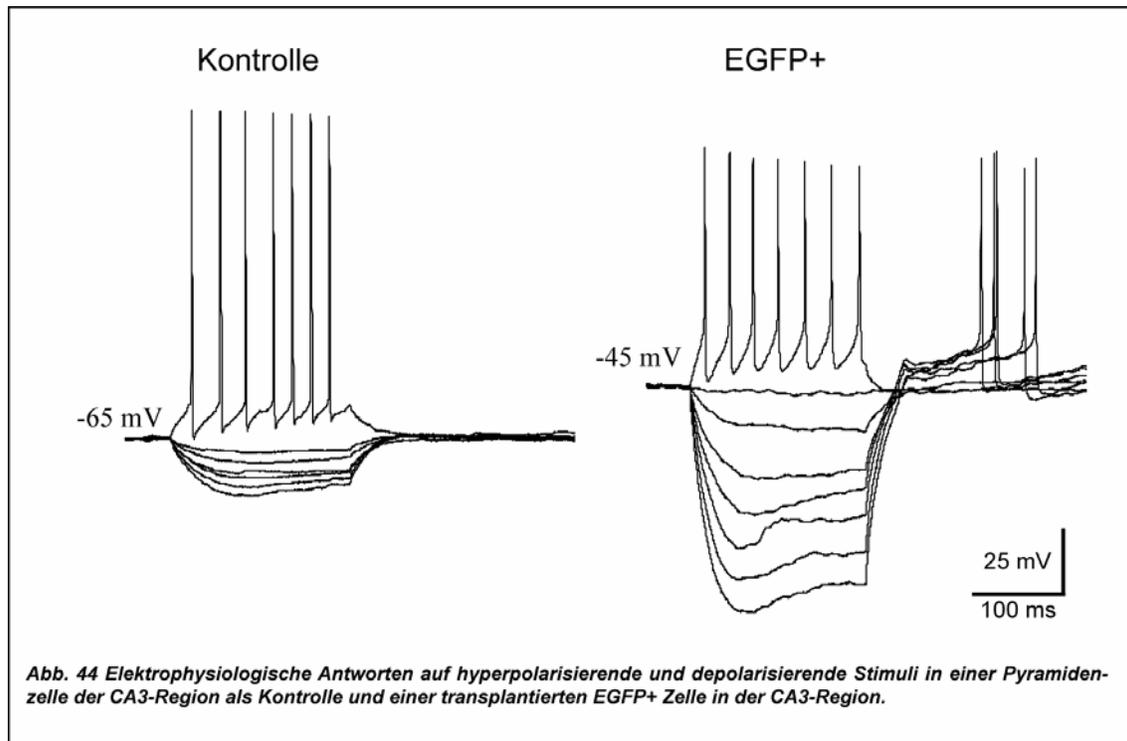


Abb. 42 zeigt ein Beispiel für diese Methode, zunächst eine EGFP-positive Nervenzelle, dann das Zurückfliessen von EGFP in die Patch-Elektrode als Beweis für die korrekte Platzierung der Elektrode und die Darstellung der analysierten Nervenzelle durch Biozytin. Die anschliessend angefertigten elektronenmikroskopischen Bilder zeigten, dass die transplantierten Neurone dendritische Synapsen von den lokalen Neuronen erhielten (Abb. 43).

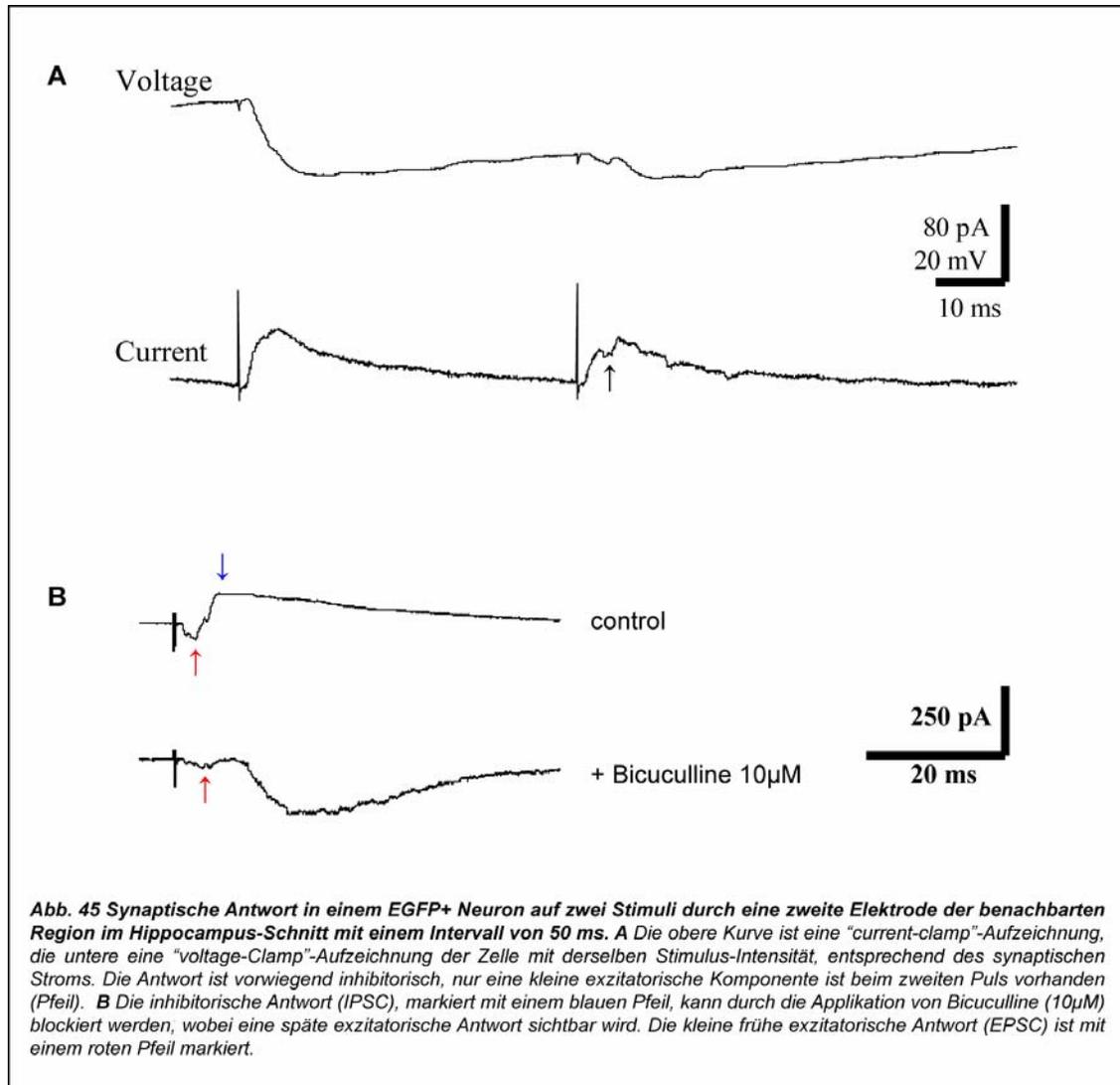


12 EGFP-positive Neurone wurden elektrophysiologisch untersucht. Abb. 44 zeigt ein Beispiel für die elektrophysiologischen Antworten eines in der CA3-Region transplantierten EGFP-positiven Neurons auf hyperpolarisierende und depolarisierende Pulse. Vergleichend sind die Antworten einer Kontroll-Pyramidenzelle in der CA3 Region desselben Schnittes dargestellt. Dabei gab es folgende Unterschiede: Kontroll-Zellen zeigten ein Membranpotential zwischen -60 und -65 mV, EGFP-positive Zellen hingegen eines um -45 mV. Bei den EGFP-positiven Zellen war die Amplitude des Aktionspotentials (AP) tiefer und seine Dauer länger und die Nach-Hyperpolarisierung weniger prominent als bei den Kontroll-Zellen. Die AP-Frequenz war dementsprechend tiefer in den EGFP-positiven Zellen. Es zeigten sich grössere Antworten auf die hyperpolarisierenden Pulse, weil die Input-Resistenz

entsprechend der geringeren Oberfläche und vielleicht auch kleinerer Dichte an Kanälen grösser war. Alle diese Differenzen sind vereinbar mit den generellen Eigenschaften von immaturren Neuronen.



Durch die Stimulation der benachbarten Neurone mit einer zweiten Elektrode konnten die synaptischen Antworten der EGFP-positiven Neurone abgeleitet werden. Die Abb. 45 zeigt die synaptische Antwort eines EGFP-Neurons, hervorgerufen durch zwei Stimuli mit einem Intervall von 50ms. Die Antworten sind vor allem inhibitorisch, nur eine kleine exzitatorische Komponente ist sichtbar nach dem zweiten Puls. Die inhibitorische Antwort (inhibitory postsynaptic current - EPSP) konnte auch mit Bicuculline (10 μ M), einem GABA-A-Rezeptorblocker, blockiert werden, wobei eine späte exzitatorische Antwort sichtbar wurde. Dies bestätigt funktionell, was morphologisch durch die elektronenmikroskopischen Bilder gezeigt wurde, nämlich dass es eine Verbindung zwischen lokalen und transplantierten Neuronen über Synapsen gibt und diese auch funktionell sind. Die Analyse 2-3 Wochen nach Transplantation der neuronalen Vorläuferzellen zeigt sich in einem immaturren Muster der elektrophysiologischen Antwort sowie auch der vorwiegend inhibitorischen synaptischen Antwort. Interessant wäre es natürlich, diese Analysen zu einem späteren Zeitpunkt zu wiederholen, was aus Zeitgründen nicht mehr möglich war.



Zusammenfassend handelt es sich bei den vorliegenden Experimenten um eine präliminäre Studie, welche keine definitiven Antworten bezgl. des Potentials der neuronalen Vorläuferzellen geben kann, die lokalen Signale eines neuronalen Gewebes zu erkennen, welche jedoch klar zeigt, dass diese Zellen fähig sind, sich funktionell in ein postnatales Gewebe des ZNS zu integrieren. Deshalb kann man davon ableiten, dass Transplantationsexperimente in einer lebenden Maus durchaus vielversprechend sein können. Die vorliegende Studie diente auch als Ausgangspunkt für zwei weitere Kollaborationen, einerseits mit dem Labor von Martin Korte, Braunschweig DE und Martin Schwab, Zürich CH.

4. Diskussion

Im folgenden werden die experimentellen Ansätze dieser Doktorarbeit diskutiert. Das erste Projekt, nämlich die Generierung von Mäusen mit einer konditionalen p75^{NTR}-Mutation und einer neuronenspezifischen induzierbaren Cre-Linie, ist nur teilweise geglückt, indem zwar entsprechende ES-Zellen generiert werden konnten, jedoch diese ES-Zellen nicht die Keimbahn kolonisiert haben. Dies führte zu einem Wechsel in der Strategie, die Funktion von p75^{NTR} zu untersuchen, nämlich von einem zell- und zeitspezifischen *in vivo*-Ansatz zu einem neuen *in vitro*-Modell, der ES-Zell-basierten Differenzierung in Neurone. Dies erforderte die erfolgreiche Generierung von ES-Zellen, in welchen beide Allele von p75^{NTR} deletiert sind. Da die Funktion von p75^{NTR} in ausgeprägter Weise von dem zellulären Kontext abhängig ist, wurden die diversen bekannten Funktionen von p75^{NTR} in dem neuen System getestet. Eine Genexpressionsanalyse bildet den Abschluss der Untersuchungen um p75^{NTR} und eröffnet gleichzeitig die Möglichkeit, unterschiedlich regulierte Gene in zukünftigen Experimenten auf ihre funktionelle Relevanz zu überprüfen oder umgekehrt, eine molekulare Erklärung für die beobachteten phänotypischen Veränderung zu geben. Zum Abschluss wurde das funktionelle Potential der durch Differenzierung aus ES-Zellen gewonnenen neuronalen Vorläuferzellen getestet, indem ein Transplantations-Assay in hippocampalen Schnittkulturen entwickelt wurde.

4.1 *In vivo*-Modell mit zell- und zeitspezifischer Deletion von p75^{NTR}

Wie in der Einleitung beschrieben, übt p75^{NTR} vielfältige bis zu entgegengesetzte Funktionen aus, abhängig von dem zellulären Kontext und dem Zeitpunkt der Entwicklung. Im Gegensatz zum adulten Organismus ist p75^{NTR} während der Entwicklung in vielen neuronalen und einigen nicht-neuronalen Zellen wie beispielsweise in Endothelzellen und Schwannzellen exprimiert. Die Analyse der beiden bestehenden p75^{NTR}-Mutanten (Exon III- und Exon IV- Mutante) ermöglichte zwar weitgehende Erkenntnisse über die Gesamt-Effekte von p75^{NTR}, sie lässt jedoch nicht auf primäre Effekte von p75^{NTR} in einzelnen Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt schliessen. So ist bis heute ungeklärt, warum in Abwesenheit von p75^{NTR} die Anzahl der Neuronen in den sensorischen Ganglien reduziert ist. Erklärungsmöglichkeiten sind Überlebenssignale von p75^{NTR} direkt in den Neuronen, eine gestörte Migration der Zellen aus der Neuralleiste sowie ein verminderter Support durch Schwannzellen, welche nachgewiesenermassen eine verminderte Migration entlang der Axone in Abwesenheit von p75^{NTR} zeigen. Ebenfalls ungeklärt ist die Funktion von p75^{NTR} in den cholinergen Neuronen des Septums im adulten Organismus. Die bestehenden KO-

Mäuse zeigen, dass die Anzahl dieser Neuronen erhöht ist, sodass p75^{NTR} offenbar normalerweise die Anzahl dieser Neurone durch gezieltes Absterben reguliert. Ob dieser Effekt hauptsächlich während der Entwicklung stattfindet oder auch im adulten Gehirn eine Rolle spielt, kann mit diesen Mäusen nicht beantwortet werden. Diese Frage ist deshalb von besonderem Interesse, weil die cholinergen Neuronen für die Funktion der selektiven Aufmerksamkeit wichtig sind und diese Neuronen in der Alzheimer-Krankheit zuerst betroffen sind. In diesem Kontext sollte auch erwähnt werden, dass im adulten Nervensystem p75^{NTR} in pathologischen Situationen wieder exprimiert wird und eine Degeneration in den entsprechenden Neuronen bewirken kann. Somit könnte man spekulieren, dass durch die physiologische Expression von p75^{NTR} die cholinergen Neuronen besonders anfällig auf "krankhafte Störungen" sind - und möglicherweise auch auf natürliche Prozesse wie Alterung. In der Tat wurde beobachtet, dass in gealterten Ratten (30 Monate alt) deutlich mehr spinale Motoneuronen p75^{NTR} exprimieren als in jungen Tieren (Xie et al., 2003). Ob p75^{NTR} dabei eine protektive oder degenerative Rolle spielt, bleibt offen. Um die Konsequenz einer Zunahme von cholinergen Neuronen des Septums in den p75^{NTR}-Mutanten funktionell zu testen, sind die bestehenden p75^{NTR}-Mutanten ebenfalls nicht geeignet, da durch die massiven Veränderungen im peripheren Nervensystem die Verhaltens-Tests verfälscht würden.

Um diese Fragen zu untersuchen und die entsprechenden Unterscheidungen machen zu können, sollten in diesem ersten Ansatz zwei Mauslinien generiert werden, eine konditionale p75^{NTR}-Mutante sowie eine neuronenspezifische, induzierbare Cre-Linie. Die entsprechenden ES-Zellen wurden generiert, es konnte jedoch trotz wiederholter Elektroporation keine Keimbahntransmission erreicht werden. Eine erfolgreiche Keimbahntransmission ist von mehreren Faktoren abhängig: der Art der Mutation, des genetischen Hintergrundes der ES-Zellen, der Qualität der ES-Zellen vor und nach der Manipulation, der Art der Injektion der ES-Zellen in die Blastozysten und des nachfolgenden Transfers in die scheinchwangeren Mäuse. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Mutationen erzeugt, im Fall von *tau*-CreERT2 handelt es sich um einen Locus, der mit denselben homologen Sequenzen und derselben Selektionskassette schon mehrmals rekombiniert worden ist, mit Keimbahntransmission der entsprechenden ES-Zellen. Für beide Konstrukte ist in der Maus kein Phänotyp zu erwarten, insbesondere kein Überlebensnachteil. Somit ist beinahe ausgeschlossen, dass die fehlende Keimbahntransmission auf die Konstrukte zurückzuführen ist. Weiter wurden ES-Zellen mit verschiedenem genetischen Hintergrund (R1, J1, E14R1) verwendet, welche ursprünglich alle bzgl. Keimbahntransmission getestet worden sind. Die Injektionen wurden an zwei unabhängigen Orten durchgeführt, mit den besseren Chimärenresultaten in Heidelberg, DE

(siehe Abb. 11). Somit fallen der ES-Zell-Hintergrund sowie die Injektionsart als Gründe ebenfalls weg. Es bleiben die Kulturbedingungen, welche in unserem Labor speziell für das Protokoll der Differenzierung in Neurone optimiert worden sind (z.B. FCS) - im Gegensatz zur Mausgenerierung. Die Kulturbedingungen könnten somit ausreichend sein für den Verlust der Fähigkeit zur Keimbahnbesiedelung, insbesondere da diese Fähigkeit nachgewiesenermassen zuerst verlustig geht im Falle einer ES-Qualitätseinbusse (Zwaka et al., 2005).

Da die oben erwähnten Fragestellungen in der Zwischenzeit keineswegs von anderen Forschungsgruppen gelöst worden sind, wird es weiterhin ein Ziel sein, diese Mauslinien zu generieren.

4.2 *In vitro*-Analyse des induzierbaren Cre-System mittels Differenzierung von ES-Zellen in Neuronen

Dieser Ansatz diente dazu, die *tau*-CreERT2-Linie als 'Tool' generell und insbesondere für den p75^{NTR}-Locus zu testen. Dabei ging es um die Frage der Induzierbarkeit durch den Liganden 4-OH-Tamoxifen, um die Hintergrundaktivität, und um die Frage, ob über die regulatorischen Elemente von *tau* genügend CreERT2-Protein exprimiert wird, um eine Exzision des gewünschten Gens zu erreichen.

Als erstes zeigte sich, dass die Klonierstrategie von *tau*-CreERT2 erfolgreich war, da eine mRNA von CreERT2 spezifisch in Neuronen detektierbar war. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Induzierbarkeit durch den Liganden 4-OH-Tamoxifen äusserst effektiv war, indem maximal bei 98% der Zellen eine Translokation von Cre in den Zellkern stattfand. Dabei schien weniger die Dosierung von 4-OH-Tamoxifen eine Rolle zu spielen, da schon geringe Mengen die maximale Wirkung zeigten. Hingegen erwies sich die Behandlungsdauer als wichtiger Faktor für die Induzierbarkeit. Dies deckt sich mit den veröffentlichten *in vivo*-Daten, wo durch kleinere Dosierungen über einen grösseren Zeitraum verteilt eine bessere Induzierbarkeit erzielt wurden (Leone et al., 2003).

Da eine Translokation von Cre in den Zellkern nicht einhergehen muss mit einer Rekombination, wurde der Aufwand unternommen, ES-Zellen mit dem Konstrukt *tau*-CreERT2 zu rekombinieren, welche in einem Allel eine konditionale Mutation von p75^{NTR} aufwiesen. Dies ermöglichte, die induzierbare Rekombinationsfähigkeit direkt für den p75^{NTR}-Lokus zu testen. Die durch PCR detektierte Exzision von p75^{NTR} Exon IV bewies, dass es grundsätzlich möglich ist, mit diesem System p75^{NTR} in Neuronen zeitspezifisch auszuschalten. Auf eine Quantifizierung der Exzision z.B. mittels Southern Blot-Analyse

wurde bewusst verzichtet, da dies sich in dem lebenden Organismus durch die veränderte Erreichbarkeit der Zellen für 4-OH-Tamoxifen anders darstellen wird.

Die Exzision war nicht nur in neuronalen Vorläuferzellen, sondern auch in postmitotischen Neuronen möglich. Das war deswegen von Bedeutung, weil das Chromatin von proliferativen Zellen sich anders verhält als dasjenige von postmitotischen Zellen und infolgedessen die Cre-Aktivität sich ändern kann. Es ist anzunehmen, dass die Rekombinierbarkeit auch für viele andere Genloci zutrifft, da die Cre-Aktivität jedoch abhängig vom Locus unterschiedlich sein kann, muss dies offen gelassen werden.

Eine messbare Hintergrundaktivität konnte weder durch die Immunfärbung noch durch die PCR festgestellt werden. Da jedoch in einem sehr kleinen Zeitrahmen von 7 Tagen gearbeitet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine kleine Hintergrundaktivität besteht, welche erst *in vivo*, nach einigen Wochen sichtbar würde.

Die Differenzierung von ES-Zellen in Neurone ermöglichte die *in vitro*-Analyse dieses 'Tools' in einer Form, welche der *in vivo*-Situation sehr ähnlich ist. Es konnte z.B. von derselben Zelle ausgegangen werden, welche auch für die Generierung der Mäuse diente, d.h. es handelte sich um denselben Promoter und denselben Zelltyp, nämlich Neurone. Dies ist von zentraler Bedeutung, denn es ist aus der Literatur bekannt, dass gerade das Nervensystem eines der schwierigsten Gewebe für induzierbare Cre-Systeme darstellt. Zudem kann nur so die Funktionalität des Fusionsproteins promoterspezifisch untersucht werden.

Die *in vitro*-Untersuchungen ergaben eindeutig, dass eine *tau*-CreERT2-Maus ein wertvoller Ansatz darstellen sollte. Allerdings ist aus mehreren Publikationen bekannt, dass die Rekombinationshäufigkeit in induzierbaren Cre-Systemen im Gehirn gering sein kann. Aus diesem Grund sind die meisten Systeme nur für die Untersuchung von einzelnen Zellen geeignet. Dies kann mehrere Gründe haben: einerseits ist die Blut-Hirnschranke für 4-OH-Tamoxifen nicht frei passierbar. Weiter wurden in manchen Studien Neuronen-Typ-spezifische Promotoren für die CreERT2-Expression verwendet, welche jedoch nicht in der Lage sind, grössere Mengen Protein zu exprimieren, z.B. der Promoter von pNav1.5 (Zhao et al., 2006). Beim *tau*-Promoter handelt es sich jedoch um einen starken Promoter, somit dürften diesbezüglich bessere Resultate erwartet werden. Sollte die Passierbarkeit der Blut-Hirnschranke das Hauptproblem darstellen, müssten pharmakologische Wege untersucht werden.

4.3 Untersuchung der Rolle von p75^{NTR} basierend auf einem ES-Zell-Differenzierungssystem

Da das erste Projekt nicht weiterverfolgt werden konnte, erfolgte ein kompletter Wechsel in der Strategie, offene Fragen bzgl. p75^{NTR} anzugehen. Die in unserem Labor entwickelte Differenzierung von ES-Zellen in Neurone erwies sich als idealer Ansatz aus mehreren Gründen. Zum einen ist es ein völlig neuartiges Modell, welches die Vorteile eines leicht genetisch zu manipulierenden *in vitro*-Systems mit den Vorteilen verbindet, die *in vivo*-Situation vernünftig zu reflektieren. Durch die hoch-synchrone Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen in eine homogene Population von Neuronen entsteht eine Vereinfachung, welche molekulare Erklärungen zulassen mit gleichzeitiger Erhaltung eines neuronalen Phänotyps - und adäquater Ausbildung eines Phänotyps nach genetischer Manipulation. Zum anderen war dieser Ansatz für die Untersuchung von p75^{NTR} interessant, weil p75^{NTR} in den differenzierten Neuronen zu Beginn hoch exprimiert ist und im Verlauf der Maturierung in der Expression zurückgeht, so wie das auch *in vivo* geschieht.

Generierung von p75^{NTR}-/- ES-Zellen:

Die *in vitro*-Differenzierung setzte die Generierung von ES-Zellen mit einer vollständigen Deletion von p75^{NTR} voraus. Das bereits existierende Konstrukt für die homologe Rekombination zur Generierung einer konditionalen Mutation erschien dazu sehr geeignet, da die Möglichkeit bestand, die Selektionskassette zusammen mit Exon IV mit Cre-Plasmid zu entfernen, was das Targeting des zweiten Allels erlaubte. Nach erfolgreicher Rekombination beider Allele zeigte sich in den p75^{NTR}-/- Neuronen eine vollständige Abwesenheit von p75^{NTR}-Protein. Dies ist nicht selbstverständlich, wie die früheren Ergebnisse der homologen Rekombination von p75^{NTR} zeigen. Zunächst wurde die sogenannte Lee-KO-Maus generiert, bei welcher das Exon III durch eine Selektionskassette mit PGK-Promotor und Neomycin-Gen unterbrochen ist (Lee et al., 1992). Die inzwischen bekannte Spleiss-Variante von p75^{NTR}, bei welcher das Exon III fehlt, wird jedoch in dieser Mutante nicht entfernt. Aus diesem Grund wurde eine zweite KO-Maus, die sogenannte Exon IV-Mutante (von Schack et al., 2001) generiert, bei welcher eine Selektionskassette mit PGK-Promoter und Neomycin-Resistenz in entgegengesetzter Richtung in das Exon IV eingefügt wurde. Tatsächlich ergab sich dadurch ein im Vergleich zum Lee-Knockout verstärkter Phänotyp, z.B. belegt für die Anzahl cholinergischer Neuronen des Septums (Naumann et al., 2002). Wenig später wurden jedoch Untersuchungen veröffentlicht, welche eine vollständige Deletion von p75^{NTR} durch diese Mutation anzweifelten (Paul et al., 2003). Die Analyse von Gehirnlisaten der Exon IV-Mutante mittels Western Blot mit Antikörper

gegen die intrazelluläre Domäne von p75^{NTR} detektierte eine Bande von 26 kD, welche bei diesen Autoren im Wildtyp nicht erschien. Die Untersuchung der p75^{NTR}-mRNA ergab, dass in der Mutante die Region, welche einen Teil der Stalk-Region, die intrazelluläre Domäne und die gesamte intrazelluläre Domäne umfasst, hochreguliert sei, wahrscheinlich aufgrund der verbliebenen Resistenzkassette mit Promoter. Die Überexpression der *p75^{NTR}ExonVI*-/- cDNA in PC12-Zellen bewirkte eine Aktivierung von JNK und eine Spaltung von Caspase-3, sodass die Autoren vorschlugen, dass es sich bei der Exon IV-Mutante eher um eine "gain of function" als um eine "loss of function" von p75^{NTR} handeln würde. Die in vivo Analyse von p75-Mutanten unterstützen den Vorschlag einer "gain of function" jedoch keineswegs. So bewirkte die Überexpression der intrazellulären Domäne von p75^{NTR} in einem transgenen Mausmodell einen massiven Neuronenverlust im Telenzephalon (Majdan et al., 1997), was bei der Exon IV-Mutante nicht der Fall ist. Im Gegenteil ist die Anzahl cholinergischer Neuronen des Septums sogar erhöht (Naumann et al., 2002). Ob es sich bei dem detektierten Protein tatsächlich um ein funktionelles Fragment von p75^{NTR} handelt, ist somit fraglich, zudem in unserem Labor eine Bande von 26 kDa auch im Wildtyp detektiert worden ist.

Somit könnte es sich bei den in dieser Arbeit generierten *p75^{NTR}*-/- ES-Zellen tatsächlich um den ersten unangefochtenen p75^{NTR}-Knockout handeln. Dies ergab sich aus der andersartigen Mutation, welche zwar wie zuvor ebenfalls das Exon IV betrifft, dieses aber dabei vollständig entfernt und zudem die Selektionskassette ebenfalls entfernt.

Phänotypische Analyse der *p75^{NTR}*-/- Neuronen

Um die Rolle von p75^{NTR} in den *p75^{NTR}*-/- Zellen zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt nach einer phänotypischen Ausprägung der Deletion von p75^{NTR} gesucht. Die reine Beobachtung der Neurone in der Schale ergab zunächst keine Auffälligkeiten. Da es sich bei den aus ES-Zellen differenzierten Neuronen um einen bzgl. der Untersuchung von p75^{NTR} neuartigen Neuronentypus handelte und die von p75^{NTR} initiierten Signalwege bekannterweise vom zellulären Kontext abhängig sind, wurden sämtliche bekannten Funktionen von p75^{NTR} in diesen Zellen untersucht, d.h. Zellzyklus, Neuritenwachstum und Zelltod/-Überleben. Bei den letzteren beiden ergab sich eine phänotypische Ausprägung durch die Abwesenheit von p75^{NTR}, im folgenden sollen diese einzeln diskutiert werden:

Neuritenverzweigungen

Hier zeigte sich, dass die Abwesenheit von p75^{NTR} eine Zunahme an prinzipalen Neuriten (die Neuriten, welche direkt aus dem Zellkörper erwachsen) bewirkte. Umgekehrt verringerte sich die Anzahl Neuriten durch eine Überexpression von p75^{NTR} (bei den *tau:p75NTR* Neuronen). Somit wirkt p75^{NTR} in den ES-Zell-Neuronen als Neuriten-Inhibitor. Dies deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Experimenten in pyramidalen Neuronen von hippocampalen Schnittkulturen (Zagrebelsky et al., 2005). Die bekannte modulatorische Wirkung von p75^{NTR} auf Rho wäre eine naheliegende Erklärung für diese Ausprägung. So bewirkt Ligandenbindung an p75^{NTR} in 293- und HN10-Zellen eine Inhibition von RhoA, ohne Ligandenbindung aktiviert p75^{NTR} hingegen RhoA konstitutiv (Yamashita et al., 1999; Yamashita and Tohyama, 2003). Als eine Folge der Modulation der Rho GTPasen sind Effekte auf das Aktinzytoskelett, im Speziellen Effekte auf das Auswachsen und Verzweigen von Neuriten beschrieben (Luo L., 2000). Diese phänotypischen Ausprägungen sind jedoch auch wiederum von dem Zelltypus abhängig, wie die Doktorarbeit von R. Schweigreiter aus unserem Labor eindrücklich zeigt. Dort bewirkte nämlich die Aktivierung von p75^{NTR} durch NGF in cerebellären Körnerzellen keine Inhibition von RhoA, sondern eine Aktivierung, welche ohne Effekt auf das Aktinzytoskelett blieb. Aus diesem Grund ist es erforderlich, die dem oben genannten Phänotyp zugrundeliegenden molekularen Mechanismen im selben System zu untersuchen.

Für die *tau:p75NTR* Neuronen wurde die Beobachtung gemacht, dass sowohl die Blockierung von Rho als auch von JNK-Aktivierung in diesen Neuronen wieder vermehrte Verzweigungen bewirkte. Beide Inhibitoren waren interessanterweise auch in der Lage, die durch die Überexpression von p75^{NTR} initiierte Neuriten-Degeneration teilweise zu verhindern. Somit scheinen die gleichen Signalwege für zwei scheinbar unterschiedliche Phänomene zugrundezuliegen. Denkbar wäre, dass eine bestimmte Menge an funktionellem p75^{NTR} benötigt wird für ein gutes Gleichgewicht zwischen Neuriten-Längenwachstum und -Verzweigung. Eine zu geringe Expression von p75^{NTR} würde unnötige Verzweigungen und vielleicht auch Verknüpfungen generieren, eine Überexpression jedoch das Innervationsgebiet verkleinern, und den Neuriten bis zum Absterben bringen.

Wie JNK die Anzahl Verzweigungen beeinflussen kann, ist im Gegensatz zu Rho weniger untersucht. Dabei muss beachtet werden, dass es drei verschiedene Isoformen von JNK gibt, JNK-1, JNK-2 und JNK-3. JNK-1 scheint während der Entwicklung eine wichtige Rolle für die Differenzierung und Migration kortikaler Neuronen zu spielen (Hirai et al., 2006). Kürzlich wurde ein neues Zielgen für JNK-1 gefunden, nämlich ein Mitglied der Stathmin Familie, SCG10, welches durch JNK-1 phosphoryliert wird (Tararuk et al., 2006). Phosphorylierung verhindert die Funktion von SCG10, nämlich die Depolymerisation von

Tubulin, und moduliert so positiv das Neuritenwachstum von kortikalen Neuronen. Für die beiden anderen JNK-Isoformen ist jedoch hauptsächlich die pro-apoptotische Funktion beschrieben, Zielgene, welche eine inhibitorische Wirkung auf das Neuritenwachstum haben könnten, sind nicht bekannt.

Offen bleiben nebst RhoA und JNK auch andere Signalwege als Erklärung für die durch Abwesenheit von p75^{NTR} erzeugte Zunahme an Neuriten. Insbesondere ist es bekannt, dass die Aktivität von NF- κ B ebenfalls das Neuritenwachstum beeinflussen kann (Gutierrez et al., 2004)

Überleben/Zelltod

Zunächst ergaben die Beobachtungen, dass die p75^{NTR}-/- Kulturen wesentlich früher abstarben als die Wildtyp-Neuronen, nämlich zwischen 4 - 6 Tagen nach Dissoziation der Aggregate. Dies war jedoch genau die Zeit, in der Kulturen schlechter Qualität auch abstarben, sodass es unklar war, ob das Absterben auf die Abwesenheit von p75^{NTR} oder auf eine schlechte Qualität zurückzuführen sei. Insbesondere beunruhigte die Tatsache, dass die p75^{NTR}-/- Zellen für ihre Generierung viermalig elektroporiert werden mussten, eine mechanische Behandlung, die bekannterweise die ES-Zell-Qualität mindern kann. Aus diesem Grund wurde die Differenzierung soweit optimiert, bis eine mit den WT-Neuronen gleichwertige Kultur erreicht wurde. Somit konnte die Zelltodrate vergleichend bestimmt werden. Es ergab sich eine ungefähr doppelte Zelltodrate in den p75^{NTR}-/- Neuronen verglichen mit WT-Neuronen, jedoch nur während der ersten 2 Tage nach Dissoziation, in den folgenden Tagen war kein signifikanter Unterschied mehr zu messen und die Überlebenszeit der gesamten Kultur war mit dem WT vergleichbar.

Die erhöhte Zelltodesrate in Abwesenheit von p75^{NTR} war insofern zunächst überraschend, da die Mutation der *tau:p75^{NTR}*, welche parallel in der Arbeitsgruppe untersucht wurde, ebenfalls zu erhöhtem Zelltod führte. Die zugrundeliegenden Signalwege sind jedoch völlig verschieden. Bei dieser Mutation führt die Insertion von p75^{NTR} in den *tau*-Lokus zu einer leichten Überexpression und der natürliche Expressionsrückgang von p75^{NTR} während der Maturierung der ES-Neurone wird verhindert. Diese Manipulation induziert eine Überexpression von Galectin-1, welches sich als neuer Effektor in der Degeneration von Neuriten erwies (Plachta et al., 2007). Dies wurde durch *in vivo*-Untersuchungen mit Läsionsmodellen sowohl im ZNS als auch im PNS bestätigt. Es handelt sich hierbei um pathologische Situationen, in welchen p75^{NTR} bekannterweise hochreguliert wird. Dabei werden durch p75^{NTR} offensichtlich grundsätzlich andere Signalwege angeschaltet als dies während der natürlichen Expression von p75^{NTR} der Fall ist. Die *tau:p75^{NTR}* Neuronen reflektieren also eher eine pathologische Situation, während die p75^{NTR}-/- Neuronen der

Untersuchung der physiologische Funktion von $p75^{NTR}$ dienen. Somit ist es wichtig, die durch die beiden Mutationen induzierten Ausprägungen für die Interpretation klar auseinanderzuhalten.

Eine Erklärung für das Phänomen des erhöhten Zelltodes in Abwesenheit von $p75^{NTR}$ wurde in der NF- κ B-Aktivität gesucht. Wie in der Einleitung erläutert, kann $p75^{NTR}$ zu einer Aktivierung von NF- κ B in vielfältigen Zelltypen führen, für dissoziierte sensorische und sympathische Neurone ist eine Beteiligung von $p75^{NTR}$ -vermittelter NF- κ B-Aktivität zum Überleben belegt (Maggirvar et al., 1998; Hamamoue et al., 1999). Tatsächlich fand sich eine deutlich geringere Färbung der $p75^{NTR-/-}$ Neuronen mit einem Antikörper gegen aktives (nukleäres) p65. Eine Bestätigung ergab sich durch den akuten Transfer von einem Reporter-Vektor, welcher Luziferase exprimiert als Antwort auf die Bindung von aktivem NF- κ B an die NF- κ B-Bindungsstelle. Es zeigte sich eine höhere Luziferase-Aktivität im WT. Dabei soll erwähnt werden, dass es sich bei diesem Transfer um eine Elektroporation (Amaxa®) handelte, bei welcher zwar durchschnittlich 75% der Zellen transfiziert werden konnten, jedoch dadurch eine hohe Zelltodrate induziert wurde. Bekanntlich können vielfältige Arten von Stress wie oxidativer, mechanischer Stress sowie Entzündungsprozesse und viele andere Faktoren NF- κ B aktivieren. Offensichtlich war der Unterschied in der NF- κ B-Aktivität zwischen den Genotypen gross genug, dass er durch die genannte unspezifische Aktivierung nicht maskiert wurde. Um die verminderte NF- κ B-Aktivität in den $p75^{NTR-/-}$ Neuronen mit der erhöhten Zelltodrate in der frühen Phase nach Dissoziation zu korrelieren, wurden Transfektionsexperimente durchgeführt, welche mit der NF- κ B-Aktivität interferierten. Aufsteigende Mengen an I κ B-Superrepressor, welcher eine konstitutiv aktive I κ B exprimiert, führten zu einer dosisabhängigen Zunahme der Zelltodrate im WT. In den $p75^{NTR-/-}$ Neuronen hingegen führte schon die kleinste Vektormenge zu einem maximalen Anstieg der Zelltodesrate. Dass ein Anstieg im Vergleich zum Mock-Vektor sichtbar war, lässt eine Restaktivität von NF- κ B vermuten, welche jedoch deutlich kleiner ist als im WT, da sie durch die geringste Vektormenge blockiert wird. Umgekehrt konnte durch die Transfektion einer konstitutiv aktiven IKK2 eine deutliche Reduktion der Zelltodesrate in den $p75^{NTR-/-}$ Neuronen beobachtet werden. Dabei stellte es sich heraus, dass die Zelltodesrate mit sehr grossen Vektormengen wieder zunimmt, und dies stärker in den $p75^{NTR-/-}$ Neuronen als im WT. Damit korrelierend steigt auch die Luziferase-Aktivität mit denselben Vektormengen in den $p75^{NTR-/-}$ Neuronen stärker an als in den WT-Neuronen. Für beide Phänomene gibt es eine mögliche Erklärung. NF- κ B kann bekannterweise beide Funktionen im Nervensystem ausüben, Überleben wie auch Zelltod, letzteres vorallem in pathologischen Situationen (Pizzi et al., 2002; Shou et al., 2002). Dabei konnte gezeigt werden, dass abhängig von dem induzierenden Faktor unterschiedliche NF- κ B-Untereinheiten aktiviert werden können, welche vermutlich die Funktion bestimmen (Pizzi

et al., 2002). So aktiviert IL-1 β die p65-, p50- und c-Rel-Untereinheiten und bewirkt Überleben, wohingegen Glutamat nur die Untereinheiten p50 und p65 aktiviert, dabei Zelltod auslösend. So ist es denkbar, dass mit steigender NF- κ B-Aktivität andere Untereinheiten rekrutiert werden, welche gesamthaft eine andere Funktion ergeben. Zweitens sind die inhibitorischen Untereinheiten von NF- κ B selber NF- κ B-Zielgene (www.nf-kb.org). Somit entsteht ein negatives Feedback, falls NF- κ B konstant aktiviert ist, wie dies auf die WT-Zellen zutrifft. Dieses Feedback ist entsprechend kleiner in den *p75^{NTR}*-/- Neuronen, sodass eine akute Aktivierung zu insgesamt grösseren Antworten führen kann.

Die Transfektionsexperimente legen einen kausalen Zusammenhang zwischen der erhöhten Zelltodrate der *p75^{NTR}*-/- Neuronen am Tag 1 und 2 nach Dissoziation und der erniedrigten NF- κ B-Aktivität nahe. Dadurch, dass die Transfektion selber einen toxischen Effekt auf die Zellen ausübt, war jedoch ein "Rescue-Experiment" im eigentlichen Sinne nicht möglich, welches die erhöhte Zelltodrate durch die Abwesenheit von *p75^{NTR}* wieder auf die Zelltodesrate des WT's zurückbringen würde. Eine denkbare Lösung wäre die Infektion mit Lentiviren, welche sehr geringe Nebeneffekte auf die Zellen ausüben oder die Generierung von *p75^{NTR}*-/- ES-Zellen mit einer Überexpression von IKK2 im *tau*-Lokus, was momentan bereits in Vorbereitung ist.

Zusammenfassend liesse sich für dieses Kapitel folgende Hypothese formulieren: Die aus ES-Zellen differenzierten Neuronen benötigen in der frühen Phase nach Dissoziation für ihr Überleben die Möglichkeit NF- κ B aktivieren zu können, was in Abwesenheit von *p75^{NTR}* in reduziertem Masse gegeben ist. Zu einem Zeitpunkt, wo alle Neuronen postmitotisch sind und sich ein Netzwerk über die Neuriten ausgebildet hat, können andere Signale die Überlebensfunktion übernehmen. Ein hierfür denkbarer Mechanismus wäre z.B. der Signalweg über TrkB, der ebenfalls in dieser Arbeit untersucht wurde. Die Aktivierung von TrkB über BDNF konnte sowohl in den WT- als auch *p75^{NTR}*-/- Neuronen ab Tag 3 gezeigt werden, mit konsekutiver Aktivierung von Akt.

Genexpressionsanalyse:

Dass die Abwesenheit von *p75^{NTR}* in den ES-Zell-Neuronen phänotypische Auswirkungen hatte, nämlich vermehrte Neuritenverzweigungen und die erhöhte Zelltodrate in der frühen Phase nach Dissoziation, eröffnete die Möglichkeit, für diese zugrundeliegende molekulare Mechanismen zu suchen. Da die erhöhte Zelltodrate mit erniedrigter NF- κ B-Aktivität korrelierte, lag es auf der Hand, eine Genexpressionsanalyse durchzuführen, um mögliche Zielgene von NF- κ B zu identifizieren. Zudem könnten Gene gefunden werden, deren unterschiedliche Transkription zu dem Phänotyp der Neuriten beiträgt. Die unvoreingenommene Suche mit dieser Methode erlaubte auch die Identifikation von bisher unbekanntem Zielgenen von *p75^{NTR}*.

Der Vergleich der Genexpression in ES-Zell-Neuronen des WT- versus $p75^{NTR-/-}$ Genotyps während Tag 1, 2, 3 und 5 ergab insgesamt 282 unterschiedlich regulierte Gene (hoch- oder runterreguliert). Bei der Erstellung dieser Liste wurde von einem relativ kleinen Vergleichsfaktor ausgegangen, nämlich von 1.3. Dabei wurde einerseits berücksichtigt, dass im Nervensystem kleine Unterschiede grosse Auswirkungen haben können (Pavlidis, 2003), andererseits sollten die Unterschiede zu allen Zeitpunkten erhalten bleiben, sodass sich bei Erhöhung des Faktors naturgegeben die Anzahl der Gene stark reduziert hätte und dadurch vielleicht interessante Gene weggefallen wären. Da aufgrund der fehlenden Duplikate im WT keine p-Werte errechnet werden konnten, muss die Gewichtung der Signifikanz durch die Betrachtung der Änderungswerte erfolgen. So gehören Gene, welche fast durchwegs sehr nahe bei einem Änderungswert von 1.3 liegen, sicher zu den weniger wertvollen für eine Überprüfung. Aus der Liste sollen vorerst diejenigen Gene diskutiert werden, welche funktionell einen Zusammenhang mit dem beobachteten Phänotyp haben könnten.

Zelltod: es wurden keine Gene gefunden, welche direkt in der Ausführung der Apoptose involviert sind. Dies ist wenig erstaunlich aus zwei Gründen: Einerseits wurden in der Analyse nur Gene berücksichtigt, welche zu allen Zeitpunkten eine veränderte Expression zeigten. Das Phänomen des erhöhten Zelltodes ist jedoch nur während der ersten zwei Tage nach Dissoziation zu beobachten, sodass dieses vorübergehende Ereignis in der Analyse nicht erfasst werden kann. Zweitens werden Effektoren von Zelltod selten auf transkriptioneller Ebene reguliert, da Apoptose ein sehr schnell auszuführender Mechanismus ist. Somit wäre eine Analyse auf Proteinebene für die Suche nach Zelltod-Effektoren sicher zielführender.

Gene mit einer Rolle im Neuritenwachstum:

In der folgenden Tabelle sind zur besseren Übersicht diejenigen Gene nochmals hervorgehoben, welche in den beiden Listen der Abb. 35 und 36 erscheinen und eine Rolle im Neuritenwachstum oder -Verzweigung spielen. Die Änderung (\uparrow/\downarrow) bezieht sich auf die Situation der $p75^{NTR-/-}$ Zellen, der Änderungskoeffizient ist für die jeweiligen Tage angegeben:

\uparrow/\downarrow	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 5	Gen-Bezeichnung
\downarrow	1.87	1.87	1.4	1.43	Cadherin 1
\downarrow	1.31	1.81	1.5	1.3	Cadherin 10
\downarrow	1.47	1.74	1.7	1.35	Netrin-1
\downarrow	1.56	1.37	2.3	3.18	S100 Calcium binding protein A6 (Calcyclin)

↑	2.4	4.94	5.9	3.09	Integrin alpha 8
↑	1.54	1.6	2.6	1.3	Nik related kinase
↑	1.85	1.51	2	2.07	LIM domain binding 2
↑	2.1	2.67	1.9	1.9	Semaphorin 5A
↑	1.47	1.42	1.5	1.7	Cdc 42 GTPase-activating protein
↑	1.31	1.45	1.5	1.38	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17

Rho-Signalweg: In der Liste erscheinen Gene, welche zum Signalweg von Rho gehören, das sind Rho GEF 17, Cdc 42 GTPase-activating protein und LIM domain binding 2. Dass gleich mehrere Mitglieder dieser Familie eine veränderte Expression zeigen, impliziert eine Beteiligung des Rho-Signalweges an den Veränderungen, welche durch die Absenz von p75^{NTR} in unserem System hervorgerufen werden. So wäre es sicher lohnend, die Rho-Aktivität und deren Effektoren zu untersuchen und gegebenenfalls mit ihr zu interferieren. Denn es wurde zwar erstmals in 293 Zellen klar gezeigt, dass p75^{NTR} die Rho-Aktivität modulieren kann, doch die nachfolgenden Untersuchungen zeigten, dass sowohl die Richtung der Aktivität als auch die morphologischen Auswirkungen in verschiedenen neuronalen Zelltypen unterschiedlich ausfallen können: So bewirkte die Aktivierung von p75^{NTR} durch NGF in Primärkulturen von hippocampalen Neuronen eine Hemmung des Neuritenwachstums, dieselbe Behandlung in Primärkulturen von cerebellären Körnerzellen blieb jedoch ohne Effekt, obwohl eine Aktivierung von RhoA gemessen wurde (siehe Doktorarbeit Rüdiger Schweigreiter). Andererseits wurde in Wachstumskernen von peripheren und zentralen sensorischen Neuronen aus der Exon IV-Mutante eine verminderte Rho-Aktivität gemessen und eine verstärktes Wachstum von Filopodien beobachtet (Gehler et al., 2004). Interessanterweise erscheint in der Liste auch ein Rho GEF, das Rho GEF 17. Es wäre lohnend dieses Zielgen weiter zu untersuchen, insbesondere auch auf Proteinebene. Denn bis heute ist es nämlich nicht geklärt, durch welches Rho GEF RhoA aktiviert wird, da p75^{NTR} selber diese Funktion nicht auszuführen scheint (Yamashita and Tohyama, 2002).

Nik related kinase (NRK/NESK) ist ein weiteres Gen der Liste, welches nicht direkt im Rho-Signalweg involviert ist, jedoch einen gemeinsamen Effektor am Aktin-Zytoskelett beeinflusst, nämlich Cofilin (Nakano et al., 2003). Die Phosphorylierung von Cofilin durch NRK/NESK oder im Rho-Signalweg durch LIM Kinase bewirkt eine verstärkte Actin-Polymerisierung.

Semaphorine und Netrine: Diese sind "guidance" Moleküle, welche insbesondere als Attraktoren oder Repressoren von axonalen Wachstumskernen gelten, jedoch gleichzeitig die Verzweigungen regulieren können. So zeigt Netrin-1 einen positiven Effekt auf die

Verzweigung von kortikalen Axonen, Semaphorin 3A hingegen einen negativen, beide Effekte werden über die Reorganisation des Zytoskeletts vermittelt (Dent et al., 2004). Die Signalwege scheinen in beiden Fällen die Aktivität von Rac zu beeinflussen. Dass in der vorliegenden Arbeit die transkriptionelle Regulierung dieser Moleküle entgegengesetzt verläuft (Netrin-1 ist hinunterreguliert, Semaphorin 5A hochreguliert), würde eine weitere Untersuchung interessant machen, da die Funktion von Netrin-1 und Semaphorin 3A auf die Verzweigung ebenfalls gegenläufig ist. Jedoch ist für Semaphorin 5A ein solcher Effekt nicht beschrieben.

Zell-Adhäsionsrezeptoren: Dazu gehören Integrin alpha 8 und die Cadherine 1 und 10. Die Integrine sind eine grosse Familie von heterodimeren Oberflächenrezeptoren, welche aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit bestehen. Sie vermitteln eine physische Interaktion zwischen dem extrazellulären Raum und dem Zytoskelett über verschiedene Signalwege einschliesslich MAPK (für eine Übersicht siehe Huber et al., 2003). Im Zusammenhang mit p75^{NTR} ist es interessant, dass Integrine auch die Tyrosinkinase Fyn aktivieren können, und zwar über die Assoziation mit Caveolin-1, welches ebenfalls ein Interaktionsmolekül von p75^{NTR} ist (Wary et al., 1996, 1998). Sowohl Integrine als auch Cadherine können zusätzlich zu MAPK auch den Rho-Signalweg modulieren. Dies würde die oben genannten Argumente für eine Untersuchung der Rho-Aktivität noch verstärken, umso mehr als dass der Änderungsfaktor für Integrin alpha 8 ziemlich hoch ist. Dass Integrine bidirektionale Signale über der Zellmembran vermitteln können, ist erwähnenswert im Zusammenhang mit der Beobachtung, dass der Phänotyp der vermehrten prinzipalen Neuriten in den p75^{NTR}-/- Neuronen zellautonom ist.

Weiter sollen Gene erwähnt werden, welche durch ihre Zusammengehörigkeit im Signalweg auffallen, sogenannte *Gen-Cluster*. Ein solcher Gen-Cluster betrifft den *Insulin-like growth factor* (IGF)-Signalweg. Zur besseren Übersicht sollen die dazugehörigen Gene mit Hoch- und Runterregulierung (↑/↓) und mit dem Änderungsfaktor zum jeweiligen Zeitpunkt nochmals dargestellt werden:

↑↓	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag5	Gen-Bezeichnung
↓	146	56.13	23.8	4.15	Growth factor receptor bound protein 10
↓	2.53	2.34	2.68	1.68	Insulin-like growth factor receptor 2
↑	3.02	4.07	2.88	2.92	Insulin-like growth factor 1
↑	2.26	2.29	2.01	3.02	Insulin-like growth factor 2

Auffallend war bei der Betrachtung der Liste von unterschiedlich regulierten Genen, dass gleich mehrere Mitglieder des IGF-Signalweges erscheinen, nämlich Insulin-like growth factor receptor 2 (IGF2R), Insulin-like growth factor 1 und 2 (IGF-1 und IGF-2) und das Adapterprotein Growth factor receptor bound protein 10 (Grb10). Bei sämtlichen dieser Gene ist der Änderungsfaktor sehr hoch, d.h. zu den meisten Zeitpunkten über 2. Interessanterweise zeigte eine Microarray-Analyse, welche komplett unabhängig von der hier gezeigten in Witten, DE, durchgeführt wurde, dieselbe Regulierung für Grb 10 und IGF2R. Zusammen genommen schliesst sich somit ein Zufallsbefund für diese Gene beinahe aus. Erweiternd konnte in Witten, DE, auch gezeigt werden, dass die Expressionswerte für Grb 10 und IGF2R durch einen Transfer mit IKK2-Vektor wieder auf WT-Werte zurückgingen. Dies spricht für eine p75-vermittelte Regulierung dieser Gene durch NF- κ B.

Der IGF-Signalweg ist vorallem bezüglich IGF1R intensiv untersucht (für eine Übersicht siehe Bondy and Cheng, 2004). Es handelt sich um einen Tyrosinkinase Rezeptor, welcher sowohl durch IGF-1 als auch IGF-2 aktiviert wird. Es gibt eine grosse Homologie zum Insulin-Rezeptor, so wie auch IGF-1 und IGF-2 eine grosse Sequenzhomologie zu Insulin zeigen. So binden die Rezeptoren nebst ihrer eigentlichen Liganden auch die verwandten Peptide, jedoch mit geringerer Affinität. Es wird sehr wenig Insulin im Gehirn synthetisiert, dagegen wurden hohe Mengen an IGF-1-mRNA im Gehirn gefunden, speziell während der postnatalen Entwicklung. Die Funktion von IGF-1 ist derjenigen von Insulin ähnlich, indem die Aktivierung von IGF1R zu einer erhöhten Glucose-Aufnahme führt und die IGF-1-Nullmutanten eine 30-60%-ige Reduktion der Glucose-Aufnahme zeigen. Zudem hat IGF-1 jedoch einen starken Effekt auf das anabole Wachstum, der im peripheren Gewebe durch Wachstumshormon kontrolliert wird. Im Nervensystem ist die Regulierung der Aktivität jedoch nicht bekannt. Die Funktion des anabolen Wachstums scheint auch auf das Zentralnervensystem zuzutreffen, indem bei der IGF1R-KO-Maus eine 40%ige Reduktion des Gehirnvolumens mit erhaltener Zellzahl gefunden wurde (Cheng et al., 2003). Dabei zeigte sich eine Reduktion der Somagrösse, der Dendritenlänge und der Anzahl von Verzweigungen und Synapsen.

Interessanterweise wird IGF1R im adulten Gehirn nach Verletzung wieder hochreguliert, ein Expressionsmuster, welches an p75^{NTR} erinnert. In solchen pathologischen Situationen scheint IGF-1 auch das Überleben zu fördern, indem der Verlust an Neuronen reduziert wurde durch die Zugabe von IGF-1 im adulten Ratten-Gehirn nach hypoxischer Schädigung (Guan et al., 1993).

Der IGF2R, auch cation-independent mannose-6-phosphate receptor (M6P) genannt, ist weit weniger erforscht. Er ist ein die Zellmembran einmal durchquerendes Glycoprotein mit

einer grossen extrazellulären Domäne und einem kleinen zytoplasmatischen Anteil ohne Tyrosinkinase-Aktivität. Im Gegensatz zu IGF1R bindet er IGF-2 mit höherer Affinität als IGF-1 und interagiert nicht mit Insulin. IGF2R bindet auch einige andere Liganden über Mannose-6-Phosphat-Bindungsstellen wie lysosomale Enzyme, TGF- β , LIF, Proliferin und Retinsäure (für eine Übersicht siehe Hawkes et al., 2006). Der grösste Anteil von IGF2R ist involviert in der Segregation von lysosomalen Enzymen (Kornfeld, 1992). Die in der Zellmembran lokalisierten IGF2-Rezeptoren regulieren die Endozytose von sezernierten lysosomalen Enzymen und vermitteln die Internalisierung und Degradierung von IGF-2, LIF und Proliferin und potenzieren die Aktivierung von TGF- β (Hille-Rehfeld, 1995; Braulke, 1999). Der Signalweg von IGF2R ist jedoch weitgehend ungeklärt und die biologische Aktivität von IGF-2 scheint hauptsächlich über IGF1R zu gehen, wobei der IGF2R vor allem als "Fänger" von IGF-2 dient und so die lokale IGF-2-Konzentration stabilisiert (Hawkes and Kar, 2004). Dass diese IGF2R vermittelte Funktion jedoch unabdingbar ist, zeigen Deletionsmutanten, welche zum Zeitpunkt der Geburt an einem Wachstums-Überschuss sterben (Lau et al., 1994). IGF2R wird in verschiedenen Gehirnregionen wie Kortex, Striatum, Hippocampus und diversen Kernen im Hirnstamm während der Entwicklung und auch im adulten Stadium exprimiert (für eine Übersicht siehe Hawkes et al., 2006; Nagano et al., 1995). Dass die Expression jedoch nicht mit derjenigen von IGF1R oder Insulin-Rezeptor einhergeht, lässt eine Funktion vermuten, welche über die oben genannte hinausgeht. Tatsächlich wurde kürzlich erstmals gezeigt, dass IGF2R mit einem G-Protein interagiert und dadurch die Acetylcholin-Ausschüttung über die Aktivierung von PKC α in cholinergen Neuronen des Septums potenziert (Hawkes et al., 2006).

Grb10 gehört zu der Familie der Adapterproteine einschliesslich Grb7, Grb10 und Grb14, welche an Tyrosinkinase-Rezeptoren binden. Jedoch nur Grb 10 bindet an den Insulin-Rezeptor und an IGF1R. Die Deletion von Grb10 führt zu embryonalem Wachstums-Überschuss und zu einer 30%igen Zunahme der Körpergrösse zum Zeitpunkt der Geburt (Charalambous et al., 2003). Dies führte zu der Annahme, dass Grb 10 als negativer Regulator des Insulin- und IGF-1-Signalweges fungiert. Dies wurde für den IGF1R bestätigt, indem siRNA von Grb10 zu vermehrter IGF-1-vermittelter Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in NIH-3T3-Zellen führte (Dufresne and Smith, 2005). Auch der Insulin-Signalweg wird nachweislich negativ reguliert, indem einerseits die Interaktion zwischen Insulin-Rezeptor und Insulin-Rezeptor Substrat (IRS) blockiert wird andererseits auch die Degradation des Insulin-Rezeptors im Proteasom vermittelt wird (Ramos et al., 2006). Die Proteinmenge von IGF1R scheint jedoch unverändert zu bleiben (Dufresne and Smith, 2005). Diese Untersuchungen beschränken sich jedoch auf nicht-neuronale Zellen, die Expression oder Funktion von Grb 10 im Nervensystem ist nicht erforscht.

In Bezug auf p75^{NTR} wurde bisher keine Verbindung zum IGF-Signalweg beschrieben, somit wären die oben genannten Gene neu identifizierte Zielgene von p75^{NTR}. Die Konstellation mit erniedrigter mRNA-Expression von IGF2R und Grb10 in Abwesenheit von p75^{NTR} würde für ein vermehrtes IGF-1-Signal sprechen. Dies ist interessant bezüglich des beobachteten Phänotyps der vermehrten Neuritenverzweigungen, da es korreliert mit der oben beschriebenen Wirkung des IGF-1-Signalweges. Da die Herunterregulation von Grb10 und IGF2R über NF-κB vermittelt scheint, könnte dieser Signalweg auch eine Erklärung für die beobachteten Einflüsse von NF-κB auf das Neuritenwachstum darstellen (Gutierrez, 2005). Zusammengenommen sind dies starke Argumente für eine zukünftige Bestätigung dieser Zielgene mittels real time-PCR und Untersuchung auf Proteinebene.

4.4 Integrationspotential von neuronalen Vorläuferzellen nach Transplantation in hippocampale Schnittkulturen

Die Neurogenese im adulten Gehirn ist ein Beweis dafür, dass das Gehirn in der Lage ist, neugeborene Neurone sinnvoll in einen existierenden neuronalen Schaltkreis zu integrieren. Dies lässt vermuten, dass diese Fähigkeiten der Rekrutierung von neuen Neuronen auch genutzt werden können, um exogen "produzierte", transplantierte Vorläuferzellen zu integrieren. Daraus entstand bei vielen Forschern die Idee, die Transplantation von Zellen für therapeutische Zwecke zu nutzen, indem diese Zellen verlorene Elemente substituieren und neuronale Schaltkreise wieder rekonstituieren würden und somit verlorene Funktionen wiederherstellen würden. Ein vielleicht weniger ambitionierter Ansatz wäre die Transplantation von Zellen, welche für die lokalen Neuronen in parakriner Weise wichtige Überlebenssignale aussenden würden. Dies wurde zuerst realisiert in klinischen Studien mit Parkinson-Patienten, wobei fetale Zellen transplantiert wurden, welche durch die Produktion von Dopamin eine klinische Verbesserung ergaben (Bjorklund, A., 2003). In ähnlicher Weise wurden auch Huntington- Krankheit und vaskuläre Läsionen behandelt (für eine Übersicht siehe Peschanski, M., 2001). Technische und ethische Schwierigkeiten sind jedoch die Limiten dieser Behandlungen. Somit wurden etliche andere Zellen als Donor-Zellen exploriert. Idealerweise wäre diese Donorzelle in unlimitierten Mengen *in vitro* expandierbar, wäre homogen und gut charakterisiert, wäre festgelegt in die neuronale Richtung. Dies wurde mit der Isolierung von den unter 1.2.2 erwähnten putativen, neuronalen Stammzellen in etlichen Versuchen angestrebt, Immortalisierung sollte die Proliferation garantieren und Trennungsmethoden die Reinheit verbessern. Es war jedoch schwierig, die beobachteten Verbesserungen durch Transplantationen in Läsionsmodellen von Ratten mit zugrundeliegenden Mechanismen zu korrelieren (für eine Übersicht siehe Conti et al., 2006). Auch die *in vitro*-Eigenschaften dieser Zellen sind noch nicht ausreichend charakterisiert.

Aus diesem Grund sind auf ES-Zellen basierende Strategien vielversprechend. Die ES-Zellen selber generieren nach Transplantation meist Tumoren. Die "Vor-Differenzierung" von ES-Zellen erlaubt jedoch die Generierung eines definierten Spektrums von Zelltypen sowie die genetische Modifikation auf einfache Weise. Die Integrationsfähigkeit von solchen Vorläuferzellen wurde in mehreren Modellen getestet. Die Transplantation von differenzierten ES-Zellen (nach dem Protokoll von Okabe et al., 1996) in den Ventrikel von Maus-Embryonen zeigte, dass diese Zellen in verschiedene Gehirnregionen migrieren konnten, wo sie einen neuronalen Phänotyp mit inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmitter erwarben, jedoch nicht die regionalen Marker exprimierten (Wernig et al., 2004). Bei Transplantationen in adultes Gewebe war die Migration weniger effektiv (Rüschenschmidt et al., 2005) und bei Transplantationen in Läsionsmodellen muss eine weitere Schwierigkeit überwunden werden, nämlich die inhibitorischen Komponenten auf das axonale Wachstum (Harper et al., 2004).

Alle diese bisher unternommenen Transplantationsversuche weisen eine zentrale Schwierigkeit auf, nämlich die Heterogenität der transplantierten Zellen, womit eine Korrelation des funktionellen Ergebnisses mit den Zellen verunmöglicht wird. Mit dem in unserem Labor entwickelten *in vitro*-Differenzierungssystem ist es jedoch, wie oben ausgeführt, erstmals gelungen, eine homogene Population von neuronalen Vorläufern und Neuronen zu generieren (Bibel et al., 2004). Aus diesem Grund wurde es als lohnend erachtet, erste Transplantationsversuche mit diesen Zellen in Hinblick auf die oben angesprochene therapeutische Dimension durchzuführen.

Diese präliminäre Transplantations-Studie war motiviert durch zwei Fragen: Wie verhalten sich die aus ES-Zellen differenzierten neuronalen Vorläufer in einem *ex vivo* Umfeld, das ihren ermittelten intrinsischen Eigenschaften entspricht? Und können Aussagen gemacht werden über den potentiellen Wert von Transplantationen dieser Zellen in adultes Hirngewebe?

Durch die Expression von radialen Glia-Marker der neuronalen Vorläuferzellen und von Emx-2 der Neuronen unseres Zellsystems würden diese *in vivo* am ehesten pyramidalen Neuronen aus dem Hippocampus oder Kortex entsprechen. Das Verhältnis von glutamatergen zu GABA-ergen Neuronen ist ca. 95% zu 5%, ein Verhältnis, wie es auch im Hippocampus vorkommt. Dies sprach für eine Transplantation in Hippocampus-Schnitte, zumal der Hippocampus durch die planare Anordnung eines gesamten neuronalen Schaltkreises die Beobachtung von Projektionen zuließ.

Zusammengefasst ergab sich, dass die transplantierten Zellen in das lokale Gewebe integrierten und als Neurone ausgedehnte Dendritenbäume und weitreichende Axone ausbildeten. Dass die transplantierten Zellen im Hippocampusschnitt länger überleben

konnten als dieselben Zellen in der Kulturschale, gibt einen ersten indirekten Hinweis darauf, dass das Umfeld des Hippocampus oder des angrenzenden entorhinalen Kortex für diese Zellen geeignet ist. Natürlich würden vergleichende Transplantationsexperimente z.B. in peripheres Nervensystem oder andere ZNS-Regionen weitere wichtige Hinweise über die Adaptationsfähigkeiten dieser Zellen geben, so wie dies für das embryonale Stadium mit Experimenten im Huhnembryo gemacht worden ist (Plachta et al., 2005). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine morphologisch funktionelle Integration, indem die transplantierten Zellen Synapsen zu den lokalen Neuronen ausbildeten und auch synaptische Kontakte an den Dendriten erhielten. Elektrophysiologisch entsprachen die intrinsischen Eigenschaften weitestgehend denjenigen von immaturren Neuronen, entsprechend des Zeitpunktes der Analyse (3 Wochen nach Dissoziation). Es zeigte sich, dass die synaptischen Kontakte der lokalen Neuronen funktionell waren, indem nach Stimulation benachbarter Neurone sowohl inhibitorische als auch schwache exzitatorische Antworten gemessen wurden. Dass nur eine schwache exzitatorische Antwort messbar war, kann mit dem Zeitpunkt der Analyse erklärbar sein. Die "elektrophysiologische Maturierung" von neugeborenen Neuronen im adulten Hippocampus wurde kürzlich intensiv untersucht. So werden diese zunächst tonisch durch GABA depolarisiert, was für ihre Integration in ein funktionelles Netzwerk als unabdingbar erscheint. Danach folgt die Etablierung von inhibitorischem, GABAergen Input und erst ab 3-4 Wochen erhalten die Neurone auch glutamatergen Input (Ge et al., 2006). Es wäre sicher interessant, dieselbe Analyse zu anderen Zeitpunkten zu machen und zu untersuchen, ob die elektrophysiologische Maturierung der transplantierten Zellen derjenigen der intrinsischen neugeborenen Neuronen folgt. Zudem könnte zu einem späteren Zeitpunkt eine vergleichende Analyse der intrinsischen elektrophysiologischen Eigenschaften, insbesondere der Form des Aktionspotentials, Aufschluss geben über den ausgebildeten neuronalen Subtyp der transplantierten Zellen. Dies wäre deshalb von Bedeutung, weil z.B. keine spezifischen Marker für Pyramidenneurone des Kortex oder des Hippocampus existieren, was für die Zellen unseres Systems besonders wertvoll wäre.

Eine weitergehende Frage, die Frage der Projektion, erwies sich als schwierig zu beantworten. Denn ungeachtet, ob die Zellen im Gyrus dentatus, in der CA3 oder im entorhinalen Kortex platziert wurden, projizierten ihre Axone in das Stratum moleculare des Gyrus dentatus, wo sich die axonalen Endigungen des "perforant path" aus dem entorhinalen Kortex befinden. Diese unspezifische Antwort könnte einerseits in der durch den Schnitt veränderten Oberflächenstruktur oder unterbrochenen Aktivität der Signalmoleküle liegen oder andererseits in der Unfähigkeit der transplantierten neuronalen Vorläuferzellen, auf die lokalen Signale zu antworten. Grundsätzlich behalten hippocampale Schnittkulturen ihre Fähigkeit zur endogenen Neurogenese. Ob die neugebildeten Neurone jedoch auch

korrekt integrieren - was einen Hinweis für die obige Fragestellung geben würde - wurde bisher nicht untersucht, (Kamada et al., 2004).

Die Transplantationsversuche im Hippocampus-Schnitt zeigten erstmals, dass die in unserem Labor etablierte Differenzierung von ES-Zellen in Neurone eine wertvolle Quelle für zukünftige Transplantationen in Hinblick auf eine therapeutische Anwendung darstellen kann. Es versteht sich von selbst, dass bis dahin noch viele Fragen geklärt werden müssen. Als nächstes könnten Transplantationen in Läsionsmodelle der lebenden Maus Aufschlüsse darüber geben, ob die funktionelle Integration der transplantierten Zellen auch mit einer Verbesserung der läsionsbedingten Symptome korreliert. Dies wird momentan in einer Zusammenarbeit mit dem Labor von Martin Schwab in Zürich, CH, in den dort etablierten Rückenmarksläsionen getestet. Allerdings muss, wie oben erwähnt, die Schwierigkeit der inhibitorischen Komponenten des ZNS-Myelin auf das axonale Wachstum überwunden werden. Dabei könnten wiederum die $p75^{NTR}/-$ Zellen von Bedeutung sein, da bekannterweise diese Signale über NogoR in Assoziation mit $p75^{NTR}$ vermittelt werden (Wang et al., 2002; Wong et al., 2002; Yamashita and Tohyama, 2003).

4.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit generierten ES-Zellen mit einer Deletion von $p75^{NTR}$ in Kombination mit der *in vitro*-Differenzierung in Neurone eröffnet vielfältige Anwendungen. Vorallem die durch die Genexpressionsanalyse in den $p75^{NTR}/-$ Neuronen erhaltenen Ergebnisse werfen neue Fragen auf. In der Liste der unterschiedlich regulierten Gene fiel ein Gen-'Cluster' auf, der mehrere Gene des IGF-Signalweges einschliesst. Diese Gene scheinen durch NF- κ B reguliert zu sein. Es wird interessant sein, diesen bisher nicht bekannten Zusammenhang von $p75^{NTR}$ und NF- κ B mit dem IGF-Signalweg weiter zu untersuchen. Insbesondere sollten auch die Auswirkungen des IGF-Signalweges auf die phänotypische Ausprägung in unserem Zellsystem untersucht werden, da für die Deletionsmutante von IGF2R ein vermehrtes Neuritenwachstum beschrieben ist, eine Ausprägung, die auch in den $p75^{NTR}/-$ Neuronen beobachtet wurde und deren molekulare Mechanismen noch ungeklärt sind. Gleichzeitig sind auch Auswirkungen von NF- κ B auf das Neuritenwachstum beschrieben, mögliche dafür verantwortliche Zielgene könnten aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls Komponenten des IGF-Signalweges sein.

Die Transplantationsversuche in hippocampalen Schnittkulturen eröffnen ebenfalls weitere Untersuchungen. Zukünftige Experimente werden zeigen, ob die beobachtete Integration der transplantierten Zellen auch von Bedeutung für die Funktion im lebenden Organismus ist. Dies wird momentan durch Transplantationen in Läsionsmodelle der Maus in Zusammenarbeit mit dem Labor von M. Schwab, Zürich CH, untersucht.

Zudem wird in einer weiteren Zusammenarbeit mit M. Korte, Braunschweig, DE, der in dieser Arbeit etablierte Transplantationsassay weiter verwendet, um die elektrophysiologischen Eigenschaften der $p75^{NTR-/-}$ Neuronen mit WT-Neuronen vergleichend zu analysieren.

5. Abkürzungen

In den Fällen, wo keine adäquate deutsche Übersetzung eines englischen Begriffes existiert, wurden dieser in Anführungszeichen (z.B. 'activation loop') übernommen. Im übrigen wurden folgende Abkürzungen in dieser Arbeit verwendet:

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AMPA	(R,S)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ASK1	Associated with spindles and kinetochores protein 1
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BLBP	brain lipid-binding protein
BMP	bone morphogenic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
BRDU	Bromo-desoxy-Uridin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cdc42	cell division cycle 42
cDNA	komplementäre DNA
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CRD	Cystein-reiche Domäne
cRNA	komplementäre RNA
CT-1	Cardiotrophin-1
d	Tag (day)
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid
DD	death domain
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EM	Elektronenmikroskopie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	Embryonic carcinoma cells
ECD	Extrazelluläre Domäne (extracellular domain)
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Grünes fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
EPSC	Excitatory postsynaptic current
ERK	extracellular response kinase
ES	Embryonale Stammzellen
et al.	et alii
Fap-1	Fas-associated phosphatase-1
FACS	Fluorescence assisted cell sorting
FCS	Fetal calf serum
g	Gramm
G	Guanin
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDNF	Glial derived neurotrophic factor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GDP/GTP exchange factor

GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLAST	Glutamate/Aspartate transporter
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (hour)
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase)
HSP90	heatshock protein 90
ICD	Intrazelluläre Domäne (intracellular domain)
ICM	Innere Zellmasse (inner cell mass)
IGF	Insulin like growth factor
IGF1R	IGF-Rezeptor 1
IGF2R	IGF-Rezeptor 2
IκB	Inhibitor of kappa B
IKK	IκB-kinase
IL	Interleukin
IPSC	Inhibitory postsynaptic current
IRAK	IL-1-receptor-associated kinase
IRES	internal ribosomal entry site
JNK	c-Jun N-terminal kinase
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	knock-out
l	Liter
LIF	Leukemia inhibitory factor
LTD	long term depression
LTP	long term potentiation
m	Milli
M	Molar
μ	Mikro
MAG	Myelin-associated glycoprotein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MEF	Embryonale Fibroblasten
min.	Minute
MKK	MAP kinase kinase
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
n	Nano
neo	Neomycin-Resistenzgen
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NGF	Nerve growth factor
NIK	NF-κB-inducing kinase
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRAGE	neurotrophin receptor-interacting MAGE-homolog
NRIF	neurotrophin receptor-interacting factor
NT-3	Neurotrophin 3
NT-4	Neurotrophin 4
OMgP	Oligodendrocyte myelin glycoprotein
P	post, Tag nach der Geburt
pA	polyA
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDZ	PSD-95, Discs large, Zona occludens-1
PFA	Paraformaldehyd
PGC	Primordial germ cells

PGK	phosphoglycerate kinase
pH	potentia hydrogenii
PI3K	phosphatidylinositol-3-OH kinase
PKC	Proteinkinase C
PLCy	Phospholipase C gamma
PNS	Peripheres Nervensystem
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	Retinsäure (retinoic acid)
RG	Radiale Gliazellen
RIP	receptor interacting protein
RIP	regulated intramembrane proteolysis
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Kombination von Reverser Transkription und PCR
s	Sekunde
SC1	Schwann cell factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Spermatogonial stem cells
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAK1	TAT-associated kinase-1
Taq	Thermophilus aquaticus
T	Thymidin
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
tk	Thymidinkinase
TNFR	Tumornecrosis factor receptor
TRAF	TNFR-associated factor
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
Trk	Tropomyosin related kinase
U	Einheit (unit)
ü/n	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Well	Vertiefung in einer Zellkultur-Schale
Wnt	Wingless-related MMTV integration site
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

6. Literaturverzeichnis

- 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
- Alvarez-Buylla, A., and Lim, D.A. (2004). For the long run: Maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**, 683-686
- 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. *PNAS* **91**, 2795-2799
- Arévalo, J.C. and Wu, S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1523-1537
- Aubert, J., Dunstan, H., Chambers, I. and Smith, A. (2002). Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1240-1245
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E. and Gottlieb, D.I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev. Biol.* **168**, 342-357
- Bamji, S.X., Majdan, M., Pozniak, C.D., Belliveau, D.J., Aloyz, R., Kohn, J., Causing, C.H. and Miller F.D. (1998). The p75 neurotrophin 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. *J. Neurobiol.* **25**, 1386-1403
- Barde, Y.-A. (1990). The nerve growth factor family. *Prog. Growth Factor Res.* **2**, 237-248
- 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. *PNAS* **91**, 6501-6505
- Bazenet, C.E., Mota, M.A. and Rubin, L.L. (1998). The small GTP-binding protein Cdc42 is required for nerve growth factor withdrawal-induced neuronal death. *PNAS* **95**, 3984-3989
- Beattie, M.S., Harrington, A.W., Lee, R., Kim, J.Y., Boyce, S.L., Longo, F.M., Bresnahan, J.C., Hempstead, B.L. and Yoon, S.O. (2002). ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* **36**, 375-386
- Belliveau, D.J., Krivko, I., Kohn, J., Lachance, C., Pozniak, C., Rusakov, D., Kaplan, D. and Miller, F.D. (1997). NGF and neurotrophin-3 both activate TrkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neuritogenesis. *J. Cell Biol.* **136**, 375-388
- Benninger F., Beck, H., Wernig, M., Tucker, K.L., Brüstle, O. and Scheffler, B. (2003). Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in hippocampal slice cultures. *J. Neurosci.* **23(18)**, 7075-7075
- 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

- Benzel, I., Barde, Y.-A. and Casademunt, E. (2001). Strain-specific complementation between NRIF1 and NRIF2, two zinc finger proteins sharing structural and biochemical properties. *Gene* **81**, 19-30
- Bibel, M., Hoppe, E. and Barde, Y.-A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors *trk* and p75^{NTR}. *EMBO J.* **18(3)**, 616-622
- Bibel, M. and Barde, Y.-A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* **14**, 2919-2937
- Bibel, M., Richter, J., Schrenk, K., Tucker, K.L., Staiger, V., Korte, M., Goetz, M. and Barde, Y.-A. (2004). Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage. *Nat. Neurosci.* **7(9)**, 1003-1009
- Bibel, M., Richter, J., Lacroix, E. and Barde, Y.-A. (2007). Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Protocols* **2(5)**, 1034-1043
- Bjorklund, A., Dunnett, S.B., Brundin, P., Stoessl, A.J., Freed, C.R., Breeze, R.E., Levivier, M., Peschanski, M., Studer, L., Barker, R. (2003). Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **2**, 437-445
- Bothwell, M. (1995). Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **18**, 223-253
- Bondy, C.A. and Cheng, C.M. (2003). Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur. J. Pharmacol.* **490**, 25-31
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H. and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**, 255-256
- Brann, A.B., Scott, R., Neuberger, Y., Abulafia, D., Boldin, S., Fainzilber, M. and Futerma, A.H. (1999). Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **19**, 8199-8206
- Braulke, T. (1999). Type-2 IGF receptor: a multiple-ligand binding protein. *Horm. Metab. Res.* **31**, 242-246
- Brennan, C. Rivas-Plata, K. and Landis, S.C. (1999). The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons *in vivo*. *Nat. Neurosci.* **2(8)**, 699-705
- Brook, F.A., and Gardner, R.L. (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *PNAS* **94**, 5709-5712
- Burdon, T., Chambers, I., Stracey, C., Niwa, H. and Smith, A. (1999). Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* **165**, 131-143
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Goeddel, D.V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443-446

- Casaccia-Bonnel, 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
- Casanova, E., Fehsenfeld, S., Lemberger, T., Shimshek, D.R., Sprengel, R. and Mantamadiotis, T. (2002). ER-based double iCre fusion protein allows partial recombination in forebrain. *Genesis* **34**, 208-214.
- Carter, B.D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhäuser, N., Böhm-Matthaei, R., Baeuerle, P.A. and Barde, Y.-A. (1996). Selective activation of NF- κ B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* **272**, 542-545
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M, Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643-655
- Chao, M.V. and Hempstead, B.L. (1995). p75 and Trk: A two-receptor system. *Trends Neurosci.* **18**, 321-326
- Charalambous, M., Smith, F.M., Bennett, W.R., Crew, T.E., Mackenzie, F. and Ward, A. (2003). Disruption of the imprinted Grb10 gene leads to disproportionate overgrowth by an Igf2-independent mechanism. *PNAS* **100**, 8292-8297
- Cheng, C.M., Mervis, R.F., Niu, S.L., Salem J.N., Witters, L.A., Tseng, V., Reinhardt, R. and Bondy, C.A. (2003). Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. *J. Neurosci. Res.* **73**, 1-9
- Chittka, A. and Chao, M.V. (1999). Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *PNAS* **96**, 10705-10710
- Chittka, A., Arevalo, J.C., Rodriguez-Guzman, M., Pérez, P., Chao, M.V. and Sendtner, M. (2004). The p75^{NTR}-interacting protein SC1 inhibits cell cycle progression by transcriptional repression of cyclin E. *J. Cell Biol.* **164**, 985-996
- Conti, L., Reitano, E. and Cattaneo, E. (2006). Neural stem cell systems: diversities and properties after transplantation in animal models of disease. *Brain Pathology* **16**, 143-154
- Cooke, E.L., Uings, I.J., Xia, C.L., Woo, P. and Ray, K.P. (2001). Functional analysis of the interleukin-1-receptor-associated kinase (IRAK-1) in interleukin-1 beta-stimulated nuclear factor kappa B (NF-kappa B) pathway activation: IRAK-1 associates with the NF-kappa B essential modulator (NEMO) upon receptor stimulation. *Biochem. J.* **359**, 403-410
- Corbeil, D., Röper, K., Hannah, M.J., Hellwig, A. and Huttner, W.B. (1999). Selective localization of the polytopic membrane protein prominin in microvilli of epithelial cells - a combination of apical sorting and retention in plasma membrane protrusions. *J. Cell Sci.* **112**, 1023-1033
- Coulson, E.J., Reid, K., Shipham, K.M., Morley, S., Kilpatrick, T.J. and Bartlett, P.F. (2004). The role of neurotransmission and the chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog. Brain Res.* **146**, 41-62
- Danielian, P.S., Muccino, D., Rowitch, D.H., Michael, S.K. and McMahon, A.P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr. Biol.* **8**, 1323-1326

- Davies, A.M., Lee, K.F. and Jaenisch, R. (1993). p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins. *Neuron* **11**, 565-574
- DeFreitas, M.F., McQuillen, P.S. and Shatz, C. (2001). A novel p75NTR signaling pathway promotes survival, not death of immunopurified neocortical subplate neurons. *J. Neurosci.* **21(14)**, 5121-5129
- Della-Bianca, V., Rossi, F., Armato, U., Dal-Pra, I., Costantini, C., Perini, G., Politi, V. and Della Valle, G. (2001). Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126). *J. Biol. Chem.* **276**, 38929-38933
- Dent, E.W., Barnes, A.M., Tang, F. and Kalil, K. (2004). Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton. *J. Neurosci.* **24(12)**, 3002-3012
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E., Mosialos, G. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biol.* **16**, 7098-7108
- DiStefano, P.S., Chelsea, D.M., Schick, C.M. and McKelvy, J.F. (1993). Involvement of a metalloprotease in low-affinity nerve growth factor receptor truncation: inhibition of truncation in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* **13**, 2405-2414
- 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
- Dostaler, S.M., Ross, G.M., Myers, S.M., Weaver, D.F., Ananthanarayanan, V. and Riopelle, R.J. (1996). Characterization of a distinctive motif of the low molecular weight neurotrophin receptor that modulates NGF-mediated neurite growth. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 870-879
- Duckett, C.S., Gedrich, R.W., Gilfillan, M.C. and Thompson, C.B. (1997). Induction of nuclear factor kappaB by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. *Mol. Cell Biol.* **17**, 1535-1542
- Dufresne, A.M., and Smith, R.J. (2005). The adapter protein GRB10 is an endogenous negative regulator of insulin-like growth factor signaling. *Endocrinology* **146(10)**, 4399-4409
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R.A., Bulfone, A., Kowalczyk, T. and Hevner, R.F. (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J. Neurosci.* **25**, 247-251
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156
- Fahnestock, M., Michalski, B., Xu, B. and Coughlin, M.D. (2001). The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol. Cell. Neurosci.* **18**, 210-220
- Fainzilber, M., Smit A.B., Syed, N.I., Wildering, W.C., Hermann, P.M., Van der Schors, R.C., Jiménez, C., Li, K.W., van Minnen, J., Bulloch, A.G.M., Ibanez, C.F. and Geraerts, W.P. (1996). CRNF, a molluscan neurotrophic factor that interacts with the p75 neurotrophin receptor. *Science* **274**, 1540-1543

- Fan, G., Egles, C., Sun, Y., Minichiello, L., Renger, J.J., Klein, R., Liu, G. and Jaenisch, R. (2000). Knocking the NT4 gene into the BDNF locus rescues BDNF deficient mice and reveals distinct NT4 and BDNF activities. *Nat. Neurosci.* **3**, 350-357
- Fariñas, I., Wilkinson, G.A., Backus, C., Reichardt, L.F. and Patapoutian, A. (1998). Characterization of neurotrophin and Trk receptor functions in developing sensory ganglia: Direct NT-3 activation of TrkB neurons in vivo. *Neuron* **21**, 325-334
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D. and Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 752-757.
- Finch, B.W. and Ephrussi, B. (1967). Retention of multiple developmental potentialities by a mouse testicular teratocarcinoma during prolonged culture in vitro and their extinction upon hybridization with cells of permanent lines. *PNAS* **57**, 615-621
- Flores, I., Benetti, R. and Blasco, M.A. (2006). Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Curr. Op. Cell Biol.* **18**, 254-260
- 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. (2000). NRAGE and the cycling side of the neurotrophin receptor p75. *TINS* **23(12)**, 591-592
- Frade, J.M. (2005). Nuclear translocation of the p75 neurotrophin receptor cytoplasmic domain in response to neurotrophin binding. *J. Neurosci.* **25(6)**, 1407-1411
- Friedman, W.J. (2000). Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J. Neurosci.* **20**, 6340-6346
- Gage, F.H., Batchelor, P., Chen, K.S., Chin, D., Higgins, G.A., Koh, S., Deputy, S., Rosenberg, M.B., Fischer, W. and Bjorklund, A. (1989). NGF receptor reexpression and NGF-mediated cholinergic neuronal hypertrophy in the damaged adult neostriatum. *Neuron* **2**, 1177-1184
- Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-1438
- Garcia, A.D.R., Doan, N.B., Imura, T., Bush, T.G. and Sofroniew, M. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* **7(11)**, 1233-1240
- Gardner, R.L. and Brook, F.A. (1997). Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *Int. J. Dev. Biol.* **41**, 235-243
- Gargano, N., Levi, A. and Alema, S. (1997). Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA receptors. *J. Neurosci.* **50**, 1-12
- Ge, S., Goh, E.L.K., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G. and Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* **439(7076)**, 589-593

- Gehler, S., Gallo, G., Veien, E. and Letourneau, P.C. (2004). p75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity. *J. Neurosci.* **24(18)**, 4363-4372
- Giel, K.M., Rohrig, S., Bonatz, H., Gutjahr, M., Leiner, B., Bartke, I., Yan, Q., Reichardt, L.F., Backus, C., Welcher, A.A., Dethleffsen, K., Mestres, P. and Meyer, M. (2001). Endogenous brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 antagonistically regulate survival of axotomized corticospinal neurons *in vivo*. *J. Neurosci.* **21**, 3492-3502
- Giuliani, A., D'Intino, G., Paradisi, M., Giardino, L. and Calzà, L. (2004). p75NTR-immunoreactivity in the subventricular zone of adult male rats: expression by cycling cells. *J. Mol. Hist.* **35**, 749-758
- Greferath, U., Bennie, A., Kourakis, A., Bartlett, P.F., Murphy, M. and Barrett, G.L. (2000). Enlarged cholinergic forebrain neurons and improved spatial learning in p75 knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 885-893
- Gu, Y., Oyama, F. and Ihara, Y. (1996). Tau is widely expressed in rat tissues. *J. Neurochem.* **67(3)**, 1235-1244
- Guan, K., Chang, H., Rolletschek, A. and Wobus, A.M. (2001). Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell Tissue Res.* **305**, 171-176
- Guan, K., Nayernia, K., Maier, L.S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J.H., Nolte, J., Wolf, F., Li, M., Engel, W. and Hasenfuss, G. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* **440**, 1199-1203
- Guo, C., Yang, W. and Lobe, C.G. (2002). A Cre recombinase transgene with mosaic, widespread tamoxifen-inducible action. *Genesis* **32**, 8-20.
- Gutierrez, H., Hale, V.A., Dolcet, X. and Davies, A. (2005). NF- κ B signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* **132(7)**, 1713-1726
- Hamanoue, M., Middleton, G., Wyatt, S., Jaffray, E., Hay, R.T. and Davies, A.M. (1999). p75-mediated NF- κ B activation engages the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol. Cell. Neurosci.* **14**, 28-40
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T. and Hirokawa, N. (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking *tau* protein. *Nature* **369**, 488-491.
- Harper, J.M., Krishnan, C., Darman, J.S., Deshpande, D.M., Peck, S., Shats, I., Backovic, S., Rothstein, J.D. and Kerr, D.A. (2004). Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons *in vitro* and in motoneuron-injured adult rats. *PNAS* **101(18)**, 7123-7128
- Harrington, A.W., Leiner, B., Blechschmitt, C., Arevalo, J.C., Lee, R., Morl, K., Meyer, M., Hempstead, B.L., Yoon, S.O. and Giehl, K.M. (2004). Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *PNAS* **101**, 6226-6230
- Hawkes, C. and Kar, S. (2004). The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* **44**, 117-140

- Hawkes, C., Jhamandas, J.H., Harris, K.H., Fu, W., MacDonald, R.G. and Kar, S. (2006). Single transmembrane domain insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor regulates central cholinergic function by activating a G-protein-sensitive, protein kinase C-dependent pathway. *J. Neurosci.* **26(2)**, 585-596
- Hayashi, S. and McMahon, P. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental Biology* **244**, 305-318.
- He, X.L. and Garcia, K.C. (2004). Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* **304**, 870-875
- 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
- Heuer, J.G., Fatemie-Nainie, S., Wheeler, E. and Bothwell, M. (1990). Structure and development of the chicken NGF receptor. *Dev. Biol.* **137**, 287-304
- Hille-Rehfeld, A. (1995). Mannose-6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochem. Biophys. Acta* **1241**, 177-194
- Hirai, S., Cui, D.F., Miyata, T, Ogawa, M., Kiyonari, H, Suda, Y., Aizawa, S., Banba, Y. and Ohno, S. (2006). The c-Jun N-Terminal kinase activator dual leucine zipper kinase regulates axon growth and neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* **26(46)**, 11992-12002
- Horton, A., Laramée, G., Wyatt, S., Shih, A., Winslow, J. and Davies, A.M. (1997). NGF binding to p75 enhances the sensitivity of sensory and sympathetic neurons to NGF at different stages of development. *Mol. Cell. Neurosci.* **10**, 162-172
- Hosomi, S., Yamashita, T., Aoki, M. and Tohyama, M. (2003). The p75 receptor is required for BDNF-induced differentiation of neural precursor cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **301**, 1011-1015.
- Huang, E.J. and Reichardt, L.F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 677-736
- Huber, L.J., and Chao, M.V. (1995). A potential interaction of p75 and *trkA* NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation. *J. Neurosci. Res.* **40**, 557-563
- Imai, T., Jiang, M., Chambon, P. and Metzger, D. (2001). Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor α mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT²) in adipocytes. *PNAS* **98**, 224-228
- Imura, T., Kornblum, H.I. and Sofroniew, M.V. (2003). The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not from early embryonic forebrain expresses GFAP. *J. Neurosci.* **23**, 2824-2832
- Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.-M., Xiao, J.-H., Chambon, P. and Metzger, D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ERT¹ and Cre-ERT². *Nucleic Acid Res.* **27**, 4324-4327.

- Ivanova, N.B. Dimos, J.T., Schaniel, C., Hackney, J.A., Moore, K.A. and Lemischka, I.R. (2002). A stem cell molecular signature. *Science* **298**, 601-604
- 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., Taniuchi, M. and DiStefano, P.S. (1988). Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends Neurosci.* **11**, 299-304
- Jung, K.M., Tan, S., Landman, N., Petrova, K., Murray, S., Lewis, R., Kim, P.K., Kim, D.S., Ryu, S.H., Chao, M.V. and Kim, T.W. (2003). Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 42161-42169
- Kamada, M., Li, R.-Y., Hashimoto, M., Kakuda, M., Okada, H., Koyanagi, Y., Ishizuka, T. and Yawo, H. (2004). Intrinsic and spontaneous neurogenesis in the postnatal slice culture of rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 2499-2508
- Kanamoto, T., Mota, M., Takeda, K., Rubin, L.L., Miyazono, K., Ichijo, H. and Bazenet, C.E. (2000). Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons. *Mol. Cell Biol.* **20**, 196-204
- Kanning, K.C., Hudson, M., Amieux, P.S., Wiley, J.C., Bothwell, M. and Schecterson, L.C. (2003). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J. Neurosci.* **23**, 5425-5436
- 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
- Kellendonk, C., Tronche, F., Casanova, E., Anlag, K., Opherk, C. and Schütz, G. (1999). Inducible site-specific recombination in the brain. *J. Mol. Biol.* **285**, 175-182.
- Khursigara, G., Orlinick, J.R. and Chao, M.V. (1999). Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J. Biol. Chem.* **274**, 2597-2600
- Khursigara, G., Bertin, J., Yano, H., Moffett, H., DiStefano, P.S. and Chao, M.V. (2001). Klein, R., Conway, D., Parada, L.F. and Barbacid, M. (1990). The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* **61**, 647-656
- Kim, J.H., Auerbach, J.M., Rodriguez-Gomez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K. and McKay, R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**, 50-56
- Klein, R., Conway, D., Parada, L.F. and Barbacid, M. (1990). The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* **61**, 647-656
- Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E. and Barbacid, M. (1991). The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* **65**, 189-197
- Kleinsmith, L.J. and Pierce, G.B. (1964). Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* **24**, 1544-1552

- Kokaia, Z., Andberg, G., Martinez-Serrano, A. and Lindvall, O. (1998). Focal cerebral ischemia in rats induces expression of p75 neurotrophin receptor in resistant striatal cholinergic neurons. *Neuroscience* **84**, 1113-1125
- Kornfeld, S. (1992). Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 307-330
- Kosodo, Y., Röper, K., Haubensak, W., Marzesco, A.-M., Corbeil, D. and Huttner, W.B. (2004). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J.* **23(11)**, 2314-2324
- Kriegstein, A.R. and Götz, M. (2003). Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia* **43**, 27-43
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M. and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**, 1427-1429.
- Lau, M.M., Stewart, C.E., Liu, Z., Bhatt, H., Rotwein, P., Stewart, C.L. (1994). Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev.* **8**, 2953-2963
- Laywell, E.D., Rakic, P., Kukekov, V.G., Holland, E.C. and Steindler, D.A. (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *PNAS* **97**, 13883-13888
- Lee, K.F., Li, E., Huber, L.J., Landis, S.C., Sharpe, A.H., Chao, M.B. 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
- Leone, D.P., Genoud, S., Atanasoski, S., Grausenburger, R., Berger, P., Metzger, D., Macklin, W.B., Chambon, P. and Suter, U. (2003). Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Cell. Neurosci.* **22(4)**, 430-440
- Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R., and Smith, A. (1998). Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr. Biol.* **8**, 971-974
- Linggi, M.S., Burke, T.L., Williams, B.B. and Harrington, A., B.D. (2005). Neurotrophin receptor interacting factor (NRIF) is an essential mediator of apoptotic signaling by the p75 neurotrophin receptor. *J. Biol. Chem.* **280**, 13801-13808
- Locksley, R.M., Killeen, N. and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501
- LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S.Ch., Zinkowski, R.P., Binder, L.I. (1995). Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *PNAS* **92**, 10369-10373.
- Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B and Smith, A.G. (2006). Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biology* **4(5)**, 805-818
- Lowry, K.S., Murray, S.S., McLean, C.A., Talman, P., Mathers, S., Lopes, E.C. and Cheema, S.S. (2001). A potential role for the p75 low-affinity neurotrophin receptor in spinal motor

neuron degeneration in murine and human amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral. Scler. Other Motor Neuron Disord.* **2**, 127-134

Luo, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 173-80

Maggirvar, S.B., Sarmiere, P.D., Dewhurst, S. and Freeman, R.S. (1998). Nerve growth factor-dependent activation of NF- κ B contributes to the survival of sympathetic neurons. *J. Neurosci.* **18(24)**, 10356-10365

Mahadeo, D., Kaplan, L., Chao, M.C. and Hempstead, B.L. (1994). High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association receptors. *J. Biol. Chem.* **269**, 6884-6891

Majdan, M., Lachance, C., Gloster, A., Aloyz, R., Zeindler, C., Bamji, S., Bhakar, A., Belliveau, D., Fawcett, J., Miller F.D. and Barker, P.A. (1997). Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* **17**, 6988-6998

Malatesta, P., Hack, M.A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F. and Götz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: Regional difference in radial glia fate. *Neuron* **37**, 751-764

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS* **78**, 7634-7638

Martin, G.R. and Evans, M.J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *PNAS* **72**, 1441-1445

Mattson, M.P., Culmsee, C., Yu, Z.F. and Camandola, S. (2000). Roles of nuclear factor κ B in neuronal survival and plasticity. *J. Neurochem.* **74**, 443-456

McCarthy, J.V., Ni, J. and Dixit, V.M. (1998). RIP2 is a novel NF- κ B-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 16968-16975

McQuillen, P.S., DeFreitas, M.F., Zada, G. and Shatz, C. (2002). A novel role for p75NTR in subplate growth cone complexity and visual thalamocortical innervation. *J. Neurosci.* **22(9)**, 3580-3593

Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M. and Mann, M. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science* **278**, 860-866

Mi, S., Lee, X., Shao, Z., Thill, G., Ji, B., Relton, J., Levesque, M., Allaire, N., Perrin, S., Sands, B., Crowell, T., Cate, R.L., McCoy, J.M., Pepinsky, R.B. (2004). LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat. Neurosci.* **7**, 221-228

Middleton, G., Hamanoue, M., Enokido, Y., Wyatt, S., Pennica, D., Jaffray, E., Hay, R.T. and Davies, A.M. (2000). Cytokine-induced nuclear factor- κ B activation promotes the survival of developing neurons. *J. Cell Biol.* **148**, 325-332

Middlemas, D.S., Lindberg, R.A. and Hunter, T. (1991). trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: Evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 143-153

- Misson, J.P., Edwards, M.A., Yamamoto, M. and Caviness, V.S. (1988). Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **44**, 95-108
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T. and Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* **131**, 3133-3145
- Mufson, E.J. and Kordower, J.H. (1992). Cortical neurons express nerve growth factor receptors in advanced age and Alzheimer disease. *PNAS* **89**, 569-573
- Nagano T., Sato, M., Mori, Y., Du, Y., Takagi, H. and Tohyama, M. (1995). Regional distribution of messenger RNA encoding the insulin-like growth factor type 2 receptor in the rat lower brainstem. *Mol. Brain Res.* **32**, 14-24
- Nakai, Y., Irie, S. and Sato, T.A. (2000). Identification of IkappaBalpha as a substrate of Fas-associated phosphatase-1. *Eur. J. Biochem.* **267**, 7170-7175
- Nakano, H., Oshima, H., Chung, W., Williams-Abbott, L., Ware, C.F., Yagita, H. and Okumura, K. (1996). TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 14661-14667
- Nakano, K., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Moriyama, K., Yazaki, K., Hayashi, Y. and Kitamura, N. (2003). Cofilin phosphorylation and actin polymerization by NRK/NESK, a member of the germinal center kinase family. *Exp. Cell Res.* **287**, 219-227
- Naumann, T., Casademunt, E., Hollerbach, E., Hofmann, J., Dechant, G., Frotscher, M. and Barde, Y.-A. (2002). Complete deletion of the neurotrophin receptor p75NTR leads to long-lasting increases in the number of basal forebrain cholinergic neurons. *J. Neurosci.* **22**, 2409-2418
- Nichols, J., Chambers, I., Taga, T. and Smith, A. (2001). Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development* **128**, 2333-2339
- Niwa, H., Miyazaki, J. and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genetics* **24**, 372-376
- Norton, J.D. (2000). ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J. Cell Sci.*, **113**, 3897-3905
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemann, M. Schwarz, E., Willnow, T.E., Hempstead, B.L. and Petersen, C.M. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal death. *Nature* **427**, 843-848
- O'Connor, L., Huang, D.C., O'Reilly, L.A. and Strasser, A. (2000). Apoptosis and cell division, *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 257-263
- Oh, J.D., Chartisathian, K., Chase, T.N. and Butcher, L.L. (2000). Overexpression of neurotrophin receptor p75 contributes to the excitotoxin-induced cholinergic neuronal death in rat basal forebrain. *Brain Res.* **853**, 174-185
- Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A.C., Segal, M. and McKay, R.D. (1996). Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech. Dev.* **59**, 89-102

- Pavlidis, P. (2003). Using ANOVA for gene selection from microarray studies of the nervous system. *Methods* **31**, 282-289
- Persson, H., Ayer-LeLievre, C., Soder, O., Villar, M.J., Metsis, M., Olson, L., Ritzén, M. and Hokfelt, T. (1990). Expression of β -nerve growth factor receptor mRNA in Sertoli cells downregulated by testosterone. *Science* **247**, 704-707
- Peschanski, M. (2001). 10 years of substitution therapy for neurodegenerative diseases using fetal neuron grafts: a positive outcome but with questions for the future. *J. Soc. Biol.* **195**, 51-55
- Pizzi, M., Goffi, F., Boroni, F., Benarese, M., Perkins, S.E., Liou, H.C. and Spano, P. (2002). Opposing roles for NF-kappa B/Rel factors p65 and c-Rel in the modulation of neuron survival elicited by glutamate and interleukin-1beta. *J.Biol.Chem* **277**, 20717-20723
- Plachta, N., Bibel, M., Tucker, K.L. and Barde, Y.-A. (2004). Developmental potential of defined neural progenitors derived from mouse embryonic stem cells. *Development* **131(21)**, 5449-5456
- Plachta, N., Annaheim, C., Bissière, S., Lin, S., Rüegg, M., Hoving, S., Müller, D., Poirier, F., Bibel, M. and Barde, Y.-A. (2007). Identification of a lectin causing the degeneration of neuronal processes using engineered embryonic stem cells. *Nat. Neurosci.* **10(6)**, 712-719
- Rabidazeh, S., Oh, J., Zhong, L.T., Jang, Y., Bitler, C.M., Butcher, L.L., Bredesen, D.E. (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* **261(5119)**, 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
- Rakic, P. (2003). Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia* **43**, 19-32
- Ramalho,-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R.C. and Melton, D.A. (2002). 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* **298**, 597-600
- Ramos, F.J., Langlais, P.R., Hu, D., Dong, L.Q. and Liu, F. (2006). Grb10 mediates insulin-stimulated degradation of the insulin receptor: a mechanism of negative regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **290**, E1262-E1266
- Rattenholl, A., Lilie, H., Grossmann, A., Stern, A., Schwarz, E. and Rudolph, R. (2001). The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3296-3303
- Rattenholl, A., Ruoppolo, M., Flagiello, A., Monti, M., Vinci, F., Marino, G., Lilie, H., Schwarz, E. and Rudolph, R. (2001). Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *J. Mol. Biol.* **305**, 523-533
- Rende, M., Provenzano, C. and Tonali, P. (1993). Modulation of low-affinity nerve growth factor receptor in injured adult rat spinal cord motoneurons. *J. Comp. Neurol.* **338**, 560-574
- Renoncourt, Y., Carroll, P., Filippi, P., Arce, V. and Alonso, S. (1998). Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons and interneurons. *Mech. Dev.* **79**, 185-197

- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A. and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* **18**, 399-404
- Ridley, A.J. (2000) Rho. In: Hall A. (Ed.) GTPases. *Frontiers in Molecular Biology* (24), IRL Press at Oxford University Press
- 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
- Rösch, H., Schweigreiter, R., Bonhoeffer, T., Barde, Y.-A. and Korte, M. (2005). The neurotrophin receptor p75^{NTR} modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *PNAS* **102(20)**, 7362-7367
- 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
- Rüschenschmidt, C., Koch, P.G., Brüstle, O. and Beck, H. (2005). Functional properties of ES-derived neurons engrafted into the hippocampus of adult normal and chronically epileptic rats. *Epilepsia* **46(S5)**, 174-183
- Salama-Cohen, P., Arévalo, M.-Á., Meier, J., Grantyn, R. and Rodríguez-Tébar, A. (2005). NGF controls dendrite development in hippocampal neurons by binding to p75^{NTR} and modulating the cellular targets of Notch. *Mol. Biol. Cell* **16**, 339-347
- Salama-Cohen, P., Arévalo, M.-Á., Grantyn, R. and Rodríguez-Tébar, A. (2006). Notch and NGF/p75^{NTR} control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurones through neurogenin 3. *J. Neurochem.* **97**, 1269-1278
- 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
- Sariola, H., Saarma, M., Sainio, K., Arumäe, 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
- Sasaki, Y., Derudder, E., Hobeika, E., Pelanda, R., Reth, M., Rajewsky, K. and Schmidt-Suprian, M. *Immunity* **24**, 729-739
- Seibler, J., Zevnik, B., Küter-Luks, B., Andreas, S., Kern, H., Hennek, T., Rode, A., Heimann, C., Faust, N., Kauselmann, G., Schoor, M., Jaenisch, R., Rajewsky, K., Kühn, R., and Schwenk, F. (2003). Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acid Res.* **31(4 e12)**, 1-8
- Sen, R. and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705-716
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., McEwen, B.S. and Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci* **21**, 7153-7160

- Shou, Y., Li, N., Li, L., Borowitz, J.L and Isom, G.E. (2002). NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-X(S) and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis. *J.Neurochem.* **81**, 842-852
- Simpson, E.M., Linder, C.C., Sargent, E.E., Davisson, M.T., Mobraaten, L.E. and Sharp, J.J. (1997). Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nature genetics* **16**, 19-27.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M. and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-690
- Smith, A. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 435-462
- Soilu-Hanninen, 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
- Solter, D., Damjanov, I. and Skreb, N. (1970). Ultrastructure of mouse egg-cylinder. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* **132**, 291-198
- Song, M.S. and Posse de Chaves, E.I. (2003). Inhibition of rat sympathetic neuron apoptosis by ceramide. Role of p75NTR in ceramide generation. *Neuropharmacology* **45**, 1130-1150
- Spivakoc, M. and Fisher, A.G. (2007). Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat. Rev. Genetics* **8**, 263-271
- Stevens, L.C. (1970). The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.*, **121**, 364-382
- Stoppini, L., Buchs, P.-A. and Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci.* **37(2)**, 173-182
- Susen, K., Heumann, R., Blochl, A. (1999). Nerve growth factor stimulates MAPK via the low affinity receptor p75 (LNTR). *FEBS Lett.* **463**, 231-234
- Tanaka, S., Sekino, Y., Shirao, T. (2000). The effects of neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor on cerebellar granule cell movement and neurite extension in vitro. *Neuroscience* **97**, 727-734
- Taniura, H., Taniguchi, N., Hara, M. and Yoshikawa, K. (1998). Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J. Biol. Chem.* **273(2)**, 720-728
- Tararuk, T., Östman, N., Li, W., Biörkblom, B, Padzik, A., Zdrojewska, J., Hongisto, V., Herdegen, T., Konopka, W., Courtney, M.J. and Coffey, E. (2006) JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *J. Cell Biol.* **173(2)**, 265-277
- Tchepakov, M., Bronfman, F.C., Conticello, S.G., Vaskovsky, A., Levy, Z., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Arenas, E. and Fainzilber, M. (2002). The p75 neurotrophin receptor interacts with multiple MAGE proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 49101-49104

- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J. Marshall, V.S. and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147
- Tucker, K.L., Meyer, M. and Barde, Y.-A. (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nature neuroscience* **4(1)**, 29-37.
- Tuffereau, C., Benejean, J., Blondel, D., Kieffer, B., and Flamand, A. (1998). Low-affinity nerve-growth factor receptor (p75^{NTR}) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.* **14**, 7250-7259
- Vanier, M.-T., Neuville, P., Michalik, L. and Launay, J.-F. (1998). Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *J of Cell Sci.* **111(Pt10)**, 1419-1432.
- Vilar, M, Murillo-Carretero, M., Mira, H., Magnusson, K., Besset, V. and Ibáñez, C.I. (2005). Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle. *EMBO J.* **25(6)**, 1219-1230
- von Schack, D., Casademunt, E., Schweigreiter, R., Meyer, M., Bibel, M. and Dechant, G. (2001). Complete ablation of the neurotrophin receptor p75^{NTR} causes defects both in the nervous and the vascular system. *Nat. Neurosci.* **4**, 977-978
- Vooijs, M., Jonkers, J. and Berns, A. (2001). A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep.* **2**, 292-297
- Walsh, G.S., Krol, K.M., Crutcher, K.A. and Kawaja, M.D. (1999). Enhanced neurotrophin-induced axon growth in myelinated portions of the CNS in mice lacking the p75 neurotrophin receptor. *J. Neurosci.* **19**, 4155-4168
- Wang, K.C., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Segal, R. and He, Z. (2002). p75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* **420**, 74-78
- Weber, P., Metzger, D. and Chambon, P. (2001). Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in the mouse brain. *Eur. J. of Neurosci.* **14(11)**, 1777-1783
- Wehrmann, T., He, X., Raab, B., Dukipatti, A., Blau, H. and Garcia, C. (2007). Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron* **53**, 25-38
- Wernig, M., Benninger, F., Schmandt, T., Rade, M., Tucker, K.L., Bussow, H., Beck, H. and Brüstle, O. (2004). Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons *in vivo*. *J. Neurosci* **24**, 5258-5268
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J.A. and Jessell, T.M. (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* **110**, 385-397
- Wiese, S., Metzger, F., Holtmann, B. and Sendtner, M. (1999). The role of p75^{NTR} in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Europ. J. Neurosci.* **11**, 1668-1676
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A. and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684-687

- Wong, S.T., Henley, J.R., Kanning, K.C., Huang, K.H., Bothwell, M. and Poo, M.M. (2002). A p75 (NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat. Neurosci.* **5**, 1302-1308
- Wyatt, S., Shooter, E.M. and Davies, A.M. (1990). Expression of the NGF receptor gene in sensory neurons and their cutaneous targets prior to and during innervation. *Neuron* **4**, 421-427
- Xie, Y., Yao, Z., Chai, H., Wong, W.-M. and Wu, W. (2003). Expression and role of low-affinity nerve growth factor receptor (p75) in spinal motor neurons of aged rats following axonal injury. *Dev. Neurosci.* **25**, 65-71
- Xu, B., Gottschalk, W., Chow, A., Wilson, R.I., Schnell, E., Zang, K., Wang, D., Nicoll, R.A., Lu, B. and Reichardt, L.F. (2000). The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *J. Neurosci.* **20**, 6888-6897
- Yaar, M., Zhai, S., Fine, R.E., Eisenhauer, P.B., Arble, B.L., Stewart, K.B. and Gilchrist, B.A. (2002). Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 7720-7725
- 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
- Yamashita, T., Higuchi, H., Tohyama, M. (2002). The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J. Cell Biol.* **121**, 139-148
- Yamashita, T. and Tohyama, M. (2003). The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat. Neurosci.* **6**, 461-467
- Yang, B., Slonimsky, J.D. and Birren, S.J. (2002). A rapid switch in sympathetic neurotransmitter release properties mediated by the p75 receptor. *Nat. Neurosci.* **5**, 539-545
- Yeiser, E.C., Rutkoski, N.J., Naito, A., Inoue, J. and Carter, B.D. (2004). Neurotrophin signaling through the p75 receptor is deficient in *traf6*^{-/-} mice. *J. Neurosci.* **24**, 10521-10529
- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I. and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-292
- 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
- Zagrebelsky, M., Holz, A., Dechant, G., Barde, Y.-A., Bonhoeffer, T. and Korte, M. (2005). The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **25(43)**, 9989-9999
- Zhao, J., Nassar, M.A., Gavazzi, I. and Wood, J.N. (2006). Tamoxifen-inducible NaV1.8-CreERT2 recombinase activity in nociceptive neurons of dorsal root ganglia. *Genesis* **44(8)**, 364-371
- Zwaka, T.P. and Thomson, J.A. (2005). A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development* **132(2)**, 227-233

Lebenslauf

Christine Annaheim
Bienenstrasse 65
4104 Oberwil
Tel.: 079 271 26 16
christine.annaheim@unibas.ch

Geboren: 03.08.1973
Zivilstand: geschieden
Nationalität: Schweiz

Ausbildung

Doktorarbeit, Neurobiologie, Universität Basel

- Arbeitsgruppe Prof. Yves-Alain Barde
- Titel der Arbeit: "Untersuchungen über die funktionelle Rolle des Neurotrophinrezeptors p75 basierend auf embryonalen Stammzellen der Maus."

Oktober 2002 -
August 2007

Studium der Humanmedizin, Universität Bern

- Promotion 2001 unter der Leitung von PD Paul Mohacsi, Inselspital Bern
- Titel der Arbeit: "Klinische und genetische Analyse einer hypertrophen Kardiomyopathie mit WPW und Sinusknoten- bzw. AV-Knotendysfunktion."

1993-1999

Matura Typus A

- Kantonsschule Olten, SO

1985-1993

Berufserfahrung

Praktikandenbetreuung European biotechnology, Perugia

Juni 2006 -
August 2006

Wissenschaftliche Tätigkeit, Kardiologie, Inselspital Bern

- Arbeitsgruppe PD Paul Mohacsi

September 2001 -
September 2002

Assistenz Ambulatorium für Herztransplantation, Inselspital Bern
Februar

Januar und
2002

Assistenzstelle Innere Medizin, Kantonsspital Olten

- Chefarzt Prof. Mauro Pirovino

Januar 2001 -
April 2001

Assistenzstelle Paraplegikerzentrum, Nottwil

- Chefarzt Dr. med. Dieter Michel

Januar 2000 -
Dezember 2000

Publikationen

Plachta, N., Annaheim, C., Bissière, S., Howing, S., Voshol, V., Bibel, M. and Barde, Y.-A. (2007).

Identification of a lectin causing the degeneration of neuronal processes using engineered embryonic stem cells. *Nat. Neurosci.* **10(6)**, 712-719

Sprachen

- Deutsch: Muttersprache
- Englisch: fließende Sprachkenntnisse
- Französisch: Grundkenntnisse

Referenzen

Prof. Yves-Alain Barde
Biozentrum
Klingelbergstrasse 50-70
CH-4056 Basel
Tel.: 061 267 22 30
yves.barde@unibas.ch

Prof. Paul Mohacsi
Leiter CHF/HTx-Ambulatorium
Inselspital
CH-3010 Bern
Tel.: 031 632 40 88
paul.mohacsi@insel.ch