

**Regulation der Endozytose durch den Nerven-Wachstums-Faktor in
PC12-Zellen**

Von dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat-
genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biochemikerin Anneke Loos
geboren am 20.08.1971 in Hamburg

2003

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. R. Bauerfeind am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. M. Gästel) durchgeführt.

Referat: PD Dr. W. Müller

Korreferat: Prof. Dr. E. Ungewickell

Tag der Promotion: 21.01.2003

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf folgenden Tagungen vorgestellt:

First Joint French-German Congress on Cell Biology, Strasbourg, November 2001:

A.Loos, R.Bauerfeind

Nerve growth factor-induced lamellipodia formation in neuroendocrine cells.

B. Ludewig, B. Pfander, A. Loos, F. Ullrich, C.Schnatwinkel, R.Bauerfeind

Phosphorylation of cytosolic proteins implicated in clathrin-mediated endocytosis is stimulated by nerve growth factor.

ELSO, Nice, June 2002, Gordon Conference, June/July 2002 :

A. Loos und R.Bauerfeind

Nerve growth factor-induced macropinocytosis of cell surface receptors in PC12 cells.

Zusammenfassung

Der Nerven-Wachstums-Faktor (NGF) ist der Prototyp der Familie der Neurotrophine, die notwendig für das Überleben und die Differenzierung von Nervenzellen sind. Die Neurotrophine werden von postsynaptischen Zellen, die sich im ernierten Gewebe befinden sezerniert und binden an die Rezeptoren auf der Oberfläche der Präsynapse. Dabei ist der Rezeptor *trkA* spezifisch für NGF, während der p75-Neurotrophin-Rezeptor (p75NTR) alle Neurotrophine binden kann. Das NGF-Signal wird vermutlich durch Endozytose der Liganden-gebundenen Rezeptoren und durch axonale Endozytosevesikel in den Zellkörper transportiert, um dort die Transkription bestimmter Gene zu regulieren.

In dieser Arbeit wurde die Endozytose von NGF und die Regulation von Endozytose-Vorgängen durch NGF in PC12-Zellen untersucht. In biochemischen und morphologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass NGF die rezeptorvermittelte Endozytose von Transferrin erhöht. Dieses korrelierte mit einer gesteigerten Kolokalisation von internalisiertem Transferrin und Dextran, einem Marker für Makropinozytose. Die Stimulation von Lamellipodienbildung und Makropinozytose durch NGF konnte bei lebenden Zellen durch videomikroskopischen Experimente und bei fixierten Zellen durch Fluoreszenzfärbung beobachtet werden. Dieses spricht für die Hypothese, dass NGF zu einer Erhöhung der rezeptorvermittelten Endozytose von Transferrin durch Makropinozytose führt.

Internalisiertes, fluorochromiertes NGF konnte nach 30 Minuten in PC12-Zellen nachgewiesen werden. Die Endozytose der NGF-Rezeptoren *trkA* und p75NTR wurde durch rezeptoraktivierende und nicht-rezeptoraktivierende Antikörper, gerichtet gegen die extrazellulären Domänen der Rezeptoren untersucht. Während eine spezifische Endozytose von *trkA* nicht nachgewiesen werden konnte, wurde eine konstitutive Internalisierung von p75NTR gezeigt. Dabei konnte eine teilweise Kolokalisation von endozytiertem p75NTR mit einem Marker für frühe Endosomen (EEA1) und Dextran, aber nicht mit Caveolin-1, Transferrin oder ci-MP6R beobachtet werden. NGF erhöhte die p75NTR-Endozytose und führte zu einer Steigerung der Kolokalisation mit EEA1, während die Kolokalisation mit Dextran-positiven Punkten reduziert war. Möglicherweise führt die Bindung von NGF an *trkA* zu einer erhöhten Endozytose und Degradation von p75NTR.

Die Entdeckung, dass NGF Makropinozytose induziert wirft die Frage auf, ob der NGF-Rezeptor-Komplex möglicherweise seine Internalisierung durch Makropinozytose induziert und die Makropinosomen Vorstufen zu den axonalen Vesikeln sein könnten, die das NGF-Signal zum Kern transportieren.

Schlagworte: NGF, Endozytose, PC12

Abstract

Nerve growth factor (NGF) is the prototypic member of the neurotrophin family, which is essential for the differentiation and survival of neurons. Neurotrophins are secreted by postsynaptic and glial cells and bind to receptors at the surface of the presynapse. The trkA receptor is highly specific for NGF, while the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) is able to bind all neurotrophins. The NGF-signal is probably transported to the cell body by endocytosis and axonal transport of ligand-receptor-complexes.

The aim of this work was to analyse the endocytosis of NGF and the regulation of endocytosis by NGF in PC12 cells. Morphological and biochemical experiments revealed a NGF induced increase in receptor mediated transferrin uptake. After NGF stimulation endocytosed transferrin co-localised with dextran, a marker for macropinocytosis. NGF induced transient lamellipodia formation and stimulation of macropinocytosis, as shown by time lapse microscopy of living cells and fluorescence staining of fixed cells. Therefore I hypothesized that transferrin endocytosis after NGF stimulation was established through receptor mediated macropinocytosis.

Endocytosis of NGF was detected after 30 minutes internalisation in PC12 cells using fluorescently labelled protein. The endocytosis of the NGF receptors trkA and p75NTR was analysed by using receptor-activating and non-activating antibodies directed against the extracellular domains of the receptors. While no specific uptake of trkA was measured, a constitutive internalisation of p75NTR was detected. Endocytosed p75NTR co-localised in part with the early endosome antigen 1 (EEA1) and dextran, while co-localisation with transferrin, caveolin-1 or ci-M6PR did not occur. NGF stimulation leads to a significant increase in p75NTR endocytosis and co-localisation with EEA1, while the co-localisation with dextran decreased. One could speculate that the NGF induced stimulation of trkA leads to an increased internalisation and degradation of p75NTR.

The finding of the NGF induced macropinocytosis raises the question if macropinocytosis could be the uptake mechanism for the NGF receptor complex and if macropinosomes could be precursors for the vesicles transporting the NGF-signal to the cell body.

Keywords: NGF, Endocytosis, PC12

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	IV
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung.....	1
1.1. Der Nerven-Wachstums-Faktor.....	1
1.1.1. Signalübertragung durch den trkA-Rezeptor.....	2
1.1.2. Signaltransduktion des p75NTR.....	5
1.1.3. Interaktion der trkA- und p75Neurotrophin-Rezeptoren.....	8
1.1.4. Wie wird das NGF-Signal in Neuronen vermittelt?	11
1.2. Überblick über die verschiedenen Endozytose-Formen	12
1.2.1. Clathrin-vermittelte Endozytose.....	14
1.2.2. Caveolin-abhängige Endozytose	18
1.2.3. Makropinozytose	19
1.3. Endozytose von NGF.....	22
1.4. Ziele der Arbeit.....	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1. Material.....	25
2.1.1. Geräte	25
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien	27
2.1.3. Lösungen, Puffer und Medien	28
2.1.4. Antikörper	30
2.1.5. Kits	33
2.1.6. Enzyme.....	33
2.1.7. Molekulargewichtstandard	33
2.1.8. Oligonukleotide.....	34
2.1.9. Plasmide, Bakterienstämme und eukaryontische Zellen	34
2.2. Methoden.....	36
2.2.1. Zellkultur.....	36
2.2.2. Transfektion	37
2.2.3. Videomikroskopie	37
2.2.4. Internalisierungsexperimente	38
2.2.5. Biotinylierung von Oberflächenproteinen.....	40
2.2.6. Immunfluoreszenz-Färbung	41
2.2.7. PCR	41
2.2.8. Restriktionsverdau.....	42
2.2.9. Ligation	42
2.2.10. Transformation.....	42
2.2.11. Analyse der Klone nach Transformation von Ligationsansätzen in elektokompetenten Bakterien.....	43
2.2.12. Sequenzierung.....	44
2.2.13. Proteinexpression	44
2.2.14. Fluorochromierung von NGF.....	46
2.2.15. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAAGE).....	47
2.2.16. Silberfärbung.....	48
2.2.17. Westernblot	48
3. Ergebnisse.....	50
3.1. Untersuchung des Einflusses von NGF auf die Endozytose von Transferrin	50
3.1.1. Aufnahme von Transferrin-TMR in 4°C-Bindungsexperimenten in Abhängigkeit von NGF51	
3.1.2. Endozytose von rTransferrin in <i>pulse-chase</i> -Experimenten in Abhängigkeit von NGF.....	53
3.1.3. Einfluss von Bisindolylmaleimid-I, Cytochalasin D und PMA auf die rTransferrin-Endozytose	55
3.1.4. Untersuchung der I ¹²⁵ Transferrin-Endozytose in Abhängigkeit von NGF.....	58
3.1.4.1. Endozytose von I ¹²⁵ Transferrin in <i>pulse-chase</i> -Experimenten in Abhängigkeit von NGF	58
3.1.4.2. Kontinuierliche Aufnahme von I ¹²⁵ Transferrin in Abhängigkeit von NGF	60
3.2. Charakterisierung der NGF-induzierten Lamellipodienbildung.....	62
3.2.1. Untersuchung der Kinetik der NGF-induzierten Lamellipodienbildung an fixierten Zellen..	63

3.2.2. Untersuchung der NGF-induzierten Lamellipodienbildung lebender Zellen	65
3.2.3. Signaltransduktion der NGF-induzierten Lamellipodienbildung	67
3.2.3.1. Welcher NGF-Rezeptor aktiviert die Lamellipodienbildung ?.....	67
3.2.3.2. Untersuchung der PMA-induzierten Lamellipodienbildung	68
3.2.3.3. Einfluss von Bisindolylmaleimid-I, Cytochalasin D und Amilorid auf die NGF- bzw. PMA-induzierte Lamellipodienbildung	68
3.2.4. Lokalisation zellulärer Marker während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung.....	70
3.2.4.1. Lokalisation der NGF-Rezeptoren und der Mikrotubuli während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung	70
3.2.4.2. Veränderung des Phosphotyrosin-Signals während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung	71
3.2.4.3. Untersuchung der Lokalisation verschiedener an der Endozytose beteiligter Proteine während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung	72
3.3. Untersuchung der NGF-induzierten Makropinozytose in PC12-Zellen.....	73
3.3.1. Untersuchung von Makropinozytose-Vorgängen bei lebenden Zellen durch Videomikroskopie.....	74
3.3.1.1. Untersuchung des Einflusses von NGF auf GFP-transfizierte PC12-Zellen	74
3.3.1.2. Untersuchung des Einflusses von NGF auf FM1-43 gefärbte Zellen.....	75
3.3.2. Untersuchung von Makropinozytose an fixierten Zellen	76
3.3.2.1. Untersuchung der Dextran-Aufnahme in Abhängigkeit von NGF.....	78
3.3.2.2. Einfluss von Bisindolylmaleimid-I und Cytochalasin D auf die NGF-induzierte Erhöhung der Dextran-Aufnahme	79
3.3.2.3. Kolokalisation von Dextran-TMR und rTransferrin.....	83
3.4. Untersuchung der Endozytose von NGF und den NGF-Rezeptoren.....	85
3.4.1. Herstellung eines hbNGF-GFP-Fusionsproteins in <i>E.coli</i>	86
3.4.1.1. Klonierung und Expression von hbNGF	87
3.4.1.2. Isolierung des DsbA-hbNGF-Fusionsproteins aus dem periplasmatischen Raum von <i>E.coli</i> BL21Codon+	88
3.4.1.3. Klonierung und Expression eines hbNGF-GFP-Fusionsproteins	89
3.4.1.4. Isolierung des DsbA-hbNGF-GFP-Fusionsproteins aus dem periplasmatischen Raum von BL21Codon +.....	92
3.4.2. Fluorochromierung von hbNGF.....	93
3.4.2.1. Fluorochromierung von NGF mit aminoreaktiven Farbstoffen.....	95
3.4.2.2. Fluorochromierung von NGF mit dem thiolreaktiven Fluoreszenzfarbstoff Alexa488C ₅ - Maleimid.....	101
3.4.2.3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der Fluorochromierungsreaktionen	104
3.4.2.4. Endozytose von Alexa488C ₅ -Maleimid-markiertem NGF	106
3.4.3. Untersuchung der Endozytose von NGF durch Verwendung von anti-NGF-Antikörpern ..	107
3.5. Untersuchung der Endozytose der NGF-Rezeptoren trkA und p75NTR	108
3.5.1. Endozytose von Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von trkA	108
3.5.2. Zelluläre Lokalisation von trkA	110
3.5.3. Endozytose von Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von p75NTR.....	111
3.5.4. Zelluläre Lokalisation von p75NTR.....	113
3.5.5. Einfluss von NGF auf die Aufnahme von p75NTR-Antikörpern.....	113
3.5.6. Charakterisierung der p75NTR-Internalisierung.....	114
3.5.6.1. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit p75NTR	115
3.5.6.2. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und Caveolin-1-positiven Kompartimenten.....	116
3.5.6.3. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und Transferrin.....	116
3.5.6.4. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und EEA1-positiven Kompartimenten.....	117
3.5.6.5. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit ci-M6PR.....	118
3.5.6.6. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit Dextran.....	119
3.5.6.7. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit F-Aktin.....	120
4. Diskussion.....	121
4.1. Wirkung von NGF auf PC12-Zellen.....	121
4.1.1. Stimultation von Makropinozytose und Lamellipodienbildung durch PMA	123
4.1.2. Stimultation von Makropinozytose und Lamellipodienbildung durch NGF	126

4.1.3. Wirkung von NGF auf die Endozytose von PC12-Zellen.....	130
4.1.4. Mögliche Zusammenhänge zwischen Clathrin-vermittelter Endozytose und Aktin- vermittelten Prozessen	133
4.2. Endozytose von NGF und der NGF-Rezeptoren.....	135
4.2.1. Endozytose von NGF und trkA	135
4.2.2. Endozytose von p75NTR	139
4.2.3. Makropinozytose als möglicher Internalisierungsmechanismus von NGF.....	143
5. Literaturverzeichnis	146
Anhang I	164
Anhang II.....	253

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Akt	Serin/Threonin Kinase/ Proteinkinase B
ARF6	ADP-ribosylierender Faktor 6
Arp	<i>actin-related protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>Bcl-2/Bcl-x-associated death promotor</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bNGF	β -NGF
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
cpm	Zähleinheit pro Minute (counts per minute)
CTP	Cytidintriphosphat
d	2`-desoxy(ribo)-
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eigel-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherischias coli</i>
ECL	Enzymgekoppelte Chemilumineszenz
EDTA	Ethyendiamintetraacetat
EGF	Epidermis-Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykol-bis[β -aminoethylether]-N,N,N` ,N` - tetraessigsäure
Eps15	<i>epidermal growth factor pathway substrate 15</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	Foetales Kälberserum
G	Guanin
GAP-1	<i>growth factor receptor binding protein associated binder</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Grb-2	<i>growth factor receptor binding protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat

HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
hsc70	<i>heat shock cognate protein 70kDa</i>
I κ B	Inhibitor von κ B
IgG	Immunglobulin G
<i>in vitro</i>	im Modellsystem
<i>in vivo</i>	im Organismus
IPTG	Isopropyl- β --D-thiogalactosid
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoprotein geringer Dichte
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mNGF	Maus-NGF
NBT	Nitrotetrazoliumblau
NF κ B	<i>nuclear factor κB</i>
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>
nt	Nukleotide
N-WASP	<i>neural Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC12	<i>pheochromocytoma</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
s.	siehe
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Magnesiumchlorid
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminoethan
TTP	Thymidintriphosphat
v/v	Volumenprozent
vgl.	vergleiche
w/v	Gewichtsprozent

1. Einleitung

1.1. Der Nerven-Wachstums-Faktor

Der Nerven-Wachstums-Faktor (NGF) wurde als erster Vertreter der Familie der Neurotrophine entdeckt, zu der auch der *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und die Neurotrophine (NT)-3, -4/-5 gehören. Die verschiedenen Neurotrophine vermitteln das Überleben, Wachstum und Differenzierung aber auch Apoptose spezifischer Neuronenpopulationen.

NGF ist ein Homodimer und besteht aus zwei β -Untereinheiten, die miteinander nicht-kovalente Wechselwirkungen eingehen (Wiesmann et al., 1999). In manchen Spezies wird NGF als $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ Hexamer exprimiert, wobei die α und γ Untereinheiten nicht zur biologischen Aktivität beitragen (Bax et al., 1997).

Zielzellen von NGF sind sympathische Neuronen (Levi-Montalcini und Booker, 1960), cholinergische sympathische Neuronen (Landis et al., 1985), sensorische Neuronen (Johnson et al., 1980) und *adrenal medullary cells* (Aloe and Levi-Montalcini, 1979). Viele Experimente zur Wirkung von NGF wurden in PC12-Zellen durchgeführt, die bei NGF-Exposition einen neuronalen Phänotyp ausbilden (Greene and Tischler, 1976).

Während der Entwicklung des Nervensystems wirkt NGF als chemotaktischer Faktor (Tucker et al., 2001), der von den Zellen des zu enervierenden Gewebes sezerniert wird (Übersicht in Davies, 1994 Bothwell, 1995). NGF gewährleistet dort die Differenzierung und das Überleben von sympathischen und sensorischen Neuronen (Übersicht in Miller and Kaplan, 2001, Ginty and Segal, 2002). Zellen, die kein NGF bekommen, initiieren Apoptose und sterben ab (Miller et al., 2000, Oppenheim, 1991).

Neben seiner Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems reguliert NGF auch den Phänotyp von peripheren Neuronen über die gesamte Lebensdauer des Organismus (Thoenen, 1995, McAllister et al., 1999) und wirkt auf vom Knochenmark abstammenden Zellen, wobei letzteres auf eine Rolle bei der Immunabwehr hindeutet (Übersicht in Levi-Montalcini et al., 1995). Zudem wurde die Hypothese aufgestellt, dass in der Blutbahn zirkulierendes NGF als allgemeines Alarmsignal bei Stress oder Angst zur „Vorwarnung“ des Immunsystems dient (Übersicht in Levi-Montalcini et al., 1995).

Neurotrophine können an zwei verschiedene Rezeptoren binden. Ein Rezeptor ist ein Mitglied der Familie der *tropomyosin related kinases* (trk, Barbacid 1994, Kaplan and

Stephens, 1994) und der andere der p75-Neurotrophin-Rezeptor (p75NTR, Johnson et al., 1986, Radeke et al., 1987).

Die trk-Familie umfaßt in Säugetieren trkA, B und C (Überblick in Barbacid, 1994). Der zytoplasmatische Anteil der Rezeptoren ist relativ hoch konserviert und enthält eine Tyrosin-Kinase-Aktivität, weshalb die trk-Rezeptoren zu der Klasse der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen zählen. Durch unterschiedliche extrazelluläre Domänen werden die verschiedene Neurotrophine spezifisch und mit hoher Affinität gebunden: NGF bindet an trkA, BDNF und NT-4/5 an trkB und NT-3 an trkC, sowie mit geringerer Affinität an trkA oder B (Barbacid, 1994).

Die Aktivierung von trk vermittelt positive Signale, wie Überleben, Wachstum und Differenzierung der Neuronen, während p75NTR je nach zellulärem Kontext positive Signale übermittelt, aber auch Apoptose induzieren kann (Überblick in Hempstead, 2002, Kaplan and Miller, 2000, Miller and Kaplan, 2001)

Im Gegensatz zu den trk-Rezeptoren, die spezifisch von den jeweiligen Neurotrophinen gebunden werden, binden alle Neurotrophine mit nahezu gleicher, aber niedrigerer Affinität an p75NTR (Rodriguez-Tebar et al., 1990, Rodriguez-Tebar et al., 1992). Je nach Ligand wird dabei eine unterschiedliche Signaltransduktionskaskade ausgelöst (Carter et al., 1996).

p75NTR gehört zu der *tumor necrosis factor receptor* (TNFR)-Familie. Weitere bekannte Mitglieder sind z.B. Fas und der p55-TNF-Rezeptor. Charakteristisch für die TNF-Familie, deren Mitglieder keine katalytische Aktivität besitzen, ist eine sogenannte *death domain* (Todes-Domäne) im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors (Baker and Reddy, 1998, Ware et al., 1996). Die Rezeptoren werden durch Kontakt mit dem Liganden trimerisiert und vermitteln Apoptose (Baker and Reddy, 1998, Ware et al., 1996).

1.1.1. Signalübertragung durch den trkA-Rezeptor

Die Bindung von NGF führt zur Dimerisierung, Autophosphorylierung und Aktivierung von trkA (Klein et al., 1991, Kaplan et al., 1991, Meakin and Shooter, 1992, Jing et al., 1992). Der zytoplasmatischen Teil von trk-Rezeptoren enthält 10 konservierte Tyrosine, von denen 3 in der autoregulatorischen Schleife der Kinase-Domäne lokalisiert sind. Die Phosphorylierung dieser Tyrosine führt zu einer Aktivierung der Kinase und kann zusammen mit den anderen phosphorylierten Tyrosin-Resten durch die Bindung von

Adaptormolekülen zur Initiierung verschiedener Signalkaskaden beitragen (Papapoutian und Reichardt 2001).

Die größte Beachtung wurde bislang den Tyrosinen 490 und 785 geschenkt, die in der Kinase-Aktivierungsdomäne lokalisiert sind und deren Phosphorylierung zur Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) sowie zu der Ras-vermittelten Stimulation des Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt- und ERK/MAPK-Signaltransduktionsweges führt (Abbildung 1.1., Überblick in Patapoutian and Reichardt, 2001, Kaplan and Miller, 2000). Fünf von den verbleibenden sieben konservierten Tyrosinen scheinen am NGF-induzierten Neuriten-Wachstum beteiligt zu sein (Inagaki et al., 1995).

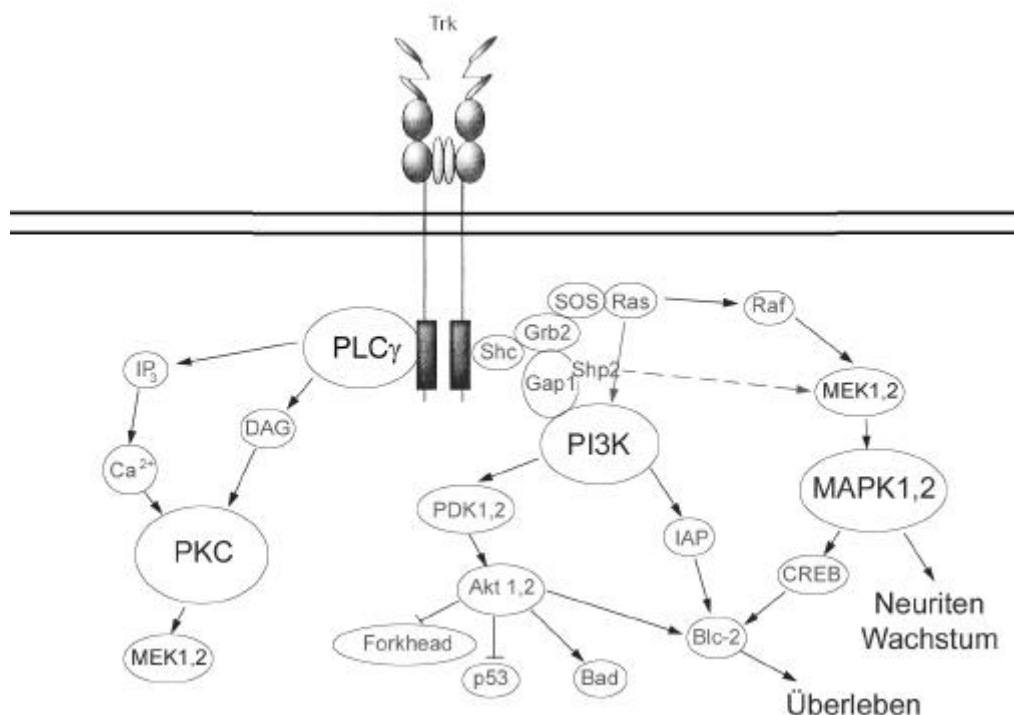


Abbildung 1.1.: Schematische Übersicht über die Signaltransduktionswege des aktivierten trkA-Rezeptors. (Die Referenzen sind dem Text zu entnehmen.)

Y490 wird nach der Phosphorylierung von Shc gebunden. Die Rekrutierung und Phosphorylierung von Shc führt zur Rekrutierung von Grb-2 und *son of Sevenless* (SOS), welches zu einer transienten Aktivierung von Ras führt (Xing et al., 1996). Ras aktiviert wiederum die PI3K und die MAPK/ERK-Signaltransduktionskaskade (Überblick in Patapoutian and Reichardt, 2001, Kaplan and Miller, 2000).

Die MAPK/ERK-Signaltransduktion hat in Neuronen viele Aufgaben, darunter die Vermittlung der synaptischen Formbarkeit, der Langzeit-Potenzierung und die Sicherung des Überlebens (Überblick in Grewal et al., 1999). Ob die Neurotrophin-Bindung zur Proliferation oder zur Differenzierung führt, scheint davon abhängig zu sein, ob eine

transiente oder anhaltende Aktivierung der ERK-Signaltransduktion stattfindet (Grewal et al., 1999). Im Hinblick auf die Sicherung des Überlebens scheint diese Kaskade die Aufgabe zu haben, die Neuronen vor dem Tod durch Verletzung oder toxische Substanzen zu schützen (Hetman et al., 1999, Anderson and Tolkovsky, 1999, Skaper et al., 1998, Shen et al., 1999). Dieses geschieht durch die Stimulierung der Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 (Aloyz et al., 1998, Michaelidis et al., 1996, Liu et al., 1999) oder dem *cAMP response element binding protein* (CREB, Bonni et al., 1999, Riccio et al., 1999). Die Beiteiligung der MEK/MAPK-Signalkaskade an der Aktivierung von CREB scheint dabei je nach Art der Neuronen unterschiedlich ausgeprägt zu sein (Du and Montminy, 1998, Bonni et al., 1999).

Nach Neurotrophin-Bindung interagiert Ras direkt mit der PI3K (Rodriguez-Viciano et al., 1994) und aktiviert die Kinase (Mazzoni et al., 1999, Klesse and Parada, 1998, (Rodriguez-Viciano et al., 1994). Alternativ kann PI3K auch durch die Bindung durch Gab-1, welches an den Shc/Grb2-Komplex bindet, aktiviert werden (Holgado-Madruga et al., 1997, Korhonen et al., 1999). Gab-1 kann ebenfalls die Bildung eines Shp-2 enthaltenden Proteinkomplexes fördern (Shi et al., 2000, Yamada et al., 1999), von dem man annimmt, dass er zu einer Verstärkung der ERK-Signaltransduktion führt.

Die Aktivierung der PI3K ist in den meisten Neuronen der wichtigste Weg zur Sicherung des Überlebens (Vaillant et al., 1999). Sie führt zur Bildung von verschiedenen an der 3' Position phosphorylierten Phosphoinositolen (Überblick in Wymann and Pirola, 1998). Diese können Proteine, die eine *pleckstrin homology* (PH)-Domäne enthalten, zur Plasmamembran rekrutieren (Thomas et al., 2002, Dowler et al., 2000, Lietzke et al., 2000). Dazu gehört auch die Serin/Threonin-Kinase Akt (oder Proteinkinase B, Crowder and Freeman, 1998, Dudek et al., 1997, Vaillant et al., 1999, Virdee et al., 1999, Andjelkovic et al., 1998, Ashcroft et al., 1999), und die 3-Phosphoinositol-abhängige Kinase (PDK), die Akt an der Plasmamembran aktiviert (Egawa et al., 2002, Carver et al., 2000).

Akt wirkt dabei auf mehrere apoptotische bzw. anti-apoptotische Proteine, die im Zusammenhang mit neuronalem Überleben stehen können: BAD, Bcl-2, p53 und Forkhead (Überblick in Kaplan and Miller, 2000, Datta et al., 1999). Durch die Phosphorylierung von I κ B wird der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert, welches das Überleben von Neuronen unterstützt (Middleton et al., 2000). Weitere Ziele der PI3K sind Proteine der *inhibitor of apoptosis* (IAP)-Familie (Wiese et al., 1999).

Die Phosphorylierung von Y785 führt zu der Rekrutierung der PLC γ , die durch trkA phosphoryliert und aktiviert wird. Die PLC γ hydrolysiert Phosphatidylinositole, was zur Bildung von Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-Triphosphat führt (IP₃ Überblick in Liu and Heckman, 1998). IP₃ induziert eine Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Levels, welches zur Aktivierung verschiedener Ca²⁺-abhängiger Signaltransduktionswege führt. Durch Diacylglycerin und die erhöhte Ca²⁺-Konzentration wird die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, die eine Rolle bei Prozessen wie Wachstum, Differenzierung und Transformation von Zellen spielt. Außerdem beeinflusst sie das Aktin-Zytoskelett, den Vesikel-Verkehr und die Genexpression (Überblick in Liu and Heckman, 1998, Keenan and Kelleher, 1998). In neuronalen Zellen wurde gezeigt, dass durch die PKC die ERK-Kaskade aktiviert wird, welche für das Neuriten-Wachstum verantwortlich ist (Corbit et al., 1999).

1.1.2. Signaltransduktion des p75NTR

Obwohl p75NTR trk-unabhängig anti-apoptotische Signale aussenden kann, wird seine wesentliche Rolle bei der Vermittlung von Apoptose gesehen, wie in vielen Beispielen gezeigt wurde (Übersicht in Miller and Kaplan, 2001, Sofroniew et al., 2001, Bibel and Barde, 2000, Dechant, 2001). Dabei stellte sich heraus, dass diese Antworten häufig Zelltyp-abhängig und auf bestimmte Entwicklungsphasen beschränkt sind. p75NTR-induzierte Apoptose kann ligandenabhängig und –unabhängig sein, wobei ersteres *in vivo* häufiger auftritt (Dechant and Barde, 1997, Bibel and Barde, 2000). Weiterhin scheint eine effektive p75NTR-vermittelte Apoptose nur mit Hilfe der Expression bestimmter Adaptor-Proteine (Lee et al., 2000 , vgl. Abbildung 1.2.) sowie einer inhibierten TrkA-Signaltransduktion möglich zu sein, deren anti-apoptotische Wirkung sonst die p75NTR-Signaltransduktion überdecken würde (Überblick in Majdan et al., 2001).

Wichtig für die p75NTR-Signaltransduktion scheint die Bildung von di-, tri- oder oligomeren p75NTR-Komplexen sein (Venkatakrisnan et al., 1991, (Carter et al., 1996, Grob et al., 1985, Meakin and Shooter, 1992), da gezeigt wurde, dass monomere und dimere p75NTR-Rezeptoren mit verschiedenen zellulären Proteinen unterschiedliche Wechselwirkungen eingehen können (Ye et al., 1999). In Abwesenheit von trkA wurden bei p75-Neurotrophin-Rezeptoren primärer Neuronen und verschiedener Zell-Linien Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität nachgewiesen (Dechant et al., 1997, Ross

et al., 1998). Dieses könnte im ursächlichem Zusammenhang mit der Mono- und Dimerenbildung von p75NTR stehen.

Die p75NTR-Aktivierung in Abwesenheit oder Funktionsunfähigkeit von *trkA* führt zur Apoptose, welches durch die Bindung einer Vielzahl von Adaptor-Proteinen vermittelt wird. Dazu gehören der *neurotrophin receptor interacting factor* (NRIF) ([Casademunt, 1999 #4155), der *p75-associated cell death executor* (NADE) (Mukai et al., 2000) und das *neurotrophin receptor interacting melanoma associated antigen homolog* (NRAGE) (Salehi et al., 2000). Die Bindung von NADE an p75NTR ist ligandenabhängig. (Park et al., 2000). Es wird diskutiert, dass die p75NTR-NADE-Interaktion zu einer Rekrutierung des 14-3-3-Proteins führt, wodurch die Caspase-3 aktiviert wird. Dieses führt zum Zelltod von Oligodendrozyten (Kimura et al., 2001).

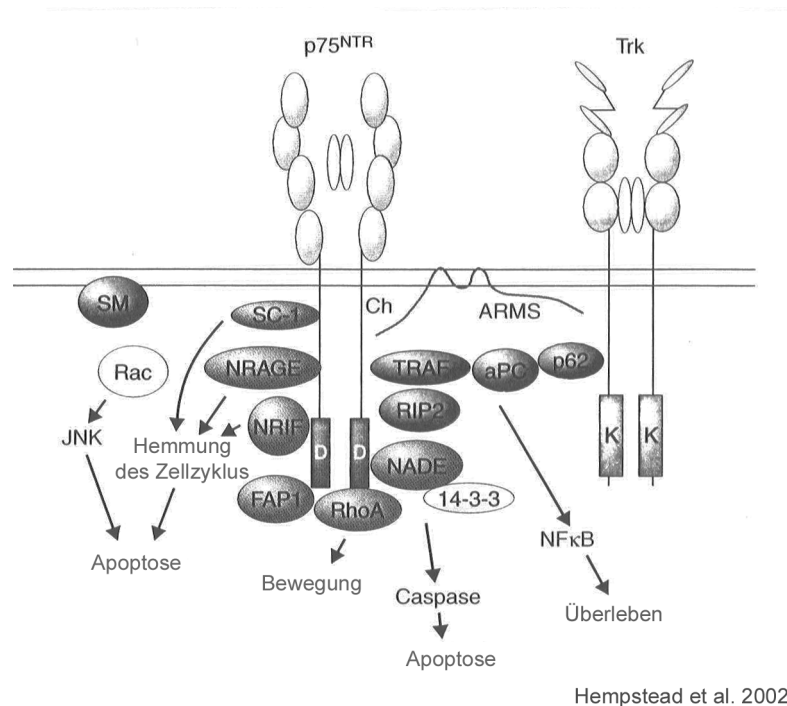


Abbildung 1.2.: p75NTR kann verschiedene Effekte vermitteln (modifiziert nach Hempstead, 2002).

Einer anderer Weg, über den p75NTR Apoptose induzieren kann, ist die Aktivierung der *c-jun N-terminal kinase* (JNK) (Casaccia-Bonnet et al., 1996, Bamji et al., 1998, Aloyz et al., 1998, Friedman, 2000). Obwohl keine direkte Bindung von p75NTR an Rac nachgewiesen werden konnte, wurde Rac als Effektor bei der p75NTR-vermittelten JNK-Aktivierung in Oligodendrozyten nachgewiesen (Harrington et al., 2002). JNK aktiviert zum einen *c-jun* und zum anderen den *p53/Bax*-Signaltransduktionsweg, die beide zur Apoptose führen (Überblick in Miller and Kaplan, 2001).

Weiterhin führt die ligandenabhängige Aktivierung der sauren Sphingomyelinase zur Sphingomyelin-Hydrolyse (Dobrowsky et al., 1994, Dobrowsky et al., 1995), wobei das dabei gebildete Ceramid ebenfalls zur pro-apoptotischen Signaltransduktion beiträgt (Dobrowsky et al., 1994, Hannun, 1994, Cassacia-Bonnet et al. 1995).

Der *schwann cell factor 1* (SC1) ist ein weiterer p75NTR-bindender Faktor, welcher im Zusammenhang mit der Induzierung des Zellzyklus-Arrestes stehen könnte (Chittka and Chao, 1999). Die *Fas-associated phosphatase 1* (FAP1) wurde über die Fähigkeit, an den „Todes-Rezeptor“ Fas zu binden identifiziert, wirkt hier aber eher als negativer Modulator für Apoptose (Irie et al., 1999). Im Gegensatz zu den Wechselwirkungen mit anderen Mitgliedern der TNFR-Familie führt die ligandenabhängige Bindung des *receptor-interacting-proteins* (RIP) an die sogenannte Typ-II-Todes-Domäne (*type II death domain*, D) von p75NTR zu anti-apoptotischen Signalen (Khursigara et al., 2001).

Der Nachweis der Bindung von TRAF6 an p75NTR und der Bindung von p62 an trkA (Wooten et al., 2001) führte zu der Hypothese, dass über einen Komplex aus TRAF6, einer atypischen PKC und p62 eine Verbindung zwischen trkA und p75NTR hergestellt werden könnte, welche zu einer koordinierten Regulation einer anti-apoptotischen NFκB-Signaltransduktion führen könnte.

Die Bindung von RhoA an p75NTR (Yamashita et al., 1999) steht vermutlich im Zusammenhang mit der Regulation der Axon-Bildung, da die durch Ligandenbindung induzierte Inaktivierung von RhoA zu einem erhöhten Neuriten-Wachstum führte.

Neurotrophine werden als Vorläufer-Proteine exprimiert, die entweder in dieser Form sekretiert oder intrazellulär durch bestimmte Proteasen geschnitten werden, wodurch das Neurotrophin freigesetzt wird (Mowla et al., 2001, Heymach and Shooter, 1995).

Die Entdeckung, dass sezernierte NGF-Vorläufer-Proteine, die nicht an trkA binden, eine höhere Affinität zu p75NTR als NGF haben und effektiver Apoptose induzieren (Lee et al., 2001), hat die physiologische Relevanz der NGF-induzierten pro-apoptotischen Effekte relativiert.

Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass die lokale Sekretion von Neurotrophinen oder deren Vorläufern über „Leben und Tod“ benachbarter Nervenzellen bestimmen. Bisher wurde allerdings nur für Pro-NGF eine p75NTR-Aktivierung nachgewiesen (Lee et al., 2001).

Neben Neurotrophinen wurden auch noch andere Liganden, die p75NTR binden, identifiziert (vgl. Abbildung 1.3.). Dazu gehört β-Amyloid, welches mit niedriger Affinität

(20nM) an p75NTR aber nicht an trkA bindet (Yaar et al., 2002, Yaar et al., 1997). β -Amyloid bindet Tri- und Monomere von p75NTR, wodurch Apoptose induziert wird (Troy et al., 2001).

Als weiterer p75NTR-Ligand wurde das aggregierte Prion-Protein-Fragment identifiziert, welches an der Vermittlung der neuronalen Apoptose beteiligt ist (Della-Bianca et al., 2001). Die Affinität für p75NTR ist dabei relativ hoch (5nM). Da aber NGF nur wenig kompetitiert wird, scheinen unterschiedliche Bindungsstellen für NGF und aggregierte Prion-Peptide vorzuliegen (Della-Bianca et al., 2001).

1.1.3. Interaktion der trkA- und p75Neurotrophin-Rezeptoren

Die Fähigkeit der Zelle, auf Neurotrophin-Signale zu antworten, wird durch die Zugänglichkeit der Rezeptoren an der Zelloberfläche bestimmt. Um die Anzahl der Rezeptoren in der Plasmamembran zu erhöhen, müssen diese entweder neu synthetisiert oder von einem interzellulären *pool* zur Plasmamembran recycelt werden (Eveleth and Bradshaw, 1988). Die Rekrutierung von intrazellulär gelagerten Rezeptoren wird im zentralen Nervensystem durch Membran-Depolarisation (Meyer-Franke et al., 1998) und in PC12-Zellen durch den Zellzyklus reguliert (Urdiales et al. 1998).

Die Signaltransduktion der Neurotrophin-Rezeptoren wird zudem durch die Dynamik zellulärer Prozesse, wie z.B. Veränderungen in der Lipid-Umgebung (Übersicht in Dobrowsky, 2000), Internalisierung und retrograden Transport (Übersicht in Miller und Kaplan, 2001, Ginty and Segal, 2002, Reynolds et al., 2000, Neet and Campenot, 2001, siehe auch Abschnitt 1.1.4.) reguliert.

Durch Messung der Neurotrophin-Bindung wurden niedrig- und hochaffine Bindungsstellen auf der Zelloberfläche ermittelt (Meakin and Shooter, 1992, Clary et al., 1994). Man nimmt an, dass Rezeptor-Dimerisierung im Zusammenhang mit der Bildung der hochaffinen Bindungsstelle steht. Dieses konnte welches für p75NTR-Homodimere in nur p75NTR-exprimierenden Zellen (Dechant et al., 1997, Ross et al., 1998), für trk-Homodimere in nur trk-exprimierenden Zellen (Squinto et al., 1991, Dechant et al., 1993) und für trk/p75NTR-Heterodimere in trk- und p75NTR-exprimierenden Zellen (Überblick in Dechant et al., 1994, Huang and Reichardt, 2001) gezeigt werden. Zur Bildung von Heterodimeren kann p75NTR je nach gebundenem Liganden mit allen drei trk-Rezeptoren

Wechselwirkungen eingehen (MacPhee and Barker, 1997, Bamji et al., 1998, Verdi et al., 1994, Barker and Shooter, 1994).

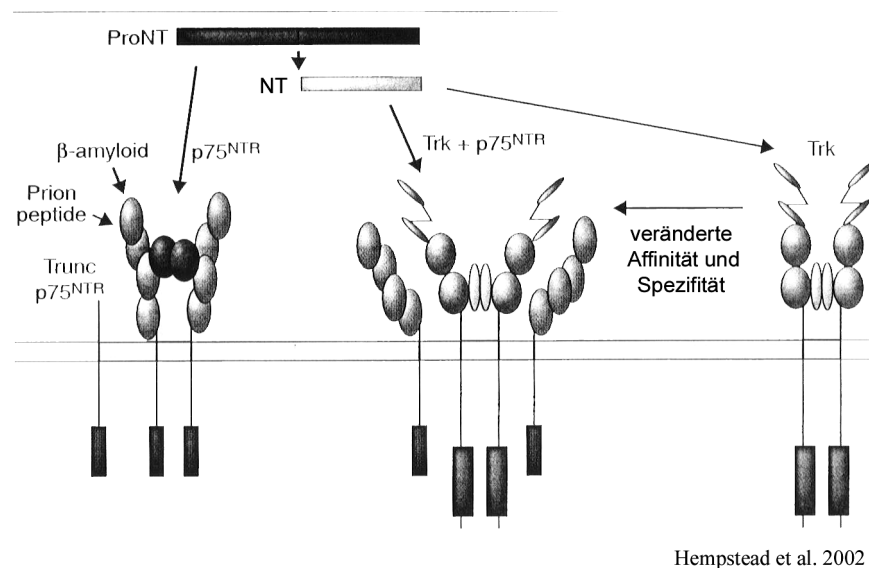


Abbildung 1.3.: Derzeitig anerkannte Modellvorstellung über die Bindung von Neurotrophinen und Pro-Neurotrophinen an trk- und p75-Neurotrophin-Rezeptoren. Die Abbildung wurde modifiziert nach Hempstead, 2002.

Bei der Koexpression von p75^{NTR} und trkA kann eine erhöhte Affinität von trkA für NGF und eine verstärkte trkA-Aktivierung durch NGF nachgewiesen werden (Verdi et al., 1994, Barker and Shooter, 1994, Mahadeo et al., 1994). Neben der Modulation der trkA-Affinität für NGF kann durch p75^{NTR} auch die Liganden-Spezifität von trkA beeinflusst werden (Esposito et al., 2001, Bibel et al., 1999, Mischel et al., 2001, Vesa et al., 2000, Zaccaro et al., 2001).

Die Bindung von NGF an p75^{NTR} ist nicht für die Bildung der hochaffinen Bindungsstelle erforderlich. Da TrkA direkt mit p75^{NTR} Wechselwirkungen eingehen kann (Bibel et al., 1999, Ross et al., 1996, Gargano et al., 1997, Huber and Chao, 1995, Ross et al., 1998), wurde ein Modellsystem konstruiert, in dem durch Bindung von p75^{NTR} an trkA eine Konformationsänderung in trkA induziert und so die hochaffine Bindungsstelle gebildet wird (vgl. Abbildung 1.3.). Kürzlich wurde eine Isoform von p75^{NTR} entdeckt, der die extrazelluläre Domäne fehlt und die keine Neurotrophine bindet (von Schack et al., 2001, Abbildung 1.3.). Diese kurze Isoform (s-p75^{NTR}) wird im Vergleich mit p75^{NTR} deutlich schwächer exprimiert. Die Rolle des s-p75^{NTR} ist bisher noch unklar, eine Wechselwirkung mit trkA und dessen Modulation wären aber denkbar (Esposito et al., 2001).

Neben direkten Wechselwirkungen können möglicherweise auch Proteine eine Brücke zwischen den Rezeptoren bilden, da das *ankyrin repeats membrane spanning molecule* (ARMS, Kong et al., 2001) und Caveolin-1 (Bilderback et al., 1997, Bilderback et al., 1999) jeweils trkA und den p75NTR binden kann.

Außerdem wurde gezeigt, dass trkA und p75NTR auf der Signaltransduktionsebene wechselwirken können. Während die p75NTR-induzierte pro-apoptotische Aktivierung von JNK (Yoon et al., 1998, Mazzoni et al., 1999, Aloyz et al., 1998, Chen et al., 2000, Kanamoto et al., 2000) und der Sphingomyelinase (Dobrowsky et al., 1995) durch aktive trk-Signaltransduktion inhibiert wird, beeinflusst diese nicht die Aktivierung von NFκB, einem anti-apoptotischen Faktor (Maggirwar et al., 1998, Hamanoue et al., 1999).

Es gibt auch Beispiele für Einflüsse der p75NTR-Signaltransduktion auf die trkA-Aktivität. Zum Beispiel wird durch BDNF-Bindung an p75NTR die NGF-abhängige Autophosphorylierung von trkA reduziert (MacPhee and Barker, 1997). Außerdem können Ceramide, die durch die p75NTR-induzierte Sphingomyelinase-Aktivierung freigesetzt wurden, inhibitorisch auf PI3K und Akt wirken (Zhou et al., 1998, Zundel et al., 2000).

Neben agonistischen Wechselwirkungen wurde aber auch die kooperative Aktivierung von NFκB durch trkA und p75NTR (vgl. Abschnitt 1.2.2.) beobachtet.

Die Bildung von gemischten Komplexen könnte zumindest teilweise die synergistischen und agonistischen Effekte der Signaltransduktion trkA- und p75NTR-exprimierender Zellen in Anwesenheit von NGF erklären (Übersicht in Bothwell, 1995, Majdan and Miller, 1999, Hempstead, 2002).

Allerdings muss die physiologische Signifikanz einer direkten Bindung von trkA an p75NTR noch gezeigt werden. Ebenfalls unbekannt ist, ob heterodimere trk/p75NTR-Komplexe zu einer Signaltransduktion in der Lage sind, die sich von homodimeren trk- oder p75NTR-Komplexen unterscheidet.

1.1.4. Wie wird das NGF-Signal in Neuronen vermittelt?

NGF wird von den peripheren Geweben, die durch Neuronen innerviert werden sezerniert (Übersicht in Davies, 1994 Bothwell, 1995). Die Oberflächen-Rezeptoren der Nerv-Endigungen binden NGF, welches unter anderem Veränderungen der Genexpression im Zellkern bewirkt, der bis zu einem Meter von den Nervendigungen entfernt sein kann. Es stellt sich daher die Frage, wie das NGF-Signal über eine so große Entfernung vermittelt wird.

Das derzeit favorisierte Model für die Weiterleitung des NGF-Signals von den Nerv-Endigungen zum Zellkern ist der Transport von NGF-Rezeptor-Komplexen in sogenannten *signalling endosomes* (Überblick in Ginty and Segal, 2002, Reynolds et al., 2000, Neet and Campenot, 2001, Miller and Kaplan, 2001). Nach diesem Model wird nach der Bindung von NGF an trkA neben der Rezeptor-Aktivierung ebenfalls die Endozytose des NGF-Rezeptor-Komplexes induziert, wobei der Endozytosemechanismus noch unklar ist (siehe Abschnitt 1.3.). Nach der Endozytose wird der Neurotrophin-gebundene trk-Rezeptor in spezialisierten Endosomen mit einer Geschwindigkeit von 2-20mm/h (Überblick in Reynolds et al., 2000) retrograd zum Zellkern transportiert. TrkA bleibt dabei weiterhin aktiviert und kann an Signaltransduktionsintermediate binden (Bhattacharyya et al., 1997, Ehlers et al., 1995, Tsui-Pierchala and Ginty, 1999, Watson et al., 1999), weshalb vermutet wird, dass die Transportvesikel als Signaltransduktions-Plattform dienen könnten.

Anscheinend wird aber nur ein Teil der NGF-Rezeptor-Komplexe retrograd transportiert (Tsui-Pierchala and Ginty, 1999, Weible et al., 2001) und es gibt Hinweise darauf, dass endozytierte NGF-TrkA-Komplexe zurück zur Plasmamembran recycelt werden (Grimes et al., 1996, Zapf-Colby and Olefsky, 1998).

Mehrere Arbeiten zeigten, dass die Signaltransduktion von internalisiertem trkA sich von der plasmamembranständiger Rezeptoren unterscheidet (Saragovi et al., 1998, Zhang et al., 2000, Wu et al., 2001). Dabei sind Endozytose und retrograder Transport zur Initiierung bestimmter Signaltransduktionskaskaden notwendig, während andere davon nicht beeinflusst werden (Überblick in Ginty and Segal, 2002, Barker et al., 2002, Miller and Kaplan, 2001). Dieses korreliert mit Daten, nach denen neben dem langsamen vesikulären retrograden Transport auch eine schnelle, nicht-vesikuläre Weiterleitung des trkA-Signals zum Zellkern erfolgt (Miller and Kaplan, 2001, Ginty and Segal, 2002).

Außerdem wurde ebenfalls retrograder Transport von p75NTR in Neuronen dokumentiert (von Bartheld et al., 1996, Kramer et al., 1999, Curtis et al., 1995, Johnson et al., 1987, Hartig et al., 1998, Yan et al., 1993), der in bestimmten Zelltypen am Transport von NGF

beteiligt ist (Yan et al., 1993, Yan and Greene, 1998, Kramer et al., 1999). Der Endozytosemechanismus und die zellulären Kompartimente, in die der p75NTR transportiert wird, sind bisher völlig unbekannt.

Eine nähere Untersuchung des Endozytose-Mechanismus, über den Neurotrophine aufgenommen werden, sowie ihrer zellulären Lokalisation könnte demnach zum Verständnis darüber beitragen, wie Neurotrophine ihre vielfältigen Effekte vermitteln.

1.2. Überblick über die verschiedenen Endozytose-Formen

Der Begriff Endozytose bezeichnet die Aufnahme von Nähr- und Botenstoffen, Plasmamembran und extrazellulärer Flüssigkeit durch die Zelle. Dieses geschieht durch Einstülpung der Plasmamembran und Vesikelbildung.

Die Endozytose ermöglicht der Zelle eine „Analyse“ ihrer Umgebung, auf Signale zu reagieren und durch gezielte Internalisierung bestimmter Oberflächen-Rezeptoren die Antworten auf extrazelluläre Stimuli zu modifizieren. Endozytose dient außerdem der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen inneren und äußeren Membranen z.B. bei Bewegung, dem Ausbilden von Polarität, sowie der Ernährung und wird von Zellen des Immunsystems als Abwehrmechanismus eingesetzt (Übersicht in Alberts, 2002, Mellman, 2000).

Um die verschiedenen Aufgaben erfüllen zu können, existieren verschiedene Endozytose-Formen in einer Zelle. Dabei wird zunächst zwischen der Aufnahme von großen ungelösten Partikeln (Phagozytose) und in der extrazellulären Flüssigkeit gelösten Substanzen (Pinozytose) unterschieden.

Phagozytose dient Protozoen zur Nahrungsaufnahme und wird von den Zellen des Immunsystems zur Beseitigung von Mikroorganismen oder Zelltrümmern eingesetzt (Überblick in Cardelli, 2001, Kwiatkowska and Sobota, 1999, Aderem and Underhill, 1999). Die entstehenden Phagosomen haben häufig einen Durchmesser von über 250nm.

Pinozytose kann nach der Größe der abgeschnürten Vesikel in Makro- und Mikropinozytose unterteilt werden. Dabei variiert die Größe der durch Makropinozytose (siehe Abschnitt 1.2.3.) aufgenommenen Makropinosomen zwischen 0,2 und 1µm im Durchmesser, kann aber auch bis zu 5µm betragen (Swanson, 1989, Hewlett et al., 1994, Steinman and Swanson, 1995).

Mikropinozytose umfaßt alle Endozytose-Formen, die zur Internalisierung von Vesikeln

mit einem Durchmesser unter 0,2 μm führen. Durch Verwendung verschiedener Protein-coats (Mäntel) und Internalisierungsmechanismen können Clathrin-abhängige (s. Abschnitt 1.2.1), Caveolin-abhängige (s. Abschnitt 1.2.2.) und Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose (Überblick in Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001) unterschieden werden.

Anhand der rezeptorvermittelten Endozytose von Transferrin, *low density lipoprotein* (LDL) und *epidermal growth factor* (EGF) soll verdeutlicht werden, wie unterschiedliche das zelluläre Schicksal von endozytierten Substanzen und ihren Rezeptoren sein kann.

Transferrin ist ein Träger-Protein, das zur Eisenversorgung von Zellen beiträgt (Übersicht in Rolfs and Hediger, 1999, Dautry-Varsat, 1986, Richardson and Ponka, 1997). Pro Transferrin-Molekül können 2 Fe^{3+} Ionen gebunden werden. Nur eisengebundenes Transferrin (Ferrotransferrin) kann an den Transferrin-Rezeptor an der Oberfläche der Zellen binden. Dieser wird unabhängig von der Ligandenbindung kontinuierlich über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert (Alberts, 2002). Innerhalb von 2-6 Minuten kann der Transferrin-Rezeptor-Komplex in den frühen Endosomen nachgewiesen werden (Ciechanover et al., 1983, Sheff et al., 1999). Durch den dort vorherrschenden sauren pH von etwa 5 sinkt die Affinität der Fe^{3+} Ionen für Transferrin, was zu einer Dissoziation von Fe^{3+} führt (Morgan, 1981, Morgan, 1981, Armstrong and Morgan, 1983, van Renswoude et al., 1982). Transferrin bleibt aber weiterhin an den Rezeptor gebunden und wird vom frühen Endosom in der Peripherie in das Recycling-Endosom in der Nähe des Mikrotubuliorganisierenden Zentrums (MOC, Apodaca et al., 1994) transportiert (Yamashiro et al., 1984, Sheff et al., 1999) und von dort aus zur Plasmamembran recycelt. Eisenfreies Transferrin (Apotransferrin) hat bei dem neutralen pH an der Zelloberfläche eine deutlich reduzierte Affinität zum Transferrin-Rezeptor und dissoziiert (Morgan, 1981, Klausner et al., 1983, Dautry-Varsat et al., 1983, Ciechanover et al., 1983). Je nach Zelltyp beträgt die Dauer eines Transferrin-Zyklus zwischen 16 und 30 Minuten (Ciechanover et al., 1983, Sheff et al., 1999)

Im Gegensatz zum Recycling des Transferrins führt die Bindung des Wachstumsfaktors EGF an den EGF-Rezeptor zu einer Degradation beider Komponenten. Durch die Wechselwirkungen zwischen EGF und dem EGF-Rezeptor wird dieser aktiviert, wodurch mehrere Signaltransduktionskaskaden und die Internalisierung des EGF-Rezeptor-Komplexes über Clathrin-vermittelten Endozytose initiiert werden (Sorkin and Waters, 1993, Sorkin et al., 1993). Nach der Aufnahme kann der EGF-Rezeptor-Komplex in frühen

Endosomen und in *multi vesicular bodies* (MVB) nachgewiesen werden. MVBs sind große vakuolenartige Strukturen, die eine unterschiedliche Anzahl von Vesikeln mit einem Durchmesser von 50-70nm enthalten (Piper and Luzio, 2001, Gruenberg, 2001). Sie bilden sich an den vakuolenartigen Bereichen von frühen Endosomen (Futter et al., 1996). Im MVB werden die EGF-Rezeptor-Komplexe sortiert. Ein Großteil wird in späten Endosomen und Lysosomen degradiert, während ein kleiner Anteil zur Plasmamembran recycelt wird (Übersicht in Sorkin and Waters, 1993, Stahl and Barbieri, 2002).

Der Rezeptor muss aber nicht zwangsläufig mit dem Liganden degradiert werden. Im Fall des LDL erfolgt nach Ligandenbindung und Clathrin-vermittelter Endozytose die Dissoziation von Ligand und Rezeptor im frühen Endosom. Während der Ligand über das späte Endosom in die Lysosomen transportiert und dort degradiert wird, wird der LDL-Rezeptor zurück zur Plasmamembran recycelt (Überblick in Li et al., 2001).

1.2.1. Clathrin-vermittelte Endozytose

Clathrin-vermittelte Endozytose findet in den meisten Zellen statt. Dabei können durch rezeptorvermittelte Aufnahme Signal- und Botenstoffe in den Endozytose-Vesikeln konzentriert werden. Beispiele für Clathrin-vermittelte Endozytose sind die Aufnahme von Transferrin und LDL sowie synaptisches Vesikel-Recycling, welches sich besonders zur Untersuchung dieser Vorgänge eignet.

Clathrin-vermittelte Endozytose benötigt zwei Gruppen von Proteinen: die Proteine, die den Clathrin-*coat* bilden (Clathrin, AP2, CALM/ AP180) und sogenannte Helferproteine (Endophilin, Epsin, Eps15, Intersectin, Dynamin, Amphiphysin, hsc70, Auxilin, Syaptojanin, Überblick in Brodin et al., 2000, Slepnev and De Camilli, 2000).

Nach der derzeitigen Modelvorstellung beginnt die Bildung eines Clathrin-*coats* mit der Rekrutierung des Adaptorprotein-Komplexes AP2 an die Plasmamembran (Schmid, 1997, Kirchhausen et al., 1997,). Dieses erfordert die Interaktion mit Phosphoinositolen wie Phosphoinositol-4,5-Bisphosphat (PI(4,5)P₂, Marsh et al. 1999, Gaidarov and Keen, 1999) und in neuronalen Zellen mit Synaptotagmin (Zhang et al., 1994, Ullrich et al., 1994). AP2 bindet dabei ebenfalls an bestimmte Sequenzmotive in den zytoplasmatischen Domänen von Membranproteinen, die als Sortierungssignale fungieren (Kirchhausen et al., 1997, Ohno et al., 1995).

AP2 rekrutiert Clathrin an die Plasmamembran (Gallusser and Kirchhausen, 1993, Goodman and Keen, 1995, Traub et al., 1999, Brown and Petersen, 1999). Clathrin besteht aus einem hexameren Komplex in Form eines Triskelions, welches der Grundbaustein des

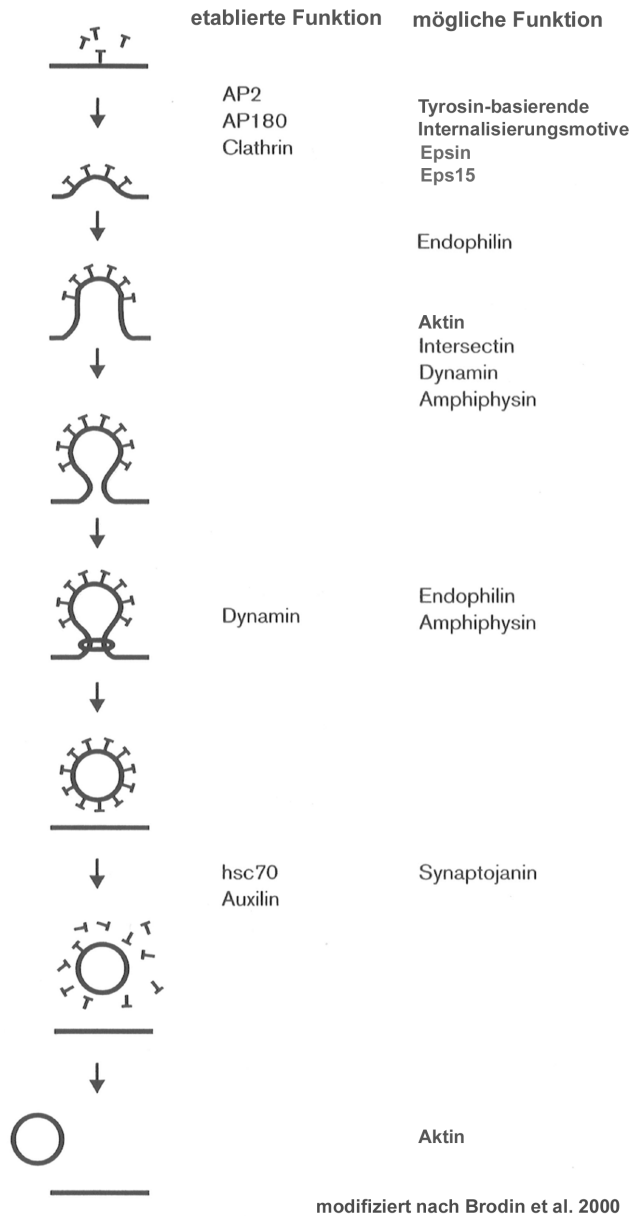


Abbildung 1.4. Schematische Übersicht über den Ablauf der Clathrin-vermittelten Endozytose.

Clathrin-Käfigs ist (Smith and Pearse, 1999). Aufgrund seiner Struktur kann Clathrin in Hexagons und Pentagons oligomerisieren und eine Krümmung erzeugen (Musacchio et al., 1999), wobei die Oligomerisierung energetisch begünstigt ist. Gereinigtes Clathrin und AP2 können *in vitro* Käfige bilden, die mit denen vergleichbar sind, die Clathrin-behüllte Vesikel umgeben (Hirst and Robinson, 1998). *In vivo* werden allerdings zur Bildung und Abschnürung von Clathrin-behüllten Vesikeln eine Reihe von Helferproteinen benötigt (Brodin et al., 2000, Slepnev and De Camilli, 2000).

Neben AP2 fungiert AP180 (das neuralspezifische Homolog von CALM, Tebar et al., 1999) als zusätzlicher Adaptor zwischen Clathrin und der Plasmamembran (Ahle and Ungewickell, 1986, Hao et al., 1999, Hao et al., 1997). Man vermutet, dass AP180 die Vesikelgröße beeinflusst (Ye and Lafer, 1995).

Für die Abschnürung des Clathrin-behüllten Vesikels ist die GTPase Dynamin essentiell. *In vitro*-Interaktionen von synaptischen Membranen, Zytosol, ATP und dem nicht hydrolysierbaren GTP γ S zeigen mit Dynamin dekorierte Membrantubuli (Takei et al., 1995). Ähnliche Strukturen wurden auch in den Nerv-Endigungen von paralysierten Fruchtfliegen beobachtet, die eine temperatursensitive Mutation in dem *shibire*-Gen aufweisen, welches in *Drosophila* für

Dynamin codiert (Takei et al., 1996, Koenig and Ikeda, 1989). Die GTP-Hydrolyse durch Dynamin scheint also notwendig für die Abschnürungsreaktion zu sein. Der Mechanismus ist allerdings unklar. Es könnte sein, dass die GTP-Hydrolyse zu einer Konformationsänderung von Dynamin und dadurch zur Abschnürung des Vesikels führt (Hinshaw and Schmid, 1995, Takei et al., 1995, Stowell et al., 1999).

Andere Daten zeigen, dass durch die Hemmung der Dynamin GTPase-Aktivität die Endozytose eher erhöht als gesenkt wird (Sever et al., 1999). Deshalb wird auch diskutiert, ob Dynamin eher wie eine klassische GTPase zur Aktivierung von weiteren Proteinen führt, welche die Abschnürungsreaktion katalysieren.

Unmittelbar nach der Bildung des Clathrin-behüllten Vesikels wird der *coat* entfernt. Die Entfernung der Clathrin-Hülle wird durch das hsc70 und Auxilin bewerkstelligt (Ungewickell, 1999). Ein weiteres Protein, welches an diesem Prozess beteiligt sein könnte, ist Synaptojanin (Gad et al., 2000, Harris et al., 2000, Cremona et al., 1999). Die Phosphatase-Aktivität von Synaptojanin könnte durch Dephosphorylierung von PI(4,5)P₂ und anderen Phosphoinositolen zu einer Schwächung der Bindung von AP180/ CALM, Epsin (Hao et al., 1997, Ford et al., 2001, Itoh et al., 2001), AP2 und Clathrin (Cremona et al., 1999) an die Vesikel-Membran und so zu einer Destabilisierung des *coats* führen (Cremona et al., 1999, Cremona and De Camilli, 2001).

Nachdem die Clathrin-Hülle entfernt wurde, können die Vesikel mit dem frühen Endosom fusionieren (Hirst and Robinson, 1998, Mellman, 1996) von wo aus seine Bestandteile ihrer weiteren Verwendung zugeführt werden.

Aufgrund der Domänenstruktur scheint die Funktion von Amphiphysin (Überblick in Slepnev and De Camilli, 2000) und Intersectin (Roos and Kelly, 1998, Sengar et al., 1999, Hussain et al., 1999) die eines multifunktionalen Adaptors zu sein. Für beide Proteine wurde ebenfalls die Interaktion mit verschiedenen Signaltransduktionskaskaden und dem Aktin-Zytoskelett gezeigt (Gold et al., 2000, Galderisi et al., 1999, Wechsler-Reya et al., 1997, Tong et al., 2000 Slepnev and De Camilli, 2000).

Während gezeigt wurde, dass die Wechselwirkung von Amphiphysin mit Dynamin essentiell für die Abschnürungsreaktion ist (Shupliakov et al., 1997, Marsh and McMahon, 1999), scheint die Funktion von Intersectin eher in der Rekrutierung des *coats* zur Plasmamembran sowie einer Koordination der Helfer-Proteine zu liegen (Überblick in Slepnev and De Camilli, 2000).

Weitere wichtige Proteine sind Epsin, Eps15 und Endophilin. Als mögliche Funktion für Epsin und Eps15, das mit Epsin über die Eps15-Homologie (EH)-Domäne interagieren kann (Chen et al., 1998), wird die Ausbreitung der Clathrin-behüllten Gruben diskutiert (Tebar et al., 1996, Carbone et al., 1997, Benmerah et al., 1998, Chen et al., 1998, Itoh et al., 2001). Eps15 könnte dabei auch als Adaptor zur Rekrutierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren in die behüllten Gruben fungieren (Drake et al., 2000). Für Endophilin wird eine unterstützende Funktion beim Einstülpen der Clathrin-behüllten Gruben diskutiert (Ringstad et al., 1999, Schmidt et al., 1999).

In verschiedenen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass Aktin bei der Clathrin-vermittelten Endozytose eine wichtige Rolle spielt (Fujimoto et al., 2000). Worin diese besteht ist allerdings unklar. Eine Möglichkeit, die auf den Wechselwirkungen von Dynamin und Aktin-Funktionen basiert, ist eine unterstützende Rolle des Aktins bei der Vesikelabschnürung (Ochoa et al., 2000, Merrifield et al., 1999). In diesem Zusammenhang wird auch Syndapin diskutiert, welches Dynamin, Synaptotagmin und das *neural Wiskott-Aldrich syndrome protein* (N-WASP) binden kann Qualmann et al., 1999. Da es auch von anderen an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligten Proteinen Verbindungen zum Aktin-Zytoskelett gibt, sind auch andere Funktionen von Aktin denkbar (Übersicht in Slepnev and De Camilli, 2000).

Als möglicher Regulationsmechanismus der Clathrin-vermittelten Endozytose wurde Phosphorylierung vorgeschlagen (Überblick in Cousin et al., 2001). Dieses Model basiert auf Daten, nach denen durch Stimulation der Nerv-Endigungen im Gehirn sieben strukturell nicht verwandte und für die Clathrin-vermittelten Endozytose essentielle Proteine dephosphoryliert werden. Diese Proteine sind Dynamin (Robinson et al., 1994), Amphiphysin-I und -II (Bauerfeind et al., 1997, Ramjaun et al., 1997, Leprince et al., 1997, Wigge et al., 1997), Synaptojanin (McPherson et al., 1994, McPherson et al., 1996) sowie Epsin, Eps15 und AP180 (Chen et al., 1999, Cousin et al., 2001). Die Dephosphorylierung dieser Proteine führt zu einer Stimulation des synaptischen Vesikel-Recyclings (Überblick in Cousin et al., 2001). Weiterhin konnte in *in vitro*-Untersuchungen gezeigt werden, dass durch Phosphorylierung die Wechselwirkungen zwischen den an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligten Proteinen gestört werden können (Überblick in Cousin et al., 2001).

1.2.2. Caveolin-abhängige Endozytose

Caveolae sind flaschenförmige, nicht-behüllte Plasmamembran-Einstülpungen mit einem Durchmesser von 50 bis 80nm. Ihre Zusammensetzung, Erscheinungsbild und Funktion ist Zelltyp-abhängig (Stan et al., 1997, Stan et al., 1999, Parton et al., 1997, Carozzi et al., 2000, Montesano et al., 1982, Rothberg et al., 1992). Besonders häufig sind sie in Endothelzellen, wo sie im Zusammenhang mit Endozytose und Transzytose von Blutbestandteilen stehen (Henley et al., 1998).

Biochemisch werden die Caveolae durch ihre Assoziation mit einer Familie von Proteinen charakterisiert, die Caveoline genannt werden. Die Proteine der Caveolin-Familie sind integrale Membranproteine, die nur das innere Blatt der Plasmamembran durchspannen, wobei der C- und N-Terminus jeweils ins Cytoplasma ragt (Dupree et al., 1993, Thomsen et al., 2002). Caveoline sind im C-terminalen Bereich palmitoyliert (Dietzen et al., 1995), können an Tyrosin-Resten phosphoryliert werden (Glenney, 1989) und bilden Dimere oder Oligomere (Monier et al., 1995). Ihre Funktion liegt in der Bildung und der Aufrechterhaltung von Caveolae (Kurzchalia and Parton, 1999, Fra et al., 1995).

Caveolae zeichnen sich durch eine charakteristische Lipidzusammensetzung aus (Übersicht in Simons and Toomre, 2000, Brown and London, 1998). Durch die Anreicherung von z.B. Cholesterin, Glycoproteinen und Sphingomyelin ähneln sie biochemisch den sogenannten *lipid rafts*, die bei 4°C in Triton-X-100 (TX-100) unlöslich sind.

Ob Caveolin eine direkte Rolle bei der Endozytose der Caveolae hat, ist unklar (Pelkmans et al., 2001, Roy et al., 1999, Minshall et al., 2000, Le et al. 2001). Man nimmt an, dass Caveolin eher eine stabilisierende Funktion ausübt und so einem *raft*-abhängigen Endozytosemechanismus entgegenwirkt (Lamaze et al., 2001). Neben der Plasmamembran findet man Caveoline auch im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) (Dupree et al., 1993, Kurzchalia et al., 1992) und in sogenannten Caveosomen (Pelkmans et al., 2001).

Für verschiedene Liganden, Membranbestandteile, Viren und Bakterien wurde eine Caveolae-abhängige Internalisierung gezeigt, von denen die Aufnahme des Simian Virus 40 (SV40) am besten charakterisiert ist (Überblick in Pelkmans and Helenius, 2002). Generell scheint zur Induzierung der Caveolin-abhängigen Internalisierung das Quervernetzen von Caveolae-Bestandteilen durch multivalente Liganden, z.B. Bakterien oder Viren wichtig zu sein (Parton et al., 1994, Mayor et al., 1994, Parton and Lindsay, 1999, Verkade et al., 2000). In vielen Fällen wird die Endozytose von Caveolae durch die

Aktivierung einer Phosphorylierungskaskade ausgelöst (Anderson, 1998, Minshall et al., 2000, Pelkmans et al., 2002, Thomsen et al., 2002, Parton et al., 1994).

Man nimmt an, dass Dynamin parallel zu den Clathrin-behüllten Vesikeln auch die Abschnürungsreaktion der Caveolae katalysiert (De Camilli et al., 1995, Sever et al., 2000), da es auch am „Hals“ der flaschenförmigen Caveolae nachgewiesen wurde (Oh et al., 1998, Henley et al., 1998).

Eine vorübergehende Depolymerisierung des kortikalen Aktin-Zytoskelett ist ebenfalls notwendig für die Vesikelbildung und den Transport in das Zytosol (Thomsen et al., 2002, Pelkmans et al., 2002). Lokal rekrutiertes Aktin fungiert möglicherweise als Gerüst für die zur Internalisierung notwendigen Proteine (Pelkmans et al., 2002).

Bei der Aufnahme des Virus SV40 wird der Inhalt der endozytierten Vesikel in Caveosomen transferiert (Pelkmans et al., 2001). Dieses geschieht wahrscheinlich über Membranfusion, da Caveolae die molekulare Maschinerie für das Andocken und die Fusion von Vesikeln enthalten (Schnitzer et al., 1995).

Caveosomen sind ein Komplex aus tubulären Membran-Organellen (Pelkmans and Helenius, 2002). Die Membranen enthalten viel Cholesterin, Glykosphingolipide und Caveolin-1, der pH im Inneren des Caveosoms ist neutral (Pelkmans et al., 2001, Puri et al., 2001). Liganden, die durch Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden wie z.B. Transferrin oder Flüssigphasen-Endozytose-Marker wie Dextran werden in ihnen nicht angereichert (Kartenbeck et al., 1989, Pelkmans et al., 2001).

Die Caveolin-abhängige Endozytose scheint kein essentieller Mechanismus zu sein, da die Caveolin-1 *knock-out*-Maus, die über keine nachweisbaren Caveolae verfügt, kaum beeinträchtigt ist (Galbiati et al., 2001, Razani et al., 2001, Drab et al., 2001).

Das könnte daran liegen, dass die Caveolae-abhängige Endozytose durch andere Mechanismen kompensiert wird.

1.2.3. Makropinozytose

Als Makropinozytose wird die Bildung von großen, heterogenen, primären Endozytose-Vesikeln an Lamellipodien oder *membrane ruffles* (Membran-Rüschen) bezeichnet (Swanson, 1989, Hewlett et al., 1994).

Lamellipodien treten bei sich bewegenden Zellen am Leitsaum auf, wo sie für eine gerichtete Bewegung benötigt werden (s. Abbildung 1.5. A), können aber in vielen Zelltypen auch durch extrazelluläre Faktoren induziert werden (Small, 1988, Stossel, 1993). Lamellipodien sind zweidimensionale, planare, bewegliche Erweiterungen der Zelloberfläche, die aus parallel angeordneten F-Aktin-Fasern bestehen (Allison et al., 1971, s. Abbildung 1.5. B).

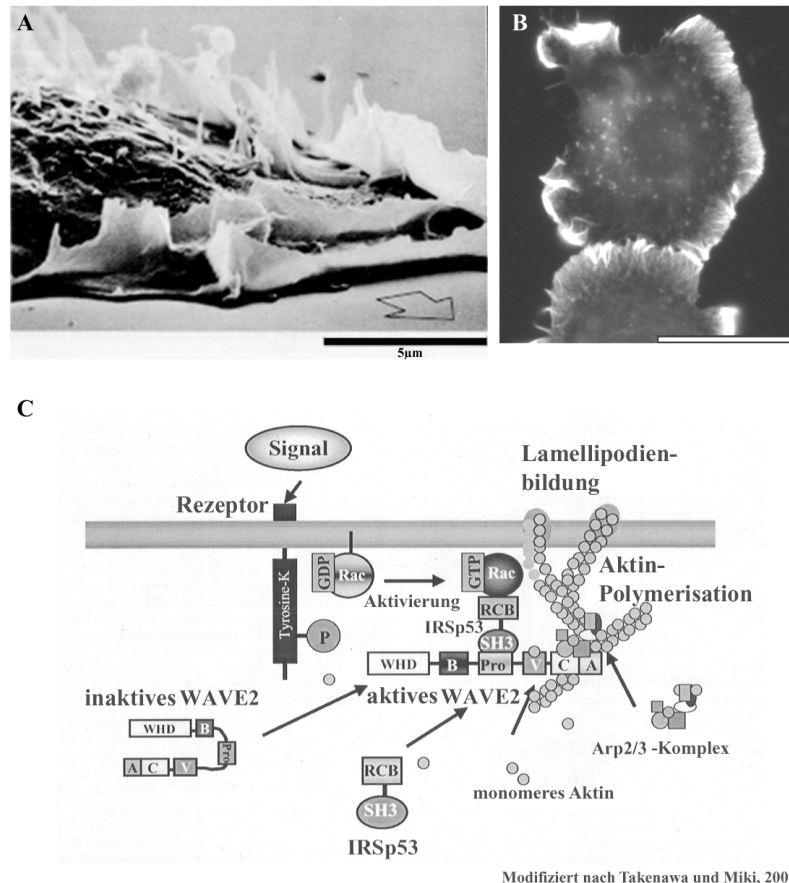


Abbildung 1.5.: Bildung von Lamellipodien in Säugerzellen. A Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahme von Lamellipodien und Mikrospiques am Leitsaum eines menschlichen Fibroblasten, der in Pfeilrichtung wandert (Bild von J. Heath). B Immunfluoreszenz-Aufnahme von NGF-induzierten Lamellipodien bei PC12-Zellen aus dieser Arbeit (Tafel 2.2.). Das F-Aktin wurde mit Phalloidin-TRITC sichtbar gemacht. Der Balken entspricht 15µm. C Modell für den Mechanismus der Lamellipodienbildung nach Takenawa and Miki, 2001. Durch Ligandenbindung wird die Phosphorylierung eines Tyrosin-Kinase Rezeptors induziert, wodurch Rac aktiviert wird. Dieses rekrutiert das *insulin receptor substrate p53* (IRSp53), welches Rac über seine RCB Domäne bindet. Die Wechselwirkung der SH3-Domäne von IRSp53 mit der Prolin-reichen Domäne von WAVE2 führt zu einer Konformationsänderung von WAVE2. Dadurch wird die VCA-Domäne von WAVE2 für Aktin und den Arp2/3 Komplex zugänglich, welches zur Bildung eines Netzwerkes von Aktin-Filamenten und somit zur Lamellipodienbildung führt. WHD= *WAVE homology domain*, B = *basic region*, Pro= *prolin rich region*, A=*acidic domain*, C= *cofilin homology domain*, V= *verprolin homology domain*, RCB= *rac-binding domain*, SH3= *src homology domain*, VCA-domain= *verprolin homology, cofilin homology, acidic domain*.

Für die Bildung und Aufrechterhaltung der Lamellipodien ist eine kontinuierliche zur Plasmamembran gerichtete Aktin-Polymerisierung essentiell, wobei man annimmt, dass dieses an der Plasmamembran durch den sogenannten „Tretmühleneffekt“ von Aktin-Fasern bewerkstelligt wird (Stossel, 1993, Cooper, 1991). Die derzeitige Modell-Vorstellung über den Mechanismus der Lamellipodienbildung ist in Abbildung 1.5.C dargestellt (Überblick und Referenzen in Takenawa and Miki, 2001).

Weil Makropinosomen über keinen erkennbaren *coat* verfügen und nicht zu einer Konzentration von Oberflächenrezeptoren führen (Racoosin and Swanson, 1992), nimmt man an, dass ihre Bildung zufällig und spontan durch das Zurückklappen der Lamellipodien zur Plasmamembran erfolgt.

Makropinosomen sind relativ groß, wodurch ihr Oberflächen/Volumen-Verhältnis niedriger ist, als bei kleineren Vesikeln und zur Aufnahme einer größeren Mengen an extrazellulärer Flüssigkeit führt (Racoosin and Swanson, 1992, [Watts, 1992 #4247]). Diese Eigenschaft kann man sich für den Nachweis von Makropinozytose z.B. durch Verwendung von Dextran-Konjugaten zunutze machen.

Nach der Bildung von Makropinosomen ist deren weiteres Schicksal zelltypabhängig. In Makrophagen erfolgt durch Interaktionen mit anderen Makropinosomen oder Endosomen (Berthiaume et al., 1995) ein Reifungsprozess, der von dem Absinken des vesikulären pH-Wertes begleitet wird (Racoosin and Swanson, 1993). Im Gegensatz dazu interagieren bei A431-Zellen die Makropinosomen hauptsächlich mit anderen Makropinosomen, welches zur Bildung einer Brefeldin-A-resistenten Population führt (Hewlett et al., 1994). Ein Großteil des Inhaltes der Makropinosomen wird hier zurück zur Plasmamembran transportiert.

In Säugerzellen wird das Membran-Recycling zwischen der Plasmamembran und zellulären Kompartimenten wahrscheinlich durch die GTPase ARF6 reguliert (Franco et al., 1999, Radhakrishna and Donaldson, 1997). ARF6 aktiviert die Phosphoinositol-4-Phosphat-5-Kinase an der Plasmamembran (Honda et al., 1999), wobei die lokale Konzentration von PI(4,5)P₂ essentiell für die Makropinozytose zu sein scheint (Amyere et al., 2000). Man vermutet, dass Komponenten des Aktin-Zytoskeletts *downstream*-Effektoren der ARF6-vermittelten PI(4,5)P₂ Produktion sind.

Die enge Kopplung von Lamellipodien und Makropinozytose zeigt sich auch dadurch, dass ihre Stimulation (soweit bisher bekannt) auf gemeinsamen Signalübertragungs-Mechanismen basiert (Überblick in Swanson and Watts, 1995, Ridley, 1994). Darüber hinaus wurden verschiedene Proteine in Lamellipodien lokalisiert (Überblick in Ridley,

1994), die eine Rolle bei der Makropinozytose in Säugetier-Zellen bzw. in *Dictyostelium* (Überblick in Cardelli, 2001) spielen.

Obwohl es bisher keinen Beweis gibt, dass die Membran-Zusammensetzung der Makropinosomen anders ist als die der Membran von Lamellipodien, könnte sich die Lamellipodienmembran möglicherweise durch eine Anreicherung bestimmter Phosphoinositole und *lipid-raft*-Marker von der Plasmamembran unterscheiden (Swanson and Watts, 1995, Manes et al., 1999). Das *human spectrin SH3-domain-binding Protein 1* (Hssh3bp1) ist das erste Beispiel für ein Protein, welches an Makropinosomen, aber nicht an Lamellipodien nachgewiesen werden konnte (Xu et al., 2000).

Über die Funktion von Makropinozytose wird bisher nur spekuliert. Dass sie aber nicht nur der Aufnahme von Flüssigkeit dient, oder einen zellulären Vorrat an Lamellipodien-Membran während des *membrane ruffling*s oder bei Bewegungsvorgängen darstellt, zeigen Experimente mit „unreifen“ dendritischen Zellen. Diese betreiben in Gegenwart von Interleukin-4 oder dem Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) konstitutiv Makropinozytose (West et al., 2000, Sallusto et al., 1995), was möglicherweise mit der Antigen-Präsentation dieser Zellen im Zusammenhang stehen könnte.

Außerdem stimulieren verschiedene pathogene Bakterien (z.B. *Salmonella*) Makropinozytose, um von den Zellen aufgenommen zu werden (Alpuche-Aranda et al., 1994, Francis et al., 1993).

Es könnte auch sein, dass Lamellipodienbildung und Makropinozytose Teil der zellulären Antwort auf chemotaktische Substanzen ist, da diese ebenfalls solche Effekte auslösen können.

1.3. Endozytose von NGF

Es ist wenig über den Mechanismus bekannt, über den NGF endozytiert wird. Generell wird davon ausgegangen, dass NGF rezeptorvermittelt internalisiert wird, da die Aufnahme von I¹²⁵-markiertem NGF in sympathischen Neuronen durch unmarkiertes NGF kompetitiert werden kann (Johnson et al., 1978). Für die in dieser Arbeit verwendeten PC12-Zellen und sympathische Neuronen wurde eine trkA-abhängige Internalisierung gezeigt (Grimes et al., 1996, Kahle et al., 1994, Tsui-Pierchala and Ginty, 1999), während

in anderen Nervenzellen p75NTR-abhängige Endozytose von NGF beobachtet wurde (Yan et al., 1993, Yan and Greene, 1998, Kramer et al., 1999). In trkA- oder p75NTR-transfizierten Sf9-Zellen konnte eine Bindung von NGF an beide Rezeptoren gemessen werden. Eine Internalisierung von NGF fand aber nur in trkA-transfizierten Zellen statt (Gargano et al., 1997).

Der Endozytose-Mechanismus, der für die Internalisierung von trkA-gebundenem NGF in PC12-Zellen verantwortlich ist, ist bisher nicht eindeutig identifiziert worden. Experimente, in denen eine temperatursensible Mutante von Dynamin in PC12-Zellen überexprimiert wurde, zeigten eine Dynamin-abhängige Internalisierung von NGF (Zhang et al., 2000). Man nimmt an, dass Dynamin neben der Abschnürung von Clathrin-behüllten Vesikeln (Koenig and Ikeda, 1989, Schmid et al., 1998) auch für die Abschnürung von Caveolae (Sever et al., 2000, De Camilli et al., 1995, Oh et al., 1998, Henley et al., 1998) und vermutlich für die Bildung von Phagosomen in Makrophagen (Gold et al., 2000) verantwortlich ist. Der Abschnürungsmechanismus von Makropinosomen ist unklar. Da gezeigt wurde, dass Dynamin in PDGF-stimulierten Fibroblasten deutlich in den Lamellipodien konzentriert wird (McNiven et al., 2000), könnte Dynamin möglicherweise auch an der Bildung von Makropinosomen beteiligt sein.

Eine mögliche Internalisierung von NGF durch Clathrin-vermittelte Endozytose wird durch folgende Daten unterstützt: Im Zeitraum von 30 Sekunden bis 2 Minuten nach NGF-Stimulation wurde eine erhöhte Konzentration von Clathrin an der Plasmamembran in Immunfluoreszenz-Experimenten gezeigt (Grimes et al., 1996, Beattie et al., 2000, Howe et al., 2001). In biochemischen Experimenten zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Konzentration von tyrosinphosphoryliertem Clathrin an der Plasmamembran (Beattie et al., 2000). Howe et al., 2001 zeigte darüber hinaus nach zwei Minuten NGF-Stimulation einen 58%igen Anstieg von Clathrin an der Plasmamembran und eine um 145% erhöhte Assoziation von Clathrin mit intrazellulären Membranen in PC12-Zellen. Der Anteil an Membran-assoziiertem Clathrin in DRG-Neuronen und Synaptosomen stieg etwa um den Faktor zwei bzw. acht. Weiterhin wurde durch trkA-Immunpräzipitation zwei Minuten nach NGF-Stimulation ein erhöhter Anteil von AP2 und Clathrin im Präzipitat nachgewiesen.

Andere Arbeiten deuten auf eine Internalisierung über Caveolae hin. Die Existenz von Caveolae in PC12-Zellen wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen, Immunfluoreszenz-Experimente und biochemische Analysen nachgewiesen (Peiro et al., 2000). In Immunfluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte

Kolokalisation von trkA und Caveolin-1 nachgewiesen werden (Peiro et al., 2000). Aus Extrakten von trkA-transfizierten PC12-Zellen konnte TrkA mit Caveolin-1 immunpräzipitiert werden, außerdem konnte die Bindung von trkA aus PC12-Extrakten an rekombinantes GST-Caveolin nachgewiesen werden (Bilderback et al., 1997). Außerdem führen Substanzen, die Caveolae zerstören, zu einer Inhibition der NGF- aber nicht der EGF-induzierten Aktivierung der MAPK-Signaltransduktionskaskade (Peiro et al., 2000). Es gibt allerdings keine Daten, die eine Internalisierung von trkA-NGF-Rezeptor-Komplexen durch Caveolae nachweisen.

1.4. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Endozytose von NGF in PC12-Zellen untersucht werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf dem Internalisierungs-Mechanismus sowie dem weiteren zellulären Schicksal des aufgenommenen NGFs, da letzteres Hinweise auf die Weiterleitung des NGF-Signals in Neuronen geben könnte.

In unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss von NGF auf verschiedene an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligten Proteine untersucht. Dabei konnte eine NGF-induzierte Phosphorylierung von Amphiphysin-I und -II, Epsin und Synaptojanin (Ludewig et al., 2001) nachgewiesen werden. Die Auswirkung dieser Phosphorylierungen sollte anhand des Einflusses von NGF auf die Transferrin-Endozytose untersucht werden, die ein etabliertes Testsystem für die Clathrin-vermittelte Endozytose darstellt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Sterilwerkbank	Heraeus HERA <i>safe</i>
Co ₂ -Inkubator	Forma scientific
Wasserbad	MHH Forschungswerkstatt
Neubauer-Zählkammer	Omnilab
Wasser-Thermostat	HAAKE DC1
Probenrad	MHH Forschungswerkstatt
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415C
Zentrifugen	Heraeus Instruments Laborfuge 400R (Zellkultur) Eppendorf Centrifuge 5810R (I125-Experimente) Dupont Instruments RC5S (Molekularbiologie)
Ultrazentrifuge	TL 100, Beckman
Blockthermostat	Omnilab BT 100
PAGF-Systeme:	
Gradienten Gele	Pharmacia Biotech-Hoefler SE6000-15-1.5.
Mini-Gele	Pharmacia Biotech-Hoefler SE250
Western-Blot-Transfersystem:	
Gradienten Gele	Pharmacia Biotech-Hoefler TE62
Mini-Gele	Pharmacia Biotech-Hoefler TE22
Kühlaggregat	Biometra KH-3
Pumpe	Peristaltic Pump P1, Pharmacia
Wippbank	Biometra Rocking Platform
Geldokumentationsgerät	Intas digit-store duo
Fimentwicklungsgerät	Protec Optimax
Elektroporationsgerät	BioRad Gene Pulser
Ultraschallgerät	Ultrasonic Cleaner, Branson 200
Photometer	Utraspec III, Pharmacia Biotech
Schüttelinkubator	Innova 4320, New Brunswick Scientific
Hybridisierungsöfen	Biometra Mini Hybridisation Oven
Sequenzier	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser
PCR-Gerät	Biometra Personal Cyclers und

	Biometra T Gradient
Mikroskop	Leica DMIL
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM IRBE
Konfocales Mikroskop	Leica TNS NT
Kamera	DMLD (Leica)
35mm Negativ-Scanner	Nikon LS-100
Digitale Kamera	Princeton Instruments
γ -Strahlen Meßgerät	Berthold Multi-Crystal γ Counter LB 2104 (Abteilung für Nuklearmedizin)

Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Brand, Eppendorf, Greiner, Nalgene, Neolab, Nunc, Omnilab, Pharmacia Biotech und Sarstedt bezogen. Für Dialysen wurden Slide-A-Lyser-Kassetten von Pierce oder Dialyseschläuche von Medicell International LTD (Größe 2-18/32'') mit geeigneten Ausschlußgrenzen verwendet.

Die Deckgläschen zum Einlegen in die 24-Lochplatten (12 mm Durchmesser, #1001) wurden von Omni-Lab bezogen. Für videomikroskopische Experimente wurden Lab-TekTM II Kammerdeckgläser (1,5 mm Borsilica-Glas) # 155382 oder # 155379 von Nunc verwendet.

Die Elektroporationsküvetten stammen von Eurogentec (1mm, # CE-0001 25). Als Westernblot-Transfermembran wurde Protean BA85 von Schleicher und Schüll # 10401196 eingesetzt und für den Nachweis von Signalen bei ECL-entwickelten Westernblots wurden HyperfilmTM ECL-Filme von Amersham Pharmacia Biotech verwendet.

Für Fluoreszenzaufnahmen mit der Fotokamera wurden Ilford HP5 400 Filme eingesetzt.

Zur Gelfiltration wurde Sephadex-G75 von Pharmacia bzw. PD-10 „ready to use“ Einmal-Säulen von Pharmacia #17-0851-01. Die Aufreinigung von His-markierten Fusionsproteinen wurde mit *nickel-nitrilotriacetic acid* (Ni-NTA)-Agarose Perlen von Qiagen # 30210 in 1ml Mobicol-Säulen der Firma MoBiTec durchgeführt.

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Die Chemikalien, Reagenzien und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen JT Barker, Roth, Diagnostic Chemical, Sigma, Serva, Merck, Uelzena, Pierce, Gibco, Fluka, Aldrich, ICN und Riedel-de Haën bezogen. Die Bodipy- und Alexa-Farbstoffe für die Fluorochromierungsreaktionen sowie TCEP und EDAC stammen von Molecular Probes.

Agarose	NEEO Ultra Qualität von Roth # 2267.4
Alexa488-Streptavidin	Molecular Probes # S11222, eingesetzt 1:1500
Amilorid	Calbiochem # 129876 (Dharmawardhane et al., 2000)
Biotin	EZ-Link SulfoNHS-SS-Biotin™, Pierce #21331
Bisindolylmaleimid	(Gö6450/ GF 109203 X/2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimid) Calbiochem #203290, (Ahmed et al., 1995)
Bradford-Reagenz	Roti-Nanoquant von Roth # k880.1
Collagen S	Roche #1098 292
Cytochalasin D	Calbiochem # 250255
Dextran-TMR	10.000 MW, Lysin-fixierbar, MoBiTec #D-1817
FM143	MoBiTec # T-3166,
hbNGF	rekombinates humanes β - NGF, Böhringer Mannheim
Hoechst 33258	Molecular Probes # H-1398, 1mg/ml, (Gavathiotis et al., 2000)
I ¹²⁵ -Transferrin	Die Markierung von Ratten-Transferrin (s.u.) wurde von der Firma Hartmann Analytics mit Lactoperoxidase durchgeführt.
Mowiol 40-88	Aldrich #32,459-0
Phalloidin-FITC	Sigma #P-5882, eingesetzt 1:1000
Phalloidin-TRITC	Sigma # P-1951, eingesetzt 1:10.000
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat, Calbiochem #524400, Tepper et al., 1995
Ratten-Transferrin	ICN # 55953
Transferrin-TMR	humanes Transferrin, konjugiert mit Tetramethylrhodamin (TMR), Molecular Probes # T-2872

2.1.3. Lösungen, Puffer und Medien

Abstopplösung	5% (w/v) Tris, 10% (v/v) Essigsäure
AP-Substratlösung	33µL BCIP-Stammlösung, 66µL NBT-Stammlösung in 10ml TSM Puffer
Auftragspuffer	40% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau
BCIP-Stammlösung	50mg/ml BCIP in N,N-Dimethylformamid
Blockierungspuffer	6,9g/L NaH ₂ PO ₄ , 9,0g/L NaCl, 5%(w/v) Milchpulver, pH 7,8
Deferroxamin-Mesylat-Lösung	150mM NaCl, 2mM CaCl ₂ , 25mM Natrium Acetat, 50µM Deferroxamin Mesylat
dNTPs	dATP, dGTP, dTTP, dCTP verdünnt auf je 2mM, von Peq-Lab #20-3011
GSH-Puffer (100ml)	1,537g Glutathion, 1,488ml 5M NaCl, 0,991ml 0,1M EDTA, direkt vor Gebrauch in der Kälte dazugeben: 0,744ml 10M NaOH aq, 9,924ml 10% BSA aq nach Bretscher and Lutter, 1988
Einbettungsmedium	25mg/ml DABCO in Mowiol-Lösung
Elutionspuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ pH 8,0, 0,3M NaCl, 250 mM Imidazol
Entwicklerlösung	0,005% (w/v) Zitronensäure, 0,018% Formaldehyd- lösung in 200ml H ₂ O
Fäll-Lösung	30% (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig
Fixierlösung	1,18g Na ₂ B ₄ O ₇ x10 H ₂ O, 1% Glutaraldehyd in 60ml H ₂ O
Immunfluoreszenz- Blockierungspuffer	0,2% Gelatine in PBS
KRB ^{low} (Krebs Ringer Puffer)	132mM NaCl, 4,8mM KCl, 2,4mM MgSO ₄ , 1,1mM CaCl ₂ , 0,1mM EGTA, 10mM Glucose, 10mM HEPES, pH 7,4
Laemmli-Auftragspuffer	0,375M Tris-HCL pH6,8, 0,35M SDS, 30% (v/v) Glycerin, 1% β-Mercaptoethanol (5-fach),
Laufpuffer	25mM Tris-HCl, 0,19M Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
LB-Agar	32g Lennox L Agar ad 1L H ₂ O

LB-Medium	10g/L Pepton, 5g/L Hefeextrakt, 5g/L NaCl, 1mM NaOH
Lysispuffer 1	4g Sucrose, 5ml 0,5M EDTA, 0,25ml Triton-X-100, 8mM Tris-HCL, pH 8, ad 50 ml H ₂ O
Lysispuffer2	50mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,9; 0,33M NaCl
Mowiol-Lösung	6g Glycerin, 2,4g Mowiol 40-88, 6ml Wasser, 12ml 0,2M Tris pH8,5
NBT-Stammlösung	50mg/ml NBT in 70% N,N-Dimethylformamid
OSS (50-fach)	<i>oxygen scavenging system</i> , (Kishino and Yanagida, 1988,)
RNase-Lösung	40µg/ml RNase in H ₂ O
PBS	2mM KH ₂ PO ₄ , 13mM Na ₂ HPO ₄ , 130mM NaCl, 3mM KCl, pH 7,3
Phosphatpuffer++	0,1M NaH ₂ PO ₄ pH 7,4; 0,88mM CaCl ₂ , 0,5mM MgCl ₂
Ponceau-S-Lösung (10fach)	2% (w/v) Ponceau-S, 30% (w/v) Trichloressigsäure, 30% (w/v) Sulfosalicyl-Säure
Sammelgelpuffer (4-fach)	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Sequenzierungs-Premix	Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Perkin Elmer oder DyEnamic TE-Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Pharmacia # U581050
Silberlösung	23mM NaOH, 0,625% NH ₃ aq, 47mM AgNO ₃
SOC-Medium	Sambrook J, 1989
<i>Superstain</i> -Lösung	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 0,1% Coomassie Brilliant Blue G250, 50%(v/v) Methanol, 10%(v/v) Essigsäure
T4 Ligase Puffer	400mM Tris-HCl, 100mM MgCl ₂ , 100mM DTT, 5mM ATP pH 7,8
TBS	100mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5
Transferpuffer	48mM Tris, 380mM Glycin, 0,1%(w/v) SDS, 10%(v/v) Methanol
Trenngelpuffer (4-fach)	1,5M Tris, pH 8,7

Trypsin/EDTA	0,25% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in PBS, steril
TSM-Puffer	100mM Tris, 100mM NaCl, 5mM MgCl ₂ , pH 9,5
Versuchsmedium	RPMI 1640, 20mM HEPES, 0,1% BSA, pH 7,4
Wachstumsmedium	10% (v/v) Pferdeserum, 5% (v/v) Fötale Kälberserum, 2% Glutamin in DMEM-Medium
Waschpuffer	50mM NaH ₂ PO ₄ pH8; 0,3 M NaCl, 20mM Imidazol

2.1.4. Antikörper

Wenn nicht anders angegeben, wurden die in Klammern stehenden Verdünnungen oder Konzentrationen verwendet. Für Immunfluoreszenzfärbung von PC12-Zellen mussten mehrere Kaninchen-Antikörper präadsorbiert werden (s.u.), da sie in den PC12-Zellen einen hohen unspezifischen Hintergrund hervorriefen. Diese Antikörper tragen in der Liste den Vermerk „präadsorbiert“.

CD5	Kaninchen-anti-Amphiphysin-Serum, polyklonal, gerichtet gegen die SH3-Domäne, erhalten von P.de Camilli, Universität Yale; David et al., 1994 (1:750)
anti-Amphiphysin-I	Kaninchen-AmphiphysinI-Serum, polyklonal, gerichtet gegen die SH3-Domäne von humanem Amphiphysin-I (1:500)
4G10	Maus-anti-Phosphotyrosin IgG, monoklonal, Upstate Biotechnology #05-321 (1:100)
PY20	Maus-anti-Phosphotyrosin-IgG, monoklonal, Transduction Laboratories # P11120, Fan et al., 1993 (1:100)
P145	Maus-anti-SynaptojaninI, monoclonal, erhalten von P. De Camilli, Universität Yale, McPherson et al., 1994 (1:100)
Dynamamin	Maus-anti-rDynamaminI, monoklonal, gerichtet gegen die Prolin-reiche Domäne, Transduction Laboratories # D25520 (1:100)
Caveolin-1	Kaninchen-anti-Caveolin1, polyklonal, B.D. Transduction Laboratories. # 610059 (1:300)

ci-M6PR	Kaninchen-anti-ci-M6PR, von Bernard Hoflach über E. Ungewickell, MHH (1:100)
EEA1 (01JF)	Kaninchen-anti-EEA1, polyklonal, von R. Lippe über B. Sodeik, MHH (1:100)
EEA1	Maus-anti-EEA1-IgG, monoklonal, Klon 14 von BD Transductions Laboratories #610465 (1:500)
DM1A	Maus-anti-Tubulin-Antikörper, monoklonal, Sigma # T9026 (1:1000)
Anti-rTransferrin	Kaninchen-anti-Ratten-Transferrin, ICN# 55734, präadsorbiert, (1:200)
Anti-trkA	Kaninchen-anti-trkA IgG, polyklonal, upstate biotechnology #06-574, Clary et al., 1994 (20µg/ml)
Anti-trk	Maus-anti-trk, Zymed # 13-6500 (20µg/ml) Muragaki et al., 1995
Anti-rNGFR (MC192)	Maus-anti-Ratten-p75- <i>low affinity</i> -NGFR IgG, monoklonal, Chemikon # MAB365R, Hauser et al., 1983, Chandler et al., 1984, dialysiert (siehe unten, 1:10)
Rex	Kaninchen-anti-p75NTR, polyklonal, erhalten von Dr. Reichardt, Weskamp and Reichardt, 1991 (1:1000)
9651	Kaninchen-anti-p75NTR, polyklonal, erhalten von M.Chao Huber and Chao, 1995 (1:750)
Anti-NGF	Kaninchen-anti-bNGF, polyklonal, Chemikon #AB15265SP, präadsorbiert,(1:200)
Anti-GFP Core	Kaninchen-anti-denaturiertes GFP, polyklonal, von M. Nassal, Uni Freiburg über B. Sodeik, MHH. Kratz et al., 1999 (1:5000)
Penta-His	Maus-anti-HHHHH, monoklonal, Qiagen # 34660 (1:1000)
M α R	Maus-anti-Kaninchen IgG, polyklonal, Jackson Immuno Research #211-005-109, präadsorbiert, (1:120)
Alexa488-G α R	AlexaFluor488-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen IgG, polyklonal, Molecular Probes #A-11034, präadsorbiert, (1:200)
Alexa546-G α R	AlexaFluor546-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen IgG, polyklonal, Molecular Probes # A-11035, präadsorbiert, (1:400)
FITC-G α M	FITC-gekoppelter Ziege-anti-Maus IgG, polyklonal, Jackson Immuno Research # 115-095-146, (1:200)

LRSC-G α M	Lissamin Rhodamin-gekoppelter Ziege-anti-Maus IgG, polyklonal, Jackson Immuno Research # 115-085-146, (1:200)
AP α R	mit Alkalischer Phosphatase verknüpfter Ziege-anti-Kaninchen IgG, polyklonal, Jackson Immuno Research # 111-055-003, (1:2500)
AP α M	mit Alkalischer Phosphatase verknüpfter Ziege-anti-Maus IgG, polyklonal, Jackson Immuno Research # 115-055-003, (1:2500)
HRP α R	mit Meerrettich Peroxidase verknüpfter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper, Jackson Immuno Research # 115-035-003, (1:25.000)
HRP α M	mit Meerrettich Peroxidase verknüpfter Ziege-anti-Maus Antikörper, Jackson Immuno Research # 111-035-003, (1:1000)

Der kommerziell erhältliche anti-rNGFR-Antikörper (MC192) war mit einem Konservierungsmittel (MIT, 0,01%) versetzt, welches bei den verwendeten Konzentrationen zur Phosphorylierung von Amphiphysin-I führte und bereits nach 30-minütiger Inkubation Apoptose in PC12-251C-Zellen induzierte (Daten nicht gezeigt). Der Antikörper wurde deshalb für den Einsatz in Internalisierungs-Experimente dialysiert und anschließend zur Konservierung mit 0,02% NaN_3 versetzt. Der Proteinverlust nach der Dialyse lag etwa bei 50% (abgeschätzt nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit anschließender Silberfärbung, Daten nicht gezeigt). Immunfluoreszenz-Färbungen fixierter Zellen mit dem dialysierten MC192-Antikörper unterschieden sich qualitativ nicht von Färbungen mit nicht dialysiertem Antikörper gleicher Verdünnung (Daten nicht gezeigt).

Präadsorbition von Antikörpern: Zur Präadsorbition von Antikörpern wurden 400.000 PC12-Zellen pro Loch in 24-Loch-Platten ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Zellen wie für die Immunfluoreszenzfärbung fixiert und permeabilisiert. Nach der Blockierung der unspezifischen Bindungstellen wurde 500 μ l Antikörper-Lösung in einer 1:5 Verdünnung auf die Zellen gegeben und die 24-Loch-Platte mindestens für vier Stunden bei 4°C auf der Wippbank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und zwei Minuten bei 14.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde die Antikörper-Lösung zur Konservierung mit 0,1% NaN_3 versetzt und aliquotiert.

2.1.5. Kits

ECL	Superstain West Pico von Pierce #34080
Effekten Transfektionsreagenz	Qiagen # 301425
pGEM-T VektorsystemI	Promega #A360
Qiafilter Plasmid Midi Kit	Qiagen # 12243
Qiapräp Spin Mini Kit	Qiagen # 27106
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen # 28704
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen # 28104

2.1.6. Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von MBI bezogen.

Catalase	Sigma # C-100
Glucose Oxidase	Sigma # G6641
RNaseA	Qiagen #19101
T4-Ligase	MBI Fermentas # ELO334
Taq-Polymerase	MBI Fermentas # EPO404

2.1.7. Molekulargewichtstandard

Für die Gelelektrophoresen wurden Proteinstandards der Firma Bio-Rad und MBI eingesetzt. Für die Kontrolle des fluorochromierten NGFs und von NGF-Fusionsproteinen wurde der Bio-Rad-Standard mit niedrigen Molekulargewichten (*low range* 97,4 kDa bis 14,4 kDa) oder der MBI-Standard benutzt. Ansonsten wurde mit dem Bio-Rad-Marker mit Proteinbanden zwischen 200 kDa und 31 kDa gearbeitet (*high range*).

Bio-RAD-Marker:	Myosin	200 kDa
	β -Galctosidase	116 kDa
	Phosphorylase b	97 kDa
	Serumalbumin	66 kDa
	Ovalbumin	45 kDa
	Carboanhydrase	31 kDa
	Trypsin-Inhibitor	22 kDa
	Lysozym	14 kDa
MBI-Marker	β -Galctosidase	116 kDa
	Serumalbumin	66 kDa
	Ovalbumin	45 kDa
	Lactatdehydrogenase	35 kDa
	Restriction Endonuclease Bsp981	25 kDa
	β -Lactoglobulin	18 kDa
	Lysozym	14 kDa

2.1.8. Oligonukleotide

Primer zur Amplifizierung von β -NGF aus puc8NGF:

HbNGFs2-2 (sense)	5'-GTA CTC GAG TCA TCA TCC CAT C-3'
HbNGFas2 (reverse)	5'-ACC GTC GAC AGT CTC ACA GCC-3'

Sequenzierungsprimer für pET39b+-NGF und pET39b+-NGF-GFP

T7terminator	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'
BNGF760	5'-GAA CTC ATA TTG TAC CAC GAC-3'
DSBA TAG	5'-CGA GTA TGC TGA TAC AGT GA-3'

Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe des DNA-Star Computer Programms ausgewählt.

2.1.9. Plasmide, Bakterienstämme und eukaryontische Zellen

Plasmide

NGF-puc8	erhalten von Dr. Blömer, MHH In die <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I-Schnittstelle des puc8-Vektors wurde hinter dem CMV-Promotor ein 1,8kb großes Stück genomischer DNA kloniert, das einen 732 Nukleotide langen <i>open reading frame</i> (ORF), der für Pre-bNGF kodiert enthält. Das Plasmid enthält eine Ampicillin-Resistenz.
PGEM-T	Promega # A3600
PET39b+	Novagen # 69337-3
PEGFP-N1	Clontech #6085-1
pEGFP-N1-Aktin	Clontech # 6116-1
pEGFP-N1-Tubulin	Clontech #6117-1

Bakterienstämme

Für die DNA-Amplifizierung und Klonierung wurde der *E.coli* Stamm DH5 α verwendet.

Genotyp $-F^-$ *gyrA96* (Nal^r) *recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* ($r_K -m_K+$) *glnV44 deoR*
 $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 [Φ 80d $\Delta(lacZ)$ M15]

Für die Expression von rekombinanten Fusionsproteinen wurden verwendet:

E. Coli BL21-CodonPlus, ein Derivat des *E. Coli* B-Stamms (Stratagene)

Genotyp F^- *ompT hsdS* ($r_B-m_B^-$) *dmc+* Tet^r *gal endA Hte* [*argU ileY leuW Cam*^r]

und DH5 α (siehe oben).

Eukaryontenzellen

PCNA	exprimieren nur p75NTR, erhalten von R. Niedenthal, MHH
NRA5	PC12-Zellen ohne p75NTR, erhalten von Dr. Bredezen, Rabizadeh et al., 1993
NNR5	PC12-Zellen ohne trkA, erhalten von Dr. Poksay, Green et al., 1986
PC12 251	erhalten von W. Huttner, MPI Dresden
PC12 251C	erhalten von W. Huttner, MPI Dresden
HeLa	erhalten von E. Ungewickell, MHH

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Zellen wurden zur Passage mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst.

Für alle Experimente mit nachfolgender Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät, in deren Löcher vorher ein Poly-L-Lysin-beschichtetes Deckgläschen (Durchmesser 12mm) gelegt wurde.

PC12-251/251C-Zellen: Die Zellen wurden bei 37°C und 10% CO₂ in Wachstumsmedium sieben Tage kultiviert. Zur Passage wurden $1,6 \times 10^6$ Zellen pro 75cm²-Zellkulturflasche in Wachstumsmedium ausgesät.

Für Internalisierungs- und Differenzierungsexperimente, Transfektionen sowie für Biotinylierungsexperimente wurden je 80.000 Zellen pro Loch in einer 24-Lochplatte ausgesät. In Differenzierungsexperimenten wurden die Stimuli nach vier Stunden nach Aussaat zum Wachstumsmedium dazugegeben und die Zellen für 16 bis 24 Stunden inkubiert. Wurde NGF als Stimuli verwendet, wurden die Zellen dann als NGF-differenziert bezeichnet. Internalisierungsexperimente wurden nach 24 Stunden nach der Aussaat durchgeführt.

Für Experimente zur Phosphorylierung von Amphiphysin-I wurden $3,5$ bis 4×10^5 Zellen pro Loch in 24-Loch-Platten eingesetzt und das Experiment zwei Tage nach Aussaat durchgeführt.

Zur Durchführung von I¹²⁵-Transferrin-Aufnahme-Experimenten wurden $10 \times 1 \times 10^7$ Zellen pro 180cm²-Zellkulturflasche eingesetzt. Das Experiment wurde vier Tage nach Aussaat durchgeführt.

NNR5-Zellen wurden in konditionierten Wachstumsmedium bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Das konditionierte Medium bestand zu 50% aus Wachstumsmedium, in dem vier Tage PC12-Zellen kultiviert worden waren und zu 50% aus frischem Wachstumsmedium. Zur Passage wurden 1×10^6 Zellen in CollagenS-beschichteten 10 cm Durchmesser Schalen ausgesät und über sieben Tage bei 10% CO₂ kultiviert. Für Immunfluoreszenz-Experimente wurden 4×10^4 Zellen pro Loch in 24-Loch-Platten je ausgesät. Die CollagenS-beschichtung erfolgte nach Hersteller-Angaben.

NRA5-Zellen wurden in Wachstumsmedium bei 37°C und 10% CO₂ 7 Tage kultiviert. Zur Passage wurden 3×10^6 Zellen pro 75cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Für Immunfluoreszenz-Experimente wurden in 24-Loch-Platten je 2×10^4 Zellen pro Loch ausgesät.

Hela-Zellen wurden inkubiert in DMEM, 5% FCS, 2mM Glutamin bei 37°C und 5% CO₂. Zur Passage wurden 3x10⁶ Zellen in einer 75cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Für Immunfluoreszenz-Experimente wurden in einer 24-Loch-Platte 80.000 Zellen pro Loch ausgesät.

Die **PCNA-Zellkultur** wurde von C. Hakim (Labor R. Niedenthal, MHH) durchgeführt.

Beschichtung der Deckgläschen mit Poly-L-Lysin: Vor der Beschichtung wurden die Deckgläschen gründlich gereinigt. Dazu wurden die Deckgläschen 10 Minuten im Ultraschallbad in Seifenlauge inkubiert. Dann wurde gewaschen und anschließend 10 Minuten im Ultraschallbad in ExtranAP-11-Lösung inkubiert. Nach erneuten Waschen wurden die Zellen in H₂O im Ultraschallbad inkubiert. Dann wurden die Deckgläschen in 100% Ethanol gewaschen und anschließend in Ethanol im für 10 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Dann wurden die Deckgläschen in H₂O gewaschen und getrocknet.

Zur Beschichtung wurden die Deckgläschen mindestens für 30 Minuten in 50µg/ml Poly-L-Lysin aq (filtriert) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen in H₂O gespült, getrocknet und dann trockensterilisiert.

2.2.2. Transfektion

Die Zellen wurden 4 Stunden nach Aussaat mit dem Effekten-Transfektionsreagenz (Kit) laut Hersteller-Angaben transfiziert. Für Transfektionen von Zellen in 24-well Platten wurden 0,24µg PEGFP-N1, pEGFP-N1-Aktin oder pEGFP-N1-Tubulin und 5µl Effekten-Reagenz eingesetzt. Für Transfektionen von Zellen in 2er- oder 4er Kammerdeckgläsern wurden das vom Hersteller angegebene Protokoll für 24-Loch-Platten entsprechend dem Kammervolumen adaptiert. Für Videomikroskopie-Experimente wurden die Zellen 16 bis 24 Stunden nach Transfektion eingesetzt.

2.2.3. Videomikroskopie

Für videomikroskopische Experimente wurden 1,5 x10⁵ Zellen pro Kammer in 2er-Kammerdeckgläsern bzw. 70.000 Zellen pro Kammer in 4er-Kammerdeckgläsern ausgesät und gegebenenfalls transfiziert. Die Experimente wurden in Versuchsmedium bei 37°C durchgeführt. Dazu musste der Mikroskopraum auf 37°C erwärmt werden. Die Temperatur

schwankte während des jeweiligen Experimentes um etwa 1°C. Teilweise wurde OSS zum Medium zugegeben, welches die Radikalbildung reduzieren sollte.

Die Belichtungszeit wurden je nach Intensität des Signals zwischen 0,2 und einer Sekunde gewählt. Während der Aufnahme war die „autoscale“ Funktion des Metamorph-Computer-Programms eingeschaltet. Dadurch wurde für die Wiedergabe die Helligkeit jedes Bildes automatisch optimal eingestellt.

2.2.4. Internalisierungsexperimente

Außer für Differenzierungsexperimente wurden die Zellen während der Experimente in Versuchsmedium oder KRB^{low} inkubiert. Im Rahmen der Versuchsbedingungen erwiesen sich beide Medien als gleich gut geeignet.

Alle Inkubationen wurden im Wasserbad durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass Kontakt zwischen der Zellkulturschale und der Flüssigkeit bestand. Beim Wechseln der Inkubationslösungen wurde von der einen Seite vorsichtig abgesaugt und von der anderen Seite ebenfalls vorsichtig das frische Medium zugegeben. Als Mindestvolumen wurde in 24-Loch-Schalen 220µl pro Loch eingesetzt.

Bei Inkubationen in kleinen Volumina (z.B. Antikörperlösungen) wurde das Deckgläschen mit der mit Zellen bewachsenen Seite vorsichtig auf einem 50µl Tropfen gelegt. Kleinere Volumina sind ungünstig, da es bei längeren Inkubationen bei 37°C zum Austrocknen kommen kann. Um hier Kontakt mit dem Wasserbad zu halten wurde zunächst eine Metallplatte so plaziert, dass ihre Unterseite Kontakt zur Flüssigkeit hatte. Die Platte wurde an der Oberseite leicht angefeuchtet und Parafilm darauf gelegt, auf den dann der Tropfen pipettiert wurde. Am Ende der Inkubation sollte das Deckgläschen ebenfalls vorsichtig wieder abgenommen werden. Dieses sollte durch einmaliges Anheben geschehen, um die Scherkräfte so gering wie möglich zu halten.

Da schnelle Temperaturänderungen zum Ablösen der Zellen führen können, wurde darauf geachtet, dass die Umstellung langsam durchgeführt wurde. Beim Abkühlen wurde z.B. die Zellen im warmen Versuchsmedium in ein 4°C- Wasserbad gestellt. Erfolgte die Inkubation in 24-Loch-Platten in einem Flüssigkeitsvolumen von einem Milliliter, so dauert es etwa 10 Minuten, bis das Medium 4°C erreicht hat.

Antikörper-, Transferrin- oder Dextran-Verdünnungen wurden vor dem Einsatz für 5 Minuten bei 13.0000 rpm zentrifugiert.

4°C-Bindungsexperimente: Die Zellen wurden für 15 Minuten auf 4°C abgekühlt. Anschließend folgte eine 30 bis 60 Minuten lange Bindungsphase mit dem entsprechenden Reagenz bei 4°C. Dann wurde dreimal vorsichtig mit 4°C-kaltem Versuchsmedium gewaschen und dann die Zellen auf 37°C im Wasserbad für verschiedene Zeiten erwärmt (*chase*).

***pulse-chase*-Experimente:** Für einen bestimmten Zeitraum (meistens fünf Minuten, *pulse*) wurde die zu internalisierende Substanz bei 37°C zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde 3 mal mit 37°C warmen Versuchsmedium gewaschen und dann für verschiedene Zeiträume weiter bei 37°C inkubiert.

In Experimenten mit kontinuierlicher Aufnahme wurde die zu internalisierende Substanz zugegeben und die Zellen für verschiedene Zeiträume bei 37°C inkubiert.

Sollte die Internalisierung durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, wurde zum Beenden der Reaktion die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 3% Paraformaldehyd (PFA) in PBS versetzt.

Bei I^{125} -Transferrin-Aufnahme-Experimenten und Amphiphysin-I-Phosphorylierungs-Experimenten wurden zum Abstoppen der Reaktion die Zellen durch Zugabe von 1x Laemmli-Auftragspuffer (bei I^{125} - Experimenten ohne Bromphenolblau) lysiert.

Die Details der einzelnen experimentellen Durchführungen sind in den Tafel-Legenden beschrieben.

Aufnahme von I^{125} -Transferrin: Am Versuchstag wurden die adhären Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Für kontinuierliche Aufnahme-Experimente wurden $6,2$ bis $7,4 \times 10^6$ PC12-251-Zellen in 1,5ml 37°C warmen Versuchsmedium und für *pulse-chase*-Experimente $3,4 \times 10^6$ Zellen in 1ml 37°C warmen Versuchsmedium in Gegenwart oder Abwesenheit von Stimuli für 20 Minuten rotierend in einem Hybridisierungssofen bei 37°C inkubiert.

Für *pulse-chase*-Experimente wurden 100ng/ml I^{125} markiertes rTransferrin (37MBq/nmol) und 15µg/ml rTransferrin zugegeben und die Zellen für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Nach drei Waschschritten bei 4°C wurden die Zellen in ein neues Röhrchen überführt, um unspezifischen Hintergrund durch an die Gefäßwand gebundenes I^{125} Transferrin zu entfernen. Entweder wurde nun ein 10-minütiger Deferroxamin-Mesylat-Waschschritt bei 4°C durchgeführt und die Zellen in 1x Laemmli-Auftragspuffer (ohne Bromphenolblau) lysiert (0 Min. *chase*) oder die Zellen für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, dann wieder auf 4°C abgekühlt, mit Deferroxamin-Mesylat-Lösung inkubiert und lysiert (15 Min. *chase*).

Für kontinuierliche Transferrin-Aufnahme wurden jeweils 800ng/ml I^{125} Transferrin (37MBq/nmol) und 60µg/ml rTransferrin in 0,5ml zugegeben und die Zellen bei 37°C inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen sich nicht absetzten. Nach 3, 7, 14 und 21 Minuten wurden je 450µl abgenommen und auf 4°C abgekühlt. Die Proben wurden einmal mit Versuchsmedium und zweimal bei 4°C mit PBS gewaschen und dann für 10 Minuten bei 4°C unter gelegentlichem Schwenken mit Deferroxamin-Mesylat-Lösung inkubiert. Abschließend wurden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen und in 1x Laemmli-Auftragspuffer (ohne Bromphenolblau) lysiert.

Die verschiedenen Bedingungen wurden in je drei parallelen Ansätzen untersucht. Die Messung der Proben erfolgte mit dem Berthold Multi-Crystal γ Counter LB 2104.

2.2.5. Biotinylierung von Oberflächenproteinen

Nach dem Waschen der Zellen mit PBS (bei Raumtemperatur) wurde zum Abkühlen für 15 Minuten in Phosphatpuffer++ bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4°C mit 0,35mg/ml Biotin in Phosphatpuffer++ inkubiert. Überschüssiges Biotin wurde dann durch einmaliges waschen mit 4°C kaltem 50mM Glycerin in Phosphatpuffer++ , gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation mit 50mM Glycerin in Phosphatpuffer++ bei 4°C entfernt. Anschließend wurde einmal mit 4°C kaltem Versuchsmedium mit oder ohne Stimulus gewaschen. Die Negativ-Kontrolle wurde bei 4°C in Versuchsmedium inkubiert, während die anderen Ansätze auf 37°C erwärmt wurden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Internalisierungsvorgänge durch Abkühlen der Zellen auf 4°C für mindestens 10 Minuten gestoppt. Als nächstes wurden das oberflächlich gebundene Biotin durch 30 Minuten Inkubation mit GSH-Puffer bei 4°C abgelöst. Dann wurde einmal mit 4°C kaltem PBS gewaschen und dann noch mal für weitere 30 Minuten mit GSH-Puffer inkubiert. Vor der Fixierung mit 3% PFA für 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde einmal mit 4°C-kaltem PBS gewaschen.

Wenn eine Vorinkubation durchgeführt wurde, erfolgte diese vor der Biotinylierung in Versuchsmedium bei 37°C.

2.2.6. Immunfluoreszenz-Färbung

Wenn nicht anders angegeben wurden die Zellen mit 3%PFA in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Zum Entfernen des PFAs wurde 3 mal mit PBS gewaschen und anschließend wurde für 10 Minuten mit 50mM NH₄Cl in PBS inkubiert. Dann wurde für exakt 5 Minuten mit 0,1% Triton-X-100 (TX-100) in PBS permeabilisiert. Das TX-100 wurde ebenfalls durch dreimaliges waschen mit PBS entfernt. Zur Sättigung unspezifischer Bindungstellen wurde für 30 Minuten mit Immunfluoreszenz-Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem ersten Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur, sofern dieser nicht bereits in Internalisierungsexperimenten von den Zellen aufgenommen wurde. Für die Antikörper-Inkubation wurden die Deckgläschen mit der Zellschicht nach unten auf einem 20µl Tropfen auf Parafilm inkubiert. Anschließend wurde dreimal fünf Minuten mit Immunfluoreszenz-Blockierungspuffer gewaschen und dann 30 Minuten mit dem zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden dreimal fünf Minuten mit Immunfluoreszenz-Blockierungspuffer inkubiert, dann zweimal fünf Minuten mit PBS gewaschen und anschließend in Einbettungsmedium konserviert.

2.2.7. PCR

Für die Ligation von hbNGF mit pGEMT wurde die NGF-DNA aus puc8-NGF amplifiziert. Dazu wurde 0,1µl puc8-NGF DNA vom 14.1.00, 2 mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, je 2pmol hbNGFas2- und hbNGFs2-2-Primer und 2u Taq-Polymerase für die Amplifizierungsreaktion eingesetzt. Das PCR-Protokoll lautete:

<u>4 Minuten</u>	94°C	} 31 Wiederholungen
45 Sekunden	55°C	
60 Sekunden	72°C	
<u>45 Sekunden</u>	94°C	
45 Sekunden	55°C	
10 Minuten	72°C	

Nach der Amplifizierung wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des „Qiaquick PCR Purification Kit“ durchgeführt.

2.2.8. Restriktionsverdau

5 *units* Enzym pro μg DNA wurde in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer eine Stunde bei 37°C inkubiert. Sollte eine DNA mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten werden, wurde zunächst mit einem Enzym verdaut, dieses (wenn möglich) laut Hersteller-Angaben hitzeinaktiviert und dann mit dem zweiten Enzym verdaut. Waren die Pufferbedingungen nicht für beide Enzyme optimal, oder ließ sich keines der beiden Enzyme hitzeinaktivieren, so wurde die DNA nach dem ersten Verdau aus dem Agarose-Gel aufgereinigt (siehe unten). Anschließend wurde die DNA für die zweite Reaktion eingesetzt.

Zur Analyse erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der DNA in Agarose-Gelen sowie der Nachweis der DNA durch Färbung mit Ethidiumbromid (Durchführung nach Sambrook J, 1989). Bei einem präparativem Verdau wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpel aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem „Qiaquick Gel Extraction Kit“.

2.2.9. Ligation

Für die Ligation des hbNGFs PCR-Produkts mit pGEM-T wurde die Reaktion mit Komponenten des pGEM-T Vektorsystems I laut Hersteller-Angaben durchgeführt.

Standard-Ligationen erfolgten durch Inkubation von insgesamt 70-150ng geschnittener und gereinigter Vektor- und Insert-DNA im molaren Verhältnis 1:3 und 1:6 mit 2 u T4-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur im mitgelieferten T4-Ligationspuffer in einem Volumen von $10\mu\text{l}$.

Zum Beenden der Ligation wurde für 10 Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert.

2.2.10. Transformation

Die Transformation von Ligationsansätzen wurde über Elektroporation durchgeführt. Dazu wurden $40\mu\text{l}$ elektrokompente *E. coli* DH5 α mit $1\mu\text{L}$ des Ligationsansatzes vermischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation wurde bei $150\mu\text{FD}$, $200\ \Omega$ und $1,8\text{kV}$ durchgeführt. Anschließend wurde 1ml LB-oder SOC-Medium in die Elektroporationsküvette gegeben, gemischt und der Ansatz in ein $1,5\text{ml}$ Reaktionsgefäß überführt.

Für Transformationen von Plasmid-DNA zur DNA-Amplifizierung oder Proteinexpression in Bakterien wurde 50-100ng DNA mit 40µl CaCl₂-kompetenten DH5 α oder BL21Codon+ bei 4°C gemischt und für zwei Minuten bei 42°C inkubiert. Dann wurde der Ansatz für fünf Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben.

Nach der Transformation rotierten die Bakterien dann mindestens 30 Minuten bei 37°C in einem Probenrad, bevor ein Teil des Ansatzes auf LB-Agar-Platten, die Antibiotika entsprechend des Selektionsmarkers enthielten ausplattiert wurde. Die LB-Agar-Platten wurden dann bis zu 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden bis zu 24 Kolonien gepickt und damit 3-5 ml Antibiotika-haltige LB-Flüssigkulturen angeimpft. Diese rotierten dann über Nacht bei 37°C im Probenrad (Über-Nacht-Kultur). War Plasmid-DNA zur Amplifizierung in Bakterien transformiert worden, wurde die DNA aus den Über-Nacht-Kulturen direkt über „Qiaprep Spin Mini Kits“ aufgereinigt.

Ampicillin wurde in einer Konzentration von 50µg/ml und Kanamycin in einer Konzentration von 30µg/ml eingesetzt. Kalziumchlorid- und elektrokompetente-Bakterien sowie die LB-Agar-Platten wurden nach Sambrook J, 1989 hergestellt.

2.2.11. Analyse der Klone nach Transformation von Ligationsansätzen in elektokompetenten Bakterien

Die amplifizierten Plasmide in den Über-Nacht-Kulturen wurden zunächst auf erfolgreiche Insertion getestet.

Zur Analyse insertierter DNA-Fragmente bis 500bp wurde 1,5ml der Über-Nacht-Kultur 5 Minuten bei 5000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl Lysispuffer 1 gemischt und nach Auflösung des Pellets 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 90 Sekunden bei 96°C erwärmt und dann 10 Minuten bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit 200 µl Isopropanol versetzt und 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Als nächstes wurde für 30 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 700µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Das trockene Pellet wurde mit 20 µl RNase-Lösung resuspendiert, dann wurden 2µl des Ansatzes in einem analytischen Restriktionsverdau analysiert.

Zur Analyse insertierter DNA-Fragmente ab 500bp wurden 100µl der Übernacht-Kultur mit 50µl Phenol-Chloroform und 10µl Auftragspuffer 30 Sekunden gemischt.

Anschließend wurde für drei Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. 15µl vom Überstand wurden auf ein 0,7% Agarose-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Die DNA von Bakterien-Klonen, die ein Insert enthielten wurden dann die DNA aus der restlichen Übernacht-Kultur über „Qiaprep Spin Mini Kits“ aufgereinigt und die DNA wenn nötig weiter durch Restriktionsanalyse überprüft. Die Konzentrationsmessung erfolgte photometrisch bei 260nm.

2.2.12. Sequenzierung

300-400ng DNA gelöst in H₂O (HPLC-Grad), 3-5pmol Sequenzierungsprimer und 4µl Sequenzierungs-Premix wurden in einem Volumen von 10µl in einem 500µl Reaktionsgefäß für die Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Die Sequenzier-Reaktion erfolgte in einem PCR-Gerät.

Sequenzier-Protokoll	30 Sekunden	96°C	} 25 Zyklen
	15 Sekunden	50°C	
	4 Minuten	60°C	

Anschließend wurden 90µl H₂O (HPLC-Grad) und 10µl 3M Natriumacetat pH 4,6 zugegeben und gemischt. Dazu wurden dann 250µL 100% Ethanol gegeben und der Ansatz fünf Minuten bei 15.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Danach wurde mit 250µL 70% Ethanol gewaschen (fünf Minuten, 15.000 rpm) und anschließend bei 37°C getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde schließlich in 25µL H₂O (HPLC-Grad) resuspendiert und im Sequenzer analysiert.

2.2.13. Proteinexpression

Bevor die Proteinexpression und -reinigung im großen Maßstab durchgeführt wurde, mussten zunächst die Bedingungen in Vorexperimenten optimiert werden. Dazu wurden je 5mL Antibiotika-haltige LB-Kulturen mit einer Kolonie DH5α oder *E. coli* BL21Codon + Bakterien, die mit der entsprechenden Plasmid-DNA transformiert worden waren, angeimpft und diese bis zu einer OD_{600nm} zwischen 0,35 und 0,6 bei 37°C im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Dann wurden die Ansätze mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden

Aliquots entnommen, die Bakterien pelletiert, mit 1xLaemmli-Auftragspuffer versetzt und die exprimierten Proteine im Westernblot analysiert.

Die so ermittelten IPTG-Konzentration und Inkubationszeit wurden für das eigentliche Expressionsexperiment übernommen. Zunächst wurden 5ml Antibiotika-haltige LB-Flüssigkulturen mit Kolonien von entsprechend transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Übernacht-Kulturen wurden dann zu 500ml Antibiotika-haltigen LB-Medium gegeben und die Bakterien bis zu einer OD_{600nm} 0,6 bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Expression des Zielproteins durch 0,25mM IPTG induziert. Nach 4 Stunden IPTG-Stimulation wurden die Bakterien durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4000g pelletiert .

Isolierung aus dem periplasmatischen Raum: Pro Gramm Bakterien-Pellet wurde in 80 ml 30mM Tris-HCl, 20% Sucrose pH 8,0 bei 4°C resuspendiert. Tropfenweise wurde bis zu einer finalen Konzentration von 1mM eine 500mM EDTA-Lösung zugeben. Dann wurden die Bakterien fünf bis 10 Minuten unter leichten Schwenken bei 4°C inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 8000xg bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4°C kalter 5mM MgSO₄-Lösung resuspendiert und unter Schwenken 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde noch mal für 20 Minuten bei 8000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand nach der Zentrifugation über Nacht gegen Lysispuffer 2 dialysiert.

100 ml des Dialysates wurden mit 10mM Imidazol versetzt und auf eine mit 0,5mL Ni-NTA-Agarose gefüllte MoBiTec-Säule, äquilibriert mit 10mM Imidazol in Lysispuffer 2, gegeben. Die Säule wurde mit 20 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 5 ml Elutionspuffer eluiert.

Trichloressigsäure (TCA)-Präzipitation: Zur TCA-Präzipitation wurden 4,5ml des Säuleneluats und 7,5ml der periplasmatischen Fraktion eingesetzt. Dazu wurde bei 4°C die Lösungen jeweils 1:1 mit 20% TCA aq versetzt und 1 Stunde und 30 Minuten bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Dann wurde für 15 Minuten bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 0,5N HCl in Aceton bei 4°C resuspendiert. Anschließend wurde sieben Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200µl 1x Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen und der pH durch Zugabe von 1M Tris-HCL-Lösung justiert.

2.2.14. Fluorochromierung von NGF

Vor dem Experiment, vor jeder Reaktionsstufe und nach dem Experiment wurden Proben für die Messung der biologischen Aktivität von NGF in Amphiphysin-1-Phosphorylierungs-Experimenten, PC12-Differenzierungsexperimenten und für die Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford entnommen.

Zudem wurde das Ausgangs- und Endprodukt in der SDS-PAAGE und durch photometrische Messungen analysiert.

Reaktion mit Bodipy-Farbstoffen: NGF wurde in 0,1M NaHCO₃ pH8,3 verdünnt, der Ansatz geteilt und der Farbstoff vorsichtig unter Mischen in verschiedenen molaren Überschüssen zugegeben. Anschließend wurde zwei Stunden im Dunklen unter Schwenken inkubiert. Um den überschüssigen Farbstoff abzutrennen wurde entweder eine Gelfiltration durchgeführt oder in Slide-A-Lyser Dialyse-Kassetten (Ausschlußgrenze 7kDa) dialysiert.

Reaktion mit Alexa488Maleimid: 146mM NGF wurde in 10mM MES mit 48,7mM EDAC und 0,5M Cytamin gemischt (Endvolumen 126µl) und 30 Minuten bei Raumtemperatur langsam rotiert. Anschließend wurde über Nacht gegen 1,5L 50mM Tris pH 7,4 in Slide-A-Lyser Dialyse-Kassetten (Ausschlußgrenze 7 kDa) dialysiert.

Das Dialysat wurde mit final 0,825mM TCEP versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Dann wurde Alexa488Maleimid in einer finalen Konzentration von 1,6mM zugegeben und der Reaktionsansatz für zwei Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur rotiert. Dann wurde die Reaktion mit einer finalen Konzentration von 3,25mM Glutathion gestoppt. Nach kurzem Mischen wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 4°C gegen 1L 50mM Tris pH 7,4 lichtgeschützt dialysiert. Der Dialyse-Puffer wurde während der Dialyse nach vier Stunden gewechselt. Abschließend wurde das Dialysat photometrisch analysiert.

Gelfiltration: Nach der Reaktion mit Bodipy-TMR-X (V und VI) wurde eine Sephadex G-10 „*ready-to-use*“ Säule (2,5 ml Volumen) verwendet. Diese wurde mit 20 ml PBS und 20 ml NaHCO₃ Puffer pH 8,3 äquilibriert. Die Probe wurde aufgetragen, dann wurde die Säule mit 2x 500µl NaHCO₃ Puffer pH 8,3 gespült und Fraktionen von je 10 Tropfen gesammelt. Die Fraktionen wurden anschließend durch Messung der Absorbtion bei 280 bzw. 542nm auf Protein und Farbstoffgehalt untersucht. Fraktionen mit erhöhten Proteingehalt wurden vereinigt.

Nach Reaktion mit Bodipy-TMR-X (I) wurde der Ansatz über eine Sephadex-G-75-Säule gereinigt. Das Säulenfüllmaterial wurde nach dem Quellen zusammen mit den Puffern

entgast. Die Säule (10 x 250mm) wurde in 0,1M NaHCO₃ Puffer pH 8,3 äquiliert. Nach der Reaktion mit Bodipy-TMR-X wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und der Überstand auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit zweimal 5ml 0,1M NaHCO₃ Puffer pH 8,3 gewaschen. Es wurden 1ml-Fraktionen gesammelt und diese durch Messung der Absorbtion bei 280nm auf den Proteingehalt untersucht. Fraktionen mit erhöhten Proteingehalt wurden vereinigt.

Dialyse: Nach Reaktion mit Bodipy-TMR-X (II, III, IV), Bodipy-FL und Bodipy-TMS wurden die Ansätze kurz zentrifugiert und die Überstände in Slide-A-Lyzer-Dialyse-Kassetten mit einer Ausschlußgrenze von 10kDa über Nacht gegen 1L PBS bzw. 0,1M NaHCO₃ pH 8,3 dialysiert.

Nach der Reaktion mit Alexa488Maleimid wurde der Ansatz in einer Slide-A-Lyzer-Dialyse-Kassetten mit einer Ausschlußgrenze von 7kDa über Nacht gegen 1,5L 50mM Tris pH 7,4 dialysiert.

Proteinbestimmung: Die Ermittlung des Proteingehaltes wurde nach Bradford, 1976 durchgeführt.

Bestimmung des Fluorochromierungsgrades: Die Bestimmung des Fluorochromierungsgrad erfolgte photometrisch nach Hersteller-Angaben:

$$\frac{A_{\text{max}}(\text{Farbstoff})}{\text{Extinktionskoeffizient}} \times \frac{\text{MW Protein}}{\text{mg Protein/ ml}} = \frac{\text{Mol (Farbstoff)}}{\text{Mol (Protein)}}$$

(A_{max} und der Extinktionskoeffizient werden vom Hersteller für den jeweiligen Farbstoff angegeben.)

2.2.15. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAAGE)

Die Durchführung erfolgte nach Laemmli, 1970. Für die Analyse der Amphiphysin-I-Phosphorylierung wurden 3-10% PAA Gradienten- (15x15x1,5cm) oder 5,5% PAA Mini-Gele (9 x 8 x 0,75 cm) verwendet. Zur Analyse des fluorochromierten NGFs oder der Fusionsproteine wurden Minigele mit 14 bzw. 7,5% PAA eingesetzt. Die Herstellung des PAA-Gradienten erfolgte mit Hilfe einer Mischkammer und einer peristaltischen Pumpe. Die Proben wurden vor der Beladung des Gels in 1x Laemmli-Auftragspuffer fünf Minuten bei 96°C erhitzt.

Die Elektrophorese wurde unter Wasserkühlung (12°C) bei 100mA pro Gradientengel und 40mA pro Minigel in 1xLaufpuffer durchgeführt.

2.2.16. Silberfärbung

Das Gel wurde viermal 15 Minuten in Fäll-Lösung inkubiert. Dann wurde es dreimal fünf Minuten gewässert, bevor es für 10 Minuten in Fixierlösung inkubiert wurde. Nach dem Fixieren wurde es wieder zweimal fünf Minuten gewässert. Als nächstes erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten in Silberlösung, anschließend wurde für drei mal zwei Minuten gewässert. Dann wurde das Gel so lange in Entwicklerlösung inkubiert, bis sich die Protein-Banden schwarz färbten. Daraufhin wurde die Entwicklung durch zwei mal 10 Minuten Inkubation in Abstopplösung beendet.

2.2.17. Westernblot

Zum spezifischen Nachweis von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen wurde das Western-Blot-Verfahren (Towbin et al., 1979) verwendet. Nach SDS-PAAGE wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran nach dem Sandwich-Blot-Verfahren transferiert. Der Transfer von Proteinen aus Gradientengelen erfolgte entweder bei 600V, 400mA und 100W für vier Stunden unter Wasserkühlung (12°C) oder bei 600V, 100mA und 100W für 16 Stunden in Transferpuffer. Proteine aus Mini-Gele wurden bei 600 V, 40mA und 100W für 16 Stunden in Transferpuffer auf die Nitrozellulose-Membran transferiert.

Der Transfer auf die Membran wurde durch Ponceau-S-Färbung kontrolliert. Dazu wurde die Membran einmal mit Ponceau-S gespült und dann 10 Minuten in Ponceau-S inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Farbstoff in einem H₂O- Waschschrift entfernt.

Zum Nachweis spezifischer Proteine auf der Membran wurden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation in Blockierungspuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend folgte eine weitere Stunde Inkubation mit dem ersten Antikörper in Blockierungspuffer. Dann wurde viermal fünf Minuten mit Blockierungspuffer gewaschen, bevor eine 30-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase oder an Meerrettich-Peroxidase, in Blockierungspuffer erfolgte.

Zur Entwicklung von alkalische Phosphatase-markierten Proteinen wurde die Membran viermal für fünf Minuten mit dem Blockierungspuffer gewaschen, dann zweimal für zehn Minuten mit TSM-Puffer gewaschen und abschließend in AP-Substratlösung entwickelt. Die Entwicklung wurde durch Waschen der Membran in H₂O gestoppt.

Bei Meerrettich Peroxidase-markierten Proteinen wurde die Membran drei mal 10 Minuten mit Blockierungspuffer und drei mal 10 Minuten TBS (oder PBS) gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwicklung mit Hilfe des „Superstain West Pico“ ECL-Kits nach Hersteller-Angaben. Zur Detektion der Banden wurden Hyperfilm™ ECL-Filme von Amersham Pharmacia Biotech verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung des Einflusses von NGF auf die Endozytose von Transferrin

Der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Hypothese, dass NGF die Endozytose durch Clathrin-behüllte Vesikel (oder auch andere Endozytosevorgänge) reguliert. Für diese Hypothese sprechen die folgenden Beobachtungen:

1. NGF induziert die Phosphorylierung von Proteinen, denen eine Funktion bei der Clathrin-vermittelten Endozytose zugesprochen wird mit einem Maximum nach 20 Minuten Inkubation. Dazu gehören Amphiphysin-1 und -2, Epsin, Synaptojanin (Ludewig et al., 2001) und die schwere Kette von Clathrin (Beattie et al., 2000).
2. Die NGF-induzierte Phosphorylierung dieser Proteine verändert die Wechselwirkungen zwischen Amphiphysin-1 und -2 (F. Ullrich, B. Pfander, R. Bauerfeind, unveröffentlichte Ergebnisse).
3. Nach Inkubation mit NGF wurde eine erhöhte Konzentration von Clathrin und AP-2 in der Zellperipherie von PC12-Zellen nachgewiesen, was auf eine gesteigerte Endozytoseaktivität hindeuten könnte (Beattie et al., 2000).

Zur Überprüfung der Hypothese wurde die Aufnahme von Transferrin, einem etablierten Marker für Clathrin-vermittelte Endozytose, in Abhängigkeit von NGF untersucht. Während dieser Arbeit wurde eine Untersuchung veröffentlicht, in der mit Hilfe von radioaktiv markiertem Transferrin eine Steigerung der Transferrin-Aufnahme nach NGF-Inkubation in PC12-Zellen nachgewiesen wurde (Beattie et al., 2000). Die Autoren interpretieren dieses Ergebnis als Steigerung der Clathrin-vermittelten Endozytose, allerdings ohne morphologische Untersuchungen durchzuführen. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Transferrin-Endozytose sowohl morphologisch in Immunfluoreszenz-Experimenten als auch quantitativ durch radioaktive Markierung in 4°C-Bindungsexperimenten, *pulse-chase* Experimenten und bei kontinuierlicher Aufnahme von Transferrin untersucht. Die Anwesenheit von rekombinantem humanen β -NGF (hbNGF) führte bei allen experimentellen Ansätzen zu einer erhöhten Menge an zellulär gebundenem Transferrin nach fünf Minuten Inkubation. Im Gegensatz dazu konnte in 4°C-Bindungsexperimenten und *pulse-chase*-Experimenten zu späteren Zeitpunkten (15 Minuten *chase*) kein Unterschied zwischen der Kontrolle und NGF-behandelten Zellen nachgewiesen werden.

Für die Untersuchungen wurden die beiden PC12-Zellklone 251 und 251C verwendet, die sich im Hinblick auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente weitgehend identisch verhalten. Die Morphologie des 251C-Klones weist Anzeichen für eine höhere Aktin-Dynamik auf (vgl. Abschnitt 2.1.) und lässt sich leichter durch NGF in einen Neuronen-artigen Phänotyp differenzieren als der 251-Klon. Im Gegensatz dazu war die Transferrin-Aufnahme durch Zellen des 251-Klones höher als die des 251C-Klones (Daten nicht gezeigt).

3.1.1. Aufnahme von Transferrin-TMR in 4°C-Bindungsexperimenten in Abhängigkeit von NGF

Die Transferrin-Endozytose in PC12-Zellen wurde in 4°C-Bindungsexperimenten mit humanem Tetramethylrhodamin (TMR)-gekoppelten Transferrin (hTransferrin-TMR) untersucht.

In diesen Experimenten werden die Zellen von 37°C auf 4°C abgekühlt und dann mit dem fluoreszenzgekoppelten Transferrin inkubiert. Durch das Absenken der Temperatur auf 4°C wird die Membranfluidität soweit eingeschränkt, dass keine Endozytose stattfinden kann. Mit dieser Methode werden nur die Transferrin-Rezeptoren, die zu diesem Zeitpunkt an der Plasmamembran lokalisiert sind, markiert. Anschließendes Waschen entfernt ungebundenes Transferrin. Durch Aufwärmen auf 37°C erlangt die Plasmamembran ihre ursprüngliche Fluidität zurück und die Internalisierung des Transferrin-Rezeptor-Komplexes kann erfolgen (*chase*). Die Zellen können nach unterschiedlich langen *chase*-Zeiten fixiert und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops analysiert werden.

Die Aufnahme und das Recycling von hTransferrin-TMR konnte in 4°C-Bindungsexperimenten nachgewiesen werden (siehe Tafel 1.1.). Während der ersten Minuten der Internalisierung war das hTransferrin-TMR-Signal punktförmig in der Zelle verteilt und begann sich dann halbmondförmig am Zellkern zu konzentrieren. Die Signalintensität war gleichbleibend, nach 14 Minuten war das gesamte markierte Transferrin am Zellkern konzentriert. Diese Lokalisation wurde auch nach 28 Minuten noch beobachtet, während die Signalintensität kontinuierlich abnahm. Nach 35 Minuten entsprach die Signalintensität der nicht mit hTransferrin-TMR behandelten Kontrolle, was darauf hindeutet, dass das internalisierte Transferrin-TMR weitgehend wieder ausgeschleust wurde.

Die hTransferrin-TMR-Internalisierung in NGF-differenzierten PC12-251-Zellen folgte der gleichen Kinetik (Daten nicht gezeigt). Die Bezeichnung NGF-differenziert bezieht sich dabei auf PC12-Zellen, die 16 bis 24 Stunden mit 10ng/ml hbNGF in Wachstumsmedium inkubiert wurden.

Zur Untersuchung des Einflusses von hbNGF auf die Aufnahme und das Recycling von hTransferrin-TMR wurden die Zeitpunkte fünf und 15 Minuten *chase* analysiert. Getestet wurde 2,5; 10 und 40 ng/ml hbNGF, welches zusammen mit hTransferrin-TMR zu Beginn der 4°C-Bindungsphase zugegeben wurde. Unter diesen Bedingungen führte hbNGF nach fünf Minuten *chase* bei 37°C zu einer Erhöhung des zellulär gebundenen Transferrins, die unabhängig von der eingesetzten hbNGF-Konzentration war (s. Tafel 1.2. A, C, G). Nach 15 Minuten *chase* war die Intensität des Transferrin-Signals in NGF-behandelten und Kontrollzellen etwa gleich (s. Tafel 1.2. B,D,H). Bei Verwendung von 40 ng/ml hbNGF wurden morphologische Veränderungen des hTransferrin-TMR-Signals beobachtet. Hier war das Transferrin im Gegensatz zu den niedrigeren Konzentrationen nach 5 Minuten *chase* vermehrt in der Kerngegend lokalisiert (s. Tafel 1.2. C, G, Daten für 2,5ng/ml hbNGF nicht gezeigt).

Durch 20-minütige Vorinkubation mit 40ng/ml hbNGF bei 37°C vor der 4°C-Bindungsphase mit hTransferrin-TMR wurde eine Erhöhung der zellulären Transferrin-Konzentration nach 5 Minuten *chase* im Vergleich zu gleichzeitig mit dem Transferrin zugegebenen hbNGF beobachtet. Dieser Effekt trat bei Verwendung von 2,5 und 10ng/ml hbNGF nicht auf (s. Tafel 1.2. C, E, G, I). Das Recycling war unter diesen Bedingungen nicht verändert (s. Tafel 1.2. D, F, H, J).

Technische Probleme erschwerten die Auswertungen der Aufnahme von hTransferrin-TMR in 4°C-Bindungsexperimenten. Das Hauptproblem waren die sehr geringen Signalintensitäten in Verbindung mit dem starken Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs. Um die Experimente trotzdem auswerten zu können, mussten die Zellen parallel mit Hoechst gefärbt werden. Hoechst ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einem Emissionsmaximum bei 460nm, der in die DNA interkaliert (Gavathiotis et al., 2000). Aufgrund der Hoechst-Färbung wurden pro Bedingung 10 Zellen ausgewählt. Dann wurde in den roten Kanal umgeschaltet, in dem die Emission von hTransferrin-TMR detektiert

werden konnte und fotografiert. So konnte unterschiedlich starkes Ausbleichen des h-Transferrin-TMRs vermieden werden.

Die schwache Aufnahme des hTransferrins war abhängig vom Zelltyp; wurden HeLa-Zellen statt PC12-Zellen verwendet, waren die Signalintensitäten deutlich höher (Daten nicht gezeigt).

Um die hTransferrin-TMR-Aufnahme und somit die Signalintensitäten zu erhöhen, wurden verschiedene Medien, Serumentzug, unterschiedliche Fixierungen und Reagenzien gegen das Ausbleichen von Fluoreszenzfarbstoffen, sowie verschiedene Transferrin-Farbstoff-Konjugate getestet. Keine der Maßnahmen führte jedoch zu dem gewünschten Erfolg.

Um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren, wurde versucht nach dem *chase* das oberflächlich gebundene hTransferrin-TMR durch einen Waschschrift bei 4°C in 150mM NaCl, 10mM Essigsäure pH 3,5 (nach Sonnichsen et al., 2000) zu entfernen. Dieses führte jedoch nicht zu einem deutlicheren Signal, sondern zu einer Schädigung der Zellen (Daten nicht gezeigt).

Weil hTransferrin-TMR in der Ratten-Zelllinie PC12 möglicherweise durch artspezifische Unterschiede schlechter aufgenommen wird, wurde unmarkiertes Ratten-Transferrin (rTransferrin) eingesetzt, welches durch einen anti-rTransferrin-Antikörper und einen fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper nachgewiesen werden konnte. Allerdings wurde mit dieser Methode keine Aufnahme in 4°C-Bindungsexperimenten (getestet bis 50µg/ml rTransferrin) gemessen.

3.1.2. Endozytose von rTransferrin in *pulse-chase*-Experimenten in Abhängigkeit von NGF

In *pulse-chase*-Experimenten konnte wie in den 4°C-Bindungsexperimenten eine NGF-induzierte Erhöhung der zellulären rTransferrin- und hTransferrin-TMR-Konzentration nach fünf Minuten *pulse* nachgewiesen werden. Nach 15 Minuten *chase* konnte kein Unterschied zu nicht NGF-behandelten Zellen beobachtet werden.

In diesen Experimenten wurde Transferrin für fünf Minuten bei 37° C den Zellen angeboten (*pulse*). Nach dem Entfernen des Transferrins wurde für unterschiedlich lange Zeiträume bei 37°C inkubiert (*chase*). Anschließend wurden die Zellen fixiert, gegebenenfalls permeabilisiert, gefärbt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes analysiert.

Das kontinuierliche Recycling des Transferrin-Rezeptors bewirkt, dass bei diesem experimentellen Ablauf eine größere Anzahl von Transferrin-Rezeptoren markiert werden können. Dieses betrifft alle Rezeptoren, die während des *pulses* die Zelloberfläche erreichen. Der Unterschied zu den 4°C-Bindungsexperimenten ist ein weniger exakter *pulse* sowie eventuell ein Anteil an Transferrin, der durch Flüssigphasen-Endozytose aufgenommen wird.

Die Durchführung von *pulse-chase*-Experimenten führte im Unterschied zu 4°C-Bindungsexperimenten zu erhöhten Signalintensitäten, so dass die Internalisierung und das Recycling von hTransferrin-TMR und rTransferrin besser verfolgt werden konnten als in 4°C-Bindungsexperimenten. Dabei zeigten beide Substanzen eine vergleichbare Kinetik. Um die Ergebnisse mit den Daten aus den I¹²⁵Transferrin-Aufnahme-Experimenten vergleichen zu können (s. Abschnitt 1.5.1.), wurde vorwiegend rTransferrin eingesetzt.

Die Steigerung der eingesetzten Transferrin-Konzentration (5, 15 und 25µg/ml rTransferrin) führte zu einer kontinuierlichen Erhöhung des internalisierten Transferrins nach 0, 5 und 15 Minuten *chase* (s. Tafel 1.3.). Das rTransferrin war direkt nach dem *pulse* (0 Min. *chase*) in Punkten über die Zelle verteilt, bzw. bei etwa der Hälfte der Zellen halbmondförmig am Zellkern konzentriert. Die Signalintensität war hier im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten am höchsten.

Nach fünf Minuten *chase* hatte sich die Lokalisation des Transferrins nicht verändert, die Signalintensität war aber reduziert.

Nach 15 Minuten *chase* war das aufgenommene Transferrin fast vollständig von den Zellen wieder ausgeschleust worden, was dafür spricht, dass das endozytierte rTransferrin hauptsächlich an den Rezeptor gebunden an die Oberfläche transportiert wurde. Der Anteil an rTransferrin, der durch Flüssigphasen-Endozytose aufgenommen wurde, ist demnach gering.

Wurde den Zellen 45 oder 50µg/ml rTransferrin angeboten, war die Menge des zellulär gebundenen Transferrins direkt nach dem *pulse* im Vergleich zu 25µg/ml nochmals erhöht, im Gegensatz zu den niedrigeren Konzentrationen zeigte sich hier aber keine Abnahme der Signalintensität nach 5 oder 15 Minuten *chase* (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass bei diesen hohen Konzentrationen rTransferrin vermehrt durch Flüssigphasen-Endozytose aufgenommen wurde. Für die Interpretation der folgenden Experimente war es entscheidend, dass rezeptorvermittelte Endozytose untersucht wurde. Darum wurde für weitere Experimente zwischen 15 und 25µg/ml rTransferrin eingesetzt.

Die Vorinkubation mit hbNGF oder die gleichzeitige Inkubation von hbNGF und Transferrin während des *pulses* führte zu einer deutlichen Erhöhung des zellulär gebundenen rTransferrins (s. Tafel 1.4. B und C) bzw. hTransferrin-TMR nach fünf Minuten *pulse* (Daten nicht gezeigt). Die Signalintensitäten waren nach fünf Minuten *chase* noch leicht erhöht, während nach 15 Minuten *chase* die Menge an internalisiertem rTransferrin bzw. hTransferrin-TMR in etwa vergleichbar mit der Kontrolle war.

Dabei wurde kein Unterschied beobachtet, ob das hbNGF nur während der Vorinkubation, oder während des gesamten Experimentes anwesend war. Während des *chase* zugegebenes hbNGF führte zu keiner veränderten Kinetik der Transferrin-Endozytose im Vergleich zur Kontrolle ohne NGF (Daten nicht gezeigt).

3.1.3. Einfluss von Bisindolylmaleimid-I, Cytochalsin D und PMA auf die rTransferrin-Endozytose

Die Phosphorylierung von Amphiphysin-I und anderen Endozytoseproteinen wird möglicherweise durch PKC katalysiert. Dafür spricht, dass Phorbolster (PMA) eine gleichartige Phosphorylierung induzieren und Inhibitoren der PKC die hbNGF- und PMA-induzierte Phosphorylierung von Amphiphysin-I hemmen konnten (Ludewig et al., 2001). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von PMA und eines der PKC-Inhibitoren (Bisindolylmaleimid-I, Ahmed et al., 1995) auf die Transferrin-Endozytose gemessen.

In Vorexperimenten wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Bisindolylmaleimid-I induzierten Inhibition der NGF- bzw. PMA-stimulierten Phosphorylierung von Amphiphysin-I untersucht. Dabei zeigte sich, dass Konzentrationen bis zu 1µM Bisindolylmaleimid-I die NGF-induzierte Phosphorylierung in PC12-Zellen nur geringfügig hemmten (s. Tafel 1.6.A). Die PMA-induzierte Phosphorylierung von Amphiphysin-I wurde hingegen vollständig durch 0,5 µM Bisindolylmaleimid-I inhibiert (s. Tafel 1.6. B).

In Immunfluoreszenz-Experimenten zeigten individuelle Zellen ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der Aufnahme von Transferrin (s. Tafel 1.5.). Um den Einfluss verschiedener Stimuli und Inhibitoren besser untersuchen zu können, wurden zusätzlich quantitative Analysen der Transferrin-Endozytose durchgeführt. Dazu wurde eine bestimmte Anzahl willkürlich ausgewählter Zellen dokumentiert und die digitalen Bilder mit Hilfe des Metamorph-Computer-Programms analysiert. Dabei wurde der Umfang der

Zellen markiert und die Summe der Helligkeit (Grauwerte) der Pixel in diesem Bereich ermittelt. Das Integral entspricht dem gesamten aufgenommenem Transferrin (vgl. Tafel 1.8. A, B, C).

Eine andere Art der Analyse ist die Messung der Signalintensität des hellsten Punktes (Pixel mit dem höchsten Grauwert) der Zelle anhand von digitalen Bildern. Diese Messung wurde ebenfalls mit dem Metamorph-Computer-Programm durchgeführt. Auf der Basis dieser Werte konnten dann Mittelwerte für die einzelnen Bedingungen gebildet werden (s. Tafel 1.8. D, E, F).

PMA führte ebenso wie hbNGF zu einer erhöhten Menge zellulär gebundenen rTransferrins nach 0 und 5 Minuten *chase* (s. Tafel 1.7. A, C, E; Tafel 1.8. A, D; Tabelle 3.1.1.). Durch Bisindolylmaleimid-I konnte die hbNGF und die PMA-induzierte Erhöhung der rTransferrin-Internalisierung inhibiert werden. Dieses führte bei den hbNGF-behandelten Zellen zu einer Reduktion der Gesamtmenge an aufgenommenem rTransferrin (s. Tafel 1.7. C, D; Tafel 1.8. B, E; Tabelle 3.1.1, Integral), während die Signalintensität des hellsten Punktes pro Zelle nur wenig reduziert war (s. Tafel 1.8 E. Tabelle 1.3., hellster Punkt). Die Menge des aufgenommenen rTransferrins in PMA-behandelten Zellen nach 0 und 5 Minuten *chase* wurde durch Bisindolylmaleimid-I deutlich gesenkt (s. Tafel 1.7. A, E, F, Tabelle 3.1.1.). Die Analyse des gesamt aufgenommenen rTransferrin ergab eine nicht so starke Inhibition nach 0 Minuten *chase* wie bei hbNGF-behandelten Zellen (s. Tafel 1.8. C, Tabelle 3.1.1.), während die Signalintensität des hellsten Punktes auf den Wert der Kontrolle absank (s. Tafel 1.8. F, Tabelle 3.1.1.)

Die PMA- und NGF-induzierte Erhöhung der rTransferrin-Internalisierung korreliert mit der gleichzeitig induzierten Phosphorylierung von Amphiphysin-I (s. Tafel 1.6. A und B).

Bisindolylmaleimid-I konnte die PMA-induzierte Erhöhung der Transferrin-Aufnahme und die PMA-induzierte Phosphorylierung von Amphiphysin-I effektiv hemmen.

Anders war es bei der Inhibition der NGF-induzierten Erhöhung der rTransferrin-Endozytose durch Bisindolylmaleimid-I, die sich hauptsächlich aus einer Analyse des gesamten internalisierten Transferrins herleiten lässt. Der enorm hohe Fehler dieses Wertes (s. Tafel 1.8.B., Tabelle 3.1., Integral) deutet eine sehr heterogene Population an. Dieses könnte die Ursache dafür sein, dass der Effekt von Bisindolylmaleimid-I im Hinblick auf die NGF-induzierte Amphiphysin-I Phosphorylierung kaum zum Tragen kommt.

	Analyse der maximalen Signalintensität pro Zelle (Graustufen)		
	0 Min. <i>chase</i>	5 Min. <i>chase</i>	15 Min. <i>chase</i>
Kontrolle	1095,5+-197,1	943,2+-144,6	694,8+-72,5
BisindolylmaleimidI (Bis)	1255,7+-220,5	678,5+-67,4	799,8+-99,6
NGF	1836,9+-318,3	1072,7+-198,2	478,1+-55,9
NGF+Bis	1548,4+-311,4	689,0+-55,4	820,6+-185,8
PMA	1591,1+-341,6	1178,6+-185,7	743,8+-118,2
PMA + Bis	1114,1+-99,5	771,1+-115,3	604,0+-64,2
	Analyse der gesamten Signalintensität pro Zelle (Integral, Angaben x10¹²)		
	0 Min. <i>chase</i>	5 Min. <i>chase</i>	15 Min. <i>chase</i>
Kontrolle	0,665+-0,229	0,561+-0,137	0,552+-0,171
BisindolylmaleimidI (Bis)	0,680+-0,392	0,647+-0,141	0,605+-0,302
NGF	1,478+-0,636	1,054+-0,453	0,537+-0,195
NGF+Bis	0,860+-0,608	0,659+-0,249	0,753+-0,262
PMA	1,258+-0,392	1,163+-0,254	0,782+-0,208
PMA + Bis	0,995+-0,160	0,519+-0,388	0,489+-0,202

Tabelle 3.1.1.: Bisindolylmaleimid-I inhibiert die hbNGF-und PMA-induzierte Erhöhung der Transferrin-Endozytose. Tabellarische Zusammenfassung der in Tafel 1.8. graphisch dargestellten Werte, n=10.

Die starke Reduktion der Transferrin-Aufnahme nach 5 Minuten *chase* könnte auf einen Einfluss des Bisindolylmaleimid-I auf das rTransferrin-Recycling zurückzuführen sein. Bisindolylmaleimid-I verfügt über eine rote Eigenfluoreszenz, welche zu den erhöhten Werten bei nur mit Bisindolylmaleimid-I behandelten Zellen führen könnte. Zudem kann Bisindolylmaleimid-I als PKC-Inhibitor eine Vielzahl von Effekten hervorrufen, deren Einfluss auf die Endozytose nur schwer abzuschätzen ist.

3.1.4. Untersuchung der I¹²⁵Transferrin-Endozytose in Abhängigkeit von NGF

Um die Kinetik der Transferrin-Aufnahme in Abhängigkeit von hbNGF in einem weiteren unabhängigen, biochemischen Ansatz quantifizieren zu können, wurde die Aufnahme von I¹²⁵-markiertem rTransferrin in *pulse-chase*-Experimenten und bei kontinuierlicher Aufnahme untersucht. Die dabei ermittelte Erhöhung der I¹²⁵Transferrin-Aufnahme war um einiges geringer als in den entsprechenden Immunfluoreszenz-Experimenten.

3.1.4.1. Endozytose von I¹²⁵Transferrin in *pulse-chase*-Experimenten in Abhängigkeit von NGF

Vorexperimente bei 4°C zeigten, dass bei 500.000 Zellen eine Konzentration von 12,5ng I¹²⁵Transferrin (21,8MBq/nmol) zu einer Sättigung führte (Daten nicht gezeigt). Die Oberflächen-Bindung ließ sich zu 50% mit unmarkiertem rTransferrin kompetitieren (Daten nicht gezeigt), was auf einen hohen unspezifischen Hintergrund schließen lässt. Die Signalintensität des spezifisch gebundenen I¹²⁵-Transferrins war für die Untersuchung der Transferrin-Internalisierung in 4°C-Bindungsexperimenten zu gering, weshalb die Endozytose von I¹²⁵Transferrin in *pulse-chase*-Experimenten untersucht wurde.

Um oberflächlich gebundenes I¹²⁵Transferrin abzulösen, wurde als letzter Schritt in den Experimenten ein Deferroxamin-Mesylat-Waschschritt (nach Qualmann and Kelly, 2000) durchgeführt. Der saure pH-Wert der Deferroxamin-Mesylat-Lösung senkt die Bindungsaffinität der Eisenatome zum Transferrin. Deferroxamin Mesylat bindet als Eisen-Chelator die freien Eisenatome, wodurch eine erneute Bindung des Eisens an Transferrin verhindert wird. Durch anschließendes Waschen bei neutralem pH ist die Bindungsaffinität des nun eisenfreien Transferrin zum Transferrin-Rezeptor erniedrigt und das Transferrin dissoziiert.

Aufgenommenes I¹²⁵ Transferrin

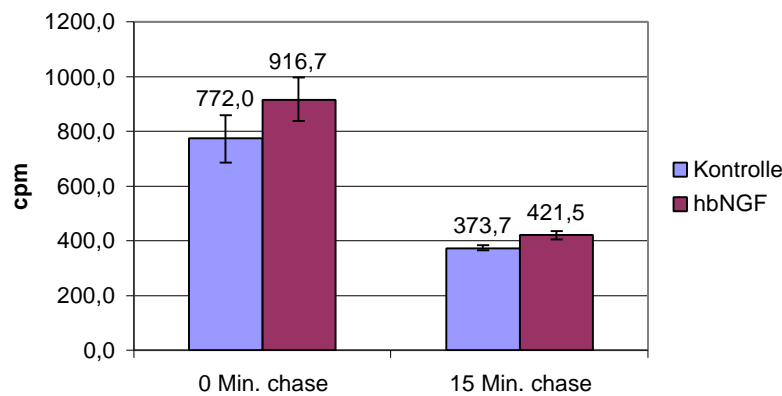


Abbildung 3.1.1.: Aufnahme von I¹²⁵Transferrin in Abhängigkeit von hbNGF in *pulse-chase*-Experimenten. Am Versuchstag wurden die adhärenen PC12-251-Zellen mit einem Plastikschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und jeweils $3,4 \times 10^6$ Zellen 20 Minuten ohne (Kontrolle) oder mit 13 ng/ml hbNGF inkubiert. Anschließend wurde für fünf Minuten mit 100ng/ml I¹²⁵ markiertem rTransferrin (37MBq/nmol) und 15µg/ml rTransferrin inkubiert. Nach drei Waschschrritten bei 4°C wurden die Zellen in ein neues Röhrchen überführt, um unspezifischen Hintergrund durch an die Gefäßwand gebundenes I¹²⁵Transferrin zu entfernen. Entweder wurde nun ein 10-minütiger Deferroxamin-Mesylat-Waschschritt bei 4°C durchgeführt und die Zellen in 1x Laemmli-Auftragspuffer (ohne Bromphenolblau) lysiert (0 Min. *chase*) oder die Zellen für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, dann wieder auf 4°C abgekühlt, mit Deferroxamin-Mesylat-Lösung inkubiert und lysiert (15 Min. *chase*). Das Experiment wurde in 3 parallelen Ansätzen durchgeführt und die Aktivität der Proben mit dem Berthold Multi-Crystal γ Counter LB 2104 gemessen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte sowie die Mittelwertabweichung des aufgenommenen I¹²⁵Transferrins.

Der Anteil des inkorporierten I¹²⁵Transferrin nach 0 Minuten *chase* betrug bei der Kontrolle 772, 0 \pm 87,0 cpm (Einbaurate 0,0858%, s. Abbildung. 3.1.1.). Nach 15 Minuten *chase* war der Wert um 51,7% auf 373,0 \pm 10,2 cpm reduziert. Vorinkubation mit 13 ng/ml hbNGF führte zu einer Erhöhung des inkorporierten I¹²⁵ Transferrins nach 0 Minuten *chase* um 18,7% (916,7 \pm 78,9 cpm, Einbaurate 0,1%) und 15 Minuten *chase* um 12,5% (421,5 \pm 15,5 cpm) im Vergleich zur Kontrolle. Die Menge an inkorporiertem I¹²⁵Transferrin während des *chases* reduzierte sich hier um 54%. Eine Negativ-Kontrolle ohne Zellen wurde während des Experiments mitgeführt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass unspezifische Bindung des I¹²⁵Transferrins an Plastikoberflächen für die Messwerte zu vernachlässigen war (Daten nicht gezeigt).

Die Kinetik der I¹²⁵Transferrin-Internalisierung war vergleichbar mit der Kinetik der rTransferrin-Aufnahme in Immunfluoreszenz-Experimenten (s. Abschnitt 3.1.4., Tafel 1.8.). Der 0 *chase* Wert war jeweils am höchsten, die Reduktion des internalisierten

Transferrins nach 15 Minuten *chase* betrug 51,7% bei der I¹²⁵Transferrin-Aufnahme und 54,0% bei Verwendung von rTransferrin in Immunfluoreszenz-Experimenten.

Vergleicht man die hbNGF-induzierte prozentuale Erhöhung der Transferrin-Endozytose nach 0 Minuten *chase*, ist die Aufnahme von I¹²⁵Transferrin deutlich niedriger als die von rTransferrin in Immunfluoreszenz-Experimenten (vgl. Tabelle 3.1.2.). Nach 15 Minuten *chase* ist der hbNGF-bedingte prozentuale Anstieg der I¹²⁵Transferrin-Aufnahme höher als in den Immunfluoreszenz-Experimenten.

	HbNGF-induzierte Erhöhung der rTransferrin- bzw. I ¹²⁵ Transferrin-Aufnahme		
	0 Min. <i>chase</i>	5 Min. <i>chase</i>	15 Min. <i>chase</i>
rTransferrin (Tafel. 1.8. Integral)	122,3%	88,0%	0%
I ¹²⁵ Transferrin (Abbildung. 3.1.1.)	18,7%	n.d.	12,5%

Tabelle 3.1.2.: Übersicht über den hbNGF-induzierten Anstieg der Transferrin-Internalisierung bei verschiedenen experimentellen Durchführungen.

Eine Ursachen für diese Unterschiede könnte darin liegen, dass sich die abgelösten Zellen in Suspension anders verhalten als adhärenente Zellen. Außerdem ist der Einfluss der I¹²⁵-Markierung auf die Rezeptor-Bindungseigenschaften des Transferrins unklar.

3.1.4.2. Kontinuierliche Aufnahme von I¹²⁵Transferrin in Abhängigkeit von NGF

In einer Arbeit von Beattie et al., 2000 wurde eine NGF-induzierte Erhöhung der I¹²⁵Transferrin-Aufnahme bei kontinuierlicher Transferrin-Zugabe beschrieben. In vergleichbar durchgeführten Experimenten konnte von mir nach drei Minuten eine Erhöhung der I¹²⁵-Transferrin-Aufnahme durch NGF gemessen werden, während Beattie et al., 2000 auch nach fünf und 15 Minuten eine deutliche Steigerung der I¹²⁵-Transferrin-Internalisierung durch NGF gemessen hat.

Bei kontinuierlicher Gabe von I¹²⁵Transferrin stieg die Menge der aufgenommenen Aktivität stetig an (s. Abbildung 3.1.2.). Vorinkubation mit hbNGF führte zu einer leichten Erhöhung der Transferrin-Aufnahme nach drei Minuten (s. Abbildung 3.1.2.A). Der Effekt von PMA war in etwa vergleichbar (s. Abbildung 3.1.2.B). Der von PMA-vermittelte prozentuale Anstieg der I¹²⁵Transferrin-Aufnahme war höher als der von hbNGF hervorgerufene.

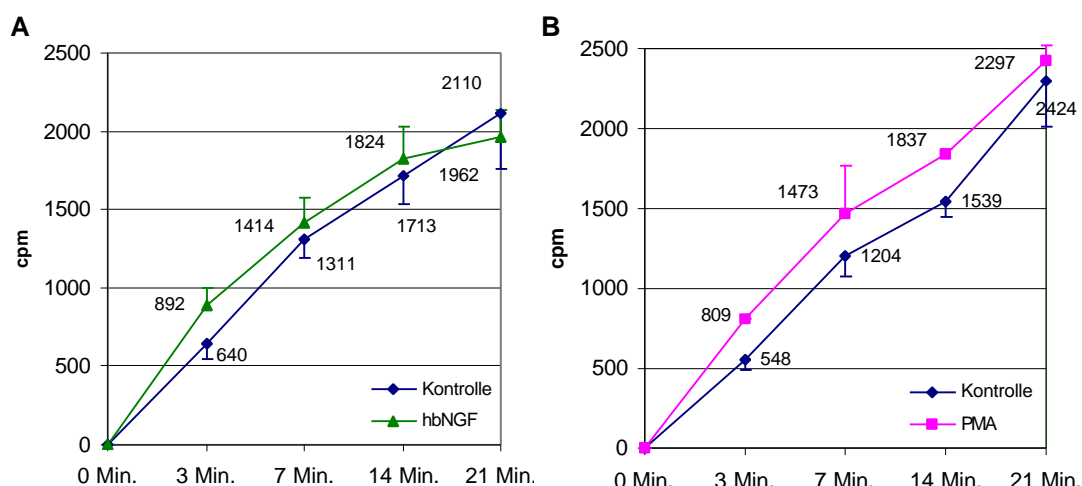


Abbildung 3.1.2.: Kontinuierliche Aufnahme von I¹²⁵-Transferrin in Abhängigkeit von hbNGF und PMA. Am Versuchstag wurden die adhärenen Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und 6,2 bis 7,4 x10⁶ PC12 251 Zellen in 1,5 ml Versuchsmedium ohne (◆) oder mit 13 bzw. 26 ng/ml hbNGF(▲) oder mit 0,6µM PMA (■) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde jeweils 800ng/ml I¹²⁵-Transferrin (37MBq/nmol) und 60µg/ml rTransferrin in 0,5ml zugegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 3, 7, 14 und 21 Minuten wurden je 450µl abgenommen und auf 4°C abgekühlt. Die Proben wurden einmal mit Versuchsmedium und zweimal mit PBS bei 4°C gewaschen und dann für 10 Minuten bei 4°C mit Deferroxamin-Mesylat-Lösung inkubiert. Abschließend wurden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen und in 1x Lämmli-Auftragspuffer (ohne Bromphenolblau) lysiert. Die verschiedenen Bedingungen wurden in je drei parallelen Ansätzen untersucht. Die Messung der Proben erfolgte mit dem Berthold Multi-Crystal γ Counter LB 2104. A Die Tafel repräsentiert die Mittelwerte der Daten aus zwei Experimenten, die vorher auf Zellzahl und zeitlich bedingten Aktivitätsverlust normiert wurden. B Die Daten stammen aus einem Experiment.

Wurde das Experiment (mit Ausnahme des Deferroxamin-Waschschrittes) mit rTransferrin und anschließender Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt, konnte durch 20-minütige hbNGF-Vorstimulation bei allen getesteten Zeitpunkten eine deutliche Erhöhung der rTransferrin-Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (s. Tafel 1.9.). Während bei nicht mit NGF-behandelten Zellen nach 21 Minuten die Menge des zellulär gebundenen rTransferrins im Vergleich zu 14 Minuten reduziert war, blieb die Menge des zellulär gebundenen rTransferrins zwischen 14 und 21 Minuten etwa konstant.

Der Unterschied zwischen der NGF-induzierten Erhöhung der kontinuierlichen I¹²⁵-Transferrin- und rTransferrin-Internalisierung könnte möglicherweise durch die Verwendung von PC12-Zellen in Suspension bei den Experimenten zur I¹²⁵-Transferrin-Endozytose zustande kommen. Es ist nicht klar, inwieweit durch das Ablösen der adhärenen Zellen die Endozytose-Vorgänge beeinflusst werden.

Um die verschiedenen experimentellen Ansätze besser vergleichen zu können, müssten allerdings eine größere Anzahl an Zellen in den Immunfluoreszenz-Experimenten quantifiziert werden.

3.2. Charakterisierung der NGF-induzierten Lamellipodienbildung

Während der mikroskopischen Untersuchung der NGF-induzierten Transferrin-Endozytose in PC12-Zellen konnte ich dramatische morphologische Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts der NGF-behandelten Zellen beobachten. Die Zellen bildeten nach vier bis fünf Minuten NGF-Stimulation sogenannte *membrane ruffles* („Membran Rüschen“) bzw. Lamellipodien aus. In PC12-Zellen die Lamellipodien gebildet hatten, konnte zu diesem Zeitpunkt deutlich weniger internalisiertes Transferrin nachgewiesen werden als bei Zellen, bei denen die Lamellipodien bereits kollabiert waren (s. Tafel 2.17.).

Die NGF-induzierte Lamellipodienbildung bei PC12-Zellen wurde zum ersten mal vor 23 Jahren beschrieben. Connolly et al., 1979 zeigte mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sich zurückbildende Mikrovilli-artigen Strukturen sowie die Bildung von *membrane ruffles* nach einer ein- bis fünfminütigen hbNGF-Exposition. Die Beteiligung von F-Aktin bei diesen Prozessen konnte später durch Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin, welches in F-Aktin-Fasern interkaliert gezeigt werden (Paves et al., 1988, Paves et al., 1990, Dicou et al., 1997, Posern et al., 2000).

Lamellipodien und *membrane ruffles* sind Bereiche der Zelle, an denen verstärkt Makropinozytose, eine Aktin-abhängige Endozytose-Form, auftritt. Es wäre denkbar, dass die NGF-induzierte Steigerung der Transferrin-Aufnahme auf eine erhöhte Aufnahme von rezeptorgebundenem Transferrin durch Makropinozytose zurückzuführen ist. Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurde zunächst die NGF-induzierte Lamellipodienbildung näher untersucht.

3.2.1. Untersuchung der Kinetik der NGF-induzierten Lamellipodienbildung an fixierten Zellen

Durch Stimulation mit hbNGF konnte eine transiente Lamellipodienbildung bei PC12-Zellen mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin nachgewiesen werden, die abhängig von der eingesetzten NGF-Konzentration war. Sie konnte auch bei NGF-differenzierten PC12-Zellen nachgewiesen werden. Zellen, die nicht mit NGF inkubiert wurden zeigten keine Lamellipodien.

Die Kinetik der Lamellipodienbildung wurde näher untersucht. Dazu wurden PC12-Zellen mit 10ng/ml hbNGF inkubiert, anschließend PFA-fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC gefärbt.

Etwa zwei Minuten nach NGF-Zugabe konnte eine beginnende Umorganisation des F-Aktin Zytoskeletts beobachtet werden. Die Stressfasern lösten sich weitgehend auf und das F-Aktin wurde an der Plasmamembran konzentriert (s. Tafel 2.1.).

Nach vier bis fünf Minuten waren die Zellen flach ausgebreitet und ein Großteil des F-Aktins in den Lamellipodiensäumen (s. Tafel 2.1. 4 und 5 Min., Pfeil) lokalisiert. Zusätzlich wurden Phalloidin-TRITC-positive Punkte im Zytoplasma angefärbt, die auch in unbehandelten Zellen beobachtet wurden. Kurz nach der Bildung kollabierten die Lamellipodien, wobei F-Aktin-angereicherte Zellausläufer zurück blieben (s. Tafel 2.1., 11 Min.,*).

Während die Bildung der Lamellipodien bei allen Zellen simultan ablief, war die Stabilität der ausgebildeten Lamellipodien unterschiedlich. Zwischen fünf und neun Minuten nach hbNGF Zugabe stieg die Anzahl der Zellen mit F-Aktin-angereicherten Ausläufern, verschiedene Zwischenstufen sind in Tafel 2.1. dargestellt.

Im Gegensatz zur Lamellipodienbildung, die nicht in unstimulierten Zellen beobachtet wurde, konnten F-Aktin-angereicherte Ausläufer in schwächerer Ausprägung und Häufigkeit auch bei unstimulierten Zellen nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3.2.1). Dabei zeigte sich, dass bei unstimulierten PC12-Zellen vom 251C-Klon diese Strukturen etwa doppelt so häufig auftraten wie bei dem 251-Klon.

Bei längeren Inkubationen mit hbNGF konnte nach etwa 20 bis 30 Minuten eine zweite Welle von Lamellipodienbildungen nachgewiesen werden, allerdings nicht im selben Ausmaß wie fünf Minuten nach hbNGF Zugabe (Daten nicht gezeigt). Nach 60 Minuten hbNGF-Inkubation sah man keine Zellen mit Lamellipodien mehr. Die Zahl der Zellen mit F-Aktin angereicherten Ausläufern war nach 60 Minuten deutlich reduziert im Vergleich zu 10 bzw. 30 Minuten nach hbNGF-Stimulation (Daten nicht gezeigt).

	Kontrolle	NGF
PC12-251C	48% (n=100)	93% (n=100)
PC12-251	26% (n=113)	81% (n=121)

Tabelle 3.2.1.: Häufigkeit von Zellen mit F-Aktin-angereicherten Ausläufern bei PC12-Zellen in Abhängigkeit von hbNGF Stimulation. Die Zellen wurden ohne (Kontrolle) oder mit 10ng/ml hbNGF für 20 Minuten in Versuchsmedium inkubiert, PFA-fixiert, TX-100 permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC gefärbt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Zellen mit oder ohne Ausläufer wurden gezählt und prozentual zu der gesamten Anzahl gezählter Zellen (n) angegeben.

Zur Stimulation der Lamellipodienbildung wurde eine Mindestkonzentration von 5-10 ng/ml hbNGF benötigt. Dieses Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt (vgl. Tabelle 3.2.2. und Tafel 2.2.). Zur Induktion der beschriebenen Effekte reichte eine NGF-Inkubation von fünf Minuten. Höhere Konzentrationen an hbNGF (getestet bis 100ng/ml) oder längere Inkubationszeiten (bis 90 Minuten) hatten keinen Einfluss auf die Kinetik.

	0 chase	10 Min. chase	25 Min. chase	55 Min. chase
1ng/ml hbNGF	Keine Lamellipodien, erhöhte Anzahl der Zellen mit F-Aktin-angereicherten Ausläufern	50-60% Zellen mit F-Aktin-angereicherten Ausläufern		Keine F-Aktin-angereicherten Ausläufer
5ng/ml hbNGF	40% Zellen mit Lamellipodien, viele Zellen mit fächerartigen Strukturen	95% Zellen mit F-Aktin-angereicherten Ausläufern		50% Zellen mit F-Aktin-angereicherten Ausläufern
10ng/ml hbNGF	95% Zellen mit Lamellipodien	10-20% Lamellipodien, 95 % Zellen mit F-Aktin-angereicherten Ausläufern		80-90% Zellen mit F-Aktin-angereicherten Ausläufern
100ng/ml hbNGF				

Tabelle 3.2.2: Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Lamellipodienbildung. PC12-251C-Zellen wurden für 5 Minuten mit hbNGF inkubiert, gewaschen und für die angegebenen Zeiten ohne hbNGF weiter inkubiert (*chase*). Dann wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC gefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops.

hbNGF-induzierte Lamellipodienbildung konnte auch an NGF-differenzierten PC12-Zellen beobachtet werden (s. Tafel 2.3.). Der Effekt war hauptsächlich an den Ausläufern zu beobachten (s. Tafel 2.3. Pfeil).

3.2.2. Untersuchung der NGF-induzierten Lamellipodienbildung lebender Zellen

Anhand von GFP-Aktin transfizierten PC12-Zellen konnte die NGF-induzierte Lamellipodienbildung durch Videomikroskopie bei lebenden Zellen verfolgt werden.

Vorexperimente mit fixierten transient GFP-Aktin-transfizierten Zellen zeigten, dass GFP-Aktin-Expression die NGF-induzierte Lamellipodienbildung nicht beeinflusste (s. Tafel 2.4.). GFP-Aktin kolokalisierte mit dem Phalloidin-TRITC gefärbten F-Aktin in den Stressfasern (Tafel 2.4. G, →) und in zytoplasmatischen Punkten (s. Tafel 2.4. G, *). Nach Stimulation mit hbNGF konnte Kolokalisation von GFP und Phalloidin-TRITC in F-Aktin-Bündeln in den Lamellipodiensäumen, in den F-Aktin angereicherten Ausläufern (s. Tafel 2.4. H, I, Pfeil) und in zytoplasmatischen Vesikeln gezeigt werden (s. Tafel 2.4. H, I,*). Stark exprimierenden Zellen zeigten eine schwächere Reaktion (Daten nicht gezeigt).

In Film 1 bis 3 (siehe CD-ROM) sind Beispiele für NGF-induzierte Lamellipodienbildung von transient GFP-Aktin transfizierten PC12-Zellen gezeigt. Film 4 zeigt eine Gruppe von unstimulierten Zellen.

Film 1 beginnt etwa 1 Minute 30 Sekunden nach Zugabe des hbNGFs. Das GFP-Aktin war zu diesem Zeitpunkt bereits an der Plasmamembran der beiden Zellen konzentriert. Die Bildung der Lamellipodien war von einer Bewegung der Zelle in dieselbe Richtung über mehrere Mikrometer begleitet. Kurz nach der Bildung der Lamellipodien kollabierten diese und gingen in GFP-Aktin angereicherte Ausläufer über, die sich sehr stark bewegten. Diese Ausläufer erreichten eine Länge von etwa 8 μm und hatten eine blatt-oder fächerartige Form.

Die Lamellipodienbildung lief in den beiden gefilmten Zellen unterschiedlich ab: Die obere Zelle begann 1 Minute 40 Sekunden nach hbNGF-Zugabe (10 Sekunden nach Beginn der Aufnahme) mit der Bildung des Lamellipodiensaumes. Dieser war nach drei Minuten nach hbNGF Zugabe vollständig ausgebildet und blieb für weitere drei Minuten 40 Sekunden konstant, bevor das Lamellipodium kollabierte.

Die untere Zelle begann zwei Minuten 20 Sekunden nach hbNGF-Zugabe mit der Bildung eines Lamellipodiensaumes, welcher nach drei Minuten 40 Sekunden vollständig ausgebreitet war. Das Lamellipodium blieb für 20 Sekunden stabil und kollabierte anschließend. Daraufhin erfolgte eine erneute Bildung eines Lamellipodiums, das neun Minuten und 30 Sekunden nach hbNGF-Zugabe vollständig ausgebreitet war und unmittelbar danach kollabierte.

Film 2 zeigt einen Ausschnitt einer Zelle. Hier wurde mit den Filmaufnahmen 30 Sekunden nach der Zugabe des hbNGFs begonnen. Nach etwa vier Minuten 30 Sekunden begann die Konzentration des GFP-Aktins an einem Bereich der Plasmamembran (vgl. Tafel 2.5. Pfeil und Film 2). Eine Minute 30 Sekunden später hatte sich der Großteil der Stressfasern aufgelöst und das GFP-Aktin war überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert. Die maximale Ausbreitung des Lamellipodiums benötigte weitere fünf Minuten (10 Minuten 50 Sekunden nach hbNGF-Zugabe). Dabei streckte sich die Zelle in diesem Bereich um 6,5 μm . Nach einer Minute 10 Sekunden kollabierte das Lamellipodium.

Einzelne Bilder aus Film 2, auf denen die verschiedenen Phasen der Lamellipodienbildung dargestellt sind, sind in Tafel 2.5. zusammengefasst.

Eine Zelle, bei der 15 Minuten nach hbNGF-Zugabe ein voll ausgebildeter Lamellipodiensaum beobachtet werden konnte, ist in Film 3 gezeigt. Das Lamellipodium blieb über die gesamte Dauer der Filmaufnahme von 15 Minuten weitgehend stabil. Diese Kinetik war untypisch für hbNGF-induzierte Lamellipodienbildung und wurde nur in Ausnahmefällen beobachtet.

Film 4 zeigt eine typische Kontroll-Zelle. Im Gegensatz zu hbNGF-behandelten Zellen kann hier weder eine Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts, noch Lamellipodienbildung beobachtet werden. Die Zelle bewegte sich nur wenig und bildete an verschiedenen Stellen der Plasmamembran flexible Ausläufer, die eine Länge von 5-10 μM erreichen konnten. Die Form dieser Ausläufer war länglich und spitz zulaufend und unterschied sich deutlich von den Ausläufern, die nach dem Kollabieren der Lamellipodien zurück blieben.

Das Fluoreszenzlicht führte in den ersten 1 $\frac{1}{2}$ Minuten nach hbNGF Zugabe zu einer Hemmung der die Lamellipodienbildung initiierenden Signaltransduktion. Nach dem Einsetzen der Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts hatte das Fluoreszenzlicht keinen

Einfluss mehr auf die Lamellipodienbildung (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt führte vermutlich zu einer verlangsamten Kinetik der Lamellipodienbildung der Zelle in Film 2. Der in einigen Experimenten zugesetzte Radikalfänger hatte keinen Einfluss auf die Kinetik (Daten nicht gezeigt).

3.2.3. Signaltransduktion der NGF-induzierten Lamellipodienbildung

3.2.3.1. Welcher NGF-Rezeptor aktiviert die Lamellipodienbildung ?

NGF bindet und aktiviert in PC12-Zellen zwei verschiedene Rezeptoren, p75NTR und trkA. Um zu untersuchen, welcher Rezeptor die Lamellipodienbildung initiiert, wurden Antikörper verwendet, die selektiv an die luminalen Domänen der Rezeptoren binden und sie aktivieren (vgl. auch Abschnitt 5.1 und 5.3.)

In fünf unabhängigen Experimenten wurde gezeigt, dass der trkA-aktivierende Antikörper (anti-trkA, Clary et al., 1994) Lamellipodienbildung in PC12-Zellen zu induzieren konnte (s. Tafel 2.6.). Die Stimulation durch anti-trkA war allerdings schwächer als die durch 10ng/ml hbNGF. p75NTR-aktivierenden Antikörper (REX und 9651 Brann et al., 1999) waren dazu nicht in der Lage, welches in 2 unabhängige Experimente gezeigt wurde (s. Tafel 2.6.).

In einem weiteren Ansatz wurden PC12-Zellen untersucht, denen entweder p75NTR (NRA5, Rabizadeh et al., 1993) oder trkA (NNR5, Green et al., 1986) fehlte. NRA5-Zellen zeigten nach 5 Minuten Inkubation mit 10ng/ml NGF Veränderungen des Zytoskeletts, die *membrane ruffles* ähnelten (s. Tafel 2.7.). Wurden statt dessen NNR5-Zellen verwendet, konnte im Einklang mit den Experimente von Green et al., 1986 nach NGF-Zugabe keine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dasselbe galt für PCNA-Zellen, die ebenfalls nur den p75NTR exprimierten (Daten nicht gezeigt). Diese Experimente weisen auf trkA als signalübertragender Rezeptor bei der NGF-induzierten Lamellipodienbildung hin.

3.2.3.2. Untersuchung der PMA-induzierten Lamellipodienbildung

PMA induziert in vielen Zelltypen *membrane ruffles* und Lamellipodien (Ridley and Hall, 1992, Schliwa et al., 1984, Roos et al., 1987, Sham et al., 1991). Außerdem führt es ebenso wie NGF zur Phosphorylierung von Amphiphysin-I (vgl. Abschnitt 1, Tafel 1.6. B) und zur Erhöhung der Transferrin-Endozytose (vgl. Abschnitt 3.1., Tafel 1.7. und 1.8.) in PC12-Zellen. Deshalb wurde getestet, ob PMA Lamellipodienbildung auch bei PC12-Zellen induziert.

Dieses konnte in drei unabhängigen Experimenten gezeigt werden (s. Tafel 2.8. und 2.9.). Im Gegensatz zur hbNGF-induzierten Lamellipodienbildung reagierten die Zellen auf die Stimulation durch PMA asynchron. Das könnte daran liegen, dass das PMA durch die Plasmamembran diffundieren muss, um seine Wirkung zu entfalten.

Bei etwa 50% der Zellen konnte die PMA-induzierte Lamellipodienbildung etwa 20 bis 40 Minuten nach PMA-Zugabe beobachtet werden. Zu früheren und späteren Zeitpunkten fand Lamellipodienbildung nur vereinzelt statt (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu der NGF-induzierten Lamellipodienbildung wurden hier nach dem Kollabieren der Lamellipodien keine F-Aktin angereicherten Ausläufer beobachtet.

3.2.3.3. Einfluss von Bisindolylmaleimid-I, Cytochalasin D und Amilorid auf die NGF- bzw. PMA-induzierte Lamellipodienbildung

Um zu untersuchen, ob es funktionale Zusammenhänge zwischen der NGF-induzierten Phosphorylierung von Amphiphysin-I, der gesteigerten Transferrin-Aufnahme, der Lamellipodienbildung und einer erhöhten Makropinozytose-Rate gibt (vgl. Abschnitt 3.3.) wurden folgende Inhibitoren verwendet:

1. Bisindolylmaleimid-I (Ahmed et al., 1995), ein PKC Inhibitor, der die PMA- und NGF-induzierten Phosphorylierung von Amphiphysin-I und die Erhöhung der Transferrin-Endozytose hemmt,
2. Cytochalasin D, welches die Aktinpolymerisation (Wallace et al., 1987) und dadurch auch Makropinozytose inhibiert (Keller and Niggli, 1995, Wang, 1985) und
3. Amilorid, ein Inhibitor der Kalium-Kanäle, der Makropinozytose hemmt (Dharmawardhane et al., 2000)

Dabei zeigte sich durch Einsatz von Cytochalasin D eine Inhibition der PMA- und NGF-induzierten Lamellipodienbildung, während Bisindolylmaleimid-I nur die PMA-induzierte und Amilorid nur die hbNGF-induzierte Lamellipodienbildung hemmte.

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Inhibitoren wurden PC12-251C-Zellen mit Amilorid, Cytochalasin D und Bisindolylmaleimid-I bei 37°C vorinkubiert, dann wurde für 5 bzw. 20 Minuten NGF oder PMA zugegeben. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC gefärbt.

Vorinkubation mit Cytochalasin D führte zu einer Depolymerisierung des F-Aktins, welches das Auflösen der Stressfasern und die Ansammlung des F-Aktins in großen, unregelmäßig geformten Aggregaten im Zytoplasma zur Folge hatte (s. Tafel 2.9.C). Während die hbNGF-induzierte Lamellipodienbildung durch 0,1µM Cytochalasin D effektiv gehemmt werden konnte (Tafel 2.9. G), reichte diese Konzentration nicht aus, um die PMA-induzierte Lamellipodienbildung vollständig zu unterdrücken (s. Tafel 2.9.K, Pfeil).

Bisindolylmaleimid-I war in der Lage, die PMA-, nicht aber die hbNGF-induzierte Lamellipodienbildung zu hemmen (s. Tafel 2.9.). In Kontrollzellen, die weder mit PMA noch mit hbNGF behandelt wurden, erhöhte Bisindolylmaleimid-I die Anzahl von Zellen, die Ausläufer bildeten (s. Tafel 2.9. B). Lamellipodien wurden durch Bisindolylmaleimid-I-Inkubation nicht induziert.

Amilorid war im Gegensatz zu Bisindolylmaleimid-I in der Lage, die hbNGF-induzierte (Tafel 2.9.H), nicht aber die PMA-induzierte Lamellipodienbildung zu inhibieren (s. Tafel 2.9.L). Die Inkubation mit Amilorid alleine führte dabei zu keiner sichtbaren Veränderung des Zytoskeletts im Vergleich zur Kontrolle (s. Tafel 2.9.D).

Während für die anderen Inhibitoren Daten aus je 2 Experimenten vorlagen, wurde mit Amilorid nur ein Experiment durchgeführt. Ob sich der Effekt auf die NGF- und PMA-induzierte Lamellipodienbildung bestätigt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

3.2.4. Lokalisation zellulärer Marker während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung

Im Folgenden wurden verschiedene zelluläre Marker in Immunfluoreszenz-Experimenten auf Veränderung ihrer Lokalisation während der hbNGF-induzierten Lamellipodienbildung untersucht.

Dabei zeigte sich eine Veränderung des Phosphotyrosin-Signals (s. Abschnitt 3.2.4.2.), während die Lokalisation der NGF-Rezeptoren trkA und p75NTR weitgehend unverändert blieb (s. Abschnitt 3.2.4.1.). Die zytoplasmatische Lokalisation der an Endozytosemechanismen beteiligten Proteine Caveolin-I, Dynamin-I und Synaptojanin blieb während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung erhalten (s. Abschnitt 3.2.4.3.) Synaptojanin-I war ebenfalls am Rand des Lamellipodiensaumes lokalisiert und kolokalisierte im Lamellipodiensaum mit prominenten F-Aktin-Bündeln. Das Caveolin-I-Signal ragte speichenförmig in den Lamellipodiensaum hinein, wobei es teilweise mit prominenten F-Aktin-Bündeln kolokalisierte. Für das Mikrotubuli-Netzwerk konnte ebenfalls eine Beteiligung bei der Formveränderung der Zelle, die während der Lamellipodienbildung stattfand, gezeigt werden (s. Abschnitt 3.2.4.1.).

3.2.4.1. Lokalisation der NGF-Rezeptoren und der Mikrotubuli während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung

Immunfluoreszenz-Färbungen fixierter Zellen zeigten, dass trkA in PC12-Zellen vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert war (vgl. Abschnitt 3.5.2.) während p75NTR an der Plasmamembran sowie in einigen zytoplasmatischen Vesikeln nachgewiesen werden konnte (vgl. Abschnitt 3.5.3.). Diese Lokalisation blieb während der hbNGF-induzierten Lamellipodienbildung weitgehend unverändert (s. Tafel 2.10. und 2.11).

Auffällig war die Kolokalisation von trkA bzw. p75NTR und prominenten F-Aktin-Bündeln in den Lamellipodiensäumen (s. Tafel 2.10. D, Pfeil und 2.11. D, Pfeil). Außerdem zeigte sich unabhängig von der hbNGF-Stimulation eine Kolokalisation von zytoplasmatischen p75NTR-haltigen Vesikeln und F-Aktin (s. Tafel 2.11. E, F, Pfeil).

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts von Änderungen des Mikrotubuli-Netzwerkes begleitet werden. Durch parallele Färbungen mit

Phalloidin-TRITC und einem Antikörper gegen α -Tubulin sollte an NGF-behandelten und unbehandelten fixierten Zellen untersucht werden, wie weit das Mikrotubuli-Netzwerk von den hbNGF-induzierten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts betroffen war.

In Zellen, die Lamellipodien gebildet hatten, reichten die Mikrotubuli bis an den Saum mit den parallel angeordneten F-Aktin-Bündeln heran (s. Tafel 2.12. Pfeil). Daraus kann geschlossen werden, dass neben den dramatischen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts während der Lamellipodienbildung auch eine Umstrukturierung des Mikrotubuli-Netzwerkes statt finden muss.

Um F-Aktin Filamente und Mikrotubuli gleichzeitig durch Immunfluoreszenzfärbung markieren zu können, wurde die für Mikrotubuli-Färbung ungünstige PFA-Fixierung gewählt. Daraus resultierte ein stark diffuses Hintergrundsignal, verursacht durch zytoplasmatisches Tubulin.

Um die Veränderungen des Mikrotubuli-Netzwerkes *in vivo* verfolgen zu können, wurden PC12- Zellen transient mit GFP-Tubulin transfiziert, durch hbNGF stimuliert und mit Hilfe von Video-Mikroskopie analysiert. Die Überexpression von monomerem GFP-Tubulin erzeugte jedoch einen starken Hintergrund, der keine Aussagen über mögliche hbNGF-induzierte Veränderungen des Mikrotubuli-Netzwerkes *in vivo* zuließ (Daten nicht gezeigt).

3.2.4.2. Veränderung des Phosphotyrosin-Signals während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung

Wie in Abschnitt 3.2.3.1. gezeigt wurde, konnten Hinweise auf eine Beteiligung von *trkA* bei der Übertragung des NGF-Signals gefunden werden. *TrkA* ist eine Tyrosin-Rezeptor-Kinase und aktiviert weitere Tyrosin-Kinasen. Deswegen wurde die Lokalisation des Phosphotyrosin-Signals während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung untersucht.

Eine veränderte Lokalisation des Phosphotyrosin-Signals konnte in drei unabhängigen Experimenten mit zwei verschiedenen Antikörpern (PY20 und 4G10) gegen phosphorylierte Tyrosine in Immunfluoreszenz-Experimenten gezeigt werden.

Bei unbehandelten PC12-Zellen wurden phosphorylierte Tyrosine hauptsächlich an den Spitzen von Stressfasern und Filopodien beobachtet (Focalkontakte, s. Tafel 2.13. C, Pfeil). Bei Zellen mit NGF-induzierten Lamellipodien war jedoch mit Ausnahme von einzelnen Punkten am Lamellipodiensaum (s. Tafel 2.13. D, Pfeil) das Signal in feinen Punkten über

die Zelle verteilt. Die Veränderung der Lokalisation korreliert mit den Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts. Vor der Lamellipodienbildung und nach dem Kollabieren der Lamellipodien entsprach das Phosphotyrosin-Signal der Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Immunfluoreszenz-Daten ist es schwer zu beurteilen, ob es sich bei den beobachteten Veränderungen des Phosphotyrosin-Signals lediglich um eine räumliche Umorganisation oder um Veränderungen chemischer Natur handelt.

Es wäre denkbar, dass es sich bei dem veränderten Muster des Phosphotyrosin-Signals nach NGF-Stimulation (zumindest teilweise) um den aktivierten trkA-Rezeptor und oder trkA-Signaltransduktions-Intermediate handelt. Um genauere Aussagen machen zu können, könnten z.B. Zell-Lysate mit Phosphotyrosin-Antikörpern immunpräzipitiert und eine Analyse der Präzipitate im Westernblot durchgeführt werden.

3.2.4.3. Untersuchung der Lokalisation verschiedener an der Endozytose beteiligter Proteine während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung

Mit dem Kollabieren der Lamellipodien beginnt in PC12-251C-Zellen eine verstärkte Internalisierung von Makropinosomen (vgl. Abschnitt 3.3.). Über eine spezifische Membran-Zusammensetzung oder den Mechanismus der Abschnürung der Makropinosomen ist nur wenig bekannt. Deshalb wurde der Einfluss der Lamellipodienbildung auf die Lokalisation verschiedener an Endozytose-Prozessen beteiligter Proteine (Caveolin-1, Dynamin und Synaptojanin) untersucht.

Färbung mit einem Synaptojanin-Antikörper zeigten in den unstimulierten Zellen ein punktiertes, zytoplasmatisches Signal vor einem diffusen Hintergrund, welches während der hbNGF-induzierten Lamellipodienbildung weitgehend unverändert blieb (s. Tafel 2.14.). Im Lamellipodiensaum kolokalisierte das Synaptojanin-Signal mit prominenten F-Aktinbündeln (s. Tafel 2.14. D, *). Besonders auffällig war hier die Lokalisation von Synaptojanin am äußeren Rand des Lamellipodiensaumes (s. Tafel 2.14, F, Pfeile).

Die Lokalisation des in unstimulierten Zellen ebenfalls vorwiegend zytoplasmatischen Dynamin-I blieb während der hbNGF-induzierten Lamellipodienbildung weitgehend unverändert (s. Tafel 2.15.). Der Lamellipodiensaum blieb größtenteils ausgespart, abgesehen von einer schwachen Kolokalisation von Dynamin I und prominenten F-Aktinbündeln (s. Tafel 2.15. D, Pfeil). Durch Verwendung des Caveolin-1-Antikörpers zeigte sich ein punktiertes zytoplasmatisches Signal, welches teilweise mit F-Aktin-

positiven Punkten kolokalisierte (s. Tafel 2.16. E, Pfeil). Nach 20-minütiger hbNGF-Stimulation war die Signalintensität der Punkte erhöht und Caveolin-1 in der perinukleären Region konzentriert.

Im Lamellipodiensaum war deutlich weniger Caveolin-1 lokalisiert. Das Caveolin-1-Signal ragte speichenförmig in den Lamellipodiensaum hinein, wobei es teilweise mit prominenten F-Aktin-Bündeln (s. Tafel 2.16. F.) kolokalisierte. Diese Lokalisation könnte auf einen erhöhten Zytoplasma-Anteil in den entsprechenden Bereichen des Lamellipodiensaumes hindeuten. Ob die zytoplasmatischen F-Aktin-positiven Punkte nach NGF-Stimulation mit Caveolin-1 kolokalisierten, war nur schwer zu beurteilen und muss in zukünftigen Experimenten z.B. mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden.

3.3. Untersuchung der NGF-induzierten Makropinozytose in PC12-Zellen

In Abschnitt 3.1. wurde gezeigt, dass die hbNGF-Inkubation eine gesteigerte Transferrin-Aufnahme in PC12-Zellen bewirkt. Bei gleichzeitiger Zugabe von rTransferrin und NGF trat diese Steigerung der rTransferrin-Internalisierung erst etwa fünf Minuten nach NGF-Zugabe auf (Daten nicht gezeigt), zeitgleich mit dem Kollabieren der durch NGF-induzierten Lamellipodien (vgl. Abschnitt 3.2.). Lamellipodien und *membrane ruffles* sind Bereiche der Zelle, an denen das Abschnüren von Makropinosomen stattfindet (Swanson, 1989, Hewlett et al., 1994). Dabei werden größere Mengen extrazellulärer Flüssigkeit und Plasmamembran in Form von heterogenen Vesikeln unterschiedlicher Größe internalisiert. In einer Arbeit von Beattie et al., 2000 wurde neben dem NGF-induzierten Anstieg der Transferrin-Endozytose auch ein NGF-induzierter Anstieg der Dextran-TMR-Aufnahme beschrieben, die als Marker für unspezifische Aufnahmemechanismen gilt.

Deshalb stellte sich die Frage, ob hbNGF die Makropinozytose-Rate in PC12-Zellen erhöht, und ob diese für den NGF-induzierten Anstieg der Transferrin-Aufnahme verantwortlich sein könnte. Makropinozytose wurde in dieser Arbeit an lebenden Zellen (Anfärben des Zytoplasmas mit dem *green fluorescent proteins* (GFP) und Anfärben der Plasmamembran mit dem Farbstoff FM1-43) und an fixierten Zellen (Dextran) untersucht.

3.3.1. Untersuchung von Makropinozytose-Vorgängen bei lebenden Zellen durch Videomikroskopie

3.3.1.1. Untersuchung des Einflusses von NGF auf GFP-transfizierte PC12-Zellen

Durch die Expression des GFPs in PC12-Zellen sollte das Zytosol angefärbt werden, um Endozytose-Vesikel (im Negativ-Kontrast) durch Videomikroskopie sichtbar zu machen. Das exprimierte GFP war tatsächlich im Zytosol und im Zellkern lokalisiert, Organellen und Vesikel konnten als dunkle Strukturen gegen den grünen Hintergrund erkannt werden. Die Bewegungen der Organellen und Vesikel im Zytoplasma, sowie die Bewegungen des Zytoplasmas selbst konnten durch Videomikroskopie verfolgt werden.

Die Inkubation der Zellen mit hbNGF führte zur verstärkten Bildung und Internalisierung von großen Vesikeln mit einem Durchmesser von etwa 0,5 bis 1µm während der Lamellipodienbildung, beim Kollabieren der Lamellipodien und besonders an den nach dem Zusammenbruch der Lamellipodien zurückbleibenden Ausläufern (s. Film 5 und 6, Pfeil, Tafel 3.1.). Dieser Effekt wurde in Zellen, die ohne hbNGF inkubiert wurden nicht beobachtet (s. Film 7). Nach der Abschnürung blieb der Durchmesser der neu gebildeten Vesikel nicht konstant. Es wurde sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme der Vesikelgröße beobachtet, die durch Fusionen oder Formveränderung zustande kommen können.

PMA-induzierte Makropinozytose wurde bei verschiedenen Zelltypen beschrieben (Keller, 1990, Keller and Niggli, 1994, Keller and Niggli, 1995, Haigler et al., 1979). Durch die Inkubation mit PMA, das in PC12-Zellen wie hbNGF Lamellipodienbildung (s. Abschnitt 3.2, Tafel 2.8.), die Phosphorylierung von Amphiphysin-I (s. Abschnitt 3.1., Tafel 1.6.) und eine Erhöhung der Transferrin-Endozytose bewirkt (s. Abschnitt 3.1, Tafel 1.7. und 1.8.), konnte ebenfalls die verstärkte Abschnürung und Internalisierung von Vesikeln von etwa 0,5µm Durchmesser in videomikroskopischen Experimenten beobachtet werden (s. Tafel 3.2.).

Makropinozytose ist ein Aktin-basierender Prozess und kann durch Inhibitoren der Aktin-Polymerisation wie Cytochalasin D inhibiert werden (Keller and Niggli, 1995, Xu et al., 2000, Poussin et al., 1998, Keller, 1990). Cytochalasin D konnte die PMA- (Daten nicht gezeigt) und hbNGF-induzierte Erhöhung der Vesikelabschnürung und Internalisierung in PC12-Zellen (s. Tafel 3.3.) hemmen. Dabei wirkte sich die Kombination aus GFP-Überexpression, Cytochalasin D, NGF bzw. PMA und Fluoreszenzlicht ungünstig auf die

Lebensdauer der Zellen aus, so dass häufig nur kurze videomikroskopische Aufnahmen über einen Zeitraum von wenigen Minuten angefertigt werden konnten.

3.3.1.2. Untersuchung des Einflusses von NGF auf FM1-43 gefärbte Zellen

Eine alternative Möglichkeit, Endozytose-Vorgänge in lebenden Zellen sichtbar zu machen, ist die Verwendung eines amphiphilen Fluoreszenz-Farbstoffes (FM1-43). Dieser Farbstoff ist wasserlöslich, kann aber in das äußere Blatt der Plasmamembran eindringen. In dieser lipophilen Umgebung ist die Fluoreszenz um etwa das 250-fache im Vergleich zu einer wässrigen Umgebung erhöht (Fluorochromierungs-Handbuch *Molecular Probes*, Abschnitt 14.1.)

Durch Verwendung dieses Farbstoffs konnte die Internalisierung von Vesikeln mit Hilfe von Videomikroskopie in PC12-Zellen verfolgt werden. Die für Filmaufnahmen optimalen FM1-43-Konzentrationen waren zytotoxisch, so dass direkt nach Zugabe des Farbstoffs mit den Aufnahmen begonnen werden musste, da die Zellen nur für wenige Minuten beobachtet werden konnten.

NGF-Stimulation führte zur Bildung und Internalisierung von unterschiedlich großen Vesikeln (Durchmesser von 0,5 bis 1µm) in kollabierenden Lamellipodien (s. Film 8, Tafel 3.4., Pfeil) und den in verbleibenden F-Aktin-angereicherten Ausläufern. Außerdem konnte die Inkorporation von kleineren Vesikeln beobachtet werden, die auch unter Kontroll-Bedingungen ohne hbNGF-Stimulation auftrat (s. Film 9, Tafel 3.5. Pfeil). Diese kleinen Vesikel waren gleichmäßig geformt und etwa gleich groß, der Außendurchmesser betrug etwa 200 nm (Kalkulation erfolgte mit Hilfe des Photoshop Computer-Programms). Unter Einfluss von PMA konnte ebenfalls Plasmamembran-Internalisierung in Form von Vesikeln mit einem Durchmesser von etwa 0,5µm *in vivo* beobachtet werden (s. Tafel 3.6.).

Wie in den vorangegangenen beiden Abschnitten gezeigt wurde, führte die Stimulation von PC12-Zellen durch NGF bzw. PMA zu einer verstärkten Aktin-abhängigen Abschnürung und Internalisierung von Vesikeln mit einem Durchmesser zwischen 0,5 und 1µm von der Plasmamembran während und nach der Lamellipodienbildung. Die Daten legen nahe, dass es sich bei den beobachteten Vesikelabschnürungen um Makropinozytose handelt.

3.3.2. Untersuchung von Makropinozytose an fixierten Zellen

Um zu überprüfen, ob die NGF- und PMA-induzierte erhöhte Makropinozytose-Rate Ursache für die erhöhte Transferrin-Aufnahme ist, sollte untersucht werden, ob nach Stimulation rTransferrin in Makropinosomen nachgewiesen werden kann. Da dieses nur an fixierten Zellen möglich ist, musste zunächst ein geeignetes Testsystem gefunden werden.

Der Nachweis der veränderten Makropinozytose-Rate durch Fixierung hbNGF-stimulierter GFP-transfizierter PC12-Zellen gelang nicht, da durch die fehlende Dynamik in fixierten Zellen nicht zu beurteilen war, bei welchen Vesikeln es sich um internalisierte Makropinosomen handelte (S. Ahrends und R. Bauerfeind, unveröffentlichte Ergebnisse).

Ebenfalls erfolglos verlief der Versuch, die Internalisierung der Plasmamembran durch Färbung der Zellen mit FM1-43 und anschließender Fixierung sichtbar zu machen, da die Farbstoffe sich nur unzureichend mit 3% PFA fixieren ließen (M. Wittig und R. Bauerfeind, unveröffentlichte Ergebnisse).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Internalisierung der Plasmamembran mit Hilfe von Oberflächen-Biotinylierung zu untersuchen.

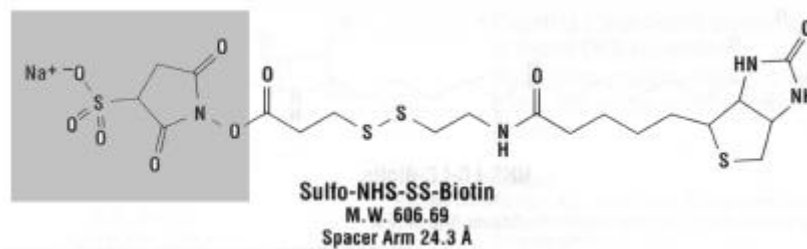


Abbildung 3.3.1. Struktur von Sulfo-NHS-SS-Biotin, der Reaktionsmechanismus entspricht der Acylierung von Aminogruppen durch Succinimid-Ester (vgl. Abschnitt 3.4.2.1.).

Dazu wurden PC12-Zellen auf 4°C abgekühlt und mit Biotin (s. Abbildung 3.3.1.) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für verschiedene Zeiten auf 37°C aufgewärmt, die Zellen dann fixiert und Biotin mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin nachgewiesen. Da das verwendete Biotin über eine Disulfidbrücke mit den Oberflächenproteinen verbunden war (vgl. Abbildung 3.3.1.), konnte nicht internalisiertes Biotin vor der Fixierung durch Glutathion-Inkubation abgetrennt werden.

Weder Inkubation mit hbNGF bzw. PMA vor der Biotinylierung (Daten nicht gezeigt), noch Zugabe nach Biotinylierung (s. Tafel 3.7.) führte zu einer Erhöhung der Biotin-Aufnahme in PC12-Zellen. Die Zellen zeigten nach 15 Minuten *chase* unregelmäßig verteilte Punkte vor einem diffusen Hintergrund (s. Tafel 3.7.A). Die Größe und Form der

Punkte war etwa identisch, die Helligkeit aber unterschiedlich. Nach 30 Minuten *chase* war die Intensität der Punkte und des Hintergrundes erhöht, qualitativ blieb das Signal unverändert. Nach 40 Minuten Inkubation nahm die Intensität des Signals ab (Daten nicht gezeigt).

Durch Inkubation von PC12-251-Zellen mit 10ng/ml hbNGF oder 0,5 μ M PMA (s. Tafel 3.7.B und C) konnte keine Erhöhung der Plasmamembran-Internalisierung im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Biotin-positive Punkte waren bei hbNGF- und PMA-behandelten Zellen im Hinblick auf Form und Größe heterogener als bei der Kontrolle.

Bei paralleler Färbung mit Phalloidin-TRITC konnten weder Lamellipodienbildung noch andere hbNGF- bzw. PMA-induzierte Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts beobachtet werden. Außerdem wurde eine teilweise Depolymerisation des F-Aktins beobachtet. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass im Fall von hbNGF- und PMA-Zugabe nach der Biotinylierung die Signalübertragung von NGF bzw. PMA und die Bildung von Lamellipodien bzw. die Induktion der Makropinozytose unterbrochen wurde. Vermutlich wurde durch die Oberflächen-Biotinylierung die NGF-Bindungsstelle der NGF-Rezeptoren blockiert, weswegen die Makropinozytose nicht stimuliert wurde und somit keine erhöhte Internalisierung von Oberflächenproteinen nachzuweisen war.

PMA wirkt intrazellulär, weshalb die Wirkung im Vergleich zur hbNGF-Signaltransduktion verzögert einsetzt. Um PKC-abhängige Signale induzieren zu können, muss PMA im inneren Blatt der Plasmamembran lokalisiert sein. Es ist denkbar, dass hier die Interaktion mit Transmembranproteinen der Plasmamembran durch die Oberflächenbiotinylierung gestört ist. Es ist auch möglich, dass nach dem Einsetzen der PMA-Wirkung nicht mehr genügend Biotin an der Oberfläche vorhanden war, um bei der PMA-induzierten Makropinozytose noch als deutliche Erhöhung des Signals im Vergleich zur Kontrolle wahrgenommen zu werden.

Die Stimulation der Zellen mit hbNGF und PMA vor der Biotinylierung führte ebenfalls nicht zu dem gewünschten Erfolg. In der Phalloidin-Färbung zeigte sich auch hier depolymerisiertes F-Aktin.

3.3.2.1. Untersuchung der Dextran-Aufnahme in Abhängigkeit von NGF

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Makropinozytose war die Messung der Dextran-Aufnahme, wobei eine hbNGF- und PMA-induzierte Erhöhung nachgewiesen werden konnte. Das hier verwendete Dextran-TMR ist ein Kohlenhydrat-Polymer ($n=10.000$), welches mehrfach mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (TMR) konjugiert ist. Durch die geringe Größe des Moleküls eignet es sich als Marker für Flüssigphasen-Endozytose und wird mit der extrazellulären Flüssigkeit in alle Arten von Vesikeln aufgenommen. Außerdem wurde es dahingehend modifiziert, dass es durch aminoreaktive Fixierungsmittel (z.B. Paraformaldehyd (PFA) oder Glutaraldehyd) quervernetzt werden kann.

Die Dextran-TMR-Aufnahme von PC12-251-Zellen wurde in *pulse-chase*-Experimenten und anschließender Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Dextran-TMR wurde nach 10-minütigen *pulse* in mehreren unregelmäßig verteilten Punkten konzentriert nachgewiesen (0 Minuten *chase*, s. Tafel 3.8. A). Außerdem bildete es ein diffuses Hintergrundsignal. Nach 10 und 20 Minuten *chase* war letzteres reduziert und gleichzeitig die Signal-Intensität der Punkte erhöht. 30 Minuten *chase* führte zu einer reduzierten Intensität der Punkte. Die Helligkeit des diffusen Hintergrundsignals war wieder leicht erhöht, was auf eine Degradation des Dextran-TMR in den Zellen hinweist. Bei kontinuierlicher Dextran-TMR-Aufnahme konnte ebenfalls eine Abnahme der Signalintensität der Dextran-TMR-Punkte und eine Zunahme des diffusen Hintergrundes nach etwa 60 Minuten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Eine 20-minütige Vorinkubation mit hbNGF führte zu einer deutlichen Erhöhung der Dextran-TMR-Aufnahme nach dem *pulse* (vgl. Tafel 3.8. B). Dieses drückte sich in einer höheren Intensität und erhöhten Anzahl von Dextran-TMR-Punkten pro Zelle aus. Nach 10 und 20 Minuten *chase* war die Aufnahme von Dextran-TMR im Vergleich zu unstimulierten Zellen erhöht. Im Vergleich zum Zeitpunkt 0 *chase* nahm die Intensität der Punkte nach 20 Minuten *chase* leicht ab. Nach 30 Minuten *chase* war die Anzahl der Punkte im Vergleich zu den vorangegangenen Zeitpunkten reduziert. Mit längeren *chase* Zeiten reduzierte sich das diffuse Hintergrundsignal deutlich. Die maximale Intensität der Punkte war zu allen Zeiten bei den hbNGF-behandelten Zellen höher als bei der Kontrolle. Da die hbNGF-induzierte Erhöhung der Dextran-TMR-Aufnahme zum Zeitpunkt 0 Minuten *chase* (=10 Minuten *pulse*) im Vergleich zur Kontrolle am höchsten war, wurde in den folgenden Experimenten nur dieser Zeitpunkt untersucht. Die Aufnahme von Dextran-TMR in PC12-251C-Zellen folgte der gleichen Kinetik wie in Klon 251.

hbNGF-Vorinkubation führte bei PC12-251C-Zellen ebenfalls zu einer Erhöhung der Dextran-Aufnahme, die vergleichbar mit der in 251-Zellen war (Daten nicht gezeigt).

3.3.2.2. Einfluss von Bisindolylmaleimid-I und Cytochalasin D auf die NGF-induzierte Erhöhung der Dextran-Aufnahme

Um die hbNGF-induzierte Erhöhung der Dextran-TMR-Aufnahme näher zu charakterisieren, wurde ein PKC-Inhibitor (Bisindolylmaleimid-I, Ahmed et al., 1995), ein Inhibitor der Aktin-Polymerisation (Cytochalasin D, Goddette and Frieden, 1986) und eine Makropinozytose-Inhibitor (Amilorid, Dharmawardhane et al., 2000) eingesetzt. Eine Vorinkubation mit Bisindolylmaleimid-I hemmte die hbNGF- und PMA-induzierte Transferrin-Aufnahme (s. Abschnitt 3.1., Tafel 1.7. und 1.8.), sowie die PMA-induzierte Lamellipodienbildung (s. Abschnitt 3.2., Tafel 2.9.).

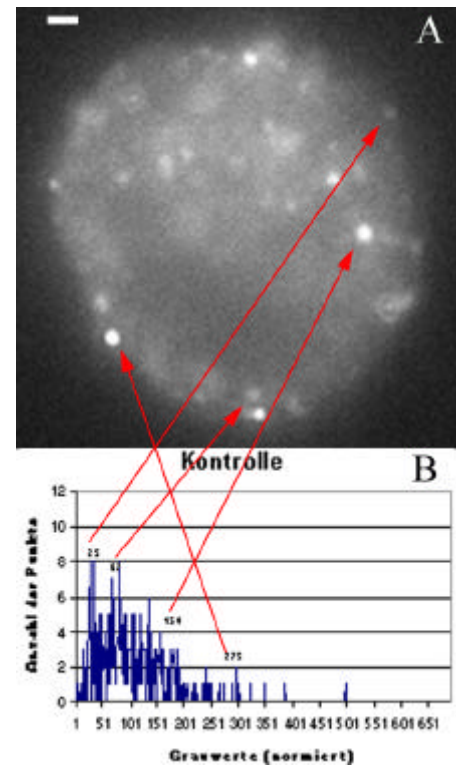
Cytochalasin D hemmt die hbNGF-, nicht aber die PMA-induzierte Lamellipodienbildung (s. Abschnitt 3.2., Tafel 2.9.), die vermutlich der Makropinozytose vorausgeht (s. Abschnitt 3.1.1.). In videomikroskopischen Experimenten mit GFP-transfizierten PC12-Zellen zeigte sich ebenfalls, dass Cytochalasin D die Vesikelabschnürung und Internalisierung lebender Zellen hemmt (s. Tafel 3.3.).

Um Makropinozytose zu stimulieren, wurde neben hbNGF auch PMA eingesetzt, welches im Vergleich zu hbNGF die Aufnahme von Dextran-TMR noch verstärkte (s. Tafel 3.9. und Tafel 3.10.). Dieses resultierte in einer erhöhten Anzahl von Dextran-TMR-Punkten sowie einer erhöhten Signalintensität. Die Dextran-TMR Punkte waren zum Teil ring- oder radförmig und größer als Dextran-TMR-Punkte in hbNGF-stimulierten oder unbehandelten Zellen (s. Tafel 3.9. und 3.10.). Bei der Untersuchung der Wirkung der Inhibitoren Cytochalasin D, Bisindolylmaleimid-I und Amilorid auf die PMA-induzierte Erhöhung der Dextran-TMR-Aufnahme zeigte sich in Immunfluoreszenz-Experimenten eine deutliche Inhibition durch Bisindolylmaleimid-I, während durch Cytochalasin D eine Erhöhung der Signalintensität beobachtet werden konnte (s. Tafel 3.10. G, H, I). Amilorid zeigte keinen Effekt (s. Tafel 3.10 I, L). Wurden die Inhibitoren zur Untersuchung der NGF-induzierten Erhöhung der Dextran-Aufnahme eingesetzt, zeigte Amilorid keinen Effekt, während durch Cytochalasin D die Anzahl und Helligkeit der Dextran-TMR-Punkte reduziert war (s. Tafel 3.10. E, G, H). Bisindolylmaleimid-I führte sogar zu einer leichten Erhöhung der

NGF-stimulierten Dextran-Aufnahme (s. Tafel 3.10. E, F). Der Einsatz von Cytochalasin D und Amilorid führte im Vergleich zur Kontrolle bereits zu einer leichten Erhöhung der Dextran-Aufnahme (s. Tafel 3.10. A, C, D). Bisindolylmaleimid-I führte zu einer leichten Erhöhung des diffusen Hintergrundsignals, welches möglicherweise in der roten Eigenfluoreszenz des Bisindolylmaleimid-I begründet liegt (s. Tafel 3.10. A, B). Die Experimente zeigen, dass die NGF-induzierte Erhöhung der Dextran-Aufnahme ebenso wie die NGF-induzierte Erhöhung der Makropinozytose-Rate und die Lamellipodienbildung durch Cytochalasin D gehemmt werden konnte (s. Tafel 2.9., Tafel 3.3. und Tafel 3.10. E, G), während Bisindolylmaleimid-I keinen Effekt hatte (s. Tafel 3.10. E, F). Die PMA-induzierte Lamellipodienbildung und Erhöhung der Dextran-Aufnahme konnte im Gegensatz dazu durch Bisindolylmaleimid-I gehemmt werden (s. Tafel 3.10., Tafel 2.9.). Cytochalasin D hatte keinen Einfluss auf die PMA-induzierten Effekte (Tafel 3.10., Tafel 2.9.), welches möglicherweise an einer zu niedrigen Konzentration des Inhibitors lag. Amilorid hemmte die NGF-induzierte, nicht aber die PMA-induzierte Lamellipodienbildung, hatte aber keinen Einfluss auf die NGF- bzw. PMA-stimulierte Erhöhung der Dextran-Aufnahme (Tafel 3.10., Tafel 2.9.).

Wie bei den Experimenten zur Transferrin-Aufnahme war auch hier die Auswertung durch die Heterogenität des Präparates erschwert. Um die Cytochalasin D bedingte Hemmung der NGF-induzierten Erhöhung der Dextran-Aufnahme näher untersuchen zu können, wurde anhand von digitalen Bildern die Helligkeit der Dextran-TMR-Punkte mit Hilfe des Metamorph-Computer-Programms bestimmt und in Form eines Histogramms ausgewertet (s. Abbildung 3.3.2.).

Abbildung 3.3.2.: Beispiel für die Quantifizierung der Experimente zur Dextran-Aufnahme. Anhand von digitalen Aufnahmen wurde die maximale Signalintensität (Graustufen) jedes Dextran-TMR-Punktes mit Hilfe des Metamorph-Computer- Programms bestimmt. Dann wurden die Daten von allen analysierten Zellen zusammengefasst. In der graphischen Darstellung wurde die Anzahl der Punkte gegen die Signalintensität aufgetragen, wobei auf die niedrigste Signalintensität normiert wurde. Gezeigt ist die Lokalisation der Signalintensitäten bestimmter Punkte im Histogramm (B) und auf dem Foto am Beispiel einer unbehandelten Zelle (A). Der Balken entspricht einem μm .



Die Kontrollzellen zeigten ein Maximum im Bereich von etwa 50 bis 100 Einheiten (s. Abbildung 3.3.3.A). Außerdem fanden sich wenige, stark fluoreszierende Punkte oberhalb 200 Einheiten. Nach hbNGF-Behandlung wurde zusätzlich ein weiteres Maximum bei 100-150 Einheiten nachgewiesen (s. Abbildung 3.3.3. B). Außerdem war die Zahl der hell leuchtenden Punkte oberhalb 200 Einheiten erhöht. Dieser Effekt konnte in zwei unabhängigen Experimenten gezeigt werden.

Durch Cytochalasin D wurden diese Auswirkungen der hbNGF-Inkubation unterdrückt. Das Maximum bei 50-100 Einheiten wurde leicht reduziert (s. Abbildung 3.3.3. C und D). Mit Cytochalasin D alleine wurden Effekte wie mit den Kontrollzellen erzielt (s. Abbildung 3.3.3. A und C).

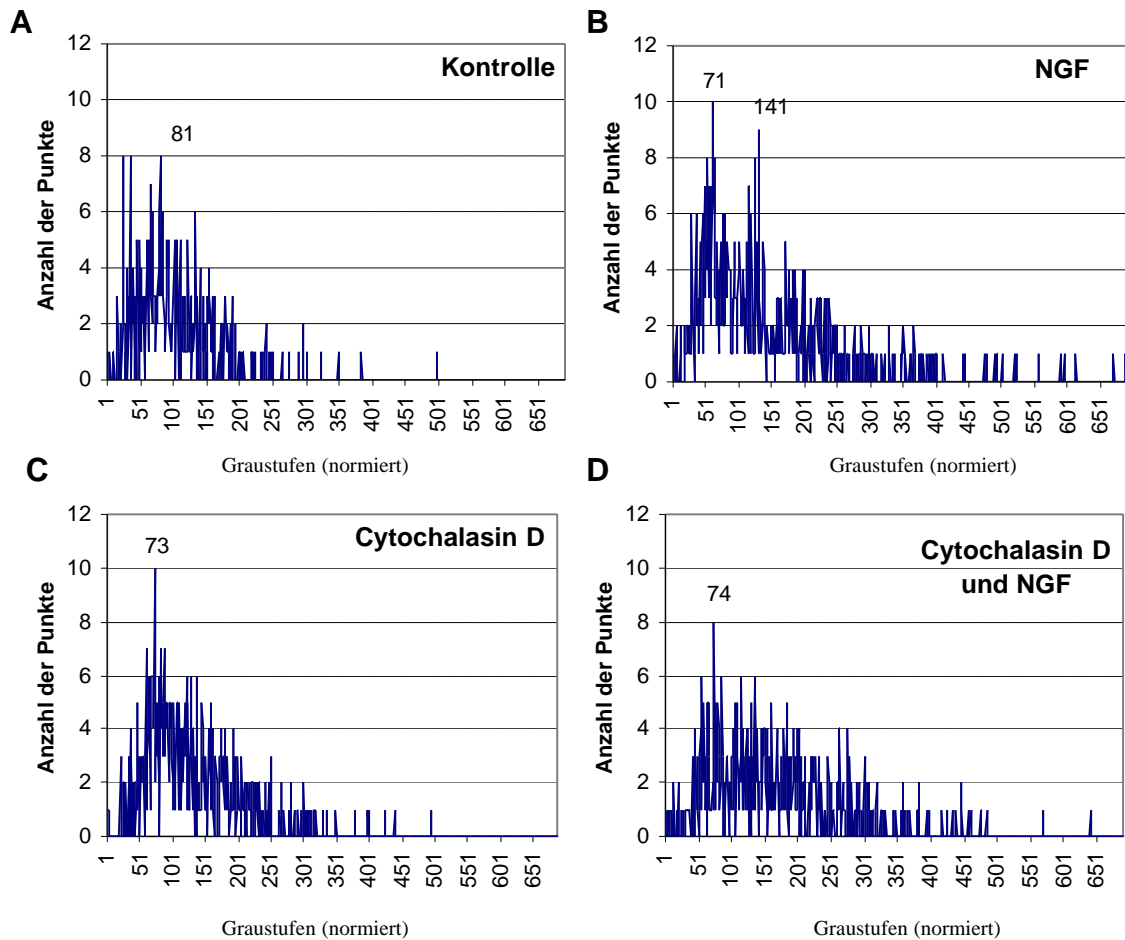


Abbildung 3.3.3.: Einfluss von Cytochalasin D auf die hbNGF-induzierte Erhöhung der Dextran-TMR-Aufnahme. PC12-251C-Zellen wurden für 20 Minuten ohne (A, B) oder mit 0,1 μ M Cytochalasin D (C, D) bei 37°C inkubiert. Dann wurde bei den entsprechenden Bedingungen 10ng/ml hbNGF (B, D) zugegeben und die Zellen für weitere 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde für 10 Minuten 2mg/ml Dextran-TMR zugegeben, dann die Zellen gewaschen und bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert. Pro Bedingung wurden willkürlich jeweils 10 Zellen dokumentiert und die Intensität (Graustufen) der Punkte gemessen. Dargestellt sind die Intensitäten gegen die Anzahl der Punkte. Es wurde auf die jeweils niedrigste Signalintensität nomiert.

3.3.2.3. Kolokalisation von Dextran-TMR und rTransferrin

Aufgrund der NGF-induzierten Veränderungen des F-Aktin-Zytoskeletts stellt sich die Frage, ob die beobachtete Erhöhung der Transferrin-Aufnahme (s. Abbildung 1.7., Beattie et al., 2000) möglicherweise damit im Zusammenhang stehen könnte. Dafür sprechen folgende Argumente:

- NGF erhöhte in videomikroskopischen Experimenten deutlich die Abschnürung und Internalisierung von Vesikeln mit einem Durchmesser von etwa $0,5\mu\text{m}$ (Abschnitt 3.3.1.) sowie die Dextran-Aufnahme (Tafel 3.9., Beattie et al., 2000, Shao et al., 2002). Beides konnte durch Cytochalasin D gehemmt werden (s. Abbildung 3.3., Tafel 3.3. und Tafel 3.10.)
- Die Erhöhung der Transferrin-Aufnahme korrelierte zeitlich mit dem Kollabieren der NGF-induzierten Lamellipodien, welches mit der Erhöhung der Makropinozytose-Rate einher geht (s. Tafel 2.17., Film 5).
- Die Erhöhung der Transferrin- und Dextran-Aufnahme ließ jeweils etwa 50 Minuten nach NGF-Stimulation nach, welches mit einem reduzierten Auftreten von F-Aktin-angereicherten Ausläufern korreliert (vgl. Abschnitt 3.5.6.3. und 3.5.6.6.)

Wenn die hbNGF-induzierte Steigerung der Transferrin-Endozytose auf Makropinozytose zurückzuführen ist, dann sollten Transferrin und Dextran zumindest zeitweise in den gleichen Vesikeln nachweisbar sein.

Die Transferrin- und Dextran-Aufnahme, Lamellipodienbildung und Makropinozytose konnten ebenfalls durch PMA stimuliert werden, wobei die Stimulation durch den PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid-I gehemmt werden konnte. Daher wurden PC12-Zellen für 20 Minuten ohne oder mit 10ng/ml hbNGF bzw. $0,5\mu\text{m}$ PMA inkubiert und dann Dextran-TMR und rTransferrin zugegeben. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert.

Nach hbNGF- und PMA-Stimulation wurde eine verstärkte Kolokalisation von gleichzeitig zugegebenen Dextran-TMR und rTransferrin beobachtet. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich wenig Kolokalisation von Dextran-TMR und rTransferrin, vor allem bei kleinen, wenig intensiv leuchtenden Punkten (s. Tafel 3.11. I, Pfeil). Intensiv leuchtende Dextran-TMR oder rTransferrin-positive Punkte kolokalisieren dagegen nicht (s. Tafel 3.11. I, Stern).

20-minütige Vorinkubation mit 10ng/ml hbNGF führte zu Kolokalisation in mehreren helleren (s. Tafel 3.11. J, K, Pfeil) und auch einigen weniger intensiven Dextran-TMR- und rTransferrin-positiven Punkten.

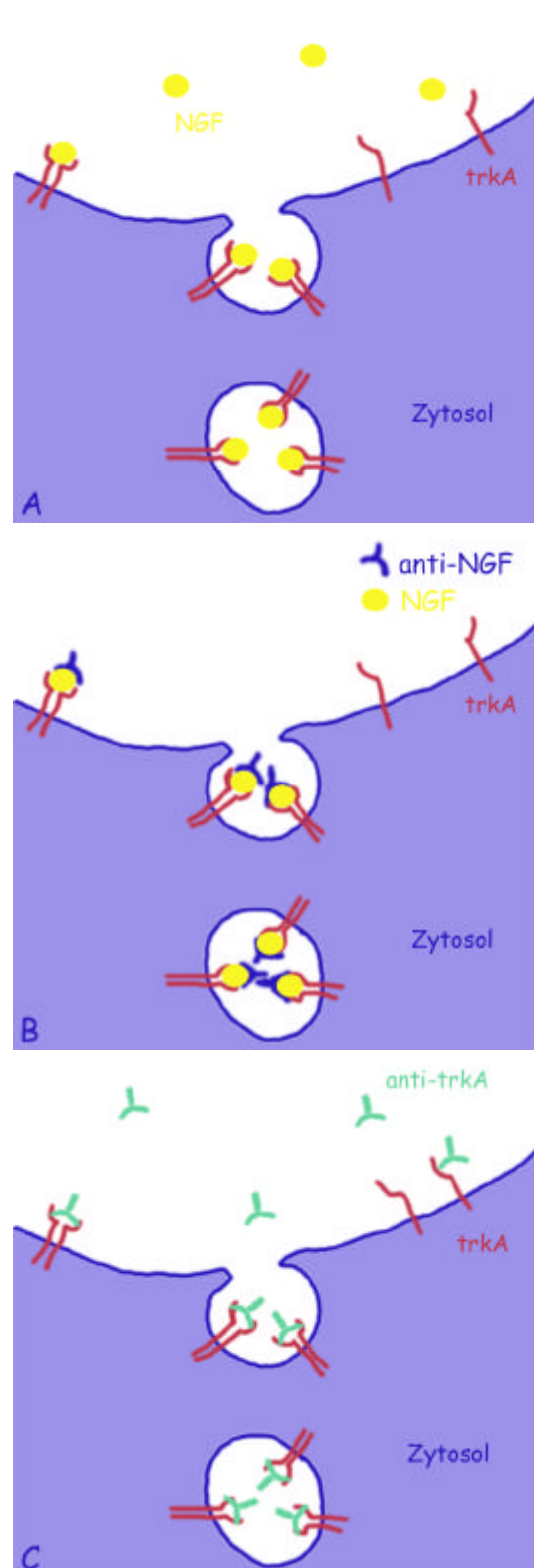
Nach PMA-Vorstimulation ließ sich ebenfalls erhöhte Kolokalisation von rTransferrin und Dextran-TMR bei Punkten mit schwächerer Intensität beobachten. Einige der helleren Dextran-TMR-Punkte kolokalisieren mit schwach leuchtenden rTransferrin-haltigen Punkten (s. Tafel 3.14. L, Pfeil), während andere Dextran-TMR-Punkte nicht kolokalisieren (s. Tafel 3.11., L, Stern)

Diese Daten weisen darauf hin, dass der hbNGF-induzierte Anstieg der rTransferrin-Endozytose auf eine Erhöhung der Makropinozytose zurückzuführen ist.

3.4. Untersuchung der Endozytose von NGF und den NGF-Rezeptoren

Neben den Effekten von NGF auf die Endozytose sollte auch der Mechanismus der Aufnahme von NGF durch PC12-Zellen untersucht werden. Dabei wurde zum einen die Internalisierung von NGF und der NGF-Rezeptoren trkA und p75NTR mit drei unterschiedlichen Methoden untersucht:

- A) Aufnahme von fluoreszenz-markiertem NGF und Analyse nach Fixierung der Zellen. Für diese Experimente wurde NGF fluorochromiert sowie ein GFP-NGF-Fusionsprotein in *E.coli* produziert.
- B) Internalisierung von unmarkierten NGF, Färbung nach Fixierung der Zellen mit einem NGF-Antikörper und Nachweis durch fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper
- C) Einsatz von Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne der NGF-Rezeptoren (trkA, p75NTR) in Internalisierungs-Experimenten. Dabei sollte die Bindung von hbNGF an die Rezeptoren imitiert und die Internalisierung initiiert werden. Der Nachweis erfolgte hier nach der Fixierung durch fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper.



Die Fluorochromierung von NGF ermöglichte die Visualisierung der NGF-Endozytose (Ansatz A, s. Abschnitt 3.4.2.4., Markierung des NGFs s. Abschnitt 3.4.2.). Das NGF-GFP-Fusionsprotein konnte hingegen nicht in Aufnahme-Experimenten eingesetzt werden, da es nicht in ausreichender Menge aufgereinigt werden konnte (Klonierung und Expression, s. Abschnitt 3.4.1.).

Während internalisiertes, unmarkiertes NGF sich mit den verwendeten Antikörpern in Immunfluoreszenz-Experimenten nicht nachweisen ließ (Ansatz B, s. Abschnitt 3.4.3.), konnte die Aufnahme von trkA und p75NTR durch Experimente mit Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren verfolgt werden (Ansatz C, s. Abschnitt 3.5).

3.4.1. Herstellung eines hbNGF-GFP-Fusionsproteins in *E.coli*

Mehrere Gruppen waren bisher erfolgreich bei der Herstellung eines biologisch aktiven rekombinanten bNGFs (Dicou, 1992, Hu and Neet, 1988, Fujimori et al., 1992). bNGF ist ein Homodimer mit einer Größe von 26kDa. Die beiden Untereinheiten werden durch nicht kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten. Für die biologische Aktivität des bNGF ist die Bildung von drei Disulfidbrücken pro Monomer essentiell (Levi-Montalcini, 1987, Davies, 1994).

Im Zytoplasma der Bakterien können die Disulfidbrücken des hbNGF normalerweise nicht gebildet werden. Dadurch wird das Protein unter Umständen nicht korrekt gefaltet und bildet unlösliche Aggregate (*inclusion bodies*). Für die Aufreinigung von bNGF aus *inclusion bodies* gibt es mehrere Beispiele in der Literatur (Dicou, 1992, Hu and Neet, 1988, Fujimori et al., 1992). In einigen dieser Publikationen wurde versucht, die Disulfidbrücken nach der Aufreinigung chemisch zu bilden. Bei dieser Art der Aufreinigung sind die Ausbeuten an biologisch aktivem Protein relativ gering.

Aus diesem Grund wurde ein anderer experimenteller Ansatz gewählt, um das Protein mit Disulfidbrücken in *E.coli* zu exprimieren. Bei *E.coli* wird die Bildung von Disulfidbrücken im periplasmatischen Raum durch die Thioreduktase DsbA bzw. die Isomerasen DsbC und DsbG katalysiert (zusammengefasst in Collet and Bardwell, 2002).

Für die Expression und Isolierung von hbNGF bzw. hbNGF-GFP wurde daher ein Vektor gewählt, der das Gen für DsbA und eine Signalsequenz für den periplasmatischen Raum enthält (pET 39b+). Auf diese Weise sollte das Fusionsprotein in den periplasmatischen Raum transportiert werden, wo die Bildung der Disulfid-Bindungen und die Faltung

erfolgen kann. Die Freisetzung der Proteine aus dem periplasmatischen Raum erfolgt durch osmotischen Schock. Der Vektor enthält für die Aufreinigung *up-* und *downstream* von der *multiple cloning site* je eine Sequenz für einen His-tag sowie *upstream* eine Sequenz für einen S-tag. Die Expression wird durch einen IPTG-induzierbaren T7-Promotor reguliert. Eine Thrombin-Schnittstelle erlaubt die Abtrennung des DsbA-Proteins und des N-terminalen His-tags vom Zielprotein (s. Abbildung 3.4.1.).

Die im Fusionsprotein enthaltenen S- und His-tags können auch zum Nachweis im Western Blot verwendet werden. Darüber hinaus bietet der S-tag die Möglichkeit zur Quantifizierung der Menge an rekombinantem Protein, indem zusammen mit dem S-Protein die Ribonuklease S Aktivität rekonstituiert wird und bestimmt werden kann (Potts, 1963, Zimmerman and Sundeen, 1965). Die Enterokinase-Schnittstelle zwischen S-tag und hbNGF ermöglicht das Abtrennen des DsbA, des N-terminalen His-tags und des S-tags.

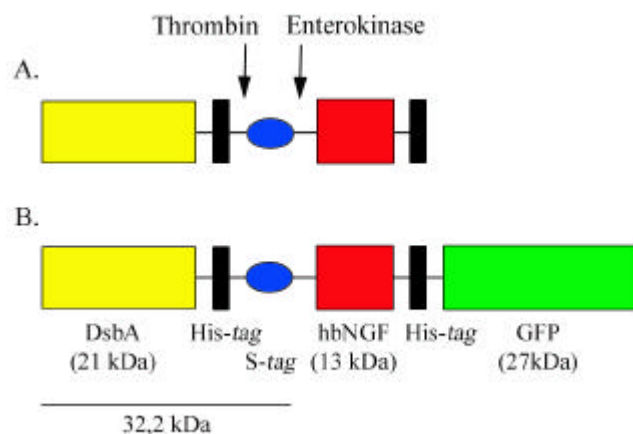


Abbildung 3.4.1.: Domänen-Diagramm der geplanten Fusionsproteine. A. DsbA-hbNGF (45,2 kDa) B. DsbA-hbNGF-GFP (72,2 kDa)

3.4.1.1. Klonierung und Expression von hbNGF

Zunächst wurde die hbNGF-cDNA in pET39b+ kloniert. Dazu wurde das hbNGF aus puc8-NGF (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Blömer, Medizinische Hochschule Hannover) über PCR amplifiziert (s. Tafel 4.1. A) und über den A-Überhang in einen speziellen PCR-Klonierungs-Vektor (pGEMT) mit entsprechenden T-Überhängen ligiert. Das resultierende pGEMT-hbNGF-Plasmid wurde in *E.coli* DH5 α transformiert, kloniert, isoliert und die pGEMT-hbNGF DNA durch Restriktionsverdau und

Sequenzierung analysiert (s. Tafel 4.1. B). Alle untersuchten Klone waren positiv für hbNGF.

Als nächstes wurde hbNGF aus pGEMT-hbNGF über die *XhoI*- und *NotI*-Restriktionsschnittstellen in den mit *SalI*- und *NotI*-linearisierten pET39b+-Vektor umklont. Das resultierende Plasmid wurde in DH5 α kloniert, isoliert und über Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert (s. Tafel 4.1.C). Nach erfolgreicher Klonierung von pET39b+-bNGF wurde die Expression eines Klones in den *E.coli*-Stämmen DH5 α und BL21Codon + getestet. Das DsbA-hbNGF Fusionsprotein konnte in BL21Codon +, nicht aber von DH5 α exprimiert werden (s. Tafel 4.2.). Drei Stunden nach Induktion der Expression der DsbA-hbNGF-cDNA in BL21Codon+ mit IPTG konnte im Westernblot die Produktion eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 45 kDa mit einem Antikörper gegen den His-tag nachgewiesen werden (s. Tafel 4.2. Pfeil.). Dieses entspricht der theoretisch errechneten Größe für das DsbA-hbNGF-Fusionsprotein von 45,2 kDa. Für die Produktion dieses Proteins in BL21Codon + war die Induktion der Expression der DsbA-hbNGF-cDNA mit 0,25mM IPTG für drei Stunden bei Raumtemperatur ausreichend. Längere Inkubationen führten nur zu einer leicht erhöhten Expressionsrate. Bei Verwendung von 0,5mM IPTG war keine Steigerung zu beobachten.

3.4.1.2. Isolierung des DsbA-hbNG-Fusionsproteins aus dem periplasmatischen Raum von *E.coli* BL21Codon+

Für die Isolierung des DsbA-hbNGF-Fusionsproteins wurde ein Kulturansatz von 500 ml gewählt. Vier Stunden nach der Induktion der Expression der DsbA-hbNGF-cDNA mit 0,25 mM IPTG in BL21Codon+ wurden die Proteine des periplasmatischen Raumes isoliert und auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit einem 20mM Imidazol-haltigen Puffer wurde ein Aliquot der Ni-NTA-Perlen zusammen mit Proben aus verschiedener Phasen der Aufreinigung im Westernblot analysiert. Dort sah man vier Stunden nach Induktion mit IPTG durch Verwendung eines Antikörpers gegen den His-tag eine Bande mit einem Molekulargewicht von 45kDa, welches dem Molekulargewicht von DsbA-hbNGF entspricht (s. Tafel 4.3, Bande A). Die Bande ließ sich schwach im Überstand II und deutlicher an den Ni-NTA-Perlen nachweisen.

Außerdem wurden noch zwei weitere Banden induziert: Eine mit einem Molekulargewicht von etwa 19 kDa (s. Tafel 4.3., Bande D) und eine weitere mit ca. 23 kDa (s. Tafel 4.3., Bande C). Banden mit diesem Molekulargewicht wurden, ebenso wie eine unspezifische Bande bei etwa 29 kDa (s. Tafel 4.3., Bande B), auch in Experimenten mit nicht transformierten BL21Codon+-Bakterien nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst konnte nach Transformation und IPTG-Induktion der pET39b+-hbNGF-cDNA ein im Westernblot durch His-tag-Antikörper nachweisbares Protein mit einem Molekulargewicht von 45kDa aus dem periplasmatischen Raum von *E.coli* BL21Codon+ isoliert und aufgereinigt werden. Das Molekulargewicht von 45kDa entsprach dem errechneten Molekulargewicht des DsbA-hbNGF-Fusionsproteins. Ob es sich wirklich um ein NGF-enthaltendes Fusionsprotein handelt, könnte in weiteren Experimenten durch Färbung der Westernblot-Membran mit NGF-Antikörpern überprüft werden. Außerdem könnten das Säulen-Eluat auf Differenzierung oder Lamellipodienbildung von PC12-Zellen untersucht werden.

3.4.1.3. Klonierung und Expression eines hbNGF-GFP-Fusionsproteins

Zur Herstellung eines hbNGF-GFP-Fusionsproteins sollte GFP an den C-Terminus von hbNGF angehängt werden, da aufgrund struktureller Untersuchungen zu vermuten ist, dass Modifikationen des N-Terminus einen negativen Einfluss auf die biologische Aktivität eines solchen Fusionsproteins ausüben (Shih et al., 1994, Woo et al., 1995).

Die Struktur eines Kokristalls aus bNGF und den Bindungsdomänen des trkA-Rezeptors zeigt, dass die N-terminalen Aminosäurereste zwei bis neun des bNGFs mit trkA interagieren (Wiesmann et al., 1999). Ein N-terminal an hbNGF fusioniertes GFP könnte diese Interaktionen behindern (s. Abbildung 3.4.2.).

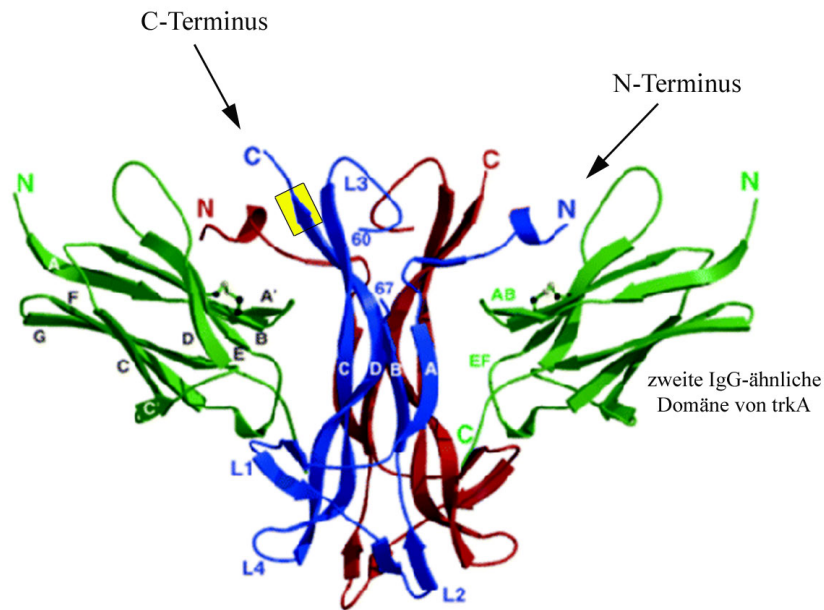


Abbildung 3.4.2.: Model von hbNGF basierend auf der Kristallstruktur (modifiziert nach Wiesmann et al., 1999). Die beiden β -Monomere (rot und blau) sind im Komplex mit der zweiten Immunglobulin-ähnlichen Domäne von trkA (grün) dargestellt. Der N- und C-Terminus eines Monomers ist mit Pfeilen gekennzeichnet, der Bereich von Aminosäure 111-115 ist gelb unterlegt.

Im Gegensatz zum N-Terminus liegt der C-Terminus in der Kristallstruktur frei, allerdings führten Punktmutationen im Bereich der Aminosäuren 111-115 (s. Abbildung 3.4.2. gelb unterlegt) zu einer Reduktion der trkA Tyrosin-Phosphorylierung und der Differenzierung von PC12-Zellen (Kruttggen et al., 1997). Zudem ist der C-Terminus eine von zwei Regionen, die in die Bindung von bNGF an p75NTR involviert sind (Urfer et al., 1994, Ryden et al., 1997). Trotzdem erschien die Fusion des GFPs mit dem C-Terminus von bNGF vielversprechender.

Zur Produktion eines GFP-NGF-Fusionsproteins wurde zunächst der pEGFP-N1-Vektor mit *SalI* und *NotI* verdaut und ein 762bp großes für GFP-codierendes DNA-Fragment isoliert. Dieses GFP-Fragment wurde anschließend mit einem *SalI* /*NotI*-geschnittenen pET39b+-hbNGF Plasmid ligiert (s. Tafel 4.1.D und E) und in *E.coli* DH5 α transformiert. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und die Sequenz über Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert. Das erhaltene Plasmid wurde pET+-hbNGF-GFP genannt.

Die *E.coli*-Stämme DH5 α und BL21Codon+ wurden mit pET39+ hbNGF-GFP transformiert und die Expression der DsbA-hbNGF-GFP-cDNA durch 0,5mM IPTG für drei, vier oder fünf Stunden bei Raumtemperatur induziert. Im Westernblot konnte durch Verwendung eines polyklonalen Antiköpers gegen GFP nach IPTG-Induktion eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 75kDa in BL21Codon+-Extrakten, nicht aber in DH5 α -Extrakten nachgewiesen werden. (s. Tafel 4.4. A, Bande A). Das Molekulargewicht dieser Bande entsprach etwa den für das DsbA-hbNGF-GFP-Fusionsprotein errechneten 72,1 kDa (*DNA Star, Computer Programm*).

Neben einer unspezifischen Bande (s. Tafel 4.4.A, Bande B), die auch in Extrakten von nicht induzierten Bakterien nachgewiesen wurde, wurden in den Extrakten von induzierten BL21Codon+ und DH5 α Bakterien mehrere schwache Banden nachgewiesen. Diese Banden könnten durch Degradation von DsbA-hbNGF-GFP entstanden sein.

Wurde dieselbe Westernblot-Membran mit einem Antikörper gegen den His-tag gefärbt, wurde in BL21Codon+-Extrakten die Induktion einer Doppelbande mit einem Molekulargewicht von 45-50 kDa und eine Bande bei 26 kDa detektiert (s. Tafel 4.4. B, Banden C und D). Da diese Banden von dem GFP-Antikörper nicht erkannt wurden, könnte es sich bei einem (oder beiden) der 45 kDa –50 kDa großen Proteine um DsbA-hbNGF handeln. Die 26 kDa-Bande wurde auch in Lysaten von nicht transformierten BL21Codon+ nachgewiesen (Daten nicht gezeigt) und trat auch teilweise nach der Induktion von DsbA-hbNGF auf (siehe oben). Der Antikörper erkannte keine Bande bei 75 kDa, obwohl durch Sequenz-Analysen die Anwesenheit des His-tags im pET39b+-hbNGF-GFP-Konstrukt nachgewiesen werden konnte. In DH5 α -Extrakten konnten mit dem Antikörper gegen den His-tag weder vor noch nach IPTG-Stimulation der Bakterien Banden detektiert werden.

Das DsbA-hbNGF-GFP-Fusionsprotein konnte mit dem GFP-Antikörper, nicht aber mit dem His-tag-Antikörper nachgewiesen werden, was sich durch unterschiedliche Spezifität der Antikörper erklären lässt. Des Weiterem wurde das DsbA-hbNGF-GFP Fusionsprotein wahrscheinlich zu einem deutlich geringeren Anteil exprimiert, als verschiedene Translationsabbruchprodukte und unspezifische Proteine, die von dem His-tag-Antikörper erkannt werden. Dieser war möglicherweise auch weniger empfindlich als der eingesetzte GFP-Antikörper.

3.4.1.4. Isolierung des DsbA-hbNGF-GFP-Fusionsproteins aus dem periplasmatischen Raum von BL21Codon +

Für die Isolierung des Fusionsproteins wurde ein Kulturansatz von 500ml gewählt. Nach der Induktion der Expression der DsbA-hbNGF-GFP-cDNA mit 0,25mM IPTG für drei Stunden in *E.coli* BL21Codon+ wurden die Proteine des periplasmatischen Raumes isoliert und über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Gebundene Proteine wurden mit Imidazolhaltigem Puffer eluiert und zusammen mit Proben verschiedener Phasen der Aufreinigung im Westernblot analysiert. Drei Stunden nach Induktion der Expression mit IPTG ließ sich in den BL21Codon+-Extrakten im Westernblot durch einen GFP-Antikörper ein ca. 75kDa großes Protein nachweisen (s. Tafel 4.5.A, Bande A). Diese Bande ließ sich nicht in der periplasmatischen Fraktion oder im Säulen-Eluat nachweisen. Neben zwei unspezifischen Banden (s. Tafel 4.5.A, Bande B und C) wurden mehreren Banden detektiert, die möglicherweise Degradationsprodukte von DsbA-hbNGF-GFP darstellen. Keine dieser Banden wurde im Säulen-Eluat detektiert.

Wurde derselbe Blot mit einem Antikörper gegen den His-tag gefärbt, konnte nach Induktion mit IPTG eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 46 bis 50 kDa nachgewiesen werden, die ebenfalls im Säulen-Eluat auftrat (s. Tafel 4.5. B, Bande D). Aufgrund des Molekulargewichtes könnte es sich bei dieser Bande um DsbA-hbNGF handeln.

Neben einer Bande, die auch in einigen Experimenten in Extrakten von nicht induzierten Bakterien detektiert wurde (s. Tafel 4.5. B, Bande G), wurden ebenfalls eine Doppelbande mit etwa 40kDa und eine Bande mit 32 kDa induziert (s. Tafel 4.5. B, Bande E und F). Letztere ließ sich auch im Säulen-Eluat nachweisen (s. Tafel 4.5. B, Bande F). Bei der 32kDa-Bande könnte es sich aufgrund des Molekulargewichtes um DsbA zusammen mit den His- und S-tags handeln. Eine Bande mit einem Molekulargewicht von 75 kDa konnte mit diesem Antikörper wie schon in den Vorexperimenten (s. Abschnitt 4.1.3.) nicht nachgewiesen werden.

Auch hier zeigte sich, dass die mit dem His-tag-Antikörper nachgewiesenen Proteine vom Molekulargewicht her nicht mit durch den GFP-Antikörper nachgewiesenen Proteinen übereinstimmten.

Zusammengefasst konnte nach IPTG-Induktion von pET39b+-hbNGF-GFP transformierten BL21codon+-Bakterien ein Protein exprimiert werden, dessen Molekulargewicht der

berechneten Größe des DsbA-hbNGF-GFP-Fusionsproteins entsprach. Das Protein ließ sich unter den hier gewählten Bedingungen nicht aus dem periplasmatischen Raum isolieren. Die Ursache hierfür könnte in einer zu starken Expression des Fusionsproteins liegen. Die Zelle kann das Protein nicht schnell genug ins Periplasma transportieren, wodurch es zu einer Verstopfung der Transportwege kommt.

Eine Alternative zu den hier durchgeführten Experimenten könnte eine Kotransformation der Bakterien mit hbNGF-GFP und den Genen für Thioisomerasen auf verschiedenen Plasmiden sein, wie es für die Herstellung von biologisch aktiven hbNGF in Kurokawa et al., 2001 beschrieben wurde. Kurokawa und Mitarbeiter hatten hbNGF mit der periplasmatischen Transportsequenz von *outer membrane protease T* (OmpT) fusioniert und koexprimierten OmpT-hbNGF mit den Thioisomerasen DsbC und D, die auf zwei Helferplasmiden codiert waren. Die Induktion der Proteinsynthese konnte dadurch zeitlich versetzt (erst DsbC und D, dann das NGF) initiiert werden.

3.4.2. Fluorochromierung von hbNGF

Parallel zur Klonierung wurde versucht, hbNGF mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Ein Vorteil gegenüber der Klonierung liegt darin, dass man für die Markierung nicht auf den N- oder C-Terminus beschränkt ist. Durch die Modifikation mit dem Farbstoff wird die Proteinstruktur nur unwesentlich beeinflusst. Außerdem besteht die Möglichkeit, mehrere Farbstoffmoleküle an ein NGF-Molekül zu koppeln.

Der Großteil der käuflich zu erwerbenden Fluoreszenzfarbstoffe markiert entweder Amino- oder Thiolgruppen. Das hbNGF-Monomer enthält sieben Arginin-, neun Lysin- sowie sechs Cystein-Seitenketten, die für eine Markierung mit thiol-oder aminoreaktiven Farbstoffen in Frage kommen. Die Markierung der Aminogruppen von Asparagin- oder Glutamin-Seitenketten, der Guanidin-Gruppe des Arginins oder der Imidazol-Gruppe des Histidins durch acylierende Reagenzien findet in wässrigen Lösungen nicht statt (Molecular Probes, Fluorochromierungs-Handbuch S. 11).

Die sechs Cysteine des hbNGF-Monomers bilden drei für die biologische Aktivität essentielle Disulfid-Brücken (Levi-Montalcini, 1987, Davies, 1994) und sind deshalb ungeeignet für Modifikationen.

In der Literatur gibt es auch Beispiele für die Markierung von Carboxylgruppen mit Diazomethan-gekoppelten (Arguello and Kaplan, 1994) oder Carbodiimid als reaktive

Gruppe enthaltenden (Mitra and Hammes, 1990) Fluoreszenzfarbstoffen. Diese Fluoreszenzfarbstoffe emittieren allerdings nach Anregung weniger Licht. Eine andere Möglichkeit ist die Einführung von Thiol-Gruppen durch Modifikationen von Carboxyl-Gruppen. Für derartige Markierungsreaktionen stehen in hbNGF theoretisch 12 Carboxylgruppen zur Verfügung.

In dieser Arbeit wurde versucht, hbNGF

- an den Amino-Gruppen mit aminoreaktiven Farbstoffen und
- an den Carboxyl-Gruppen nach Umformung in Thiol-Gruppen mit thiolreaktiven Farbstoffen zu markieren.

Dabei zeigte sich, dass die Reaktion mit den vorwiegend hydrophoben Farbstoffen generell zur Bildung von schwer löslichen Aggregaten führte. Das Ausfallen des fluorochromierten hbNGFs führte zum Verlust der hbNGF-Aktivität der Präparation. Durch Veränderung des pH-Wertes konnte die Löslichkeit von an Amino-Gruppen und an Carboxyl-Gruppen markiertem hbNGF erhöht werden. Am vielversprechendsten waren die Experimente mit dem Alexa488C₅-Maleimid-fluorochromierten hbNGF (s. Abschnitt 3.4.2.2.). Die Präparation zeigte NGF-Aktivität, außerdem konnte nach Senkung des pH-Wertes die Internalisierung des fluorochromierten hbNGFs in PC12-Zellen nachgewiesen werden.

Die Fluorochromierungsreaktionen mit den verschiedenen verwendeten Farbstoffen sind in Tabelle 3.4.1. zusammengefasst.

Amino- oder Thiol-reaktiver Farbstoff	Farbstoff	Fluorochromierungsgrad [Mol Farbstoff pro Mol hbNGF]	% fluorochromiertes hbNGF	Löslichkeit	biologische Aktivität
-NH ₂	Bodipy-TMR-X	4,32 (Ansatz IV)	100	nein	keine Phosphorylierung, keine Differenzierung
-NH ₂	Bodipy-FL-CASE	nicht bestimmt	0?	ja	Phosphorylierung, Differenzierung, keine Internalisierung
-NH ₂	Bodipy-TMR-STP	nicht bestimmt	100	ja (3% Essigsäure)	Phosphorylierung (nach Ansäuern), keine Differenzierung, schwache Internalisierung nach Ansäuern (Ansatz I)
-SH	Alexa488C ₅ -Maleimid	2,5	100	ja (verbessert durch 3% Essigsäure, DMSO)	Phosphorylierung, Differenzierung, Internalisierung nach Ansäuern

Tabelle 3.4.1.: Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und Ergebnisse der Fluorochromierungsreaktionen

3.4.2.1. Fluorochromierung von NGF mit aminoreaktiven Farbstoffen

3.4.2.1.1. Markierung mit Bodipy-TMR-X

Bodipy-TMR-X ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit ähnlichen Fluoreszenz-Eigenschaften wie Tetramethylrhodamin (TMR). Die Anregungswellenlänge ist 542 nm (555nm für TMR), die maximale Emission liegt bei einer Wellenlänge von 574 nm (580nm für TMR). Die Kopplung an die primären Amino-Gruppen von Lysin und Arginin erfolgt durch Reaktion bei leicht basischem pH mit dem Succinimidesteranteil (Abbildung 3.4.3.). Durch die Reaktion entsteht eine Amidbindung, die ähnlich stabil wie die Peptidbindung ist. Dadurch eignen sich Succinimidester-Konjugate besonders für die Fluorochromierung von Proteinen.



Abbildung 3.4.3.: Reaktionsmechanismus für die Reaktion von Amino-Gruppen mit Succinimidestern. Die Reaktion erfolgt durch nukleophilen Angriff des Stickstoffs an der Carboxyl-Gruppe des Esters, wodurch die Succinimid-Fluchtgruppe verdrängt wird

Der Farbstoff ist über eine Kohlenstoffkette (*spacer*) flexibel mit dem Protein verbunden (s. Abbildung 3.4.4.), welche die sterische Hinderung durch den Fluoreszenzfarbstoff verringern soll.

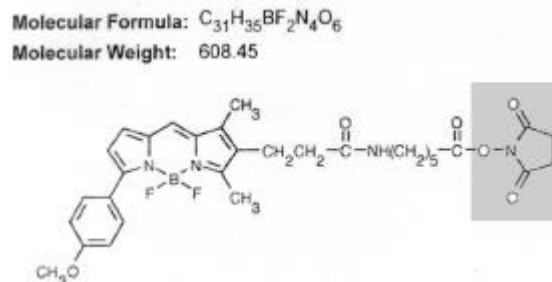


Abbildung 3.4.4.: Struktur von Bodipy-TMR-X, die Succinimid-Fluchtgruppe ist grau unterlegt.

Für die Reaktion wurden je 100 µg (I bis III) bzw. 82,5 (IV bis VI) hbNGF eingesetzt. Bodipy-TMR-X wurde im molaren Überschuss von 1,1, (I), 8,5 (II), 28,5 (III), 27,4 (IV), 63,0 (V) und 189,1 (VI) zugegeben.

Die Ansätze I bis III wurden nach der Reaktion für zwei Minuten bei 14.000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert, wobei ein roter Feststoff pelletiert wurde. Mit den Überständen wurde weiter gearbeitet.

Der Überstand von Ansatz I wurde nach Reaktion und Zentrifugation über eine Sephadex-G75, die Ansätze V und VI wurden direkt nach der Reaktion über eine Sephadex-G10 Säule gegeben. Da in allen Fällen während der Gelfiltration keine deutlich gefärbte Bande zu sehen war, wurde anschließend die Absorption der Fraktionen bei 280 und 542 nm gemessen. Fraktionen mit erhöhtem Protein- und Farbstoffgehalt wurden vereinigt und für weitere Experimente eingesetzt.

Die Überstände der Ansätze II und III nach Zentrifugation und Ansatz IV wurden über Nacht dialysiert und anschließend die Proteinmenge nach Bradford bestimmt. Dabei konnte für Probe II und III kein Wert gemessen werden, da die Werte unterhalb des Empfindlichkeitsbereichs des Tests lagen. Für Ansatz IV konnte eine um 23,2% reduzierte Proteinmenge im Vergleich zur Ausgangskonzentration bestimmt werden. Der Fluorochromierungsgrad von Ansatz IV lag bei 4,32 Mol pro Mol hbNGF.

Die Proteinmenge von Ansatz IV war nach der Dialyse deutlich höher als nach der Gelfiltration in den Fraktionen der Ansätze V und VI.

Anschließend wurde überprüft, ob das so erhaltene fluorochromierte hbNGF noch biologisch aktiv war. Ein Kriterium für biologische Aktivität ist die Phosphorylierung von Amphiphysin-I in PC12-Zellen. Wie in Abschnitt 3.1. bereits erwähnt, kann durch 20-minütige Inkubation mit 10ng/ml hbNGF das Verhältnis von niedriger phosphoryliertem Amphiphysin-I zu höher phosphoryliertem Amphiphysin-I zu Gunsten der höher phosphorylierten Form verschoben werden. Dieses wurde durch Auftrennung in SDS-Polyacrylamid-Gelen, Transfer auf Nitrozellulose und Färbung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Verdünnungen der Ansätze I-VI waren in Phosphorylierungs-Experimenten nicht in der Lage, Amphiphysin-I zu phosphorylieren (s. Tafel 4.6. A und B).

Eine weitere Möglichkeit, die biologische Aktivität von hbNGF zu testen, ist die NGF-induzierte Differenzierung von PC12-Zellen. Dabei werden die Zellen über mindestens 24 Stunden mit 10ng/ml hbNGF inkubiert, was zur morphologischen Veränderungen, unter anderem der Ausbildung von langen Neuriten führte, welche im Lichtmikroskop

beobachtet werden könnten. Inkubation der Zellen mit Verdünnungen der sechs Fluorochromierungsansätze führten nicht zur Differenzierung von PC12-Zellen.

Succinimidester sind häufig wasserunlöslich. Möglicherweise wurde das fluorochromierte hbNGF durch die Markierung in seinen Löslichkeitseigenschaften verändert und fiel nach der Kopplungsreaktion aus. Durch den anschließenden Zentrifugationsschritt könnte es im Fall von Ansatz I bis III aus dem Reaktionsansatz entfernt worden sein, was die Beobachtungen und verschiedenen Testergebnisse erklären würde.

Der niedrige Proteingehalte der Fraktionen aus den Ansätzen V und VI nach der Gelfiltration lässt vermuten, dass ein Großteil des markierten hbNGFs in der Säule verblieben ist.

Aufgrund der ermittelten Proteinkonzentration von Ansatz IV nach der Dialyse kann davon ausgegangen werden, dass hier die fehlende biologische Aktivität nicht auf einen Proteinverlust der Präparation zurückzuführen ist. Möglicherweise sind die NGF-Farbstoffaggregate nicht mehr in der Lage, die NGF-Rezeptoren der PC12-Zellen zu aktivieren. Es ist auch möglich, dass die Fluorochromierung der Aminogruppen selbst zu einer Inhibition der Rezeptor-Aktivierung führten könnte. Levi et al., 1980 beschreibt, dass die Fluorochromierung von NGF an den Aminogruppen mit Tetramethylrhodamin Isothiocyanat zu einer Inhibition der Bindung von NGF an trkA führt.

3.4.2.1.2. Markierung mit Bodipy-FL-Case

Um ein mögliches Löslichkeitsproblem zu umgehen, wurde die nächste Reaktion mit einem wasserlöslichen Succinimid-gekoppelten Farbstoff, Bodipy-FL-Case, durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen grün fluoreszierenden Farbstoff mit Absorptions- und Emissionsmaxima ähnlich dem gebräuchlichen Fluorescein (494nm und 518nm). Durch die SO_3^- -Gruppe wird die Wasserlöslichkeit des Reagenz erhöht (s. Abbildung 3.4.5.) Der Farbstoff verfügt ebenfalls über einen flexiblen *spacer*, um nach Kopplung an das Zielprotein die sterische Hinderung durch den Farbstoff möglichst gering zu halten.

Molecular Formula: C₂₇H₃₈BF₂N₅O₈S

Molecular Weight: 641.49

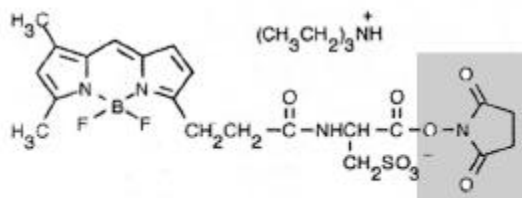


Abbildung 3.4.5.: Struktur von Bodipy-FL-Case, die Succinimid-Fluchtgruppe wurde farbig unterlegt.

Für die Fluorochromierung wurde der Farbstoff in einem molaren Überschuss von 4,1 zusammen mit 100 µg hbNGF eingesetzt. Nach der Reaktion wurde der Ansatz für zwei Minuten bei 14.000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Diesmal ließ sich kein Feststoff pelletieren. Der Reaktionsansatz wurde dialysiert und anschließend die Proteinmenge nach Bradford bestimmt (Proteinverlust 35,7%).

Um einen Eindruck vom Zustand des Proteins im Reaktionsansatz zu bekommen, wurde die Probe in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Proteine anschließend durch Silberfärbung sichtbar gemacht (s. Tafel 4.7.A). Hier zeigte sich, dass die hbNGF-Bande nach der Fluorochromierung etwa auf derselben Höhe im Gel läuft wie die Kontrolle. Inkubation von PC12-Zellen mit dem Reaktionsprodukt führte zu einer Phosphorylierung von Amphiphysin-I (s. Tafel 4.6.C) und bei Langzeit-Inkubation zur Differenzierung von PC12-Zellen (Daten nicht gezeigt). Internalisierung von fluorochromiertem hbNGF konnte in 4°C-Bindungsexperimenten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Da die NGF-Bande im Gel vor und nach der Fluorochromierungsreaktion auf der selben Höhe lief, kann angenommen werden, dass NGF gar nicht, nur schwach oder nur teilweise fluorochromiert wurde. Es wäre denkbar, dass eine schwächere Fluorochromierung mit einem besser wasserlöslichen Farbstoff nicht zur Bildung von NGF-Farbstoffaggregaten führte, die pelletiert werden können. Dieses würde auch die biologische Aktivität der Präparation erklären.

Wie dem auch sei, da in Internalisierungsexperimenten keine Endozytose nachgewiesen werden konnte, war diese Präparation für unsere Zwecke nicht brauchbar.

3.4.2.1.3. Markierung mit Bodipy-TMR-STP

Zusätzlich wurde versucht, die Fluorochromierung von hbNGF mit dem roten, wasserlöslichen und aminoreaktiven Fluoreszenzfarbstoff Bodipy-TMR-STP durchzuführen. Dieser Farbstoff unterscheidet sich durch die STP(4-Sulfotetrafluorophenyl)-Fluchtgruppe von den Succinimidester-gekoppelten Farbstoffen. Das Reaktionsprinzip der Acylierung durch den nukleophilen Angriff des Stickstoffs der Amino-Gruppen am Kohlenstoff der Carboxyl-Gruppe des Esters und Verdrängen der Fluchtgruppe entspricht dem der Succinimid-Ester (s. Abbildung 3.4.6.). Die Fluoreszenzeigenschaften sind vergleichbar mit denen von Bodipy-TMR-X.

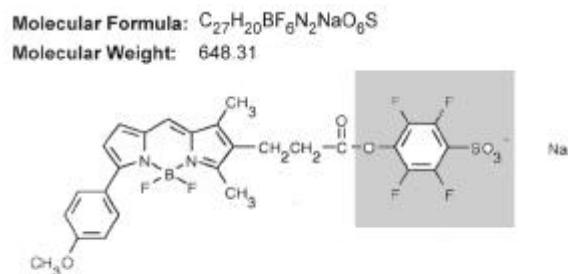


Abbildung 3.4.6.: Struktur von Bodipy-TMR-STP, die Fluchtgruppe ist grau unterlegt.

84 µg hbNGF wurden mit einem 4 (I), 10 (II) oder 30 (III)-fachen molaren Überschuss an Bodipy-TMR-STP inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz dialysiert. Während und nach der Dialyse konnte teilweise das Ausfallen eines roten Farbstoffes beobachtet werden. Die Analyse der Proben im PAA-Gel mit anschließender Silberfärbung zeigte eine leichte Erhöhung des Molekulargewichts der Proben I bis III im Vergleich zum unmarkierten NGF (s. Tafel 4.7.A). Dabei war das Molekulargewicht der Reaktionsansätze I bis III etwa gleich. Offensichtlich ist hbNGF mit dieser Methode nur bis zu einem gewissen Grad markierbar, welcher bereits durch Inkubation mit einem 4-fachen molaren Überschuss an Fluoreszenzfarbstoff erreicht wird.

Die Überstände wurden auf biologische Aktivität getestet. Keiner der drei Reaktionsansätze konnte Amphipysin-I phosphorylieren (s. Tafel 4.7.B.) oder PC12-Zellen differenzieren (Daten nicht gezeigt).

Durch Ansäuern der Ansätze mit 3% Essigsäure konnte für Ansatz I, II und III ein Teil der biologischen Aktivität im Hinblick auf Amphiphysin-I Phosphorylierung wieder hergestellt werden (s. Tafel 4.7.B.).

Internalisierung von Bodipy-TMR-STP konnte nur bei kontinuierlicher Aufnahme nach Ansäuern des Reaktionsansatzes I nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dabei war das Signal ausgesprochen schwach und der Farbstoff blich schnell aus. Außerdem führten die unlöslichen Farbstoff-NGF-Aggregate zu einem extrem hohen Hintergrund, welcher die Auswertung erschwerte.

Die Daten sprechen dafür, dass das fluorochromierte NGF größtenteils unlöslich war. Durch das Ansäuern konnte ein geringer Teil wieder in Lösung gebracht werden.

Betrachtet man die Struktur von Bodipy-TMR-STP, so stellt man fest, dass die für die Wasserlöslichkeit verantwortlichen geladenen Gruppen zur Fluchtgruppe gehören, während der nach der Reaktion an NGF gekoppelte Anteil eher unpolar ist. Vermutlich zeigt sich hier der gleiche Effekt wie bei den Bodipy-TMR-X-Kopplungsexperimenten. Die durch Ansäuern induzierte pH-Veränderung scheint sich dabei positiv auf die Löslichkeit des Konjugates auszuwirken und einen Teil der biologischen Aktivität wieder herzustellen.

3.4.2.2. Fluorochromierung von NGF mit dem thiolreaktiven Fluoreszenzfarbstoff Alexa488C₅-Maleimid

Für die Markierung von hbNGF mit dem thiolreaktiven Farbstoff Alexa488C₅-Maleimid wurde nach Levi et al., 1980 und Lin et al., 1990 von mir modifiziert. In Abbildung 3.4.7. ist das Experiment als Fließdiagramm zusammengefasst.

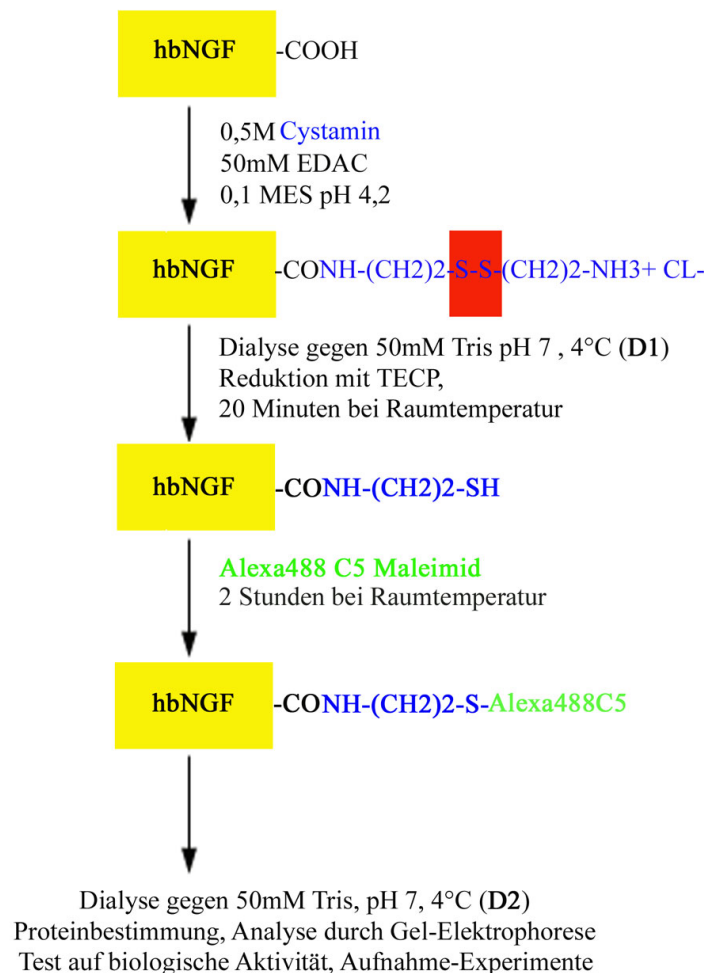


Abbildung 3.4.7.: Markierung von hbNGF mit Alexa488C₅-Maleimid nach Umwandlung der Carboxyl- in Thiolgruppen. Der Cystaminanteil im Molekül ist in der Formel blau dargestellt. Die Reaktion wurde modifiziert nach (Levi et al., 1980) und (Lin et al., 1990). Als D1 wurde das Reaktionsprodukt nach der ersten Dialyse bezeichnet. D2 bezeichnet das Reaktionsprodukt nach der zweiten Dialyse.

hbNGF wurde mit Cystamin in Gegenwart des Katalysators EDAC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) Carbodiimid) inkubiert. Dieses führte zur Bildung von Amidbindungen zwischen den freien Carboxylgruppen des hbNGFs und der Aminogruppe

des Cystamins (vgl. auch Abbildung 3.4.7.).

Zur Reduktion der Disulfidbrücke wurde TECP (Tris-(2-carboxyethyl)phosphin, Hydrochlorid) verwendet. TECP hat gegenüber zB. DTT oder Mercaptoethanol den Vorteil, dass es nicht vor der Zugabe des Farbstoffs aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden muss. Außerdem schützt es die Thiol-Gruppen vor Oxidation, so dass die anschließende Farbstoffkopplung nicht unter Schutzgas durchgeführt werden muss. Aus demselben Grund müssen die Puffer nicht vorher entgast werden. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Alexa488C₅-Maleimid verwendet. Alexa488C₅-Maleimid ist ein grün fluoreszierender Farbstoff mit einem Absorptions- und Emissions-Maximum bei 493 bzw. 516 nm (vgl. Abbildung 3.4.8.).

Molecular Formula: C₃₀H₂₅N₄NaO₁₂S₂

Molecular Weight: 720.66

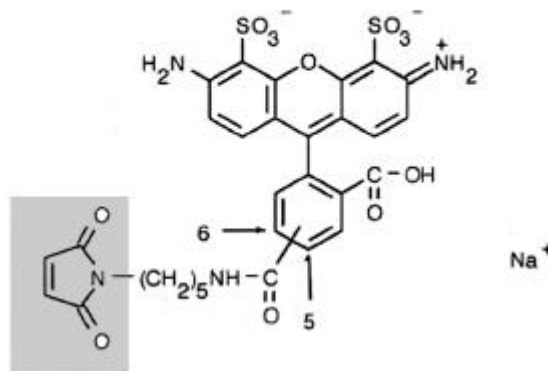


Abbildung 3.4.8.: Struktur von Alexa488C₅-Maleimid. Die reaktive Gruppe ist grau unterlegt.

Der Farbstoff ist nach Reaktion mit dem Protein über einen *spacer* verbunden, der die sterische Hinderung reduzieren soll. Nach der Kopplung verbleiben ausreichend geladene Gruppen am Farbstoffmolekül, wodurch diesem eine gewisse Wasserlöslichkeit verliehen wird.

Maleimid als reaktive Gruppe ist in seinen Reaktionseigenschaften sehr thiol-spezifisch und reagiert nicht mit Histidin oder Methionin, wie z.B. Iodoacetamid-gekoppelte Farbstoffe unter bestimmten Bedingungen. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 3.4.9. dargestellt.

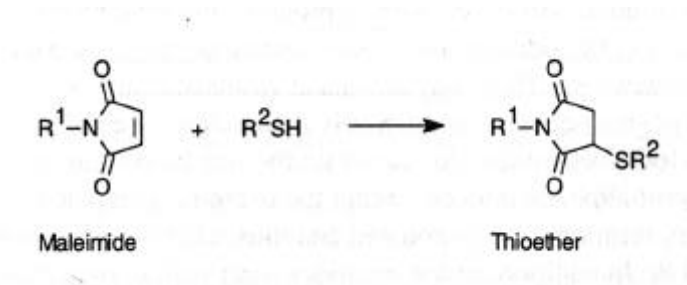


Abbildung 3.4.9.: Reaktionsmechanismus der Kopplung von Maleimiden an Thiol-Gruppen von Proteinen

Für die Fluorochromierungsreaktion wurden 146mM hbNGF (369µg) mit 48,7mM EDAC und 0,5M Cytamin für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dialysiert. Das Dialysat wurde als D1 bezeichnet. Als nächstes erfolgte die Reduktion von D1 mit einem 20-fachen molaren Überschuss an TCEP (825mM) und anschließend die Reaktion mit einem 42-fachen Überschuss an Alexa488C₅-Maleimid (1,67mM)¹. Zum Beenden der Reaktion wurde mit einem zweifachen molaren Überschuss an Gluthation (3,25mM, bezogen auf die Menge des eingesetzten Farbstoffs) abgestoppt und anschließend dialysiert. Nach der Dialyse war die Proteinmenge im Vergleich zum Ausgangsmaterial um 48,6% reduziert. Das Dialysat wurde als D2 bezeichnet.

D2 wurde für die Analyse im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAA-Gel) und die Tests auf biologische Aktivität folgendermaßen modifiziert:

- Ansäuern mit 3% Essigsäure (I) und Zentrifugation für 2 Minuten bei 14.000 rpm (Tischzentrifuge, II)
- Zentrifugation für 2 Minuten bei 14.000 rpm (Tischzentrifuge), Resuspendieren des Pellets im gleichen Volumen DMSO (III) bzw. 10% DMSO aq. (IV)

¹ Die Angaben der molaren Überschüsse beziehen sich auf die Proteinkonzentration nach der Dialyse.

Die Analyse im SDS-PAA-Gel mit anschließender Silberfärbung zeigte für D2 eine Bande mit einem erhöhten Molekulargewicht im Vergleich zum eingesetzten hbNGF (s. Tafel 4.8.A).

Nach der Zentrifugation von D2 für 14.000 rpm für zwei Minuten (Tischzentrifuge) ließ sich nach Analyse des Überstandes im silbergefärbten PAA-Gel kein NGF nachweisen. Dieses Ergebnis war konsistent mit dem vorangegangenen Experimenten (Daten nicht gezeigt). Wurde D2 mit 3% Essigsäure versetzt (I), änderte sich das Molekulargewicht nicht. Nach der anschließenden Zentrifugation (II), ließ sich im Überstand eine etwas schwächere Bande auf gleicher Höhe nachweisen, wie sie ebenfalls in vorangegangenen Experimenten beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Proteinkonzentration des fluorchromierten hbNGFs im DMSO gelösten D2 Pellet (III) war etwas höher als in D2 vor der Zentrifugation, das Molekulargewicht der Protein-Bande war unverändert. Das in 10% DMSO gelöste D2 Pellet (IV) zeigte ebenfalls keine Veränderung im Laufverhalten im SDS-PAA-Gel bzw. der Proteinmenge im Vergleich zu D2.

Bei Tests auf biologische Aktivität zeigte sich, dass alle Proben bis auf den D2-Überstand nach Zentrifugation in der Lage waren, Amphiphysin-I zu phosphorylieren (s. Tafel 4.8.B). Die Phosphorylierung von dem in 10% DMSO gelösten fluorchromierten hbNGF war nur gering.

Die Proben D2, I, III und IV wurden ebenfalls positiv auf Differenzierung von PC12-Zellen getestet (Daten nicht gezeigt, D2- und I-Überstände wurden für dieses Experiment nicht eingesetzt).

3.4.2.3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der Fluorchromierungsreaktionen

Durch Modifikationen der Aminogruppen von hbNGF mit den vorwiegend hydrophoben Farbstoffen Bodipy-TMR-X und Bodipy-TMR-STP neigte das resultierende fluorchromierte Protein zur Bildung schlecht wasserlöslicher Aggregate, was wahrscheinlich zum Verlust der biologischen Aktivität führte. Maximale Fluorchromierung konnte hier durch Reaktion mit einem etwa 4-fachen molaren Überschuss an Farbstoff erreicht werden. Ob die Reaktion mit Bodipy-FL-CASE zu einer Fluorchromierung von hbNGF führte ist unklar. In Internalisierungsexperimenten konnte mit dieser Präparation keine Aufnahme nachgewiesen werden.

Zur Fluorochromierung von NGF ist bisher nur wenig publiziert. In einer erst kürzlich erschienene Arbeit von Lalli and Schiavo, 2002 wird von der erfolgreichen Herstellung eines an den Aminogruppen mit Texas-Red fluorochromierten biologisch aktivem 7S mNGF berichtet. Das 7S mNGF ist ein Hexamer mit der Zusammensetzung $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. Der von Lalli and Schiavo, 2002 verwendete Farbstoff Texas-Red-Sulfonylchlorid führt nach der Reaktion mit der Aminogruppe zu besonders stabilen Suflonamiden. Allerdings ist dieses Reagenz nach Angaben des Herstellers ungeeignet für Markierung von Proteinen, da die reaktive Gruppe bereits nach zwei bis drei Minuten in wässriger Lösung und bei dem für die Reaktion erforderlichen pH von 8,5 komplett hydrolysiert ist (vgl. Fluorochromierungs Handbuch *Molekular Probes*, Kapitel 1.1.). Dennoch konnten Lalli und Mitarbeiter nach Einsatz eines 26-fachen molaren Überschusses an Texas-Red-Sulfonylchlorid und nach Gelfiltration (in Gegenwart von 0,2% Essigsäure) ein markiertes mNGF mit etwa 4 Molen Farbstoff pro Mol NGF herstellen.

In einer Arbeit von Sandow et al., 2000 wurde ebenfalls von der Herstellung eines an Aminogruppen mit Rhodamin-B-Isothiocyanat markiertem NGFs (Präparation nach Mobley et al., 1976) berichtet, welches in der Lage war, das Überleben von sympathischen Neuronen neugeborener Mäuse zu gewährleisten. Hier wurde der Farbstoff in einem 1000-fachen molaren Überschuss eingesetzt und nach der Reaktion gegen 0,2% Essigsäure dialysiert.

Durch Einführung von Thiolgruppen durch Modifikation der Carboxylgruppen von hbNGF nach Lin et al., 1990 und Levi et al., 1980 und deren anschließende Fluorochromierung mit Alexa488C₅-Maleimid konnte ein biologisch aktives hbNGF mit einem Fluorochromierungsgrad von 2,5 Molen Farbstoff pro Mol hbNGF hergestellt werden. Fluorochromierung mit Alexa488C₅-Maleimid führte im Gegensatz zu den anderen verwendeten Farbstoffen zu einer geringeren Menge an wasserunlöslichen Aggregaten, welches möglicherweise auch an dem niedrigeren Fluorochromierungsgrad liegen könnte. Durch Ansäuern mit 3% Essigsäure konnte die Löslichkeit und damit auch die Menge des für Experimente nutzbaren fluorochromierten hbNGFs erhöht werden. Die angesäuerte Alexa488Maleimid-hbNGF-Präparation wurde in Internalisierungsexperimenten eingesetzt, in denen die Aufnahme von Alexa488Maleimid-markiertem hbNGF nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.4.2.4.). Das Lösen der Farbstoff-NGF-Aggregate in DMSO führte im Hinblick auf Aufnahme-Experimente zu keinem besseren Ergebnis als das Ansäuern mit Essigsäure.

In der Arbeit von Levi et al., 1980 wurde nach derselben Methode die Fluorochromierung von 2,5S NGF (entspricht β -NGF, Aufreinigung nach Bocchini and Angeletti, 1969) mit Tetramethylrhodamin Isothiocyanat durchgeführt, welches in einem mit 8-10 Molekülen Farbstoff markierten NGF resultierte. Das fluorochromierte NGF war in der Lage, an den trkA-Rezeptor zu binden und sensorische Neuronen des Huhns zu differenzieren. Die Spezifität der Bindung an trkA wurde durch Konkurrenzexperimente und *radioimmunoassays* (RIA) gezeigt. Levi et al., 1980 beobachtete das Ausfallen einer Fraktion stärker markierten NGFs bei neutralem pH und löste deshalb das fluorochromierte NGF in einem Puffer der 1% Essigsäure enthielt.

Es ist unklar, welche Strategie zur Fluorochromierung erfolgreicher ist. In den Arbeiten von Lalli and Schiavo, 2002 und Sandow et al., 2000 fehlt der Nachweis für die Spezifität der Bindung des fluorochromierten NGFs an die NGF Rezeptoren und Levi et al., 1980 machte die Beobachtung, dass an den Aminogruppen fluorochromiertes NGF nicht mehr an trkA bindet. Dieses würde für eine Fluorochromierung nach Levi et al., 1980 sprechen. Die reduzierte Löslichkeit von fluorochromierten NGF bei neutralem pH scheint hingegen ein generelles Problem zu sein.

3.4.2.4. Endozytose von Alexa488C₅-Maleimid-markiertem NGF

In 4°C-Bindungsexperimenten konnte nur eine Internalisierung der angesäuerten Reaktionsansatzes (Probe I, vgl. Abschnitt 3.4.2.2.) nachgewiesen werden (s. Tafel 4.9.). Die Verwendung des Überstandes nach Zentrifugation (Probe II, s. Abschnitt 3.4.2.2.) führte zu keiner detektierbaren Internalisierung. Direkt nach der 30-minütigen Bindungsphase bei 4°C mit 10 μ l/ml fluorochromiertem hbNGF konnte nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen nur ein sehr schwaches NGF-Signal detektiert werden. Nach 30 Minuten *chase* bei 37°C sah man ein schwaches diffuses Hintergrundsignal in den Zellen und kleine intensiv leuchtene Punkte, die unregelmäßig in der Zelle verteilt waren. Nach 90 Minuten war die Intensität des Hintergrundsignals reduziert. Neben vielen kleinen sah man jetzt auch mehrere große intensiv leuchtende Punkte.

Für die Interpretation der Internalisierung des fluorochromierten NGFs ist ein Nachweis der Spezifität der Aufnahme wichtig, der noch zu erbringen ist. Da das fluorochromierte NGF stark aggregiert, sollten weitere Experimente mit aggregatfreien Präparationen durchgeführt werden. Trotz der durch Ansäuern erhöhten Löslichkeit führten die

unlöslichen Aggregate im Ansatz zu einem störenden Hintergrund in den Aufnahme-Experimenten, der selbst durch 30-minütige Zentrifugation bei 70.000g nicht abzutrennen war. Die insgesamt eher niedrigen Signalintensitäten und ein hoher Materialverlust durch das Ausfallen des markierten NGFs zeigen außerdem die Erfordernis für weitere Experimente zur Etablierung der Methode.

3.4.3. Untersuchung der Endozytose von NGF durch Verwendung von anti-NGF-Antikörpern

Eine weitere Möglichkeit, internalisiertes hbNGF sichtbar zu machen, ist der Nachweis durch NGF-Antikörper nach Inkubation der Zellen mit hbNGF bei 37°C und anschließender Fixierung und Permeabilisierung. Über einen Zeitraum von 90 Minuten konnte weder in *pulse-chase*-Experimenten noch durch kontinuierliche Zugabe von hbNGF die Aufnahme von NGF durch NGF-Antikörper nachgewiesen werden (getestet bis 100ng/ml hbNGF, Daten nicht gezeigt).

Ein Grund dafür könnte sein, dass der verwendete Antikörper rezeptorgebundenes hbNGF nicht mehr erkennt. Es wäre auch denkbar, dass die Methode nicht sensitiv genug ist. Dagegen spricht aber, dass die Internalisierung von NGF in PC12-Zellen bereits durch polyklonale NGF-Antikörper nachgewiesen werden konnte (Marchisio et al., 1980). In dieser Arbeit wurden die kontinuierliche Aufnahme von 50ng/ml 2,5S NGF in PC12-Zellen untersucht, wobei nach einer Stunde internalisiertes NGF durch polyklonale Antikörper gegen 2,5S NGF in Form von Punkten vor einem diffusen Hintergrund nachgewiesen werden konnte. Die Zellen wurden mit 3,7% PFA fixiert und mit fünf Minuten Methanol sowie fünf Sekunden Aceton permeabilisiert.

3.5. Untersuchung der Endozytose der NGF-Rezeptoren trkA und p75NTR

Um die Aufnahme der NGF-Rezeptoren zu untersuchen, wurden mehrere Antikörper gegen die extrazellulären Domänen von trkA (anti-trkA: Clary et al., 1994, anti-trk: Muragaki et al., 1995) und p75NTR (9651: Huber and Chao, 1995, REX: Weskamp and Reichardt, 1991, MC192: Hauser et al., 1983) eingesetzt. Dabei wirken die polyklonalen Antikörper anti-trkA, 9651 und REX rezeptoraktivierend (Clary et al., 1994, Brann et al., 1999), während für die monoklonalen Antikörper anti-trk und MC192 keine rezeptoraktivierende Wirkung beschrieben bzw. gezeigt wurde (Brann et al., 1999).

3.5.1. Endozytose von Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von trkA

Zur Untersuchung der Endozytose des NGF-Rezeptors trkA wurde ein polyklonaler und ein monoklonaler Antikörper (anti-trkA bzw. anti-trk) eingesetzt. Die Bindung des polyklonalen trkA-Antikörpers an trkA ist mit NGF kompetitierbar und vermittelt das Überleben und die Differenzierung von sympathischen Neuronen (Clary et al., 1994).

Der monoklonale trk-Antikörper ist gegen die Aminosäuren 20-355 eines GST-trkA-Fusionsproteins gerichtet (Muragaki et al., 1995), erkennt aber auch trkB und trkC. Eine rezeptoraktivierende Wirkung wurde bisher nicht beschrieben.

Durch Inkubation von PC12-Zellen mit dem trkA-Antikörper konnten vergleichbare Effekte wie bei der Inkubation mit NGF gezeigt werden: Nach Inkubation von PC12-Zellen mit anti-trkA konnte die Phosphorylierung von Amphiphysin-I nachgewiesen werden (s. Tafel 5.1.). Diese war konzentrationsabhängig und wurde ab einer Konzentration 20µg/ml induziert, was ebenfalls für die Bildung von Lamellipodien und für die Differenzierung von PC12-Zellen ausreichend war (vgl. Abschnitt 3.2.3.1., Tafel 2.7. und Tafel 5.2.). Die Effekte waren jeweils schwächer als die durch 10ng/ml hbNGF-induzierten. Wurde der monoklonale anti-trk Antikörper eingesetzt, konnte weder Amphiphysin-I-Phosphorylierung noch PC12-Differenzierung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Trotz der nachgewiesenen Rezeptor-Aktivierung durch den trkA-Antikörper konnte weder in 4°C-Bindungsexperimenten noch in *pulse-chase*-Experimenten (selbst bei Verwendung eines signalverstärkenden Maus-Anti-Kaninchen-Brückenantikörpers) Internalisierung in

PC12-Zellen nachgewiesen werden. Die Aufnahme von anti-trk konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Auch nach hbNGF-Stimulation und anschließender Fixierung, Permeabilisierung und Färbung der Zellen mit dem trkA-Antikörper konnte keine Veränderung des TrkA-Signals in den Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Erst bei kontinuierlicher Zugabe des trkA-Antikörpers konnte nach 20 Minuten aufgenommener trkA-Antikörper in Form von mehreren kleinen gleichmäßig geformten Punkten nachgewiesen werden (s. Tafel 5.3.). Die Signalintensität war ausgesprochen gering. Wurde für weitere 20 Minuten in Abwesenheit von trkA-Antikörper inkubiert (*chase*), blieb das Signal etwa konstant, während nach 40 Minuten die Anzahl der Punkte in der Zelle reduziert und der zelluläre Hintergrund erhöht war.

Bei kontinuierlicher Zugabe des Antikörpers kann dieser von den Zellen auch durch Flüssigphasen-Endozytose aufgenommen werden. Um zu überprüfen, inwieweit dieser Aufnahme-Mechanismus an der Internalisierung des trkA-Antikörpers beteiligt war, wurden die Zellen gleichzeitig mit anti-trkA und Dextran-TMR inkubiert. Dabei zeigte sich, dass der internalisierte trkA-Antikörper nach 20 Minuten Inkubation nahezu vollständig mit internalisiertem Dextran-TMR kolokalisierte (s. Tafel 5.4. A, C, E, Pfeil). Außerdem sah man auch Punkte, die nur Dextran-TMR, aber kein anti-trkA enthielten (s. Tafel 5.4. E,*). Nach weiteren 20 und 40 Minuten Inkubation in Abwesenheit von anti-trkA (*chase*) wurde ein vergleichbar hoher Anteil an Kolokalisation festgestellt (Daten nicht gezeigt). Nach 40 Minuten *chase* war die Signalintensität des Dextran-TMRs und des anti-trkA erniedrigt (s. Tafel 5.3, für Dextran sind die Daten nicht gezeigt).

In Anwesenheit von hbNGF konnte eine erhöhte Aufnahme von Dextran-TMR im Hinblick auf Anzahl und Intensität der Dextran-positiven zytoplasmatischen Punkte gemessen werden, die vermutlich durch eine Erhöhung der Makropinozytose-Rate hervorgerufen wurde (vgl. Abschnitt 3.2.2 und Tafel 5.4. B). NGF hatte dabei keinen Einfluss auf das Ausmaß der Kolokalisation zwischen Dextran und anti-trkA.

Da der trkA-Antikörper ebenso wie NGF die Lamellipodienbildung induziert (vgl. auch Abschnitt 2.3.1., Tafel 2.7.), wäre es auch denkbar, dass die Inkubation mit dem Antikörper Makropinozytose stimuliert. Die Dextran-TMR-Aufnahme war allerdings nach Zugabe von hbNGF im Vergleich zu den nur mit anti-trkA-behandelten Zellen erhöht. Dieses könnte an einer für die Erhöhung der Makropinozytose-Rate suboptimalen anti-trkA Konzentration liegen. Ein anderer Grund könnte sein, dass für die Steigerung der

Makropinozytose-Rate auch p75NTR aktiviert werden muss, was jedoch mit dem anti-trkA Antikörper im Gegensatz zu NGF nicht erfolgt.

Wenn anti-trkA unspezifisch aufgenommen wird, sollte durch die NGF-induzierte Erhöhung der Makropinozytose-Rate neben der Erhöhung der Dextran-TMR-Aufnahme auch eine Erhöhung der anti-trkA-Aufnahme nachweisbar sein. Diese wurde aber nicht beobachtet (s. Tafel 5.4. D). Das könnte darauf hinweisen, dass der Antikörper rezeptorvermittelt aufgenommen wurde.

3.5.2. Zelluläre Lokalisation von trkA

Ein Grund, weshalb die Internalisierung des trkA-aktivierenden trkA-Antikörpers schwer zu messen war, könnte die vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation des Rezeptors sein, die in konventioneller und konfokaler Mikroskopie nachgewiesen werden konnte (s. Tafel 5.5. und 5.6.).

TrkA ließ sich im Zytoplasma in Form eines punktierten Fluoreszenz-Signals nachweisen, welches auch nach 16-stündiger NGF-Differenzierung unverändert blieb (s. Tafel 5.7.). Die zytoplasmatische Lokalisation von trkA konnte durch Verwendung des monoklonalen trk-Antikörpers bestätigt werden (Daten nicht gezeigt) und wurde auch von anderen Gruppen beschrieben (Grimes et al., 1996).

An der Oberfläche von PC12-Zellen konnte trkA durch Verwendung des anti-trkA-Antikörpers nicht nachgewiesen werden, weder bei fixierten, nicht permeabilisierten Zellen noch durch *in vivo* Markierung bei 4°C und anschließender Fixierung (Daten nicht gezeigt).

Scatchard Analysen ergaben eine Anzahl von ca. 5000 Molekülen trkA an der Oberfläche von PC12-Zellen (Clary et al., 1994, Meakin and Shooter, 1992). Die Induzierung der Phosphorylierung von Amphiphysin-I, Lamellipodienbildung und die Differenzierung von PC12-Zellen durch anti-trkA zeigten, dass extrazellulär applizierter anti-trkA Antikörper den Rezeptor bindet (vgl. Abschnitt 3.5.1.). Vermutlich ist die Anzahl der anti-trkA-markierten Rezeptoren zu gering, um durch Immunfluoreszenz-Färbung an der Plasmamembran nachgewiesen zu werden.

3.5.3. Endozytose von Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von p75NTR

Parallel zu den Experimenten zur Internalisierung von anti-trkA wurde die Endozytose von anti-p75NTR-Antikörpern untersucht.

Im Gegensatz zu anti-trkA konnten die p75NTR Antikörper MC192 (s. Tafel 5.2.), REX oder 9651 (s. Tafel 5.8.) keine Differenzierung von PC12-Zellen induzieren. Die Antikörper REX und 9651 waren in diesen Experimenten fünfmal niedriger konzentriert als die für die Differenzierung von Neuronen ermittelte Menge Brann et al., 1999. Wurden die Antikörper für Experimente mit PC12-Zellen höher konzentriert eingesetzt, führten enthaltene Serumkomponenten zur Induktion von Apoptose, wie Kontrollen mit nicht relevanten Antikörper-Seren zeigten (Überprüfung durch Hoechst-Färbung, Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurden die Antikörper auf ihre Fähigkeit, Amphiphysin-I zu phosphorylieren, getestet. Durch Inkubation mit MC192- (s. Tafel 5.1.), 9651- und REX-Antikörpern (R. Bauerfeind, unveröffentlichte Ergebnisse) konnte keine Phosphorylierung von Amphiphysin-I nachgewiesen werden. Die Lamellipodienbildung in PC12-Zellen wurde ebenfalls weder durch 9651- noch durch REX-Antikörper induziert (s. Abschnitt 3.2.3.1., Tafel 2.7.). Der MC192-Antikörper wurde nicht getestet.

Des Weiteren wurde die Spezifität der Bindung der polyklonalen Antikörper REX und 9651 an p75NTR bei PC12-Zellen durch Konkurrenzexperimente mit NGF bei 4°C überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Bindung des 9651-Antikörpers durch 100ng/ml hbNGF um etwa 50% reduziert werden konnte, während der REX-Antikörper nicht durch hbNGF kompetitiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Deshalb wurden für Aufnahme-Experimente nur der 9651- und der MC192-Antikörper eingesetzt.

Die Aufnahme des 9651-Antikörpers konnte in 4°C-Bindungsexperimenten und *pulse chase* Experimenten nachgewiesen werden (s. Tafel 5.9.). Die resultierende Kinetik und Morphologie des Fluoreszenz-Signals waren bei beiden experimentellen Durchführungen vergleichbar. Die Aufnahme des Antikörpers in 4°C-Bindungsexperimenten deutet darauf hin, dass der Antikörper an p75NTR gebunden aufgenommen wird, was auf rezeptorvermittelte Endozytose schließen lässt.

Die Internalisierung des monoklonalen MC192 Antikörpers in 4°C-Bindungsexperimenten und *pulse-chase*-Experimenten war miteinander vergleichbar und ähnelte der Aufnahme

des 9651-Antikörpers in Bezug auf Kinetik und Morphologie des Fluoreszenz-Signals (s. Tafel 5.10.). Dies weist auf einen kontinuierlichen Internalisierungsmechanismus unabhängig von der Aktivierung des Rezeptors hin.

Bei der Aufnahme von MC192 und 9651 in *pulse-chase*-Experimenten ließ sich nach fünf Minuten *pulse* der Antikörper in gleichmäßig über die Zelle verteilten Punkten nachweisen (s. Tafel 5.9 A und 5.10 A). Im Gegensatz zu 9651 waren die MC192-positiven Punkte eher unregelmäßig geformt und weniger intensiv leuchtend.

Nach 25 und 55 Minuten *chase* konnten beide Antikörper auch in mehreren größeren, hell leuchtenden Punkten unterschiedlicher Größe und Anzahl, die sich vom fein punktierten Hintergrund abhoben (s. Tafel 5.9 C, Pfeil und 5.10) nachgewiesen werden.

In MC192- und 9651-Aufnahme-Experimenten wurden unterschiedlich hohe Signalintensitäten des Antikörpers unabhängig von Inkubationszeiten sowie Größe und Anzahl der intrazellulären p75NTR-positiven Punkte beobachtet. Unterschiedliche Signalintensitäten traten auch bei Färbungen von fixierten PC12-Zellen mit verschiedenen p75NTR-Antikörpern auf und könnten auf eine unterschiedliche Expression des p75NTR an der Oberfläche von PC12-Zellen hindeuten (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung korreliert mit Befunden die zeigen, dass das Ausmaß der p75NTR-Oberflächenexpression abhängig vom Zellzyklus ist (Urdiales et al., 1998).

Der Vorteil der Verwendung eines monoklonalen Antikörpers in Aufnahme-Experimenten liegt darin, dass dieser nur maximal 2 Rezeptoren quervernetzen kann. Polyklonale Antikörper sind in der Lage, mehrere Rezeptoren vernetzen zu können, wodurch es zur Bildung von sogenannten *patches* kommen kann. Das *patching* kann die Zusammensetzung der Plasmamembran und die Endozytose der Rezeptoren verändern, was für unsere Untersuchungen nicht wünschenswert war. Aus diesem Grund, und weil die 9651- und MC192-Aufnahme vergleichbar waren, wurde für die weitere Analyse der p75NTR-Internalisierung in Kolokalisationsexperimenten (s. Abschnitt 5.6.) nur der MC192-Antikörper eingesetzt.

3.5.4. Zelluläre Lokalisation von p75NTR

Im Gegensatz zu *trkA* war p75NTR vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert (s. Tafel 5.5.). Das zytoplasmatische p75-Signal bestand aus mehreren gleichmäßig geformten Punkten von unterschiedlicher Größe vor einem diffusen Hintergrund. Der Vergleich der drei p75NTR Antikörper REX, 9651 und MC192 zeigte, dass sich die MC192- und 9651-Färbungen ähnelten, während der REX-Antikörper ein weniger diffuses Hintergrundsignal erzeugte. Auffällig war, dass sich individuelle Zellen deutlich in der Intensität der p75NTR-Färbung unterschieden, welches auf eine unterschiedliche Oberflächenexpression des Rezeptors zurückzuführen sein könnte (Daten nicht gezeigt, siehe auch 3.5.3.).

Die Lokalisation von p75NTR konnte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden (s. Tafel 5.6.).

NGF-differenzierte PC12-Zellen zeigten keine veränderte Lokalisation von p75NTR (s. Tafel 5.7.) im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

3.5.5. Einfluss von NGF auf die Aufnahme von p75NTR-Antikörpern

Bei Aufnahme des MC192- und des 9651-Antikörpers in *pulse-chase*-Experimenten führte Vorstimulation mit hbNGF zu einer deutlich erhöhten Aufnahme des Rezeptors nach 5, 25 bzw. 55 Minuten *chase* (s. Tafel 5.9., Tafel 5.10.).

Bei der 9651-Aufnahme waren nach 5 Minuten die Punkte gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt. Sie waren jedoch in Gegenwart von hbNGF größer und eher asymmetrisch im Vergleich zur Antikörper-Aufnahme in Abwesenheit von NGF (s. Tafel 5.9. B).

Bei der MC192-Aufnahme bewirkte der Einfluss von NGF das vermehrte Auftreten von kleinen Punkten, die sich durch Größe und Intensität leicht vom punktierten Hintergrundsignal abhoben (s. Tafel 5.10. B, Stern)

Nach 25 bzw. 55 Minuten *chase* konnte bei den NGF-stimulierten Zellen deutlich mehr aufgenommener 9651- bzw. MC192-Antikörper in Form von vielen intensiv leuchtenden Punkten nachgewiesen werden (s. Tafel 5.9. und 5.10.). Die Punkte waren heterogen in Bezug auf Größe, Form und Intensität. Die Intensität der Punkte war deutlich erhöht im Vergleich zu der Aufnahme ohne hbNGF.

Ein besonders auffälliger Unterschied der hbNGF-behandelten zu unstimulierten Zellen war eine erhöhte Anzahl sowie ein stärkeres Ausmaß von großen MC192-Aggregaten an Ausläufern oder bestimmten Abschnitten der Plasmamembran, an denen das MC129-

Signal mit dort ebenfalls angereichertem F-Aktin kolokalisierte (s. Tafel 5.10. B, D, Pfeil). Dieser Effekt war direkt nach dem *pulse* und nach 25 Minuten *chase* besonders ausgeprägt und konnte in einem geringeren Ausmaß ebenfalls bei der 9651-Aufnahme beobachtet werden (s. Tafel 5.9. D, F, Pfeil).

3.5.6. Charakterisierung der p75NTR-Internalisierung

Nachdem gezeigt wurde, dass der MC192-Antikörper internalisiert wurde (s. Abschnitt 3.5.3. und 3.5.5), sollte durch Färbung mit verschiedenen Markerproteinen der Endozytose-Mechanismus und die Stationen des zellulären Abbaus untersucht werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob eine 20-minütige NGF-Vorinkubation neben einer erhöhten Internalisierung auch eine veränderte zelluläre Lokalisation des internalisierten MC192-Antikörpers bewirkt.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde der monoklonale MC192-Antikörper in *pulse chase* Experimenten eingesetzt, die Zellen anschließend fixiert und mit Antikörpern gegen Caveolin-1, early endosome antigen 1 (EEA1), ci-Manose-6-Phosphat-Rezeptor (ci-M6PR) und p75NTR (9651) gefärbt. Zum Nachweis von F-Aktin wurde Phalloidin-TRITC eingesetzt. Zur Untersuchung auf eine mögliche Kolokalisation mit Transferrin oder Dextran wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten während der MC192-Aufnahme zusätzlich für fünf Minuten mit Transferrin oder für 10 Minuten mit Dextran inkubiert und anschließend fixiert.

Bei nicht NGF-behandelten Zellen konnte ab 25 Minuten *chase* eine Kolokalisation mit EEA1 von etwa $\frac{1}{4}$ aller MC192 positiven Punkte (Abschnitt 3.5.6.4.) und eine nahezu vollständige Kolokalisation von MC192 mit 10 Minuten internalisiertem Dextran beobachtet werden (s. Abschnitt 3.5.6.6.). Inkubation mit NGF führte zu einer erhöhten Anzahl von Kolokalisationen mit EEA1 (s. Abschnitt 3.5.6.4.), während die Anzahl der Kolokalisationen mit Dextran reduziert war (s. Abschnitt 3.5.6.6.). Zudem zeigte sich nach NGF-Stimulation ein erhöhtes MC192-Signal in F-Aktin angereicherten Regionen der Zelle (s. Abschnitt 3.5.6.7.).

Kolokalisation von internalisiertem MC192 mit Transferrin und ci-M6PR konnte unabhängig von einer NGF-Stimulation zu den untersuchten Zeitpunkten nur in geringen Ausmaß festgestellt werden. (s. Abschnitt 3.5.6.3 und 3.5.6.5.). Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte konnte eine Kolokalisation mit Caveolin-I beobachtet werden (s. Abschnitt 3.5.6.2).

3.5.6.1. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit p75NTR

Als Positiv-Kontrolle wurde zunächst die Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit p75NTR untersucht. Dadurch sollte überprüft werden, ob der Antikörper während der Dauer des Experimentes an p75NTR gebunden bleibt und somit die Lokalisation des endozytierten Rezeptors markiert.

Für die Aufnahme-Experimente wurde der MC192-Antikörper eingesetzt. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde zum Nachweis des gesamten zellulären p75NTR der 9651-Antikörper verwendet.

Direkt nach dem 5-minütigen *pulse* konnte eine deutliche Kolokalisation von MC192 und p75NTR an der Plasmamembran nachgewiesen werden (s. Tafel 5.11.). Wenn die Zellen zu diesem Zeitpunkt MC192 internalisiert und in kleinen Vesikeln angereichert hatten, war Kolokalisation von MC192- und p75NTR-positiven Punkten (s. Tafel 5.11. B, D, F, Pfeil) sowie nur p75NTR-haltige Punkte erkennbar (s. Tafel 5.11.E, F*). Diese Beobachtung war unabhängig von der NGF-Vorstimulation. Außerdem wurde eine Kolokalisation von MC192 und p75NTR an bestimmten stark gefärbten Bereichen der Plasmamembran beobachtet, die bei NGF-behandelten Zellen viel ausgeprägter waren, als bei der Kontrolle (s. Tafel 5.11.F Pfeil). In Kolokalisationsexperimenten zeigte sich, dass diese p75NTR-angereicherten Bereiche häufig auch mit F-Aktin angereichert waren (s. Abschnitt 3.5.6.7.).

Nach 25 und 55 Minuten *chase* kolokalisierten MC192 und p75NTR an der Plasmamembran (s. Tafel 5.12 und 5.13.). Eine Kolokalisation der beiden Antikörper in zytosolischen Punkten war bei den nicht hbNGF-behandelten Zellen schwer zu erkennen, da es nicht möglich war, beide Färbungen in der selben Ebene zu fokussieren. Daher konnte eine Kolokalisation nur teilweise beobachtet werden (s. Tafel 5.12. und 5.13, Pfeilspitzen).

Bei den hbNGF-vorstimulierten Zellen kolokalisierte das Signal des aufgenommenen MC192-Antikörpers nach 25 und 55 Minuten *chase* vollständig mit p75NTR (s. Tafel 5.12. B, D, F, Pfeilspitze und Tafel 5.13.). Auffällig war hier eine Konzentration des p75NTR-Signals an bestimmten Bereichen der Plasmamembran (s. Tafel 5.12. und 5.13. Pfeil). Diese Regionen waren positiv für MC192 und p75NTR. Die Daten zeigen, dass die Internalisierung von MC192 geeignet ist, um die Endozytose von p75NTR zu verfolgen.

3.5.6.2. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und Caveolin-1-positiven Kompartimenten

In der Literatur gibt es mehrere Hinweise auf eine Lokalisation von p75NTR in Caveolae (Bilderback et al., 1997, Bilderback et al., 1999, Barker and Shooter, 1994, Huang et al., 1999). Caveolae sind Cholesterol-angereicherte, Caveolin-enthaltende Plasmamembran-Mikrodomänen, die am vesikulären Transport und der Signaltransduktion beteiligt sind. Die Existenz von Caveolae in PC12-Zellen wurde durch Immunfluoreszenz und elektronemikroskopische Aufnahmen bestätigt (Peiro et al., 2000). Ebenfalls konnte Caveolin-1 in PC12-Zellen im Westernblot nachgewiesen werden (Peiro et al., 2000, Bilderback et al., 1999). Aufgrund dieser Daten ist eine mögliche Caveolae-vermittelte Endozytose von p75NTR denkbar, was in den nachfolgenden Experiment überprüft werden sollte.

In den von mir durchgeführten Experimenten konnte jedoch (unabhängig von hbNGF-Vorstimulation) keine Kolokalisation zwischen aufgenommenem MC192 und Caveolin-1, weder direkt nach dem MC192-*pulse* noch nach 25 und 55 Minuten *chase*, nachgewiesen werden (s. Tafel 5.14. und 5.15., für 55 Minuten *chase* Daten nicht gezeigt).

Ebenfalls konnte keine Kolokalisation von Caveolin-1 und den NGF-induzierten Anreicherungen von MC192 in bestimmten Bereichen der Zellen beobachtet werden (s. Tafel 5.14. F, →, Tafel 5.15. F)

Interessanterweise konnte eine hbNGF-abhängige Veränderung des Caveolin-1-Signals beobachtet werden (s. Tafel 5.14 C und D). Nach fünf Minuten *pulse* war in den NGF-vorstimulierten Zellen die Intensität des Caveolin-1-Signals im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Zudem konnte eine Akkumulation von Caveolin-1 in der perinukleären Region nachgewiesen werden. Dieser Effekt trat auch auf, wenn die Zellen für den entsprechenden Zeitraum nur mit hbNGF behandelt wurden (vgl. Tafel 2.16.) und nahm mit längeren *chase*-Zeiten ab.

3.5.6.3. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und Transferrin

Fünf Minuten internalisiertes rTransferrin wurde als Marker für das frühe Endosom verwendet, wobei unter den gewählten Bedingungen eine Färbung des Recycling-Endosoms nicht ausgeschlossen werden kann. Zur Markierung des frühen Endosoms zum Zeitpunkt fünf Minuten *pulse* wurde Transferrin zusammen mit MC192 inkubiert. Bei den

späteren Zeitpunkten wurde das Transferrin jeweils fünf Minuten vor Ende des *chases* zugegeben.

Unabhängig von der NGF-Stimulation zeigte sich kaum Kolokalisation von Transferrin und MC192. Nach 25 Minuten *chase* konnte eine Kolokalisation von etwa 10% der endozytierten MC192-Antikörper und Transferrin-angereicherten Kompartimenten beobachtet werden (s. Tafel 5.17, E und F Pfeil). Zu den anderen Zeitpunkten konnte eine Kolokalisation von Transferrin und MC192 nur in Einzelfällen beobachtet werden (s. Tafel 5.16. und 5.18.).

Eine hbNGF-induzierte Erhöhung der Transferrin-Aufnahme (vgl. Abschnitt 3.1.) konnte nur für die Zeitpunkte 0 und 25 Minuten *chase*, nicht aber nach 55 Minuten *chase* gezeigt werden.

3.5.6.4. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und EEA1-positiven Kompartimenten

Zur Markierung des frühen Endosoms wurden neben Transferrin auch Antikörper gegen EEA1 (anti-EEA1, monoklonal) eingesetzt.

Direkt nach dem *pulse* sah man nur bei NGF-behandelten Zellen Kolokalisation von EEA1 mit etwa der Hälfte der zu diesem Zeitpunkt in geringer Anzahl erkennbaren zytoplasmatischen MC192-positiven Punkten. Teilweise kolokalisierten EEA1 und MC192 in ringförmigen Kompartimenten (s. Tafel 5.19. F, Pfeil).

Nach 25 und 55 Minuten *chase* sah man eine deutliche Kolokalisation von EEA1-positiven Kompartimenten mit etwa 25% des internalisierten MC192 (s. Tafel 5.20. und 5.21. A, C, E). Durch NGF-Stimulation erhöhte sich der Anteil der kolokalisierenden Punkte auf etwa 50% (s. Tafel 5.20. und 5.21. B, D, F). Nach 55 Minuten *chase* beschränkte sich die Kolokalisation mit EEA1 bei den hbNGF-vorstimulierten Zellen vorwiegend auf kleinere MC192-positive Punkte (s. Tafel 5.21., B, D, F).

Auffällig war eine Veränderung des EEA1-Signals nach 0 Minuten *chase* bei den hbNGF-vorstimulierten Zellen sowie während des *chases*. Dabei führte 20 Minuten NGF-Stimulation zu größeren ring- oder wagenradförmigen EEA1-positiven Kompartimenten (s. Tafel 5.19, F*) wobei letztere einen Durchmesser von mehreren μm erreichten. Nach 25 Minuten MC192 *chase* in Anwesenheit von NGF reduzierte sich die Anzahl der Zellen mit den großen wagenrad-förmigen Vesikeln (s. Tafel 5.20. D). Statt dessen fanden sich mehr

Zellen mit ringförmigen EEA1-positiven Vesikeln. Nach 55 Minuten MC192 *chase* war bei einem Großteil der hbNGF-behandelten Zellen das EEA1-Signal eher punktiert und in der perinukleären Region konzentriert (s. Tafel 5.21. D). Insgesamt war die Signalintensität der EEA1-positiven Kompartimente deutlich niedriger als bei nicht hbNGF-vorstimulierten Zellen. Dass dieser Effekt auf NGF zurückzuführen ist und nicht auf die Internalisierung des MC192-Antikörpers konnte in Experimenten bestätigt werden, in denen die Zellen 20 Minuten mit hbNGF inkubiert, dann fixiert, permeabilisiert und anschließend mit EEA1-Antikörpern (01JF, s. Tafel 5.22. und ant-EEA1, R. Bauerfeind, unveröffentlichte Ergebnisse) und Phalloidin-TRITC gefärbt wurden.

Das EEA1-Signal der nicht NGF-behandelten Zellen veränderte sich ebenfalls über die Dauer des Experimentes. Während zum Zeitpunkt 0 *chase* das Signal eher punktiert und in der perinukleären Region konzentriert war (s. Tafel 5.19. C), zeigte das EEA1-Signal nach 25 und 55 Minuten MC192 *chase* eher eine ringförmige Form (s. Tafel 5.20. und 5.21. C). Die Ursache dieser Veränderungen könnte im Zusammenhang mit der Endozytose des MC192-Antikörpers stehen oder durch den Serumentzug während des Experimentes zustande kommen. Dieses sollte in weiteren Experimenten überprüft werden.

3.5.6.5. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit ci-M6PR

Antikörper gegen den ci-M6PR wurden benutzt, um das späte Endosom in den PC12-Zellen zu markieren. Die Färbung erzeugte ein punktiertes Signal vor einem schwachen diffusen Hintergrund, welches in der perinukleären Region konzentriert war (s. Tafel 5.23. C).

Direkt nach dem Pulse konnte keine Kolokalisation von endozytierten MC192-Antikörpern und ci-M6PR nachgewiesen werden. Nach 25 und 55 Minuten *chase* zeigte die Mehrheit der p75-positiven cytoplasmatischen Punkte keine Kolokalisation mit ci-M6PR. Etwa 5-10% der kleinen, schwach fluoreszierenden Punkte kolokalisierte (s. Tafel 5.24. und 5.25.). Die beobachteten Effekte waren unabhängig von einer Vorstimulation mit hbNGF.

3.5.6.6. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit Dextran

Zum Markieren von Endozytose-Vesikeln wurden die Zellen für jeweils 10 Minuten vor der Fixierung mit Dextran-TMR inkubiert. Für die Untersuchung der Kolokalisation mit MC192-Antikörpern direkt nach dem *pulse* wurde Dextran fünf Minuten vor dem *pulse* zugegeben und dann noch einmal fünf Minuten zusammen mit MC192 inkubiert. Für die späteren Zeitpunkte wurde das Dextran jeweils 10 Minuten vor Ende des *chases* zugegeben.

Direkt nach dem MC192-*pulse* sah man nur bei den hbNGF-vorstimulierten PC12-Zellen Kolokalisation von Dextran-TMR und MC192 (s. Tafel 5.26. F, Pfeil). Bei den aufgereihten Dextran-TMR und teilweise MC192-positiven Punkten im Ausläufer der vorstimulierten Zelle (s. Tafel 5.26. B, D und F) handelt es sich möglicherweise um Makropinosomen. Es wurden ringartige MC192-positive Strukturen beobachtet, die nicht mit Dextran-TMR kolokalisieren (s. Tafel 5.26 F*).

Nach 25 und 55 Minuten *chase* sah man eine nahezu vollständige Kolokalisation von Dextran und dem endozytierten MC192-Antikörper (s. Tafel 5.27 und 5.28. A, C, E). Dabei kolokalisierten alle Dextran-positiven Punkte mit MC-192, während es auch MC192-positive zytoplasmatische Punkte gab, die nicht mit Dextran kolokalisierten (s. Tafel 5.27. und 5.28. E*). Durch NGF-Vorinkubation reduzierte sich der Anteil der kolokalisierten Punkte auf etwa 50% und betraf vorwiegend helle, größerer MC192-positiver Punkte (s. Tafel 5.27. und 5.28., F, Pfeil). Es fanden sich auch jeweils Dextran-TMR und MC192-angereicherte Punkte, die nicht kolokalisierten (s. Tafel 5.27. und 5.28. F*).

Auffällig war, dass nach 55 Minuten *chase* kein Anstieg der Dextran-TMR-Aufnahme in Anwesenheit von hbNGF im Vergleich zur Kontrolle mehr nachzuweisen war. Dieser Effekt wurde auch schon für den NGF-induzierten Anstieg der rTransferrin-Aufnahme beobachtet (vgl. 3.5.6.3) und korreliert mit einer Abnahme der Zellen mit F-Aktin angereicherten Ausläufern 60 Minuten nach Zugabe von 10 ng/ml NGF (vgl. Abschnitt 3.2.1.)

3.5.6.7. Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit F-Aktin

Zur Untersuchung der Kolokalisation von F-Aktin und aufgenommenen MC192-Antikörpern wurden die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten fixiert, permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC gefärbt.

Hier zeigte sich, dass nach NGF-Vorstimulation zu allen untersuchten Zeitpunkten häufig Kolokalisation von MC192- und F-Aktin-angereicherten Regionen auftrat (s. Tafel 5.29., 5.30. und 5.31. B, D, F).

Kolokalisation zwischen MC192 und F-Aktin-positiven Punkten im Zytosol konnte nur in seltenen Fällen nach 25 und 55 Minuten *chase* beobachtet werden (s. Tafel 5.30. A, C; E und 5.31. A, C, E). Durch NGF-Vorstimulation wurde nach 25 und 55 Minuten *chase* die Anzahl der kolokalisierenden Punkte erhöht. Dabei war der Anteil der kolokalisierenden Punkte von Zelle zu Zelle unterschiedlich (s. Tafel 5.29. B, D, F und 5.31. B, D, F).

4. Diskussion

4.1. Wirkung von NGF auf PC12-Zellen

Die Bindung von NGF an seine Rezeptoren auf der Oberfläche von PC12-Zellen löst eine Vielzahl von Effekten aus, deren Auswirkung sich zu unterschiedlichen Zeiten nach der NGF-Stimulation bemerkbar machen.

In dieser Arbeit wurde auf die unmittelbar eintretenden Effekte fokussiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Amphiphysin-I, die Lamellipodienbildung und die Erhöhung der Makropinozytose-Rate sich im selben Zeitraum durch NGF stimulieren ließen. Durch den Phorbolester PMA konnten diese Effekte ebenso wie durch NGF stimuliert werden (Tafel 1.6., Tafel 2.9., Tafel 3.10., Überblick in Abbildung 4.1.).

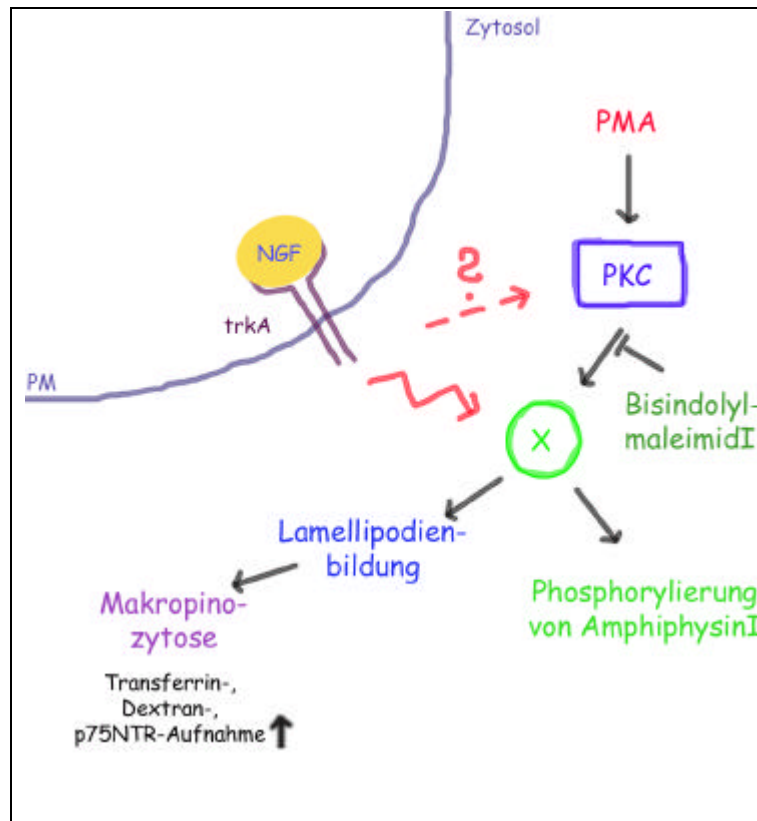


Abbildung 4.1.: Auf Basis der Experimente erstelltes Modell der unmittelbaren Wirkungen von NGF auf PC12-Zellen. Das unbekannte postulierte Signaltransduktions-Intermediat wurde mit X bezeichnet.

Die NGF-induzierte Phosphorylierung von Amphiphysin-I konnte etwa 2 Minuten nach NGF-Stimulation im Westernblot nachgewiesen werden und erreicht nach etwa 20 Minuten ein Maximum, welches für etwa 2 Stunden konstant blieb (R. Bauerfeind,

unveröffentlichte Ergebnisse). Parallel dazu konnten nach etwa 2 Minuten NGF-Stimulation in bei GFP-Aktin transfizierten bzw. FM1-43 gefärbten lebenden Zellen in videomikroskopischen Experimenten sowie durch Immunfluoreszenzfärbung fixierter Zellen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts beobachtet werden (siehe Tafel 2.1., Film 1 und Film 2). Diese führten zu einer transienten Lamellipodienbildung, welche etwa nach 5 Minuten bei 95% der Zellen beobachtet werden konnte (s. Tafel 2.1.). Nach 10 Minuten konnten keine Lamellipodien mehr beobachtet werden (s. Tafel 2.1.). Beginnend mit dem Kollabieren der Lamellipodien konnte bei GFP-transfizierten lebenden Zellen in videomikroskopischen Experimenten eine erhöhte Makropinozytose-Rate nachgewiesen werden (s. Film 5). Diese korrelierte mit einer erhöhten Dextran-Aufnahme (s. Tafel 3.9.). In Gegensatz zu NGF reagierten die Zellen weniger synchron auf PMA. Ein Großteil der Zellen bildete zwischen 20 und 40 Minuten nach PMA-Zugabe Lamellipodien. Dieses konnte bei GFP-Aktin-transfizierten lebenden Zellen in videomikroskopischen Experimenten (Daten nicht gezeigt) und durch Fluoreszenzfärbung fixierter Zellen beobachtet werden (s. Tafel 2.8.). In diesem Zeitraum konnte ebenfalls eine erhöhte Makropinozytose-Rate GFP-transfizierter bzw. FM1-43 gefärbter Zellen in videomikroskopischen Experimenten und eine erhöhte Dextran-Aufnahme nachgewiesen werden (s. Tafel 3.2., Tafel 3.6., Tafel 3.9.). 20-minütige PMA-Stimulation führte ebenfalls zur Phosphorylierung von Amphiphysin-I (s. Tafel 1.6., Ludwig et al., 2001). Die PMA-induzierten Effekte wurden vollständig durch den Proteinkinase C (PKC)-Inhibitor Bisindolylmaleimid-I (Ahmed et al., 1995) gehemmt, der die PKC-Isoformen β, δ, ϵ und besonders effektiv α hemmt (s. Tafel 1.6., Tafel 2.9., Tafel 3.10.). Der Einfluß auf die NGF-vermittelten Effekte war in den einzelnen experimentellen Ansätzen unterschiedlich ausgeprägt, im Vergleich zum Einfluß des Inhibitors auf die PMA-Stimulation war die Hemmung aber deutlich schwächer (s. Tafel 1.6., Tafel 2.9., Tafel 3.10.). Das ist ein Hinweis darauf, dass eine oder mehrere der oben erwähnten PKC-Isoformen die von PMA induzierten Effekte vermittelt, während sie bei den NGF-induzierten Effekten nur zu einem Teil der Signaltransduktion beiträgt.

Die Phosphorylierung von Amphiphysin-I und die Lamellipodienbildung konnten durch trkA-aktivierende Antikörper induziert werden, welches auf trkA als signalübertragenden Rezeptor hinweist (s. Tafel 2.6., Tafel 5.1.).

Wie hängen die PMA- und NGF-induzierten Effekte auf das Aktin-Zytoskelett und die Clathrin-vermittelte Endozytose zusammen? Die PMA- und NGF-abhängigen Signaltransduktionswege, die zur Lamellipodienbildung und Makropinozytose führen,

werden in den Abschnitten 4.1.1. und 4.1.2. diskutiert und sind in Abbildung 4.2. zusammengefasst. Während Makropinozytose und Lamellipodienbildung in einem Zusammenhang stehen, ist eine Verbindung zur Clathrin-vermittelten Endozytose, wie sie durch die Amphiphysin-I-Phosphorylierung nahegelegt wird, unklar (Abschnitt 4.1.4). Der Einfluß von NGF auf die Endozytose in PC12-Zellen wird in Abschnitt 4.1.3. diskutiert.

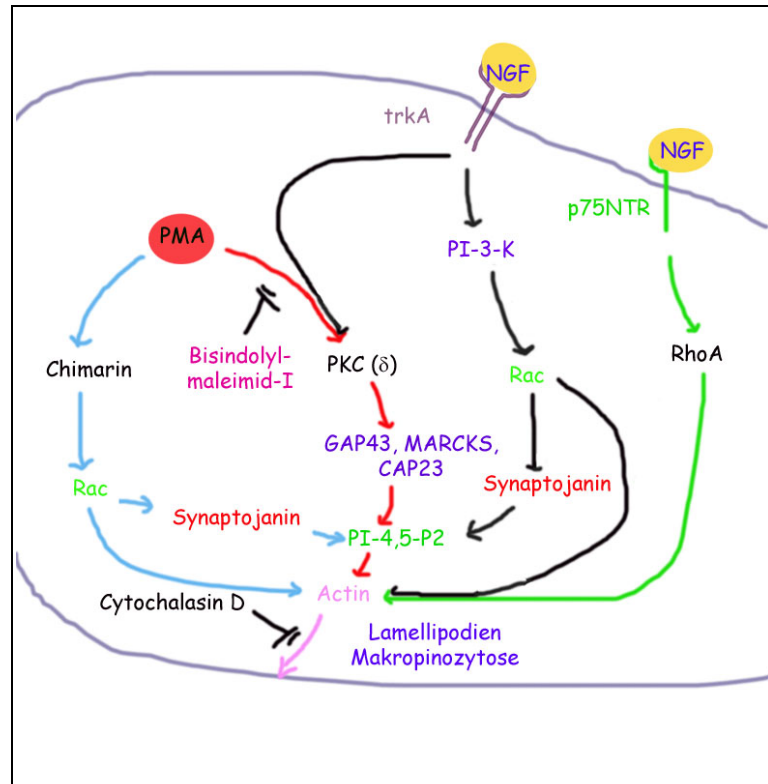


Abbildung 4.2: Zusammenfassung der möglichen Signaltransduktionswege der NGF- und PMA-induzierten Lamellipodienbildung und Makropinozytose. Die Referenzen zu den dargestellten Signaltransduktionswegen sind dem Text zu entnehmen.

4.1.1. Stimulation von Makropinozytose und Lamellipodienbildung durch PMA

Durch PMA-Stimulation konnte in PC12-Zellen nach 20 bis 40 Minuten bei etwa 50% der Zellen Lamellipodienbildung beobachtet werden (s. Tafel 2.8.). Zu früheren Zeitpunkten wurde im Gegensatz zu der NGF-induzierten Lamellipodienbildung, die weitgehend synchron innerhalb der ersten vier bis fünf Minuten nach NGF-Zugabe stattfand, nur vereinzelt Lamellipodienbildung beobachtet. Nach 50 Minuten PMA-Stimulation konnten keine Lamellipodien mehr nachgewiesen werden.

Im selben Zeitraum in dem eine erhöhte Lamellipodienbildung beobachtet wurde, konnte ebenfalls eine erhöhte Abschnürung und Internalisierung von Vesikeln bei GFP-transfizierten PC12-Zellen in videomikroskopischen Experimenten beobachtet werden.

(Tafel 3.2.), welches mit einer erhöhten Dextran-Aufnahme korrelierte (Tafel 3.9.).

Aus der Literatur ist bekannt, dass PMA bzw. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts in neutrophilen Zellen (Downey et al., 1992, Roos et al., 1987), NIH 3T3-Zellen (Sobue et al., 1988) und BSC-1 Zellen (Schliwa et al., 1984) induzieren können. PMA-induzierte Lamellipodienbildung konnte in neutrophilen Zellen (Keller and Niggli, 1995) und 3T3-Zellen Zellen (Ridley and Hall, 1992) nachgewiesen werden, während PMA-induzierte Makropinozytose in neutrophilen Zellen (Keller and Niggli, 1995), PMN-Zellen (Keller and Niggli, 1994) und A-431-Zellen (Haigler et al., 1979) gezeigt werden konnte.

Wie kann PMA diese Effekte vermitteln? PMA aktiviert die Gruppe der klassischen und der sogenannten *novel* PKC-Isoenzyme, während die atypischen und PKC-verwandte Kinasen (PRK) nicht durch PMA stimuliert werden (Überblick in Mellor and Parker, 1998, Keenan and Kelleher, 1998, Liu and Heckman, 1998). Zur Aktivierung der klassischen PKCs bedarf es neben PMA (oder dem physiologischen Aktivator 1,2-Diacylglycerin, DAG) die Bindung von Phosphatidylserin und Ca^{2+} . Die Bindung an PMA führt zur Verankerung der PKC mit der Plasmamembran und hebt die Affinität der Kinase für Ca^{2+} in den Bereich der physiologischen Ca^{2+} -Konzentration. Durch die Bindung von Ca^{2+} und PMA kommt es zu einer Konformationsänderung der PKC, wodurch die Hemmung durch die regulatorischen Domäne aufgehoben wird (Überblick in Liu and Heckman, 1998).

Neben den PKCs gibt es aber auch noch andere Effektoren für PMA (Überblick in Mellor and Parker, 1998). Ein Beispiel ist Unc-13, ein neuronales Protein aus *Caenorhabditis elegans* (Kazanietz et al., 1995), dessen Mutation zu Störungen der Neurotransmitter-Freisetzung führt. Das homologe Säugetier-Protein Munc-13 interagiert mit Syntaxin (Betz et al., 1997) und Doc2 (Orita et al., 1997), zwei Proteine, die für synaptisches Vesikel-Recycling wichtig sind. Dieses führte zu der Hypothese, dass Unc-13 eine Rolle bei der Exozytose von synaptischen Vesikeln spielt (Überblick in Rettig and Neher, 2002, Martin, 2002).

Ein weiteres Protein, das direkt mit PMA interagiert, ist Chimaerin (Ahmed et al., 1993). Die Proteine der Chimaerin-Familie sind GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) für Rac (Diekmann et al., 1991). Die zelluläre Funktion dieser Proteine scheint die Beteiligung an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts zu sein, da sie die Bildung von Lamellipodien und Filopodien in einer Rac-abhängigen Art stimulieren (Kozma et al., 1995).

Eine Beteiligung von Munc13 oder Chimaerin an der hier beschriebenen PMA-induzierten Phänomene ist unwahrscheinlich, da diese durch den PKC-spezifische Inhibitor

Bisindolylmaleimid-I vollständig gehemmt werden können (s. Tafel 2.9, Tafel 3.10). Bisindolylmaleimid-I bindet dabei kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle der PKC-Isoformen α , β , ϵ und δ (Ahmed et al., 1995). Munc13 und Chimaerin enthalten keine Kinaseaktivität, welches die Beeinflussung durch Bisindolylmaleimid unwahrscheinlich macht (Kazanietz, 2002).

Eine Funktion der PKC als ein Regulator des Aktin-Zytoskeletts wird auch durch die Bindung verschiedener PKC-Isoformen an Zytoskelett-Proteine z.B. Intermediär-Filamente (Vimentin, Zytokeratin), Membran und Zytoskelett quervernetzender Proteine (*myristoylated alanine-rich C kinase substrate* MARCKS, Ankyrin), Komponenten der Aktin-Filamente (F-Aktin) und Mikrotubuli (Tubulin) nahegelegt. Außerdem wurden PKC-Isoformen in den Fokal-Kontakten und an den Phagosomen von Makrophagen lokalisiert (Überblick in Keenan and Kelleher, 1998).

Verschiedene Arbeiten weisen hier besonders auf die Rolle der PKC δ hin (Jaken and Parker, 2000, Lopez-Lluch et al., 2001, Barry and Critchley, 1994, Lewis et al., 1996). Die PKC δ kann mit ihrer C2-Domäne an GAP43 binden (Dekker et al. 1997). GAP43 ist das Substrat der Plasmamembran-assoziierten PKC-Substrate MARCKS und CAP23 und bildet mit ihnen die Gruppe der GAP43-artigen Proteine (GMC, Aderem, 1995, Seki et al., 1996, Denisov et al., 1998), für die eine Funktion bei der Regulation Aktin-basierender Strukturen und Bewegung vorgeschlagen wurde (Myat et al., 1997, Frey et al., 2000 Aigner and Caroni, 1995, Aigner et al., 1995, Strittmatter et al., 1995).

In den Zellen akkumulieren die GMCs im inneren Blatt der Plasmamembran in TX-100 unlöslichen, Cholesterin-abhängigen *rafts*. An diesen *rafts* sind die Proteine mit PI(4,5)P₂ assoziiert (Laux et al., 2000). Man vermutet, dass die GMCs die Zusammensetzung dieser PI(4,5)P₂ enthaltenden *rafts* modulieren, um die Aktin-Dynamik an der Zelloberfläche zu regulieren (Frey et al., 2000, Laux et al., 2000).

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Bildung von F-Aktin an PI(4,5)P₂-*rafts* initiiert werden kann, indem N-WASP mit Phospholipiden wie PI(4,5)P₂ interagiert (Miki et al., 1996). In *in vitro*-Experimenten zeigte sich, dass die Kooperation von Cdc42, N-WASP und PI(4,5)P₂ ausreicht, um den Arp2/3-Komplex und die Aktin-Polymerisation zu aktivieren (Rohatgi et al., 1999, Higgs and Pollard, 2000, Ma et al., 1998, Moreau and Way, 1998).

Um zu überprüfen, ob der PMA-induzierte Lamellipodienbildung und Erhöhung der Makropinozytose-Rate in PC12-Zellen diese Signaltransduktionskaskade zu Grunde liegt,

könnte zunächst der Einfluß verschiedener PKC-Inhibitoren auf die Lamellipodienbildung und die Dextran-Aufnahme getestet werden. Dadurch könnte möglicherweise ein Hinweis auf die verantwortlichen PKC-Isotypen erhalten werden.

Die *effector domain* (ED) der GMCs ist die Region an der die PKC-Bindung und die Aktivierung der GMCs durch die PKC erfolgt (Thelen et al., 1991, Aderem, 1995). Durch transiente Transfektion von ED-deletierten GMC-Konstrukten, wie sie von Laux et al., 2000 verwendet wurden, könnte weiterhin die Beteiligung von MARCKS, GAP43 und CAP23 an den PMA-vermittelten Effekten überprüft werden.

4.1.2. Stimulation von Makropinozytose und Lamellipodienbildung durch NGF

Die Inkubation mit NGF führte in PC12-Zellen zu einer transienten Lamellipodienbildung, die in videomikroskopischen Experimenten bei GFP-Aktin-transfizierten oder FM1-43 gefärbten lebenden Zellen und durch Fluoreszenzfärbung fixierter Zellen nachgewiesen werden konnte (s. Tafel 2.1., Film 1 und 2). Nach dem Kollabieren der Lamellipodien konnte eine erhöhte Abschnürung von Makropinosomen in videomikroskopischen Experimenten beobachtet werden, die mit einer erhöhten Dextran-Aufnahme korreliert (s. Film 5, Tafel 3.9.). Eine NGF-induzierte Erhöhung der Dextran-Aufnahme wurde auch von Shao et al., 2002 beobachtet.

Die NGF-induzierte Lamellipodienbildung und die Erhöhung der Makropinozytose-Rate konnten durch Cytochalasin D, einen Inhibitor der Aktin-Polymerisation Goddette and Frieden, 1986, inhibiert werden (s. Tafel 2.9., Tafel 3.3. , Tafel 3.10.). Bisindolylmaleimid-I hingegen hatten keinen Einfluß auf die NGF-induzierte Lamellipodienbildung oder die Erhöhung der Dextran-Aufnahme (s. Tafel 2.9. Tafel 3.10.).

Wie könnte die Vermittlung der NGF-induzierten Veränderung des Aktin-Zytoskeletts erfolgen? In PC12-Zellen kann das NGF-Signal durch Aktivierung von trkA oder p75NTR übertragen werden. Lamellipodienbildung, die der Makropinozytose vorrausgeht, konnte durch trkA-aktivierende Antikörper ebenso wie durch NGF ausgelöst werden (s. Tafel 2.6.), während p75NTR-aktivierende Antikörper dazu nicht in der Lage waren (s. Tafel 2.6.). Außerdem konnte in nur trkA-exprimierenden PC12-Zellen (NRA5, Rabizadeh et al., 1993) durch NGF eine lamellipodienartige Veränderung des Aktin-Zytoskeletts induziert werden (s. Tafel 2.7.), welche in nur p75NTR-exprimierenden PC12-Zellen (NNR5, Green et al., 1986) und PCNA-Zellen nicht beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Experimente weisen auf die Funktion von trkA als signalübertragender Rezeptor bei der

NGF-induzierten Lamellipodienbildung hin. Ob *trkA*-Aktivierung auch die Erhöhung der Makropinozytose-Rate induziert ist unbekannt.

Die Bindung von NGF an *trkA* führt neben der Aktivierung der PLC γ , welche die PKC aktiviert (Überblick in Liu and Heckman, 1998), auch zur Stimulation der MAPK Signaltransduktions-Kaskade und der PI3K (Überblick in Kaplan and Miller, 2000, Patapoutian and Reichardt, 2001, siehe auch Abschnitt 1.1.1.).

Für die PKC δ konnte eine NGF-induzierte Aktivierung in PC12-Zellen nachgewiesen werden, welches für die Aktivierung der ERK-Signaltransduktionskaskade und Neuriten-Wachstum erforderlich ist (Corbit et al., 1999). Gegen eine Funktion der PKC δ bei der Vermittlung der Lamellipodienbildung oder Makropinozytose spricht, dass diese NGF-induzierten Effekte nicht durch den PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid-I gehemmt werden konnten (s. Tafel 2.9. und Tafel 3.10, getestet bis 1 μ M). Die halbmaximale inhibitorische Konzentration IC₅₀ von Bisindolylmaleimid-I für die PKC δ beträgt 210nM (Ahmed et al., 1995), was bedeutet, dass die verwendete Konzentration von 1 μ M Bisindolylmaleimid-I eigentlich für eine effektive Hemmung der PKC δ ausreichen sollte.

Im Gegensatz dazu konnte die NGF-induzierte Phosphorylierung von Amphiphysin-I ab 0,2 μ M Bisindolylmaleimid-I leicht inhibiert werden, wobei mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen keine verstärkte Hemmung beobachtet wurde (getestet bis 1 μ M, s. Tafel 1.6.). Das könnte bedeuten, dass die PKC-Isoformen α β δ und ϵ zumindest teilweise zu diesem Effekt beitragen, während sie scheinbar nicht für die NGF-induzierten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts verantwortlich sind.

In anderen Arbeiten wurde die NGF-induzierte Aktivierung der aPKC-Isoformen τ und ζ beschrieben, welches im Zusammenhang mit Differenzierung und Überleben von Nervenzellen stehen könnte (Wooten et al., 2001, Samuels et al., 2001, Mamidipudi and Wooten, 2002, Vandenplas et al., 2002).

Während die Funktion der PKC bei der Vermittlung der NGF-induzierten Effekte auf das Aktin-Zytoskelett fraglich ist, gibt es konkrete Hinweise auf eine Beteiligung der PI3K im Hinblick auf NGF-induzierte Lamellipodienbildung (Posern et al., 2000) sowie Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts in PC12-Zellen (Yasui et al., 2001, Jackson et al., 1996). Ein Einfluß der MAPK wurde im selben Zusammenhang nicht beobachtet (Yasui et al., 2001). In der Literatur finden sich noch weitere Beispiele für Wachstumsfaktor-induzierte PI3K-abhängige Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts (Hill et al., 2001) und Lamellipodienbildung (Wennstrom et al., 1994. Außerdem wurde gezeigt, dass die Aktivierung der PI3K wichtig ist für die Stimulierung von Makropinozytose in

transformierten Fibroblasten (Amyere et al., 2002) und in *Dictyostelium* (Temesvari et al., 2000).

Als ein Effektor der PI3K wurde Rac identifiziert (Yasui et al., 2001, Jackson et al., 1996, Ridley et al., 1992), welches eine wichtige Rolle bei der Lamellipodienbildung (Übersicht in Takenawa and Miki, 2001) und der Makropinozytose in *Dictyostelium* (Seastone et al., 1998) spielt. Es gibt allerdings auch Beispiele in der Literatur, wo die Lamellipodienbildung Rho und cdc42 abhängig ist (Edlund et al., 2002).

Neben trkA ist auch der p75NTR in der Lage über Aktivierung von Rho Signale zum Aktin-Zytoskelett zu leiten (Yamashita et al., 1999). Rho ist ein wichtiger Faktor bei der Bildung von Filopodien (Übersicht in Nakagawa et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Neurotrophin-Bindung an p75NTR zu einer Deaktivierung von Rho führt (Yamashita et al., 1999).

In PC12-Zellen erhöht sich nach einer Minute NGF-Stimulation in PC12-Zellen der Anteil von aktiviertem Rac1 in einer PI3K-abhängigen Weise (Yamaguchi et al., 2001, Yasui et al., 2001.). Parallel dazu sinkt der Anteil von aktivem RhoA (Yamaguchi et al., 2001). Nach zwei Minuten konnte ich eine beginnende Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts in PC12-Zellen beobachten. Dabei wurden die Stressfasern aufgelöst und das F-Aktin an der Plasmamembran konzentriert (s. Tafel 2.1.) Nach etwa fünf Minuten wurde von mir bei 95% der Zellen Lamellipodienbildung beobachtet (s. Tafel 2.1.) Im Gegensatz dazu wurde von Paves et al., 1988 bereits nach zwei Minuten und von Posern et al., 2000 nach drei Minuten NGF-induzierte Lamellipodienbildung in PC12-Zellen beobachtet.

10 Minuten nach NGF-Stimulation ist der Anteil von aktiviertem Rac1 fast wieder auf den Ausgangswert herabgesunken (Yamaguchi et al., 2001). Zu diesem Zeitpunkt war ein Großteil der Lamellipodien bereits kollabiert (s. Tafel 2.1., Paves et al., 1988). Die RhoA-Aktivität hat im Gegensatz dazu erst 30 Minuten nach NGF-Stimulation ihren Ausgangswert erreicht (Yamaguchi et al., 2001).

Durch die Bindung von NGF an p75NTR und trkA wird also gleichzeitig die Filopodienbildung gehemmt und die Lamellipodienbildung induziert.

Welche Funktion hat die NGF-induzierte Lamellipodienbildung und Makropinozytose?

Es ist seit Jahren bekannt, dass Lamellipodien ein wichtiger struktureller Bestandteil des *growth cones* (Wachstums-Kegel) der Axone von Nerven-Zellen sind (Überblick in Gallo and Letourneau, 2000). In den *growth cones* werden die Lamellipodien durch Neurotrophine induziert (Gallo and Pollack, 1997) und sind mit verantwortlich für die

Verlängerung des Axons in Richtung des Neurotrophingradienten (Marsh and Letourneau, 1984, Letourneau et al., 1987). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Proteine der Rho-Familie (Rac, Rho, cdc42) an diesen Prozessen beteiligt sind (Überblick in Luo et al., 1997, Gallo and Letourneau, 1998). Bei NGF-differenzierten PC12-Zellen konnte NGF-induzierte Lamellipodienbildung ebenfalls vorwiegend an den Ausläufern nachgewiesen werden (s. Tafel 2.3.). Es ist also möglich, dass die NGF-induzierte Lamellipodienbildung in undifferenzierten PC12-Zellen eine Reaktion darstellt, die die Vorgänge an den *growth cones* differenzierter Nervenzellen widerspiegelt.

Wenn die Lamellipodienbildung der physiologisch relevante Prozess ist, wieso findet dann auch Makropinozytose statt?

In einer Arbeit von Manes et al., 1999 wurde gezeigt, dass die Lamellipodien-Membran in sich bewegenden Neutrophilen eine andere Zusammensetzung hat, als die übrige Plasmamembran. Deswegen spekuliert man, dass eine Funktion der Makropinozytose die eines intrazellulären Speichers für Lamellipodien-Membran während Bewegungsprozessen sein könnte.

Diese Erklärung scheint aber im Hinblick auf die NGF-induzierte Lamellipodienbildung in PC12-Zellen als nicht sehr wahrscheinlich, da in den videomikroskopischen Experimenten und an fixierten Zellen gezeigt wurde, dass die Lamellipodien nur transient gebildet wurden (s. Tafel 2.1., Film 1 und 2). Mit dem Kollabieren der Lamellipodien wurde eine erhöhte Makropinozytose-Rate induziert, die bis etwa eine Stunde nach NGF-Exposition anhielt (s. Film 5, Abschnitt 3.5.6.3., 3.5.6.6., 3.5.6.7.). Die Abschnürung der Makropinosomen fand dabei hauptsächlich an den F-Aktin-angereicherten Ausläufern statt, die nach der NGF-induzierten Lamellipodienbildung zurück blieben (s. Film 5, Film 6).

Da die Zelle durch Makropinozytose die Möglichkeit hat, die extrazelluläre Umgebung z.B. auf den Neurotrophin-Gehalt zu analysieren, wäre es denkbar, dass Makropinozytose hilft, die Richtung des axonalen Wachstums festzulegen. Es wäre auch möglich, dass die Zelle nach Neurotrophin-Bindung möglichst viel NGF aus der extrazellulären Flüssigkeit entfernt, um konkurrierenden Neuronen den Kontakt zu dem Überlebens-Faktor zu verwehren.

4.1.3. Wirkung von NGF auf die Endozytose von PC12-Zellen

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die NGF-induzierte Phosphorylierung einiger für die Clathrin-vermittelten Endozytose essentiellen Proteine. Es lag daher nahe zu fragen, ob NGF Einfluß auf die Endozytose hat.

Zur Beantwortung dieser Frage habe ich ein etabliertes Testsystem zum Nachweis der Clathrin-vermittelten Endozytose eingesetzt: die rezeptorvermittelte Endozytose von Transferrin. Bei NGF- und PMA-stimulierten Zellen war in Transferrin-Aufnahme-Experimenten nach fünf Minuten Inkubation bei 37°C ein erhöhter Anteil zellulär gebundenen Transferrins messbar, als bei unstimulierten Zellen (s. Tafel 1.2., Tafel 1.7., Tafel 1.8.). Da das Recycling des Transferrins nach Stimulation mit PMA oder NGF im Vergleich zur Kontrolle nicht verzögert wurde, ist anzunehmen, dass die Ursache für den erhöhten Anteil zellulär gebundenen Transferrins nach fünf Minuten Inkubation in einer erhöhten Aufnahme liegt.

Das unveränderte Recycling des Transferrins ist ebenfalls ein wichtiges Argument dafür, dass es sich bei der Transferrin-Internalisierung um rezeptorvermittelte Aufnahme handelt. Ein weiterer Hinweis auf rezeptorvermittelte Endozytose ist die Konzentrationsabhängigkeit der Transferrin-Aufnahme (s. Abschnitt 3.1.2., Tafel 1.3.). Dennoch besteht Grund zu der Annahme, dass die rezeptorvermittelte Endozytose von Transferrin nach NGF-oder PMA-Stimulation in PC12-Zellen nicht durch Clathrin-vermittelte Endozytose, sondern durch Makropinozytose erfolgte. Dafür sprechen folgende Argumente:

- NGF und PMA erhöhten in videomikroskopischen Experimenten deutlich die Abschnürung und Internalisierung von Vesikeln mit einem Durchmesser von etwa 0,5µm (s. Abschnitt 3.3.1.).
- NGF und PMA erhöhten die Dextran-Aufnahme (s. Tafel 3.9., Beattie et al., 2000, Shao et al., 2002).
- NGF und PMA erhöhten die Transferrin-Aufnahme (s. Tafel 1.7., Tafel 1.8., Beattie et al., 2000).
- Bisindolylmalimid-I inhibierte die PMA-induzierte Lamellipodienbildung und die Erhöhung der Dextran- und Transferrin-Aufnahme (s. Tafel 1.7., Tafel 2.9., Tafel 3.10.).
- Cytochalasin D, ein Inhibitor der Aktin-Polymerisation, hemmte die NGF-induzierte Lamellipodienbildung (s. Tafel 2.9.), die NGF-induzierte Abschnürung und Internalisierung von Makropinosomen GFP-transfizierter lebender Zellen in

videomikroskopischen Experimenten (s. Tafel 3.3.) sowie die Erhöhung der Dextran-Aufnahme (s. Abbildung 3.3., Tafel 3.10.).

- Nach NGF- oder PMA-Stimulation konnte vermehrt Kolokalisation von Dextran und Transferrin beobachtet werden (s. Tafel 3.11.).
- Die Erhöhung der Transferrin-Aufnahme korrelierte zeitlich mit dem Kollabieren der NGF-induzierten Lamellipodien, welches mit der Erhöhung der Makropinozytose-Rate einher geht (s. Tafel 2.17., Film 5).
- Die Erhöhung der Transferrin- und Dextran-Aufnahme ließ jeweils etwa 50 Minuten nach NGF-Stimulation nach, welches mit einem reduzierten Auftreten von F-Aktin-angereicherten Ausläufern korreliert (s. Abschnitt 3.5.6.).

Eine NGF-induzierte Erhöhung der Dextran- und Transferrin-Internalisierung in PC12-Zellen wurde ebenfalls von Beattie et al., 2000 beobachtet. Zusammen mit einer erhöhten Konzentration von Clathrin an der Plasmamembran wurde dieser Effekt von den Autoren als eine Stimulierung der Clathrin-vermittelten Endozytose durch NGF gedeutet. Effekte von NGF auf das Aktin-Zytoskelett und die Makropinozytose wurden in dieser Arbeit nicht beschrieben.

Die Autoren wählten zur Untersuchung von rezeptorvermittelter Endozytose die kontinuierliche I^{125} -Transferrin-Aufnahme. Dieser Ansatz erlaubt jedoch keine Differenzierung zwischen Endozytose-Formen, sondern stellt die Summe aller Endozytose-Vorgänge in dem untersuchten Zeitraum dar. Zudem wurden von Beattie et al., 2000 weder Konkurrenzexperimente durchgeführt, um den Anteil rezeptorgebundenen Transferrins zu bestimmen, noch das Recycling des Transferrins untersucht.

Der zweite Punkt auf den sich Beatties Interpretation stützt, ist die NGF-induzierte Anreicherung von Clathrin an der Plasmamembran. Diese Beobachtung konnte von uns nicht reproduziert werden (R. Bauerfeind, unveröffentlichte Ergebnisse).

Auf der Basis meiner eigenen Experimente würde ich daher argumentieren, dass die Interpretation von Beattie et al., 2000 voreilig war. Meine Ergebnisse sprechen eher dafür, dass durch NGF Makropinozytose induziert wurde, welches zu einer erhöhten Endozytose von rezeptorgebundenem Transferrin führte. Ob darüber hinaus auch Clathrin-vermittelte Prozesse beeinflußt werden, kann derzeit nicht beantwortet werden.

Durch NGF-Stimulation konnte in elektronmikroskopischen Untersuchungen eine deutlich erhöhte Anzahl von Vesikeln mit einem Durchmesser von 2-3 μ m in PC12-Zellen nachgewiesen werden (Loos and Bauerfeind, 2002). Aufgrund der Größe könnte es sich

dabei um Makropinosomen handeln. An diesen NGF-induzierten Vesikeln konnten elektronendichte Strukturen nachgewiesen werden, bei denen es sich um Clathrin-behüllte Gruben handeln könnte (Loos and Bauerfeind, 2002). Es wäre denkbar, dass an den Transferrin-Rezeptor gebundenes Transferrin durch Makropinozytose endozytiert und dann von den Makropinosomen über Clathrin-behüllte Vesikel in die frühen Endosomen sortiert wird, während *fluid-phase*-Marker wie Dextran weitgehend in Makropinosomen verbleiben. Von den Endosomen wäre ein normales Recycling des Transferrin-Rezeptor-Komplexes möglich. Eine erhöhte Aufnahme und die daraus resultierende erhöhte Anzahl an Transferrin-Rezeptor-Komplexen muss dabei nicht zwangsläufig eine erhöhte Geschwindigkeit von Vesikelabschnürung und zellulären Transport bedingen, die für das Recycling des Transferrins wichtig sind.

Um zu untersuchen, ob Transferrin in Gegenwart von NGF über Makropinozytose oder Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen wird, könnte man Cytochalsin D oder andere Inhibitoren der Aktin-Polymerisation einsetzen, die Makropinozytose inhibieren. Allerdings hat das Aktin-Zytoskelett auch einen Einfluß auf die Clathrin-vermittelte Endozytose (Überblick in Qualmann et al., 2000), welches bei der experimentellen Konzeption und der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müßte.

Es gibt Hinweise darauf, dass Makropinozytose die Aktivierung von Ras ([Bar-Sagi, 1986 #4444]), PI3K (Amyere et al., 2002, Temesvari et al., 2000) und Rac (Seastone et al., 1998) erfordert. Man könnte daher versuchen durch Überexpression von dominant-negativen Rac die NGF-induzierte Makropinozytose zu inhibieren und unter diesen Bedingungen die Transferrin-Aufnahme zu messen.

Während der Etablierung der videomikroskopischen Experimente zeigte sich eine Temperatur-Abhängigkeit der NGF-induzierten Lamellipodienbildung, die bei 24°C nicht mehr stattfand (Daten nicht gezeigt). Wenn nachgewiesen werden kann, dass durch die Inhibition der Lamellipodienbildung auch die Erhöhung der Makropinozytose-Rate inhibiert wird, könnte man den Einfluß von NGF auf die Transferrin-Aufnahme bei 24°C untersuchen, da die Clathrin-vermittelte Endozytose bei dieser Temperatur wahrscheinlich verlangsamt ist, aber noch stattfindet.

Man könnte auch durch Überexpression von Eps15 oder einer mutierten μ -Untereinheit des AP-2-Komplexes die Clathrin-vermittelte Endozytose hemmen und untersuchen, welchen Einfluß dieses auf die NGF-induzierte Erhöhung der Transferrin-Aufnahme hat.

4.1.4. Mögliche Zusammenhänge zwischen Clathrin-vermittelter Endozytose und Aktin-vermittelten Prozessen

Meine Ergebnisse haben gezeigt, dass NGF die Bildung von Lamellipodien induziert und Makropinozytose stimuliert. Mit einer ähnlichen Kinetik werden Amphiphysin-I und -II, Synaptojanin und Epsin, die an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt sind, durch NGF phosphoryliert (Ludewig et al., 2001). Daher stellt sich die Frage, ob zwischen den Prozessen ein Zusammenhang besteht.

Eine mögliche Verbindung zwischen Clathrin-vermittelter Endozytose und Aktin-basierender Prozesse wie Lamellipodienbildung und Makropinozytose stellen Phosphoinositole wie PI(4,5)P₂ dar. PI(4,5)P₂ ist essentiell für die Bildung Clathrin-behüllter Gruben, da es zur Rekrutierung von AP180 und Epsin an die Plasmamembran dient (Ford et al., 2001, Itoh et al., 2001). *Coat*-Proteine wie Epsin (Itoh et al., 2001), CALM (Ford et al., 2001), AP-2 und Dynamin (Sever et al., 1999) binden an PI(4,5)P₂. Hohe Konzentrationen an PI(4,5)P₂, wie sie z.B. durch die NGF- oder PMA-induzierte Aktivierung der PKC δ hervorgerufen werden könnten (vgl. Abschnitt 4.1.1. und 4.1.2.), begünstigen die Clathrin-vermittelte Endozytose (Arneson et al., 1999, Jost et al., 1998, Martin, 1998, Corvera et al., 1999). PI(4,5)P₂ ist ebenfalls ein Substrat von Synaptojanin, einem Protein, das für das *uncoating* zuständig ist (Cremona et al., 1999). In der Modelvorstellung reduziert Synaptojanin die Konzentration von PI(4,5)P₂ durch Dephosphorylierung, wodurch die Bindungen von AP180, Epsin, AP-2 (Gaidarov et al., 1999?), Clathrin und α -Adaptin (*in vitro*, Cremona et al., 1999) an die Plasmamembran geschwächt werden, der *coat* destabilisiert wird und sich ablöst.

Die Zugänglichkeit bzw. die erhöhte Konzentration an PI(4,5)P₂ in der Plasmamembran führt ebenfalls zu verstärkter Aktin-Polymerisation (Hartwig et al., 1995, Welch et al., 1997, Ma et al., 1998, Raucher and Sheetz, 2000). Deshalb ist eine Konkurrenz zwischen Aktin-bindenden Proteinen und *coat*-Proteinen um die Bindung an PI(4,5)P₂ denkbar.

Extrazelluläre Stimuli können zu einem Vorteil für Aktin-bindene Proteine führen, da gezeigt wurde, dass die Aktivierung von Rac und Rho die Clathrin-vermittelte Endozytose von Transferrin und dem EGF-Rezeptor hemmt (Lamaze et al., 1996). Nach Aktivierung wird Rac an den Lamellipodiensaum (Malecz et al., 2000) bzw. in F-Aktin-angereicherte Ausläufer (Yasui et al., 2001) rekrutiert. Eine Lokalisation von Synaptojanin-1 konnte ebenfalls während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung in PC12-Zellen beobachtet werden (s. Tafel 2.14.). Malecz et al., 2000 konnte außerdem zeigen, dass aktives Rac für die Rekrutierung von Synaptojanin-2 zum Lamellipodiensaum von HeLa-Zellen

verantwortlich ist.

Synaptojanin könnte in dieser Situation ein *uncoating* von Clathrin-behüllten Gruben an der Plasmamembran fördern und so die Clathrin-vermittelte Endozytose hemmen.

Allerdings wurde bei einer Untersuchung der NGF-induzierten Rac1-Aktivierung in PC12-Zellen keine deutliche Veränderung der PI(4,5)P₂ Konzentration gemessen (Jackson et al., 1996). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Rac die PI(4,5)P₂ Synthese erhöht (Hartwig et al., 1995).

Die Makropinozytose, als Aktin-basierter Prozess, profitiert von einer erhöhten Aktin-Motilität. Es konnte gezeigt werden, dass der Abschnürungsprozess von Makropinosomen durch erhöhte Aktin-Polymerisation erhöht werden kann (Rozelle et al., 2000, Merrifield et al., 1999).

Es wäre also denkbar, dass die Konzentration von PI(4,5)P₂ durch PMA-Stimulation über die GAP43-artigen Proteine und nach NGF-Stimulation durch Rekrutierung von Synaptojanin zur Plasmamembran reguliert werden könnte. Ob durch NGF- und PMA-Stimulation in PC12-Zellen der Endozytose-Modus von Clathrin-vermittelter Endozytose zu Gunsten von Makropinozytose verschoben wird, muss in weiteren Experimenten überprüft werden.

Was bewirkt die NGF-induzierte Phosphorylierung von Amphiphysin I und II, Epsin und Synaptojanin? Es ist bekannt, dass viele essentielle Wechselwirkungen zwischen den an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligten Proteinen *in vitro* durch Phosphorylierung inhibiert werden können (Überblick in Cousin et al., 2001, Slepnev and De Camilli, 2000). Es wäre auch denkbar, dass eine Phosphorylierung in den basischen Lipid- oder PI(4,5)P₂-Bindungstaschen von Amphiphysin bzw. Epsin und Synaptojanin die Bindung an die Plasmamembran schwächen und somit die Clathrin-vermittelte Endozytose hemmen könnte.

Für viele Proteine, die an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt sind, können direkte Verbindungen zum Aktin-Zytoskelett geknüpft werden. Für Amphiphysin (Ganderisi et al. 1999, Wechsler-Reya et al., 1997, Gold et al., 2000, Butler et al., 1997, Mundigl et al., 1996) bzw. das Hefe-Homolog RVS176 (Munn et al., 1995) und die Epsin-Homologe Ent1 und Ent2 (Wendland et al., 1999) konnte eine regulatorische Rolle bei Aktin-vermittelten Prozessen nachgewiesen werden. Dasselbe gilt für Auxillin 2 (GAK), welches indirekt über die Wechselwirkungen mit den Epsin-Homologen Ent1 und 2 und dem Eps15-Homolog PAN1 wirkt (Cope et al., 1999, Wendland und Cope 1999, Zeng and

Cai, 1999, Engqvist-Goldstein et al., 1999, Verlier et al. 1998) und möglicherweise auch für Synaptojanin, dessen aminoternale Domäne identisch ist mit dem Hefe-Protein Sac1, welches im Zusammenhang mit der Regulation des Aktinzytosketts diskutiert wird (Foti, 2001, Hughes et al., 2000, Kearns et al., 1997).

Für Dynamin (Witke et al., 1998, McNiven et al., 2000, Ochoa et al., 2000) und Syndapin (Rohatgi et al., 1999, Ritter et al., 1999, Qualmann and Kelly, 2000) wurden darüber hinaus direkte Wechselwirkungen mit Aktin bzw. Aktin-bindenden Proteinen nachgewiesen. Außerdem wurde für Syndapin und Dynamin eine Lokalisation in Lamellipodien beobachtet (McNiven et al., 2000, Qualmann and Kelly, 2000). Eine Lokalisation von Dynamin-I am Saum von NGF-induzierten Lamellipodien in PC12-Zellen konnte hingegen nicht eindeutig nachgewiesen werden (s. Tafel 2.15.).

4.2. Endozytose von NGF und der NGF-Rezeptoren

In dieser Arbeit wurde außerdem die Endozytose von fluoreszenzmarkierten NGF sowie die Endozytose der NGF-Rezeptoren trkA und p75NTR untersucht. In Abschnitt 4.2.1 werden die Ergebnisse zur Internalisierung des fluoreszenzmarkierten NGFs sowie der Aufnahme der trkA-Antikörper und in Abschnitt 4.2.2. die Ergebnisse zur Internalisierung von p75NTR diskutiert. Abschnitt 4.2.3. beschäftigt sich mit der Frage, ob die NGF-induzierte Makropinozytose zur Endozytose von des NGF-Rezeptor-Komplexes beitragen könnte.

4.2.1. Endozytose von NGF und trkA

Die Endozytose von NGF in PC12-Zellen wurde durch Fluoreszenzmarkierung und Verwendung von Antikörpern gegen NGF untersucht. Während der Nachweis von endozytiertem NGF mit dem verwendeten Antikörper nicht möglich war (s. Abschnitt 4.3.), konnte die Internalisierung von biologisch aktivem Alexa488-markierten NGF in NGF-differenzierten PC12-Zellen nachgewiesen werden (s. Tafel 4.9.). Nach 30 Minuten Internalisierung von fluoreszenzmarkierten NGF in 4°C-Bindungsexperimenten war das NGF-Signal hauptsächlich diffus, während nach 90 Minuten ein Großteil des endozytierten NGFs in Form von Punkten im Zytosol konzentriert war.

Die Internalisierung von NGF in PC12-Zellen ist bisher vorwiegend biochemisch untersucht worden. In den wenigen vergleichbaren Experimenten wurde die kontinuierliche Endozytose von NGF untersucht oder stabil trkA-transfizierte PC12-Zellen verwendet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind vergleichbar mit der von mir beobachteten Kinetik der Internalisierung von Alexa488-markiertem NGF:

In Experimenten mit Tetramethylrhodamin-markiertem NGF konnte nach einer Stunde kontinuierlicher Aufnahme von 130ng/ml fluorochromierten mNGFs das NGF-Signal in Form von Punkten im Zytosol von PC12-Zellen nachgewiesen werden (Levi et al., 1980). In einer anderen Arbeit wurde internalisiertes NGF durch polyklonale NGF-Antikörper nachgewiesen (Marchisio et al., 1980). Hier wurde nach einer Stunde kontinuierlicher Aufnahme von 50ng/ml 2,5S NGF (entspricht β -NGF) internalisiertes NGF in Form von Punkten vor einem diffusen Hintergrund im Zytosol von PC12-Zellen nachgewiesen.

In Immunfluoreszenz-Experimenten mit stabil trkA-transfizierten PC12-Zellen ließ sich nach fünf Minuten kontinuierlicher Zugabe bei 37°C Myc-NGF in Form eines vorwiegend diffusen zellulären Signals mit Myc-Antikörpern nachweisen. Nach 60 Minuten war das NGF-Signal dann hauptsächlich in zytoplasmatischen Punkten konzentriert (Shao et al., 2002).

Untersuchungen mit I^{125} -markiertem NGF zeigten, dass die Oberflächenbindung und Internalisierung innerhalb von wenigen Minuten nach NGF-Zugabe stattfindet (Bernd und Green, 1984, Zapf-Colby and Olefsky, 1998, Grimes et al., 1996). In PC12-Zellen war nach 60 Minuten etwa 75% des gebundenen NGFs internalisiert (Bernd and Greene, 1984), während in trkA-transfizierten CHO-Zellen (exprimieren kein p75NTR) nach fünf Minuten bereits die Hälfte des I^{125} -NGFs endozytiert wurde (Zapf-Colby and Olefsky, 1998).

In Gegensatz dazu wurde in einer Arbeit von Layer and Shooter, 1983 bei Verwendung von PC12-Zellen in Suspension eine deutlich langsamere Internalisierung von I^{125} -NGF gemessen. Hier waren nach 2,5 Stunden nur etwa 10-15% des gebundenen NGFs aufgenommen worden.

Die Endozytose von trkA wurde durch trkA-aktivierende Antikörper (anit-trkA, Clary et al., 1994, vgl. Abschnitt 3.5.1.) gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors untersucht. Dabei konnte internalisierter anti-trkA erst nach 20 Minuten kontinuierlicher Aufnahme bei 37°C nachgewiesen werden (s. Tafel 5.3.). Anti-trkA kolokalisierte in diesen Experimenten mit gleichzeitig zugegebenen Dextran (s. Tafel 5.4). Die Anwesenheit von

NGF führte zu einer Erhöhung der Dextran-Aufnahme, während die Internalisierung von anti-trkA unverändert blieb (s. Tafel 5.4.).

Die Kollokalisierung des internalisierten Antikörpers mit Dextran könnte auf eine unspezifische Aufnahme von gelösten Antikörpern hindeuten, allerdings kann auch rezeptorvermittelte Aufnahme nicht ausgeschlossen werden. Da dieser trkA-Antikörper ebenso wie NGF in der Lage ist, die Phosphorylierung von Amphiphysin-I (s. Tafel 5.1.), die Lamellipodienbildung (s. Tafel 2.6.) und Differenzierung von PC12-Zellen (s. Tafel 5.2.) auszulösen, muss zumindest ein Teil der Antikörper an den Rezeptor binden. Ob diese Bindung auch die Endozytose des Antikörper-trkA-Komplexes vermitteln kann ist unklar.

Die Endozytose von Dextran war nach Zugabe von NGF im Vergleich zur Inkubation mit anti-trkA erhöht, welches vermutlich im Zusammenhang mit der NGF-induzierten Erhöhung der Makropinozytose steht (s. Abschnitt 3.3.). Der trkA-Antikörper induziert in PC12-Zellen Lamellipodienbildung (s. Tafel 2.6.), ob er auch Makropinozytose stimuliert, ist unbekannt. Falls anti-trkA ebenso wie NGF eine Erhöhung der Makropinozytose induziert, könnte die in diesem Experimenten eingesetzte anti-trkA-Konzentration dafür zu niedrig gewesen sein. Es ist auch denkbar, dass die Aktivierung von trkA zur Induktion von Makropinozytose nicht ausreichend ist, welches auf eine Beteiligung von p75NTR hindeuten würde. In beiden Fällen würde NGF zu der beobachteten Erhöhung der Dextran-Aufnahme führen.

Wenn der anti-trkA-Antikörper unspezifisch aufgenommen wurde, so sollte durch die NGF-induzierte Erhöhung der Makropinozytose-Rate neben der Erhöhung der Dextran-TMR-Aufnahme auch eine Steigerung der anti-trkA-Aufnahme nachweisbar sein, die aber nicht beobachtet wurde (s. Tafel 5.4.). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Antikörper rezeptorvermittelt aufgenommen wurde, welches allerdings in weiteren Experimenten bestätigt werden müsste. Da der Nachweis der Antikörper-Internalisierung über Immunfluoreszenzfärbung in 4°C-Bindungsexperimenten nicht sensitiv genug ist, könnte man versuchen durch biochemische Analysen die Internalisierung des Antikörpers zu verfolgen. Dazu könnten in Antikörper-Internalisierungsexperimenten zu verschiedenen Zeitpunkten die Zellen aufgeschlossen werden und der Zellextrakt durch schrittweise Zentrifugationen fraktioniert werden. Nach Immunpräzipitation von trkA z.B. mit dem monoklonalen anti-trk Antikörper, der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist, könnte an trkA gebundener internalisierter anti-trkA im Westernblot nachgewiesen werden. Parallel

dazu könnte man die Antikörper enthaltenden Kompartimente durch Verwendung verschiedener Antikörper gegen zelluläre Marker im Westernblot charakterisieren.

Da aufgrund der relativ niedrigen Konzentration von trkA-Molekülen an der Oberfläche von PC12 Zellen (s. Tafel 5.5., Tafel 5.6., Grimes et al., 1996, Clary et al., 1994, Meakin and Shooter, 1992) der Nachweis von Endozytose-Vorgängen in Immunfluoreszenz-Experimenten schwierig ist, wurden von anderen Gruppe PC12-Zellen verwendet, die trkA überexprimieren. In diesen Zellen konnte die Internalisierung von tyrosinphosphorylierten trkA nach 10 Minuten Inkubation mit NGF nachgewiesen werden (Shao et al., 2002). In Experimenten mit CFP-trkA-transfizierten PC12-Zellen konnte nach NGF-Stimulation der Transport von trkA-haltigen Vesikeln (0,5 bis 1,5µm Durchmesser) beobachtet werden (Hirashima et al. 2000). Die Geschwindigkeit von retrograden Vesikeln war dabei mit 0,72mm/h vergleichbar mit den Geschwindigkeiten, die für den retrograden Transport von NGF in Neuronen ermittelt wurden (Überblick in Reynolds et al., 2000).

In biochemischen Experimenten konnte die NGF-induzierte Internalisierung von trkA mit Hilfe von radioaktiv markiertem trkA in PC12-Zellen gezeigt werden. Vergleichbar zu den Daten zur NGF-Endozytose nimmt die Konzentration von trkA an der Plasmamembran von PC12-Zellen innerhalb von 5 Minuten nach NGF-Bindung um über 50% ab (Jullien et al., 2002). In einer anderen Arbeit wurde nach 10 Minuten Inkubation mit I125-NGF an der Oberfläche von PC12-Zellen eine um 35% erhöhte Internalisierung von trkA gemessen. Nach 20 Minuten war die Internalisierung um 65% gegenüber nicht NGF-behandelten PC12-Zellen erhöht (Grimes et al., 1996).

Neben der NGF-induzierten Endozytose von trkA konnte in PC12-Zellen und in PC12-Zellen, die stabil mit trkA-transfiziert waren, eine NGF-unabhängige Endozytose des Rezeptors nachgewiesen werden (Grimes et al., 1996, Jullien et al., 2002).

Die vornehmlich intrazelluläre Lokalisation von trkA (s. Tafel 5.5.) und eine kontinuierliche Internalisierung des Rezeptors könnten auf einen Recycling-Mechanismus ähnlich wie beim Transferrin-Rezeptor (Richardson and Ponka, 1997) hindeuten. Tatsächlich wurde gezeigt, dass in PC12-Zellen die Menge von oberflächlich an trkA-gebundenem NGF nach 10 Minuten deutlich abnimmt, während nach 30 Minuten wieder ein leichter Anstieg von trkA-gebundenem NGF an der Oberfläche gemessen wurde (Grimes et al., 1996). Bei trkA-transfizierten CHO-Zellen wurde ebenfalls Recycling von internalisiertem I¹²⁵-markierten NGF aus zellulären Kompartimenten zurück zur Plasmamembran beobachtet (Zapf-Colby and Olefsky, 1998).

4.2.2. Endozytose von p75NTR

Über die Endozytose von p75NTR ist bisher nur wenig bekannt. In mehreren Arbeiten wurde der retrograde Transport von p75NTR in Neuronen dokumentiert (von Bartheld et al., 1996, Kramer et al., 1999, Curtis et al., 1995, Johnson et al., 1987, Hartig et al., 1998, Yan et al., 1993) Je nach Zelltyp wurde dabei entweder eine Beteiligung am Transport von NGF beobachtet (Yan et al., 1993, Kramer et al., 1999) oder weitgehend ausgeschlossen (von Bartheld et al., 1996, Curtis et al., 1995). In p75NTR-transfizierten Sf9-Zellen wurde die Bindung von NGF an p75NTR nachgewiesen, eine Internalisierung von NGF fand aber in diesen Zellen nicht statt (Gargano et al., 1997).

Für sympathische Neuronen und die in dieser Arbeit verwendeten PC12-Zellen wurde eine trkA-abhängige Internalisierung gezeigt (Grimes et al., 1996, Kahle et al., 1994, Tsui-Pierchala and Ginty, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde in *pulse-chase*- und 4°C-Bindungsexperimenten eine Internalisierung von p75NTR-aktivierenden (9651, Brann et al., 1999) bzw. nicht aktivierenden Antikörpern (MC192, Hauser et al., 1983), gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne von p75NTR gezeigt (Tafel 5.9. und Tafel 5.10., Daten für 4°C-Bindungsexperimente nicht gezeigt).

Durch die Aufnahme von MC192-Antikörpern, die mit der Aufnahme von 9651-Antikörpern vergleichbar war, konnte eine konstitutive Endozytose des p75NTR in PC12-Zellen nachgewiesen werden. In *pulse-chase*-Experimenten wurde die Aufnahme des Antikörpers charakterisiert. Dabei kolokalisierte internalisierter p75NTR nach 25 und 55 Minuten *chase* nahezu vollständig mit zytoplasmatischen Dextran-positiven Punkten (s. Tafel 5.27. Tafel 5.28.). Ein Viertel der p75NTR-positiven Punkte kolokalisierte zu den selben Zeitpunkten mit EEA1, während eine Kolokalisation mit Transferrin oder ci-M6PR-positiven Kompartimenten nach 25 Minuten *chase* zu etwa 10% beobachtet wurde (s. Abschnitt 3.5.6.3. und 3.5.6.5.). Nach 55 Minuten *chase* war der Anteil der Kolokalisationen von internalisiertem MC192 mit M6PR um die Hälfte reduziert, während eine Kolokalisation mit Transferrin nur vereinzelt auftrat.

Obwohl in verschiedenen biochemischen Untersuchungen *in vitro* die Möglichkeit der Assoziation von p75NTR mit Caveolae oder TX-100-unlöslichen Membranfraktionen gezeigt wurde (Barker and Shooter, 1994, [Bilderback, 1997 #3238, Wu et al., 1997, Huang et al., 1999), konnte von mir zu keinem untersuchten Zeitpunkt Kolokalisation von internalisiertem p75NTR mit Caveolin-1 nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.5.6.2.). Die

Ursache dafür könnte in den von mir gewählten experimentellen Bedingungen z.B. Fixierung, Permeabilisierung oder den untersuchten Zeitpunkten liegen. Eine andere Möglichkeit ist, dass die biochemischen Experimente, bei denen es sich hauptsächlich um Migrations-Studien von Membranbestandteilen im Gradienten bzw. um Immunpräzipitations-Experimente handelt, die die *in vivo*-Situation nicht wiedergeben. Zusammengefasst lassen diese Beobachtungen vermuten, dass es sich bei der konstitutiven Internalisierung von p75NTR um eine Degradierung des Rezeptors über Stationen im frühen Endosom und im Lysosom handelt. Ein Recycling des Rezeptors kann zunächst nicht ausgeschlossen werden. Weitere Internalisierungsexperimente unter Verwendung von zellulären Markern z.B. LysoTracker zum Nachweis von Lysosomen oder Rab4 und Rab11 zur näheren Bestimmung von frühen und recycling Endosomen, sowie die Untersuchung des Zeitraumes zwischen fünf und 30 Minuten nach Antikörper-Zugabe sind für eine genauere Interpretation notwendig.

In Gegenwart von NGF war die Endozytose von p75NTR-aktivierenden (9651, Brann et al., 1999) und nicht rezeptoraktivierenden Antikörpern (MC192, Hauser et al., 1983) zu jedem untersuchten Zeitpunkt deutlich erhöht (s. Tafel 5.9. und Tafel 5.10.). Bei der Untersuchung der Aufnahme von MC192-Antikörpern in *pulse-chase*-Experimenten war die Kolokalisation von internalisiertem p75NTR nach 25 und 55 Minuten *chase* mit EEA1-positiven Vesikeln im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen erhöht (s. Tafel 5.20.), wobei nach 55 Minuten *chase* die Kolokalisation hauptsächlich bei kleineren Vesikeln auftrat (s. Tafel 5.21.). Im Gegensatz zu der erhöhten Kolokalisation mit EEA1-positiven Kompartimenten war durch NGF-Stimulation die Kolokalisation von aufgenommenen MC192-Antikörpern mit Dextran-positiven Punkten nach 25 und 55 Minuten *chase* im Vergleich zur Kontrolle um die Hälfte reduziert (s. Tafel 5.27., Tafel 5.28.). Nach fünf Minuten *pulse* konnte bei einem Teil der zu diesem Zeitpunkt bereits sichtbaren p75NTR-positiven Punkte eine Kolokalisation mit Dextran nachgewiesen werden, die bei unstimulierten Zellen nicht beobachtet wurde (s. Tafel 5.26.). Das könnte ein Hinweis auf die Aufnahme des Antikörpers durch NGF-induzierte Makropinozytose sein.

Keinen Einfluß hatte NGF zu den untersuchten Zeitpunkten auf die Kolokalisation mit Transferrin (s. Tafel 5.16, Tafel 5.17. Tafel 5.18) und ci-M6PR (s. Tafel 5.23, Tafel 5.24., Tafel 5.25.).

Durch NGF-Inkubation wurde eine verstärkte Caveolin-1-Färbung in der Nähe des Zellkerns nachgewiesen (s. Tafel 5.14.), die möglicherweise in Zusammenhang mit der Internalisierung von NGF stehen könnte. Eine Kolokalisation von internalisierten MC192-

Antikörpern und Caveolin-1 wurde unter diesen Bedingungen nicht beobachtet (s. Tafel 5.14., Tafel 5.15.).

Die NGF-Stimulation führt demnach zu einer verstärkten Lokalisation von endozytierten p75NTR in EEA1-positiven Kompartimenten. Um den Effekt auf die reduzierte Kolokalisation mit den Dextran-positiven Punkten interpretieren zu können, müsste zuvor die Lokalisation von Dextran unter den speziellen Versuchsbedingungen näher charakterisiert werden.

Was könnte die Ursache für die deutliche NGF-induzierte Erhöhung der p75NTR-Aufnahme sein? Durch NGF-Stimulation konnte zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine Konzentration von 9651- bzw. MC192-Antikörpern in bestimmten Regionen der Zellen beobachtet werden (s. Tafel 5.9. und Tafel 5.10.). Dabei waren die beobachteten Aggregate bei Verwendung des 9651-Antikörpers deutlich schwächer ausgeprägt, als bei Verwendung des MC192-Antikörpers, welches durch eine Kompetition des 9651-Antikörpers durch NGF zustande kommen könnte. In Kolokalisationsexperimenten mit dem MC192-Antikörper zeigte sich, dass diese Aggregate häufig mit F-Aktin-angereicherten Ausläufern oder F-Aktin-angereicherten Regionen der Zellen kolokalisierte (s. Tafel 5.29., Tafel 5.30. und Tafel 5.31.). Das könnte ein Hinweis auf eine erhöhte Aufnahme des Rezeptors durch die NGF-induzierte Makropinozytose sein. Da es in diesen Bereichen allerdings keine erhöhte Anzahl von Dextran-positiven Vesikeln gibt (s. Tafel 5.26, 5.27., 5.28.), könnte es sein, dass sich die Antikörper-Aggregate an der Oberfläche der Zellen befinden, welches durch konfokale Mikroskopie überprüft werden könnte. Die Stimulierung von Lamellipodien durch Anti-trkA (s. Tafel 2.6.) weist auf eine Beteiligung von trkA an der auf die Lamellipodienbildung folgenden Makropinozytose hin, wobei eine Beteiligung von p75NTR nicht ausgeschlossen werden kann. Demnach könnten die beobachteten Effekte durch die Aktivierung von trkA zustande kommen. Eine möglicherweise ebenfalls nötige Aktivierung von p75NTR durch NGF ist in den Antikörper-Aufnahme-Experimenten nicht auszuschließen, da keiner der beiden verwendeten Antikörper zwangsläufig die Aktivierung des p75NTR durch NGF stören muss. Im Falle des polyklonalen p75NTR-aktivierenden Antikörpers (9651) konnte durch Kompetitionsexperimente mit NGF bei 4°C nur eine Reduktion der Antikörper-Bindung bis maximal 50% erreicht werden (s. Abschnitt 3.5.3.). Das bedeutet, dass die Hälfte der Antikörper Epitope außerhalb der NGF-Bindungsstelle erkennen. Diese Antikörper würden eine Markierung des Rezeptors bei gleichzeitiger NGF-Bindung ermöglichen.

Das Epitop des monoklonalen, p75NTR nicht aktivierenden MC192-Antikörpers liegt außerhalb der NGF-Bindungsregion und erlaubt deshalb eine gleichzeitige Bindung von NGF an den Rezeptor (Brann et al., 1999). Darüber hinaus wird durch Bindung des MC192-Antikörpers die Affinität von p75NTR für NGF deutlich erhöht (Barker and Shooter, 1994).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die NGF-induzierte Veränderung der EEA1-positiven Kompartimente. Während das EEA1-Signal in unstimulierten Zellen gleichmäßig und punktiert war, wurden nach NGF-Exposition große Wagenrad-förmige, EEA1-positive Strukturen beobachtet (s. Tafel 5.19., Tafel 5.22.) mit denen der aufgenommene MC192-Antikörper kolokalisierte (s. Tafel 5.20.).

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass nach NGF-Stimulation die Anzahl von *multivesicular bodies* (MVB) in PC12-Zellen deutlich erhöht war (R. Bauerfeind, unveröffentlichte Ergebnisse). MVBs schnüren sich von den vakuolenartigen Bereichen früher Endosomen ab (Futter et al., 1996) und bilden große vakuolenartige Strukturen, die eine unterschiedliche Anzahl von Vesikeln mit einem Durchmesser von 50-70µm enthalten (Piper and Luzio, 2001, Gruenberg, 2001). Es besteht also die Möglichkeit, dass es sich bei den von mir beobachteten NGF-induzierten großen EEA1-positiven Kompartimenten um MVBs handeln könnte. In den MVBs konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen internalisierter p75NTR an der Membran der inneren Vesikel und das *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate* (hrs) und Clathrin an der äußeren Membran nachgewiesen werden. (R. Bauerfeind, unveröffentlichte Ergebnisse). Hrs kolokalisiert in den frühen Endosomen mit EEA1, wobei die Lokalisation im jeweiligen Endosom unterschiedlich ist (Raiborg et al., 2001, Raiborg et al., 2001). Für Hrs konnte eine Beteiligung an dem Sortieren von ubiquitinierten Membranproteinen in spezielle Clathrin-behüllte Gruben in der Membran der frühen Endosomen gezeigt werden (Raiborg et al., 2002).

In den MVBs werden die Oberflächenrezeptoren sortiert, welches eine kritische Stufe bei der Regulation der Oberflächenexpression der Rezeptoren darstellt (Felder et al., 1990, Gruenberg and Maxfield, 1995). Dieses geschieht durch Sortierung in bestimmte Bereiche der MBV-Membran, aus denen sich durch Einstülpung die kleinen Vesikel im inneren der MVBs bilden. Bei Fusion der MVBs mit späten Endosomen oder Lysosomen werden diese degradiert, während die Bestandteile der äußeren MVB-Membran mit den Membranbestandteilen von Lysosomen bzw. späten Endosomen fusionieren und somit

erhalten bleiben (Futter et al., 1996).

Die Lokalisation von internalisiertem p75NTR nach NGF-Stimulation in MVBs wirft die Frage auf, ob NGF möglicherweise zu einer erhöhten Internalisierung von p75NTR durch Ubiquitinylierung führt. Das wäre nicht ungewöhnlich, da viele Plasmamembran-Rezeptoren durch Ligandenbindung ubiquitinyliert werden (Yee et al., 1994, Miyazawa et al., 1994, Paolini and Kinet, 1993, Cenciarelli et al., 1992, Galcheva-Gargova et al., 1995, Mori et al., 1992, Strous et al., 1996). Die Mono-Ubiquitinylierung fungiert dabei als Internalisierungssignal (Überblick in Hicke, 2001) und markiert Plasmamembran-Proteine zum Abbau in Vakuolen oder Lysosomen (Überblick in Hicke, 2001, Weissman, 2001). Ein genereller Mechanismus zur Stimulation der Ubiquitinylierung scheint die Phosphorylierung der Rezeptoren zu sein (Überblick in Riezman et al., 1996). In PCNA-Zellen wurde eine NGF-abhängige Phosphorylierung von p75NTR nachgewiesen (Susen et al., 1999, Ohrt, 2002). Außerdem gibt es Hinweise auf eine mögliche Ubiquitinylierung von p75NTR in PCNA und PC12-Zellen (Ohrt, 2002, Bauerfeind, unveröffentlichte Ergebnisse.)

Durch NGF-Stimulation könnte eine erhöhte Makropinozytose und/oder Ubiquitinylierung des p75NTR zu einer Degradation des p75NTR über MVBs in Lysosomen erfolgen.

In beiden Fällen wäre es denkbar, dass die Aktivierung von trkA die Degradation von p75NTR verursacht und der Sinn dieser Degradation in einer Modulation der NGF-Signaltransduktion liegen könnte (vgl. Abschnitt 1.1.3.)

4.2.3. Makropinozytose als möglicher Internalisierungsmechanismus von NGF

Der Mechanismus, über den NGF endozytiert wird ist nur wenig bekannt. Man geht davon aus, dass es sich um rezeptorvermittelte Aufnahme handelt (Johnson et al., 1978), wobei für die in dieser Arbeit verwendeten PC12-Zellen eine trkA-abhängige Endozytose gezeigt wurde (Grimes et al., 1996, Kahle et al., 1994). Eine Beteidigung von p75NTR ist unwahrscheinlich, kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Als mögliche Aufnahmemechanismen werden Clatrin-vermittelte Endozytose (Grimes et al., 1996, Beattie et al., 2000, Howe et al., 2001) sowie die Aufnahme durch Caveolae diskutiert (Huang et al., 1999, Bilderback et al., 1999, Peiro et al., 2000, siehe auch Abschnitt 1.3.).

Ich konnte eine NGF-induzierte erhöhte Konzentration von Caveolin-1-Signalen in der Nähe des Zellkerns von PC12-Zellen beobachten (s. Tafel 5.14.), welches möglicherweise

im Zusammenhang mit einer Internalisierung von NGF durch Caveolae stehen könnte. Es wäre auch möglich, dass die NGF-induzierten Effekte zu einer veränderten Zugänglichkeit von Caveolin-1 für den Antikörper führen könnten.

Die Hinweise auf eine Clathrin-vermittelte Endozytose von NGF stützen sich hauptsächlich auf die Beobachtung einer Arbeitsgruppe, die 30 Sekunden bis 2 Minuten nach NGF-Stimulation eine erhöhte Clathrin-Konzentration an der Plasmamembran zeigten (Grimes et al., 1996, Beattie et al., 2000, Howe et al., 2001). Dieses wurde biochemisch und durch Immunfluoreszenzexperimente belegt. Wir haben versucht, die Immunfluoreszenzexperimente zu reproduzieren, konnten aber keine NGF-induzierte Erhöhung der Clathrin-Konzentration an der Plasmamembran feststellen (R. Bauerfeind, unveröffentlichte Ergebnisse). Außerdem wurde gezeigt, dass zu diesem Zeitpunkt durch die NGF-Stimulation die Menge der Clathrin-behüllten Vesikel erhöht war (Howe et al., 2001). Allerdings enthielten diese Clathrin-behüllten Vesikel im Gegensatz zu späteren Zeitpunkten kaum NGF. Das deutet darauf hin, dass die gemessene Erhöhung der Clathrin-behüllten Vesikel zu diesem Zeitpunkt nicht mit der Endozytose von NGF korreliert.

Etwa fünf Minuten nach NGF-Stimulation konnte ich eine NGF-induzierte Erhöhung der Makropinozytose beobachten (vgl. Abschnitt 3.3.). Deshalb stellt sich die Frage, ob der NGF-trkA-Rezeptor-Komplex evtl. auch über Makropinozytose endozytiert werden könnte. Es ist nicht klar, ob sich Makropinosomen in ihrer Zusammensetzung von der Plasmamembran unterscheiden und es wäre denkbar, dass sich an diesen Vesikeln Clathrin-behüllte Gruben bilden in die z.B. der trkA-NGF-Rezeptor-Komplex spezifisch sortiert werden könnte. Tatsächlich konnte mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von PC12-Zellen nach NGF-Stimulation eine erhöhte Anzahl von Vesikeln mit einem Durchmesser von zwei bis drei μm belegt werden, an deren Membran elektronendichte Strukturen, die Clathrin-behüllten Gruben ähnelten, nachgewiesen werden konnten (Loos and Bauerfeind, 2002). Biochemische und elektronenmikroskopische Experimente zeigten, dass nach 10 Minuten NGF-Inkubation ein Teil von trkA-gebundenem NGF in Vesikeln von 0,2-0,5 μm Durchmesser nachgewiesen werden konnte (Grimes et al., 1996). Eine zweite Population von Vesikeln mit einem Durchmesser von etwa 0,1 μm enthielt einen größeren Anteil an trkA-gebundenen NGF (Grimes et al., 1996). Die größeren Vesikel enthielten außerdem Clathrin und AP-2 (Grimes et al., 1997). In *in vitro*-Experimenten mit permeabilisierten Zellen konnte die ATP-abhängige Reduktion der großen Vesikel zu Gunsten der kleinen Vesikel beobachtet werden (Grimes et al., 1997). In einer anderen

Arbeit von Howe et al., 2001 wurde der NGF- und trkA-Gehalt von Clathrin-behüllten Vesikeln (CCV, Präparation nach Maycox et al., 1992) untersucht (Howe et al., 2001). Dabei zeigte sich, dass nach 2 Minuten NGF-Inkubation bei 37°C die Gesamtmenge an CCV-Proteinen im Vergleich zu 4°C deutlich erhöht, der NGF-Gehalt allerdings niedrig war. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C war die Gesamtmenge an CCV-Proteinen um etwa 50% reduziert, der spezifische Anteil an NGF allerdings um 70% gestiegen. Die Fraktionen enthielten auch einen deutlich erhöhten Anteil an trkA, sowie verschiedene an der Signaltransduktion beteiligte Proteine im Vergleich zu früheren Zeitpunkten.

Diese Daten können so interpretiert werden, dass der NGF-trkA-Komplex nach Endozytose in Makropinosomen in Clathrin-behüllte Vesikel sortiert wird, um dann auf dem üblichen Weg degradiert (bzw. recycelt) zu werden.

Ein weitere Punkt, der für eine Internalisierung über Makropinosomen spricht, ist die PI3K-Abhängigkeit der trkA-Endozytose (York et al., 2000, Kuruvilla et al., 2000). Die Aktivierung der PI3K ist notwendig für die NGF-induzierte Lamellipodienbildung (Posern et al., 2000) sowie für die Bildung von Makropinosomen in Fibroblasten und *Dictyostelium* (Amyere et al., 2002, Temesvari et al., 2000).

5. Literaturverzeichnis

- Aderem A (1995): **The MARCKS family of protein kinase-C substrates.** *Biochem Soc Trans*, **23**:587-591.
- Aderem A, Underhill DM (1999): **Mechanisms of phagocytosis in macrophages.** *Annu Rev Immunol*, **17**:593-623.
- Ahle S, Ungewickell E (1986): **Purification and properties of a new clathrin assembly protein.** *EMBO Journal*, **5**:3143-3149.
- Ahmed MU, Hazeki K, Hazeki O, Katada T, Ui M (1995): **Cyclic AMP-increasing agents interfere with chemoattractant-induced respiratory burst in neutrophils as a result of the inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase rather than receptor-operated Ca²⁺ influx.** *J Biol Chem*, **270**:23816-23822.
- Ahmed S, Lee J, Kozma R, Best A, Monfries C, Lim L (1993): **A novel functional target for tumor-promoting phorbol esters and lysophosphatidic acid. The p21rac-GTPase activating protein n-chimaerin.** *J Biol Chem*, **268**:10709-10712.
- Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner HR, Caroni P (1995): **Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice.** *Cell*, **83**:269-278.
- Aigner L, Caroni P (1995): **Absence of persistent spreading, branching, and adhesion in GAP-43- depleted growth cones.** *J Cell Biol*, **128**:647-660.
- Alberts BJ, A., Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.:: *Molecular Biology of the Cell.* New York: Garland Science; 2002.
- Allison AC, Davies P, De Petris S (1971): **Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis.** *Nat New Biol*, **232**:153-155.
- Aloe L, Levi-Montalcini R (1979): **Nerve growth factor in vivo induced transformation of immature cromaffin cells in sympathetic neurons: effect of antiserum to the nerve growth factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**:1246-1250.
- Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD, Toma JG, Atwal J, Kaplan DR, Miller FD (1998): **p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors.** *J Cell Biol*, **143**:1691-1703.
- Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI (1994): **Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes.** *J Exp Med*, **179**:601-608.
- Amyere M, Payrastra B, Krause U, Van Der Smissen P, Veithen A, Courtoy PJ (2000): **Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C.** *Mol Biol Cell*, **11**:3453-3467.
- Amyere M, Mettlen M, Van D, Platek A, Payrastra B, Veithen A, Courtoy PJ (2002): **Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis.** *Int J Med Microbiol*, **291**:487-494.
- Anderson CN, Tolkovsky AM (1999): **A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside.** *J Neurosci*, **19**:664-673.
- Anderson RG (1998): **The caveolae membrane system.** *Annual Review of Biochemistry*, **67**:199-225.
- Andjelkovic M, Suidan HS, Meier R, Frech M, Alessi DR, Hemmings BA (1998): **Nerve growth factor promotes activation of the alpha, beta and gamma isoforms of protein kinase B in PC12 pheochromocytoma cells.** *Eur J Biochem*, **251**:195-200.
- Apodaca G, Katz LA, Mostov KE (1994): **Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes.** *J Cell Biol*, **125**:67-86.
- Arguello JM, Kaplan JH (1994): **Glutamate 779, an intramembrane carboxyl, is essential for monovalent cation binding by the Na,K-ATPase.** *J Biol Chem*, **269**:6892-6899.
- Armstrong NJ, Morgan EH (1983): **The effect of lysosomotropic bases and inhibitors of transglutaminase on iron uptake by immature erythroid cells.** *Biochim Biophys Acta*, **762**:175-186.
- Arneson LS, Kunz J, Anderson RA, Traub LM (1999): **Coupled inositide phosphorylation and phospholipase D activation initiates clathrin-coat assembly on lysosomes.** *J Biol Chem*, **274**:17794-17805.
- Ashcroft M, Stephens RM, Hallberg B, Downward J, Kaplan DR (1999): **The selective and inducible activation of endogenous PI 3-kinase in PC12 cells results in efficient NGF-mediated survival but defective neurite outgrowth.** *Oncogene*, **18**:4586-4597.
- Baker SJ, Reddy EP (1998): **Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily.** *Oncogene*, **17**:3261-3270.
- Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, Causing CG, Miller FD (1998): **The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death.** *J Cell Biol*, **140**:911-923.
- Barbacid M (1994): **The Trk family of neurotrophin receptors.** *Journal of Neurobiology*, **25**:1386-1403.
- Barker PA, Shooter EM (1994): **Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTFR reduces NGF binding**

- to TrkA on PC12 cells. *Neuron*, **13**:203-215.
- Barker PA, Hussain NK, McPherson PS (2002): **Retrograde signaling by the neurotrophins follows a well-worn trk.** *Trends Neurosci*, **25**:379-381.
- Barry ST, Critchley DR (1994): **The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C-delta to focal adhesions.** *J Cell Sci*, **107**:2033-2045.
- Bauerfeind R, Takei K, De Camilli P (1997): **Amphiphysin I is associated with coated endocytic intermediates and undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals.** *Journal of Biological Chemistry*, **272**:30984-30992.
- Bax B, Blundell TL, Murray-Rust J, McDonald NQ (1997): **Structure of mouse 7S NGF: a complex of nerve growth factor with four binding proteins.** *Structure*, **5**:1275-1285.
- Beattie EC, Howe CL, Wilde A, Brodsky FM, Mobley WC (2000): **NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking.** *J Neurosci*, **20**:7325-7333.
- Benmerah A, Lamaze C, Bègue B, Schmid SL, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N (1998): **AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis.** *Journal of Cell Biology*, **140**:1055-1062.
- Bernd P, Greene LA (1984): **Association of 125I-nerve growth factor with PC12 pheochromocytoma cells. Evidence for internalization via high-affinity receptors only and for long-term regulation by nerve growth factor of both high- and low-affinity receptors.** *J Biol Chem*, **259**:15509-15516.
- Berthiaume EP, Medina C, Swanson JA (1995): **Molecular size-fractionation during endocytosis in macrophages.** *J Cell Biol*, **129**:989-998.
- Betz A, Okamoto M, Benseler F, Brose N (1997): **Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin.** *Journal of Biological Chemistry*, **272**:2520-2526.
- Bhattacharyya A, Watson FL, Bradlee TA, Pomeroy SL, Stiles CD, Segal RA (1997): **Trk receptors function as rapid retrograde signal carriers in the adult nervous system.** *Journal of Neuroscience*, **17**:7007-7016.
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA (1999): **Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR.** *Embo J*, **18**:616-622.
- Bibel M, Barde YA (2000): **Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system.** *Genes Dev*, **14**:2919-2937.
- Bilderback TR, Grigsby RJ, Dobrowsky RT (1997): **Association of p75(NTR) with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae.** *Journal of Biological Chemistry*, **272**:10922-10927.
- Bilderback TR, Gazula VR, Lisanti MP, Dobrowsky RT (1999): **Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophin signaling pathways.** *Journal of Biological Chemistry*, **274**:257-263.
- Bocchini V, Angeletti PU (1969): **The nerve growth factor: purification as a 30,000-molecular-weight protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **64**:787-794.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999): **Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms.** *Science*, **286**:1358-1362.
- Bothwell M (1995): **Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors.** *Annual Review of Neuroscience*, **18**:223-253.
- Bradford MM (1976): **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem*, **72**:248-254.
- Brann AB, Scott R, Neuberger Y, Abulafia D, Boldin S, Fainzilber M, Futeran AH (1999): **Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons.** *J Neurosci*, **19**:8199-8206.
- Bretscher MS, Lutter R (1988): **A new method for detecting endocytosed proteins.** *Embo J*, **7**:4087-4092.
- Brodin L, Low P, Shupliakov O (2000): **Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis.** *Curr Opin Neurobiol*, **10**:312-320.
- Brown CM, Petersen NO (1999): **Free clathrin triskelions are required for the stability of clathrin-associated adaptor protein (AP-2) coated pit nucleation sites.** *Biochem Cell Biol*, **77**:439-448.
- Brown DA, London E (1998): **Functions of lipid rafts in biological membranes.** *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**:111-136.
- Butler MH, David C, Ochoa G-C, Freyberg Z, Daniell L, Grabs D, Cremona O, De Camilli P (1997): **Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/RVS family, is localized in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of Ranvier in brain and around T-tubules in skeletal muscle.** *Journal of Cell Biology*, **137**:1355-1367.
- Carbone R, Fre S, Iannolo G, Belleudi F, Mancini P, Pelicci PG, Torrisi MR, Di Fiore PP (1997): **Eps15 and eps15r are essential components of the endocytic pathway.** *Cancer Research*, **57**:5498-5504.
- Cardelli J (2001): **Phagocytosis and macropinocytosis in dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct.** *Traffic*, **2**:311-320.

- Carozzi AJ, Ikonen E, Lindsay MR, Parton RG (2000): **Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-tubule and caveolae biogenesis.** *Traffic*, **1**:326-341.
- Carter BD, Dechant G, Frade JM, Kaltschmidt C, Barde YA (1996): **Neurotrophins and their p75 receptor.** *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **61**:407-415.
- Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhäuser N, Böhm-Mathaei R, Baeuerle PA, Barde Y-A (1996): **Selective activation of NFκB by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75.** *Science*, **272**:542-545.
- Carver DJ, Aman MJ, Ravichandran KS (2000): **SHIP inhibits Akt activation in B cells through regulation of Akt membrane localization.** *Blood*, **96**:1449-1456.
- Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV (1996): **Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75.** *Nature*, **383**:716-719.
- Cenciarelli C, Hou D, Hsu KC, Rellahan BL, Wiest DL, Smith HT, Fried VA, Weissman AM (1992): **Activation-induced ubiquitination of the T cell antigen receptor.** *Science*, **257**:795-797.
- Chandler CE, Parsons LM, Hosang M, Shooter EM (1984): **A monoclonal antibody modulates the interaction of nerve growth factor with PC12 cells.** *J Biol Chem*, **259**:6882-6889.
- Chen CH, Hwang SL, Howng SL, Chou CK, Hong YR (2000): **Three Rat Brain Alternative Splicing Dynamin-like Protein Variants: Interaction with the Glycogen Synthase Kinase 3beta and Action as a Substrate.** *Biochem Biophys Res Commun*, **268**:893-898.
- Chen H, Fre S, Slepnev VI, Capua MR, Takei K, Butler MH, Di Fiore PP, De Camilli P (1998): **Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis.** *Nature*, **394**:793-797.
- Chen H, Slepnev VI, Di Fiore PP, De Camilli P (1999): **The interaction of epsin and eps15 with the clathrin adaptor AP-2 is inhibited by mitotic phosphorylation and enhanced by stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals.** *Journal of Biological Chemistry*, **274**:3257-3260.
- Chittka A, Chao MV (1999): **Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**:10705-10710.
- Ciechanover A, Schwartz AL, Dautry-Varsat A, Lodish HF (1983): **Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents.** *J Biol Chem*, **258**:9681-9689.
- Clary DO, Weskamp G, Austin LR, Reichardt LF (1994): **TrkA cross-linking mimics neuronal responses to nerve growth factor.** *Molecular Biology of the Cell*, **5**:549-563.
- Collet JF, Bardwell JC (2002): **Oxidative protein folding in bacteria.** *Mol Microbiol*, **44**:1-8.
- Connolly JL, Greene LA, Viscarello RR, Riley WD (1979): **Rapid, sequential changes in surface morphology of PC12 pheochromocytoma cells in response to nerve growth factor.** *J Cell Biol*, **82**:820-827.
- Cooper JA (1991): **The role of actin polymerization in cell motility.** *Annu Rev Physiol*, **53**:585-605.
- Cope MJ, Yang S, Shang C, Drubin DG (1999): **Novel protein kinases Ark1p and Prk1p associate with and regulate the cortical actin cytoskeleton in budding yeast.** *J Cell Biol*, **144**:1203-1218.
- Corbit KC, Foster DA, Rosner MR (1999): **Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells.** *Mol Cell Biol*, **19**:4209-4218.
- Corvera S, D'Arrigo A, Stenmark H (1999): **Phosphoinositides in membrane traffic.** *Curr Opin Cell Biol*, **11**:460-465.
- Cousin MA, Tan TC, Robinson PJ (2001): **Protein phosphorylation is required for endocytosis in nerve terminals: potential role for the dephosphins dynamin I and synaptojanin, but not AP180 or amphiphysin.** *J Neurochem*, **76**:105-116.
- Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Luthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA, et al. (1999): **Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling.** *Cell*, **99**:179-188.
- Cremona O, De Camilli P (2001): **Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse.** *J Cell Sci*, **114**:1041-1052.
- Crowder RJ, Freeman RS (1998): **Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons.** *J Neurosci*, **18**:2933-2943.
- Curtis R, Adryan KM, Stark JL, Park JS, Compton DL, Weskamp G, Huber LJ, Chao MV, Jaenisch R, Lee KF, et al. (1995): **Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins.** *Neuron*, **14**:1201-1211.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999): **Cellular survival: a play in three Akts.** *Genes Dev*, **13**:2905-2927.
- Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF (1983): **pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**:2258-2262.
- Dautry-Varsat A (1986): **Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor.** *Biochimie*, **68**:375-381.

- David C, Solimena M, De Camilli P (1994): **Autoimmunity in stiff-Man syndrome with breast cancer is targeted to the C-terminal region of human amphiphysin, a protein similar to the yeast proteins, Rvs167 and Rvs161. *FEBS Letters*, 351:73-79.**
- Davies AM (1994): **The role of neurotrophins in the developing nervous system. *Journal of Neurobiology*, 25:1334-1348.**
- De Camilli P, Takei K, McPherson PS (1995): **The function of dynamin in endocytosis. *Current Opinion in Neurobiology*, 5:559-565.**
- Dechant G, Biffo S, Okazawa H, Kolbeck R, Pottgiesser J, Barde YA (1993): **Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB. *Development*, 119:545-558.**
- Dechant G, Rodriguez-Tebar A, Barde YA (1994): **Neurotrophin receptors. *Progress in Neurobiology*, 42:347-352.**
- Dechant G, Barde YA (1997): **Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Current Opinion in Neurobiology*, 7:413-418.**
- Dechant G, Tsoulfas P, Parada LF, Barde YA (1997): **The neurotrophin receptor p75 binds neurotrophin-3 on sympathetic neurons with high affinity and specificity. *Journal of Neuroscience*, 17:5281-5287.**
- Dechant G (2001): **Molecular interactions between neurotrophin receptors. *Cell Tissue Res*, 305:229-238.**
- Della-Bianca V, Rossi F, Armato U, Dal-Pra I, Costantini C, Perini G, Politi V, Della Valle G (2001): **Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126). *J Biol Chem*, 276:38929-38933.**
- Denisov G, Wanaski S, Luan P, Glaser M, McLaughlin S (1998): **Binding of basic peptides to membranes produces lateral domains enriched in the acidic lipids phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: an electrostatic model and experimental results. *Biophys J*, 74:731-744.**
- Dharmawardhane S, Schurmann A, Sells MA, Chernoff J, Schmid SL, Bokoch GM (2000): **Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Mol Biol Cell*, 11:3341-3352.**
- Dicou E (1992): **Expression of recombinant human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *Neurochem Int*, 20:129-134.**
- Dicou E, Pflug B, Magazin M, Lehy T, Djakiew D, Ferrara P, Neri V, Harvie D (1997): **Two peptides derived from the nerve growth factor precursor are biologically active. *J Cell Biol*, 136:389-398.**
- Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, Hall C, Lim L, Hall A (1991): **Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*, 351:400-402.**
- Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM (1995): **Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem*, 270:6838-6842.**
- Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao MV, Hannun YA (1994): **Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science*, 265:1596-1599.**
- Dobrowsky RT, Jenkins GM, Hannun YA (1995): **Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 270:22135-22142.**
- Dobrowsky RT (2000): **Sphingolipid signalling domains floating on rafts or buried in caves? *Cell Signal*, 12:81-90.**
- Dowler S, Currie RA, Campbell DG, Deak M, Kular G, Downes CP, Alessi DR (2000): **Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem J*, 351:19-31.**
- Downey GP, Chan CK, Lea P, Takai A, Grinstein S (1992): **Phorbol ester-induced actin assembly in neutrophils: role of protein kinase C. *J Cell Biol*, 116:695-706.**
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, et al. (2001): **Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*, 293:2449-2452.**
- Drake MT, Downs MA, Traub LM (2000): **Epsin binds to clathrin by associating directly with the clathrin-terminal domain. Evidence for cooperative binding through two discrete sites. *J Biol Chem*, 275:6479-6489.**
- Du K, Montminy M (1998): **CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem*, 273:32377-32379.**
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME (1997): **Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, 275:661-665.**
- Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV, Simons K (1993): **Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO Journal*, 12:1597-1605.**
- Edlund S, Landstrom M, Heldin CH, Aspenstrom P (2002): **Transforming Growth Factor-beta-induced Mobilization of Actin Cytoskeleton Requires Signaling by Small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell*, 13:902-914.**
- Egawa K, Maegawa H, Shi K, Nakamura T, Obata T, Yoshizaki T, Morino K, Shimizu S, Nishio Y, Suzuki E, et al. (2002): **Membrane Localization of 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1 Stimulates Activities of Akt and Atypical Protein Kinase C but Does Not Stimulate Glucose Transport and Glycogen Synthesis in 3T3-L1 Adipocytes. *J Biol Chem*, 277:38863-38869.**
- Ehlers MD, Kaplan DR, Price DL, Koliatsos VE (1995): **NGF-stimulated retrograde transport of trkA in the mammalian**

- nervous system. *Journal of Cell Biology*, **130**:149-156.
- Engqvist-Goldstein AE, Kessels MM, Chopra VS, Hayden MR, Drubin DG (1999): **An actin-binding protein of the Sla2/Huntingtin interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles.** *J Cell Biol*, **147**:1503-1518.
- Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, Hempstead BL (2001): **The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor.** *J Biol Chem*, **276**:32687-32695.
- Eveleth DD, Bradshaw RA (1988): **Internalization and cycling of nerve growth factor in PC12 cells: interconversion of type II (fast) and type I (slow) nerve growth factor receptors.** *Neuron*, **1**:929-936.
- Fan Z, Mendelsohn J, Masui H, Kumar R (1993): **Regulation of epidermal growth factor receptor in NIH3T3/HER14 cells by antireceptor monoclonal antibodies.** *J Biol Chem*, **268**:21073-21079.
- Felder S, Miller K, Moehren G, Ullrich A, Schlessinger J, Hopkins CR (1990): **Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body.** *Cell*, **61**:623-634.
- Ford MG, Pearse BM, Higgins MK, Vallis Y, Owen DJ, Gibson A, Hopkins CR, Evans PR, McMahon HT (2001): **Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes.** *Science*, **291**:1051-1055.
- Foti MA, A.; Emr, S. D. (2001): **Sac1 lipid phosphatase and Stt4 phosphatidylinositol 4-kinase regulate a pool of phosphatidylinositol 4-phosphatase that functions in the control of the actin cytoskeleton and vacuole morphology.** *Mol Biol Cell*, **12**:2396-2411.
- Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995): **De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**:8655-8659.
- Francis CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S (1993): **Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria.** *Nature*, **364**:639-642.
- Franco M, Peters PJ, Boretto J, van Donselaar E, Neri A, D'Souza-Schorey C, Chavrier P (1999): **EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization.** *Embo J*, **18**:1480-1491.
- Frey D, Laux T, Xu L, Schneider C, Caroni P (2000): **Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity.** *J Cell Biol*, **149**:1443-1454.
- Friedman WJ (2000): **Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor.** *J Neurosci*, **20**:6340-6346.
- Fujimori K, Fukuzono S, Kotomura N, Kuno N, Shimizu N (1992): **Overproduction of biologically-active human nerve growth factor in Escherichia coli.** *Biosci Biotechnol Biochem*, **56**:1985-1990.
- Fujimoto LM, Roth R, Heuser JE, Schmid SL (2000): **Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells.** *Traffic*, **1**:161-171.
- Futter CE, Pearse A, Hewlett LJ, Hopkins CR (1996): **Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes.** *Journal of Cell Biology*, **132**:1011-1023.
- Gad H, Ringstad N, Low P, Kjaerulff O, Gustafsson J, Wenk M, Di Paolo G, Nemoto Y, Crun J, Ellisman MH, et al. (2000): **Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin.** *Neuron*, **27**:301-312.
- Gaidarov I, Keen JH (1999): **Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits.** *J Cell Biol*, **146**:755-764.
- Gaidarov I, Krupnick JG, Falck JR, Benovic JL, Keen JH (1999): **Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding.** *EMBO Journal*, **18**:871-881.
- Galbiati F, Engelman JA, Volonte D, Zhang XL, Minetti C, Li M, Hou H, Jr., Kneitz B, Edelmann W, Lisanti MP (2001): **Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities.** *J Biol Chem*, **276**:21425-21433.
- Galcheva-Gargova Z, Theroux SJ, Davis RJ (1995): **The epidermal growth factor receptor is covalently linked to ubiquitin.** *Oncogene*, **11**:2649-2655.
- Galderisi U, Di Bernardo G, Cipollaro M, Jori FP, Piegari E, Cascino A, Peluso G, Melone MA (1999): **Induction of apoptosis and differentiation in neuroblastoma and astrocytoma cells by the overexpression of Bin1, a novel Myc interacting protein.** *J Cell Biochem*, **74**:313-322.
- Gallo G, Pollack ED (1997): **Temporal regulation of growth cone lamellar protrusion and the influence of target tissue.** *J Neurobiol*, **33**:929-944.
- Gallo G, Letourneau PC (1998): **Axon guidance: GTPases help axons reach their targets.** *Curr Biol*, **8**:R80-82.
- Gallo G, Letourneau PC (2000): **Neurotrophins and the dynamic regulation of the neuronal cytoskeleton.** *J Neurobiol*, **44**:159-173.
- Gallusser A, Kirchhausen T (1993): **The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components.** *EMBO Journal*, **12**:5237-5244.
- Gargano N, Levi A, Alema S (1997): **Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA**

- receptors. *Journal of Neuroscience Research*, **50**:1-12.
- Gavathiotis E, Sharman GJ, Searle MS (2000): **Sequence-dependent variation in DNA minor groove width dictates orientational preference of Hoechst 33258 in A-tract recognition: solution NMR structure of the 2:1 complex with d(CTTTTGCAAAG)(2)**. *Nucleic Acids Res*, **28**:728-735.
- Ginty DD, Segal RA (2002): **Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon**. *Curr Opin Neurobiol*, **12**:268-274.
- Glenney JR, Jr. (1989): **Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus**. *J Biol Chem*, **264**:20163-20166.
- Goddette DW, Frieden C (1986): **Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D**. *J Biol Chem*, **261**:15974-15980.
- Gold ES, Morrissette NS, Underhill DM, Guo J, Bassetti M, Aderem A (2000): **Amphiphysin II α , a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis**. *Immunity*, **12**:285-292.
- Goodman OB, Jr., Keen JH (1995): **The alpha chain of the AP-2 adaptor is a clathrin binding subunit**. *Journal of Biological Chemistry*, **270**:23768-23773.
- Green SH, Rydel RE, Connolly JL, Greene LA (1986): **PC12 cell mutants that possess low- but not high-affinity nerve growth factor receptors neither respond to nor internalize nerve growth factor**. *Journal of Cell Biology*, **102**:830-843.
- Greene LA, Tischler AS (1976): **Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**:2424-2428.
- Grewal SS, York RD, Stork PJ (1999): **Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons**. *Curr Opin Neurobiol*, **9**:544-553.
- Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, Valletta JS, Topp KS, LaVail JH, Bunnett NW, Mobley WC (1996): **Endocytosis of activated TrkA: Evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes**. *Journal of Neuroscience*, **16**:7950-7964.
- Grimes ML, Beattie E, Mobley WC (1997): **A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**:9909-9914.
- Grob PM, Ross AH, Koprowski H, Bothwell M (1985): **Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor**. *J Biol Chem*, **260**:8044-8049.
- Gruenberg J, Maxfield FR (1995): **Membrane transport in the endocytic pathway**. *Current Opinion in Cell Biology*, **7**:552-563.
- Gruenberg J (2001): **The endocytic pathway: a mosaic of domains**. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**:721-730.
- Haigler HT, McKanna JA, Cohen S (1979): **Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor**. *J Cell Biol*, **83**:82-90.
- Hamanoue M, Middleton G, Wyatt S, Jaffray E, Hay RT, Davies AM (1999): **p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor**. *Mol Cell Neurosci*, **14**:28-40.
- Hannun YA (1994): **The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide**. *J Biol Chem*, **269**:3125-3128.
- Hao W, Tan Z, Prasad K, Reddy KK, Chen J, Prestwich GD, Falck JR, Shears SB, Lafer EM (1997): **Regulation of AP-3 function by inositides: Identification of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate as a potent ligand**. *Journal of Biological Chemistry*, **272**:6393-6398.
- Hao W, Luo Z, Zheng L, Prasad K, Lafer EM (1999): **AP180 and AP-2 interact directly in a complex that cooperatively assembles clathrin [In Process Citation]**. *J Biol Chem*, **274**:22785-22794.
- Harrington AW, Kim JY, Yoon SO (2002): **Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis**. *J Neurosci*, **22**:156-166.
- Harris TW, Hartwig E, Horvitz HR, Jorgensen EM (2000): **Mutations in synaptojanin disrupt synaptic vesicle recycling**. *J Cell Biol*, **150**:589-600.
- Hartig W, Seeger J, Naumann T, Brauer K, Bruckner G (1998): **Selective in vivo fluorescence labelling of cholinergic neurons containing p75(NTR) in the rat basal forebrain**. *Brain Res*, **808**:155-165.
- Hartwig JH, Bokoch GM, Carpenter CL, Janmey PA, Taylor LA, Toker A, Stossel TP (1995): **Thrombin receptor ligation and activated Rac uncouple actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets**. *Cell*, **82**:643-653.
- Hauser SL, Bhan AK, Gilles FH, Hoban CJ, Reinherz EL, Schlossman SF, Weiner HL (1983): **Immunohistochemical staining of human brain with monoclonal antibodies that identify lymphocytes, monocytes, and the Ia antigen**. *J Neuroimmunol*, **5**:197-205.
- Hempstead BL (2002): **The many faces of p75NTR**. *Curr Opin Neurobiol*, **12**:260-267.
- Henley JR, Krueger EWA, Oswald BJ, McNiven MA (1998): **Dynamin-mediated internalization of caveolae**. *Journal of Cell Biology*, **141**:85-99.
- Hetman M, Kanning K, Cavanaugh JE, Xia Z (1999): **Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase**. *J Biol Chem*, **274**:22569-22580.
- Hewlett LJ, Prescott AR, Watts C (1994): **The coated pit and macropinocytic pathways**

- serve distinct endosome populations. *J Cell Biol*, **124**:689-703.
- Heymach JV, Jr., Shooter EM (1995): **The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected mammalian cells.** *J Biol Chem*, **270**:12297-12304.
- Hicke L (2001): **Protein regulation by monoubiquitin.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**:195-201.
- Higgs HN, Pollard TD (2000): **Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex.** *J Cell Biol*, **150**:1311-1320.
- Hill KM, Huang Y, Yip SC, Yu J, Segall JE, Backer JM (2001): **N-terminal domains of the class ia phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit play a role in cytoskeletal but not mitogenic signaling.** *J Biol Chem*, **276**:16374-16378.
- Hinshaw JE, Schmid SL (1995): **Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding.** *Nature*, **374**:190-192.
- Hirst J, Robinson MS (1998): **Clathrin and adaptors.** *Biochimica et Biophysica Acta*, **1404**:173-193.
- Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emlet DR, Dieterich R, Wong AJ (1997): **Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**:12419-12424.
- Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawamoto K, Nakayama K, Morris AJ, Frohman MA, et al. (1999): **Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation.** *Cell*, **99**:521-532.
- Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC (2001): **NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway.** *Neuron*, **32**:801-814.
- Hu GL, Neet KE (1988): **Expression of the cDNA for mouse beta-nerve growth factor protein in Escherichia coli.** *Gene*, **70**:57-65.
- Huang CS, Zhou J, Feng AK, Lynch CC, Klumperman J, DeArmond SJ, Mobley WC (1999): **Nerve growth factor signaling in caveolae-like domains at the plasma membrane.** *J Biol Chem*, **274**:36707-36714.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001): **Neurotrophins: roles in neuronal development and function.** *Annu Rev Neurosci*, **24**:677-736.
- Huber LJ, Chao MV (1995): **A potential interaction of p75 and trkA NGF receptors revealed by affinity crosslinking and immunoprecipitation.** *Journal of Neuroscience Research*, **40**:557-563.
- Hughes WE, Cooke FT, Parker PJ (2000): **Sac phosphatase domain proteins.** *Biochem J*, **350 Pt 2**:337-352.
- Hussain NK, Yamabhai M, Ramjaun AR, Guy AM, Baranes D, O'Bryan JP, Der CJ, Kay BK, McPherson PS (1999): **Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells.** *J Biol Chem*, **274**:15671-15677.
- Inagaki N, Thoenen H, Lindholm D (1995): **TrkA tyrosine residues involved in NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells.** *European Journal of Neuroscience*, **7**:1125-1133.
- Irie S, Hachiya T, Rabizadeh S, Maruyama W, Mukai J, Li Y, Reed JC, Bredesen DE, Sato TA (1999): **Functional interaction of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) with p75(NTR) and their effect on NF-kappaB activation.** *FEBS Lett*, **460**:191-198.
- Itoh T, Koshiha S, Kigawa T, Kikuchi A, Yokoyama S, Takenawa T (2001): **Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis.** *Science*, **291**:1047-1051.
- Jackson TR, Blader IJ, Hammonds-Odie LP, Burga CR, Cooke F, Hawkins PT, Wolf AG, Heldman KA, Theibert AB (1996): **Initiation and maintenance of NGF-stimulated neurite outgrowth requires activation of a phosphoinositide 3-kinase.** *J Cell Sci*, **109**:289-300.
- Jaken S, Parker PJ (2000): **Protein kinase C binding partners.** *Bioessays*, **22**:245-254.
- Jing S, Tapley P, Barbacid M (1992): **Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors.** *Neuron*, **9**:1067-1079.
- Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M (1986): **Expression and structure of the human NGF receptor.** *Cell*, **47**:545-554.
- Johnson EM, Jr., Andres RY, Bradshaw RA (1978): **Characterization of the retrograde transport of nerve growth factor (NGF) using high specific activity [125I] NGF.** *Brain Research*, **150**:319-331.
- Johnson EM, Jr., Taniuchi M, Clark HB, Springer JE, Koh S, Tayrien MW, Loy R (1987): **Demonstration of the retrograde transport of nerve growth factor receptor in the peripheral and central nervous system.** *J Neurosci*, **7**:923-929.
- Johnson MI, Ross CD, Meyers M, Spitznagel EL, Bunge RP (1980): **Morphological and biochemical studies on the development of cholinergic properties in cultured sympathetic neurons. I. Correlative changes in choline acetyltransferase and synaptic vesicle cytochemistry.** *Journal of Cell Biology*, **84**:680-691.
- Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA, Schmid SL (1998): **Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation.** *Current Biology*, **8**:1399-1402.
- Jullien J, Guili V, Reichardt LF, Rudkin BB (2002): **Molecular kinetics of nerve growth factor receptor trafficking and activation.** *J Biol Chem*, **277**:38700-38708.

- Kahle P, Barker PA, Shooter EM, Hertel C (1994): **p75 nerve growth factor receptor modulates p140trka kinase activity, but not ligand internalization, in Pc12 cells.** *Journal of Neuroscience Research*, **38**:599-606.
- Kanamoto T, Mota M, Takeda K, Rubin LL, Miyazono K, Ichijo H, Bazenet CE (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.
- Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF (1991): **Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF.** *Nature*, **350**:158-160.
- Kaplan DR, Stephens RM (1994): **Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor.** *Journal of Neurobiology*, **25**:1404-1417.
- Kaplan DR, Miller FD (2000): **Neurotrophin signal transduction in the nervous system.** *Curr Opin Neurobiol*, **10**:381-391.
- Kartenbeck J, Stukenbrok H, Helenius A (1989): **Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum.** *J Cell Biol*, **109**:2721-2729.
- Kazanietz MG, Lewin NE, Bruns JD, Blumberg PM (1995): **Characterization of the cysteine-rich region of the Caenorhabditis elegans protein Unc-13 as a high affinity phorbol ester receptor. Analysis of ligand-binding interactions, lipid cofactor requirements, and inhibitor sensitivity.** *J Biol Chem*, **270**:10777-10783.
- Kazanietz MG (2002): **Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection.** *Mol Pharmacol*, **61**:759-767.
- Kearns BG, McGee TP, Mayingier P, Gedvilaite A, Phillips SE, Kagiwada S, Bankaitis VA (1997): **Essential role for diacylglycerol in protein transport from the yeast Golgi complex.** *Nature*, **387**:101-105.
- Keenan C, Kelleher D (1998): **Protein kinase C and the cytoskeleton.** *Cell Signal*, **10**:225-232.
- Keller H, Niggli V (1995): **Effects of cytochalasin D on shape and fluid pinocytosis in human neutrophils as related to cytoskeletal changes (actin, alpha-actinin and microtubules).** *Eur J Cell Biol*, **66**:157-164.
- Keller HU (1990): **Diacylglycerols and PMA are particularly effective stimulators of fluid pinocytosis in human neutrophils.** *J Cell Physiol*, **145**:465-471.
- Keller HU, Niggli V (1994): **Selective effects of the PKC inhibitors Ro 31-8220 and CGP 41,251 on PMN locomotion, cell polarity, and pinocytosis.** *J Cell Physiol*, **161**:526-536.
- Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV (2001): **A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2.** *J Neurosci*, **21**:5854-5863.
- Kimura MT, Irie S, Shoji-Hoshino S, Mukai J, Nadano D, Oshimura M, Sato TA (2001): **14-3-3 is involved in p75 neurotrophin receptor-mediated signal transduction.** *J Biol Chem*, **276**:17291-17300.
- Kirchhausen T, Bonifacino JS, Riezman H (1997): **Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins.** *Current Opinion in Cell Biology*, **9**:488-495.
- Kishino A, Yanagida T (1988): **Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles.** *Nature*, **334**:74-76.
- Klausner RD, Ashwell G, van Renswoude J, Harford JB, Bridges KR (1983): **Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**:2263-2266.
- Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M (1991): **The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor.** *Cell*, **65**:189-197.
- Klesse LJ, Parada LF (1998): **p21 ras and phosphatidylinositol-3 kinase are required for survival of wild-type and NF1 mutant sensory neurons.** *J Neurosci*, **18**:10420-10428.
- Koenig JH, Ikeda K (1989): **Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval.** *Journal of Neuroscience*, **9**:3844-3860.
- Kong H, Boulter J, Weber JL, Lai C, Chao MV (2001): **An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors.** *J Neurosci*, **21**:176-185.
- Korhonen JM, Said FA, Wong AJ, Kaplan DR (1999): **Gab1 mediates neurite outgrowth, DNA synthesis, and survival in PC12 cells.** *J Biol Chem*, **274**:37307-37314.
- Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L (1995): **The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts.** *Mol Cell Biol*, **15**:1942-1952.
- Kramer BM, Van der Zee CE, Hagg T (1999): **P75 nerve growth factor receptor is important for retrograde transport of neurotrophins in adult cholinergic basal forebrain neurons.** *Neuroscience*, **94**:1163-1172.
- Kratz PA, Bottcher B, Nassal M (1999): **Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**:1915-1920.
- Kruttgen A, Heymach JV, Jr., Kahle PJ, Shooter EM (1997): **The role of the nerve growth factor carboxyl terminus in receptor binding and conformational stability.** *J Biol Chem*, **272**:29222-29228.
- Kurokawa Y, Yanagi H, Yura T (2001): **Overproduction of bacterial protein disulfide isomerase (DsbC) and its modulator (DsbD) markedly enhances periplasmic production of human nerve**

- growth factor in Escherichia coli. *J Biol Chem*, **276**:14393-14399.**
- Kuruvilla R, Ye H, Ginty DD (2000): **Spatially and functionally distinct roles of the PI3-K effector pathway during NGF signaling in sympathetic neurons.** *Neuron*, **27**:499-512.
- Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K (1992): **VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles.** *J Cell Biol*, **118**:1003-1014.
- Kurzchalia TV, Parton RG (1999): **Membrane microdomains and caveolae.** *Curr Opin Cell Biol*, **11**:424-431.
- Kwiatkowska K, Sobota A (1999): **Signaling pathways in phagocytosis.** *Bioessays*, **21**:422-431.
- Laemmli UK (1970): **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, **227**:680-685.
- Lalli G, Schiavo G (2002): **Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR.** *J Cell Biol*, **156**:233-239.
- Lamaze C, Chuang TH, Terlecky LJ, Bokoch GM, Schmid SL (1996): **Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac.** *Nature*, **382**:177-179.
- Lamaze C, Dujeancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, Dautry-Varsat A (2001): **Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway.** *Mol Cell*, **7**:661-671.
- Landis SC, Fredieu JR, Yodkowski M (1985): **Neonatal treatment with nerve growth factor antiserum eliminates cholinergic sympathetic innervation of rat sweat glands.** *Dev Biol*, **112**:222-229.
- Laux T, Fukami K, Thelen M, Golub T, Frey D, Caroni P (2000): **GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism.** *J Cell Biol*, **149**:1455-1472.
- Layer PG, Shooter EM (1983): **Binding and degradation of nerve growth factor by PC12 pheochromocytoma cells.** *J Biol Chem*, **258**:3012-3018.
- Lee C, Kim SR, Chung JK, Frohman MA, Kilimann MW, Rhee SG (2000): **Inhibition of phospholipase D by amphiphysins.** *J Biol Chem*, **275**:18751-18758.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001): **Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins.** *Science*, **294**:1945-1948.
- Leprince C, Romero F, Cussac D, Vayssiere B, Berger R, Tavitian A, Camonis JH (1997): **A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis and signal transduction pathways.** *Journal of Biological Chemistry*, **272**:15101-15105.
- Letourneau PC, Shattuck TA, Ressler AH (1987): **"Pull" and "push" in neurite elongation: observations on the effects of different concentrations of cytochalasin B and taxol.** *Cell Motil Cytoskeleton*, **8**:193-209.
- Levi A, Shechter Y, Neufeld EJ, Schlessinger J (1980): **Mobility, clustering, and transport of nerve growth factor in embryonal sensory cells and in a sympathetic neuronal cell line.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**:3469-3473.
- Levi-Montalcini R (1987): **The nerve growth factor 35 years later.** *Science*, **237**:1154-1162.
- Levi-Montalcini R, Dal Toso R, della Valle F, Skaper SD, Leon A (1995): **Update of the NGF saga.** *J Neurol Sci*, **130**:119-127.
- Lewis JM, Cheresch DA, Schwartz MA (1996): **Protein kinase C regulates alpha v beta 5-dependent cytoskeletal associations and focal adhesion kinase phosphorylation.** *J Cell Biol*, **134**:1323-1332.
- Li Y, Cam J, Bu G (2001): **Low-density lipoprotein receptor family: endocytosis and signal transduction.** *Mol Neurobiol*, **23**:53-67.
- Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, Lambright DG (2000): **Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains.** *Mol Cell*, **6**:385-394.
- Lin CM, Mihal KA, Krueger RJ (1990): **Introduction of sulfhydryl groups into proteins at carboxyl sites.** *Biochim Biophys Acta*, **1038**:382-385.
- Liu WS, Heckman CA (1998): **The sevenfold way of PKC regulation.** *Cell Signal*, **10**:529-542.
- Liu YZ, Boxer LM, Latchman DS (1999): **Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade.** *Nucleic Acids Res*, **27**:2086-2090.
- Loos A, Bauerfeind R: **Nerve growth factor-induced macropinocytosis of cell surface receptors in PC12 cells.** In *ELSO*: 2002.
- Lopez-Lluch G, Bird MM, Canas B, Godovac-Zimmerman J, Ridley A, Segal AW, Dekker LV (2001): **Protein kinase C-delta C2-like domain is a binding site for actin and enables actin redistribution in neutrophils.** *Biochem J*, **357**:39-47.
- Ludewig B, Pfander B, Loos A, Ullrich F, Schnatwinkel C, Bauerfeind R: **Phosphorylation of cytosolic proteins implicated in clathrin-mediated endocytosis is stimulated by nerve growth factor.** In *First Joint French-German Congress on Cell Biology*; Strasbourg: 2001.
- Luo L, Jan LY, Jan YN (1997): **Rho family GTP-binding proteins in growth cone signalling.** *Curr Opin Neurobiol*, **7**:81-86.
- Ma L, Rohatgi R, Kirschner MW (1998): **The Arp2/3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**:15362-15367.
- MacPhee IJ, Barker PA (1997): **Brain-derived neurotrophic factor binding to the p75 neurotrophin receptor reduces TrkA signaling while increasing serine phosphorylation in the TrkA intracellular domain.** *Journal of Biological Chemistry*, **272**:23547-23551.

- Maggirwar SB, Sarmiere PD, Dewhurst S, Freeman RS (1998): **Nerve growth factor-dependent activation of NF-kappaB contributes to survival of sympathetic neurons.** *J Neurosci*, **18**:10356-10365.
- Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hempstead BL (1994): **High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors.** *J Biol Chem*, **269**:6884-6891.
- Majdan M, Miller FD (1999): **Neuronal life and death decisions functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors.** *Int J Dev Neurosci*, **17**:153-161.
- Majdan M, Walsh GS, Aloyz R, Miller FD (2001): **TrkA mediates developmental sympathetic neuron survival in vivo by silencing an ongoing p75NTR-mediated death signal.** *J Cell Biol*, **155**:1275-1285.
- Malecz N, McCabe PC, Spaargaren C, Qiu R, Chuang Y, Symons M (2000): **Synaptojanin 2, a novel Rac1 effector that regulates clathrin-mediated endocytosis.** *Curr Biol*, **10**:1383-1386.
- Mamidipudi V, Wooten MW (2002): **Dual role for p75(NTR) signaling in survival and cell death: can intracellular mediators provide an explanation?** *J Neurosci Res*, **68**:373-384.
- Manes S, Mira E, Gomez-Mouton C, Lacalle RA, Keller P, Labrador JP, Martinez AC (1999): **Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells.** *Embo J*, **18**:6211-6220.
- Marchisio PC, Naldini L, Calissano P (1980): **Intracellular distribution of nerve growth factor in rat pheochromocytoma PC12 cells: evidence for a perinuclear and intranuclear location.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**:1656-1660.
- Marsh L, Letourneau PC (1984): **Growth of neurites without filopodial or lamellipodial activity in the presence of cytochalasin B.** *J Cell Biol*, **99**:2041-2047.
- Marsh M, McMahon HT (1999): **The structural era of endocytosis.** *Science*, **285**:215-220.
- Martin TF (1998): **Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking.** *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**:231-264.
- Martin TF (2002): **Prime movers of synaptic vesicle exocytosis.** *Neuron*, **34**:9-12.
- Maycox PR, Link E, Reetz A, Morris SA, Jahn R (1992): **Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling.** *Journal of Cell Biology*, **118**:1379-1388.
- Mayor S, Rothberg KG, Maxfield FR (1994): **Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking.** *Science*, **264**:1948-1951.
- Mazzoni IE, Said FA, Aloyz R, Miller FD, Kaplan D (1999): **Ras regulates sympathetic neuron survival by suppressing the p53-mediated cell death pathway.** *J Neurosci*, **19**:9716-9727.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1999): **Neurotrophins and synaptic plasticity.** *Annu Rev Neurosci*, **22**:295-318.
- McNiven MA, Kim L, Krueger EW, Orth JD, Cao H, Wong TW (2000): **Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape.** *J Cell Biol*, **151**:187-198.
- McPherson PS, Takei K, Schmid SL, De Camilli P (1994): **p145, a major Grb2-binding protein in brain, is co-localized with dynamin in nerve terminals where it undergoes activity-dependent dephosphorylation.** *Journal of Biological Chemistry*, **269**:30132-30139.
- McPherson PS, Garcia EP, Slepnev VI, David C, Zhang XM, Grabs D, Sossin WS, Bauerfeind R, Nemoto Y, De Camilli P (1996): **A presynaptic inositol-5-phosphatase.** *Nature*, **379**:353-357.
- Meakin SO, Shooter EM (1992): **The nerve growth factor family of receptors.** *Trends in Neurosciences*, **15**:323-331.
- Mellman I (1996): **Endocytosis and molecular sorting.** *Annual Review of Cell Biology*, **12**:575-625.
- Mellman I (2000): **Quo vadis: polarized membrane recycling in motility and phagocytosis.** *J Cell Biol*, **149**:529-530.
- Mellor H, Parker PJ (1998): **The extended protein kinase C superfamily.** *Biochem J*, **332**:281-292.
- Merrifield CJ, Moss SE, Ballestrem C, Imhof BA, Giese G, Wunderlich I, Almers W (1999): **Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells.** *Nat Cell Biol*, **1**:72-74.
- Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG, Jr., Reichardt LF, Barres BA (1998): **Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons.** *Neuron*, **21**:681-693.
- Michaelidis TM, Sendtner M, Cooper JD, Airaksinen MS, Holtmann B, Meyer M, Thoenen H (1996): **Inactivation of bcl-2 results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development.** *Neuron*, **17**:75-89.
- Middleton G, Hamanoue M, Enokido Y, Wyatt S, Pennica D, Jaffray E, Hay RT, Davies AM (2000): **Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons.** *J Cell Biol*, **148**:325-332.
- Miki H, Miura K, Takenawa T (1996): **N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases.** *EMBO Journal*, **15**:5326-5335.
- Miller FD, Pozniak CD, Walsh GS (2000): **Neuronal life and death: an essential role for the p53 family.** *Cell Death Differ*, **7**:880-888.
- Miller FD, Kaplan DR (2001): **Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis.** *Cell Mol Life Sci*, **58**:1045-1053.

- Miller FD, Kaplan DR (2001): **On Trk for retrograde signaling.** *Neuron*, **32**:767-770.
- Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Niles WD, Gilchrist A, Hamm HE, Malik AB (2000): **Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway.** *J Cell Biol*, **150**:1057-1070.
- Mischel PS, Smith SG, Vining ER, Valletta JS, Mobley WC, Reichardt LF (2001): **The extracellular domain of p75NTR is necessary to inhibit neurotrophin-3 signaling through TrkA.** *J Biol Chem*, **276**:11294-11301.
- Mitra B, Hammes GG (1990): **Membrane-protein structural mapping of chloroplast coupling factor in asolectin vesicles.** *Biochemistry*, **29**:9879-9884.
- Miyazawa K, Toyama K, Gotoh A, Hendrie PC, Mantel C, Broxmeyer HE (1994): **Ligand-dependent polyubiquitination of c-kit gene product: a possible mechanism of receptor down modulation in M07e cells.** *Blood*, **83**:137-145.
- Mobley WC, Schenker A, Shooter EM (1976): **Characterization and isolation of proteolytically modified nerve growth factor.** *Biochemistry*, **15**:5543-5552.
- Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV (1995): **VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro.** *Molecular Biology of the Cell*, **6**:911-927.
- Montesano R, Roth J, Robert A, Orci L (1982): **Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins.** *Nature*, **296**:651-653.
- Moreau V, Way M (1998): **Cdc42 is required for membrane dependent actin polymerization in vitro.** *FEBS Lett*, **427**:353-356.
- Morgan EH (1981): **Inhibition of reticulocyte iron uptake by NH₄Cl and CH₃NH₂.** *Biochim Biophys Acta*, **642**:119-134.
- Mori S, Heldin CH, Claesson-Welsh L (1992): **Ligand-induced polyubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor.** *J Biol Chem*, **267**:6429-6434.
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA (2001): **Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor.** *J Biol Chem*, **276**:12660-12666.
- Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, Suvanto P, Hanaoka T, Li Y, Irie S, Greene LA, et al. (2000): **NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR.** *J Biol Chem*, **275**:17566-17570.
- Mundigl O, Ochoa G-C, David C, Kabanov AV, De Camilli P (1996): **Amphiphysin, a dynamin binding protein is implicated in the function of the actin based cytoskeleton.** *Molecular Biology of the Cell*, **7 Suppl.**:84a.
- Munn AL, Stevenson BJ, Geli MI, Riezman H (1995): **end5, end6, and end7: Mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in Saccharomyces cerevisiae.** *Molecular Biology of the Cell*, **6**:1721-1742.
- Muragaki Y, Timothy N, Leight S, Hempstead BL, Chao MV, Trojanowski JQ, Lee VM (1995): **Expression of trk receptors in the developing and adult human central and peripheral nervous system.** *J Comp Neurol*, **356**:387-397.
- Musacchio A, Smith CJ, Roseman AM, Harrison SC, Kirchhausen T, Pearse BM (1999): **Functional organization of clathrin in coats: combining electron cryomicroscopy and X-ray crystallography.** *Mol Cell*, **3**:761-770.
- Myat MM, Anderson S, Allen LA, Aderem A (1997): **MARCKS regulates membrane ruffling and cell spreading.** *Curr Biol*, **7**:611-614.
- Nakagawa H, Miki H, Ito M, Ohashi K, Takenawa T, Miyamoto S (2001): **N-WASP, WAVE and Mena play different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia.** *J Cell Sci*, **114**:1555-1565.
- Neet KE, Campenot RB (2001): **Receptor binding, internalization, and retrograde transport of neurotrophic factors.** *Cell Mol Life Sci*, **58**:1021-1035.
- Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J (2001): **Endocytosis without clathrin coats.** *Trends Cell Biol*, **11**:406-412.
- Ochoa GC, Slepnev VI, Neff L, Ringstad N, Takei K, Daniell L, Kim W, Cao H, McNiven M, Baron R, et al. (2000): **A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes.** *J Cell Biol*, **150**:377-389.
- Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE (1998): **Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium.** *Journal of Cell Biology*, **141**:101-114.
- Ohno H, Stewart J, Fournier MC, Bosshart H, Rhee I, Miyatake S, Saito T, Gallusser A, Kirchhausen T, Bonifacino JS (1995): **Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins.** *Science*, **269**:1872-1875.
- Ohrt TJ, A.; Hakim, C.; Mancini, A.; Tamura, T.; Niedenthal, R.: **Tyrosin phosphorylation-dependent signalling of neurotrophin receptor p75NTR.** In *6. Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS) and the study groups of the German Societies for Cell Biology (DGZ), Immunology (DGfI) and Biochemistry and Molecular Biology (GBM)*: 2002.
- Oppenheim RW (1991): **Cell death during development of the nervous system.** *Annu Rev Neurosci*, **14**:453-501.
- Orita S, Naito A, Sakaguchi G, Maeda M, Igarashi H, Sasaki T, Takai Y (1997): **Physical and functional interactions of Doc2 and Munc13 in Ca²⁺-dependent exocytotic**

- machinery.** *Journal of Biological Chemistry*, **272**:16081-16084.
- Paolini R, Kinet JP (1993): **Cell surface control of the multiubiquitination and deubiquitination of high-affinity immunoglobulin E receptors.** *Embo J*, **12**:779-786.
- Park JA, Lee JY, Sato TA, Koh JY (2000): **Co-induction of p75NTR and p75NTR-associated death executor in neurons after zinc exposure in cortical culture or transient ischemia in the rat.** *J Neurosci*, **20**:9096-9103.
- Parton RG, Joggerst B, Simons K (1994): **Regulated internalization of caveolae.** *Journal of Cell Biology*, **127**:1199-1215.
- Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E (1997): **Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation.** *Journal of Cell Biology*, **136**:137-154.
- Parton RG, Lindsay M (1999): **Exploitation of major histocompatibility complex class I molecules and caveolae by simian virus 40.** *Immunol Rev*, **168**:23-31.
- Patapoutian A, Reichardt LF (2001): **Trk receptors: mediators of neurotrophin action.** *Curr Opin Neurobiol*, **11**:272-280.
- Paves H, Neuman T, Metsis M, Saarma M (1988): **Nerve growth factor induces rapid redistribution of F-actin in PC12 cells.** *FEBS Lett*, **235**:141-143.
- Paves H, Neuman T, Metsis M, Saarma M (1990): **Nerve growth factor-induced rapid reorganization of microfilaments in PC12 cells: possible roles of different second messenger systems.** *Exp Cell Res*, **186**:218-226.
- Peiro S, Comella JX, Enrich C, Martin-Zanca D, Rocamora N (2000): **PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation.** *J Biol Chem*, **275**:37846-37852.
- Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A (2001): **Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER.** *Nat Cell Biol*, **3**:473-483.
- Pelkmans L, Helenius A (2002): **Endocytosis via caveolae.** *Traffic*, **3**:311-320.
- Pelkmans L, Puntener D, Helenius A (2002): **Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae.** *Science*, **296**:535-539.
- Piper RC, Luzio JP (2001): **Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies.** *Traffic*, **2**:612-621.
- Posern G, Saffrich R, Ansorge W, Feller SM (2000): **Rapid lamellipodia formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells is dependent on Rac and PI3K activity.** *J Cell Physiol*, **183**:416-424.
- Potts JTY, D.M.;Anfinsen, C.B.; (1963): *j biol chem*, **283**:2593-2594.
- Poussin C, Foti M, Carpentier JL, Pugin J (1998): **CD14-dependent endotoxin internalization via a macropinocytic pathway.** *J Biol Chem*, **273**:20285-20291.
- Puri V, Watanabe R, Singh RD, Dominguez M, Brown JC, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE (2001): **Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways.** *J Cell Biol*, **154**:535-547.
- Qualmann B, Roos J, DiGregorio PJ, Kelly RB (1999): **Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein.** *Molecular Biology of the Cell*, **10**:501-513.
- Qualmann B, Kelly RB (2000): **Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization.** *Journal of Cell Biology*, **148**:1047-1062.
- Qualmann B, Kessels MM, Kelly RB (2000): **Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton.** *J Cell Biol*, **150**:F111-116.
- Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE (1993): **Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor.** *Science*, **261**:345-348.
- Racoosin EL, Swanson JA (1992): **M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages.** *J Cell Sci*, **102**:867-880.
- Racoosin EL, Swanson JA (1993): **Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages.** *J Cell Biol*, **121**:1011-1020.
- Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM (1987): **Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor.** *Nature*, **325**:593-597.
- Radhakrishna H, Donaldson JG (1997): **ADP-Ribosylation Factor 6 Regulates a Novel Plasma Membrane Recycling Pathway.** *Journal of Cell Biology*, **139**:49-61.
- Raiborg C, Bache KG, Mehlum A, Stang E, Stenmark H (2001): **Hrs recruits clathrin to early endosomes.** *Embo J*, **20**:5008-5021.
- Raiborg C, Bremnes B, Mehlum A, Gillooly DJ, D'Arrigo A, Stang E, Stenmark H (2001): **FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes.** *J Cell Sci*, **114**:2255-2263.
- Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, Madshus IH, Stang E, Stenmark H (2002): **Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes.** *Nat Cell Biol*, **4**:394-398.
- Ramjaun AR, Micheva KD, Bouchelet I, McPherson PS (1997): **Identification and Characterization of a Nerve Terminal-enriched Amphiphysin Isoform.** *Journal of Biological Chemistry*, **272**:16700-16706.
- Raucher D, Sheetz MP (2000): **Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension.** *J Cell Biol*, **148**:127-136.

- Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, et al. (2001): **Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities.** *J Biol Chem*, **276**:38121-38138.
- Rettig J, Neher E (2002): **Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis.** *Science*, **298**:781-785.
- Reynolds AJ, Bartlett SE, Hendry IA (2000): **Molecular mechanisms regulating the retrograde axonal transport of neurotrophins.** *Brain Res Brain Res Rev*, **33**:169-178.
- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD (1999): **Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons.** *Science*, **286**:2358-2361.
- Richardson DR, Ponka P (1997): **The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells.** *Biochim Biophys Acta*, **1331**:1-40.
- Ridley AJ, Hall A (1992): **Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **57**:661-671.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992): **The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling.** *Cell*, **70**:401-410.
- Ridley AJ (1994): **Membrane ruffling and signal transduction.** *Bioessays*, **16**:321-327.
- Riezman H, Munn A, Geli MI, Hicke L (1996): **Actin-, myosin- and ubiquitin-dependent endocytosis.** *Experientia*, **52**:1033-1041.
- Ringstad N, Gad H, Low P, Di Paolo G, Brodin L, Shupliakov O, De Camilli P (1999): **Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis [In Process Citation].** *Neuron*, **24**:143-154.
- Ritter B, Modregger J, Paulsson M, Plomann M (1999): **PACSIN 2, a novel member of the PACSIN family of cytoplasmic adapter proteins.** *FEBS Lett*, **454**:356-362.
- Robinson PJ, Liu JP, Powell KA, Fykse EM, Südhof TC (1994): **Phosphorylation of dynamin I and synaptic-vesicle recycling.** *Trends in Neurosciences*, **17**:348-353.
- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA (1990): **Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor.** *Neuron*, **4**:487-492.
- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Gotz R, Barde YA (1992): **Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor.** *Embo J*, **11**:917-922.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J (1994): **Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras.** *Nature*, **370**:527-532.
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW (1999): **The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42- dependent signals to actin assembly.** *Cell*, **97**:221-231.
- Rolfs A, Hediger MA (1999): **Metal ion transporters in mammals: structure, function and pathological implications.** *J Physiol*, **518**:1-12.
- Roos FJ, Zimmermann A, Keller HU (1987): **Effect of phorbol myristate acetate and the chemotactic peptide fNLPNTL on shape and movement of human neutrophils.** *J Cell Sci*, **88**:399-406.
- Roos J, Kelly RB (1998): **Dap160, a neural-specific Eps15 homology and multiple SH3 domain- containing protein that interacts with Drosophila dynamin.** *Journal of Biological Chemistry*, **273**:19108-19119.
- Ross AH, Daou MC, McKinnon CA, Condon PJ, Lachyankar MB, Stephens RM, Kaplan DR, Wolf DE (1996): **The neurotrophin receptor, gp75, forms a complex with the receptor tyrosine kinase TrkA.** *Journal of Cell Biology*, **132**:945-953.
- Ross GM, Shamovsky IL, Lawrance G, Solc M, Dostaler SM, Weaver DF, Riopelle RJ (1998): **Reciprocal modulation of TrkA and p75NTR affinity states is mediated by direct receptor interactions.** *Eur J Neurosci*, **10**:890-898.
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG (1992): **Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats.** *Cell*, **68**:673-682.
- Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG (1999): **Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains.** *Nat Cell Biol*, **1**:98-105.
- Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MH, Insall RH, Roth MG, Luby-Phelps K, Marriott G, Hall A, Yin HL (2000): **Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3.** *Curr Biol*, **10**:311-320.
- Ryden M, Hempstead B, Ibanez CF (1997): **Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor.** *Journal of Biological Chemistry*, **272**:16322-16328.
- Salehi AH, Roux PP, Kubu CJ, Zeindler C, Bhakar A, Tannis LL, Verdi JM, Barker PA (2000): **NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis.** *Neuron*, **27**:279-288.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A (1995): **Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex**

- class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, **182**:389-400.**
- Sambrook J FE, Maniatis T: *Molecular cloning: A Laboratory Manual. Second Edition*; 1989.
- Samuels IS, Seibenhener ML, Neidigh KB, Wooten MW (2001): **Nerve growth factor stimulates the interaction of ZIP/p62 with atypical protein kinase C and targets endosomal localization: evidence for regulation of nerve growth factor-induced differentiation.** *J Cell Biochem*, **82**:452-466.
- Sandow SL, Heydon K, Weible MW, 2nd, Reynolds AJ, Bartlett SE, Hendry IA (2000): **Signalling organelle for retrograde axonal transport of internalized neurotrophins from the nerve terminal.** *Immunol Cell Biol*, **78**:430-435.
- Saragovi HU, Zheng W, Maliartchouk S, DiGuglielmo GM, Mawal YR, Kamen A, Woo SB, Cuello AC, Debeir T, Neet KE (1998): **A TrkA-selective, fast internalizing nerve growth factor-antibody complex induces trophic but not neurotogenic signals.** *Journal of Biological Chemistry*, **273**:34933-34940.
- Schliwa M, Nakamura T, Porter KR, Euteneuer U (1984): **A tumor promoter induces rapid and coordinated reorganization of actin and vinculin in cultured cells.** *J Cell Biol*, **99**:1045-1059.
- Schmid SL (1997): **Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process.** *Annual Review of Biochemistry*, **66**:511-548.
- Schmid SL, McNiven MA, De Camilli P (1998): **Dynamin and its partners: a progress report.** *Current Opinion in Cell Biology*, **10**:504-512.
- Schmidt A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB, Söling HD (1999): **Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid.** *Nature*, **401**:133-141.
- Schnitzer JE, Liu J, Oh P (1995): **Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases.** *Journal of Biological Chemistry*, **270**:14399-14404.
- Seastone DJ, Lee E, Bush J, Knecht D, Cardelli J (1998): **Overexpression of a novel rho family GTPase, RacC, induces unusual actin-based structures and positively affects phagocytosis in Dictyostelium discoideum.** *Mol Biol Cell*, **9**:2891-2904.
- Seki K, Sheu FS, Huang KP (1996): **Binding of myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate to phosphoinositides attenuates the phosphorylation by protein kinase C.** *Arch Biochem Biophys*, **326**:193-201.
- Sengar AS, Wang W, Bishay J, Cohen S, Egan SE (1999): **The EH and SH3 domain Ese proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15.** *EMBO Journal*, **18**:1159-1171.
- Sever S, Muhlberg AB, Schmid SL (1999): **Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis.** *Nature*, **398**:481-486.
- Sever S, Damke H, Schmid SL (2000): **Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test.** *Traffic*, **1**:385-392.
- Sham RL, Packman CH, Abboud CN, Lichtman MA (1991): **Signal transduction and the regulation of actin conformation during myeloid maturation: studies in HL60 cells.** *Blood*, **77**:363-370.
- Shao Y, Akmentin W, Toledo-Aral JJ, Rosenbaum J, Valdez G, Cabot JB, Hilbush BS, Halegoua S (2002): **Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes.** *J Cell Biol*, **157**:679-691.
- Sheff DR, Daro EA, Hull M, Mellman I (1999): **The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions.** *J Cell Biol*, **145**:123-139.
- Shen S, Wiemelt AP, McMorris FA, Barres BA (1999): **Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy.** *Neuron*, **23**:285-295.
- Shi ZQ, Yu DH, Park M, Marshall M, Feng GS (2000): **Molecular mechanism for the Shp-2 tyrosine phosphatase function in promoting growth factor stimulation of Erk activity.** *Mol Cell Biol*, **20**:1526-1536.
- Shih A, Laramee GR, Schmelzer CH, Burton LE, Winslow JW (1994): **Mutagenesis identifies amino-terminal residues of nerve growth factor necessary for Trk receptor binding and biological activity.** *J Biol Chem*, **269**:27679-27686.
- Shupliakov O, Low P, Grabs D, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De Camilli P, Brodin L (1997): **Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions.** *Science*, **276**:259-263.
- Simons K, Toomre D (2000): **Lipid rafts and signal transduction.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**:31-39.
- Skaper SD, Floreani M, Negro A, Facci L, Giusti P (1998): **Neurotrophins rescue cerebellar granule neurons from oxidative stress-mediated apoptotic death: selective involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway.** *J Neurochem*, **70**:1859-1868.
- Slepnev VI, De Camilli P (2000): **Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis.** *Nat Rev Neurosci*, **1**:161-172.
- Small JV (1988): **The actin cytoskeleton.** *Electron Microsc Rev*, **1**:155-174.
- Smith CJ, Pearse BM (1999): **Clathrin: anatomy of a coat protein.** *Trends Cell Biol*, **9**:335-338.
- Sobue K, Fujio Y, Kanda K (1988): **Tumor promoter induces reorganization of actin filaments and caldesmon (fodrin or nonerythroid spectrin) in 3T3 cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**:482-486.

- Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC (2001): **Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair.** *Annu Rev Neurosci*, **24**:1217-1281.
- Sonnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M (2000): **Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11.** *J Cell Biol*, **149**:901-914.
- Sorkin A, Di Fiore PP, Carpenter G (1993): **The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired.** *Oncogene*, **8**:3021-3028.
- Sorkin A, Waters CM (1993): **Endocytosis of growth factor receptors.** *Bioessays*, **15**:375-382.
- Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, Glass DJ, Masiakowski P, Furth ME, Valenzuela DM, et al. (1991): **trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor.** *Cell*, **65**:885-893.
- Stahl PD, Barbieri MA (2002): **Multivesicular bodies and multivesicular endosomes: the "ins and outs" of endosomal traffic.** *Sci STKE*, **2002**:PE32.
- Stan RV, Roberts WG, Predescu D, Ihida K, Saucan L, Ghitescu L, Palade GE (1997): **Immunoisolation and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles (caveolae).** *Mol Biol Cell*, **8**:595-605.
- Stan RV, Ghitescu L, Jacobson BS, Palade GE (1999): **Isolation, cloning, and localization of rat PV-1, a novel endothelial caveolar protein.** *J Cell Biol*, **145**:1189-1198.
- Steinman RM, Swanson J (1995): **The endocytic activity of dendritic cells.** *J Exp Med*, **182**:283-288.
- Stossel TP (1993): **On the crawling of animal cells.** *Science*, **260**:1086-1094.
- Stowell MH, Marks B, Wigge P, McMahon HT (1999): **Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring.** *Nat Cell Biol*, **1**:27-32.
- Strittmatter SM, Fankhauser C, Huang PL, Mashimo H, Fishman MC (1995): **Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43.** *Cell*, **80**:445-452.
- Strous GJ, Van Kerkhof P, Govers R, Ciechanover A, Schwartz AL (1996): **The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor.** *EMBO Journal*, **15**:3806-3812.
- Susen K, Heumann R, Blochl A (1999): **Nerve growth factor stimulates MAPK via the low affinity receptor p75(LNTR).** *FEBS Lett*, **463**:231-234.
- Swanson JA (1989): **Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages.** *J Cell Sci*, **94**:135-142.
- Swanson JA, Watts C (1995): **Macropinocytosis.** *Trends in Cell Biology*, **5**:424-428.
- Takei K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P (1995): **Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTPγS in nerve terminals.** *Nature*, **374**:186-190.
- Takei K, Mundigl O, Daniell L, De Camilli P (1996): **The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin.** *Journal of Cell Biology*, **133**:1237-1250.
- Takenawa T, Miki H (2001): **WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement.** *J Cell Sci*, **114**:1801-1809.
- Tebar F, Sorkina T, Sorkin A, Ericsson M, Kirchhausen T (1996): **Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits.** *Journal of Biological Chemistry*, **271**:28727-28730.
- Tebar F, Bohlander SK, Sorkin A (1999): **Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukemia (CALM) Protein: Localization in Endocytic-coated Pits, Interactions with Clathrin, and the Impact of Overexpression on Clathrin-mediated Traffic.** *Mol Biol Cell*, **10**:2687-2702.
- Temesvari L, Zhang L, Fodera B, Janssen KP, Schleicher M, Cardelli JA (2000): **Inactivation of ImpA, encoding a LIMPII-related endosomal protein, suppresses the internalization and endosomal trafficking defects in profilin-null mutants.** *Mol Biol Cell*, **11**:2019-2031.
- Tepper CG, Jayadev S, Liu B, Bielawska A, Wolff R, Yonehara S, Hannun YA, Seldin MF (1995): **Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**:8443-8447.
- Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem A (1991): **Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane.** *Nature*, **351**:320-322.
- Thoenen H (1995): **Neurotrophins and neuronal plasticity.** *Science*, **270**:593-598.
- Thomas C, Deak M, Alessi D, van Aalten D (2002): **High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate.** *Curr Biol*, **12**:1256.
- Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M, van Deurs B (2002): **Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking.** *Mol Biol Cell*, **13**:238-250.
- Tong XK, Hussain NK, de Heuvel E, Kurakin A, Abi-Jaoude E, Quinn CC, Olson MF, Marais R, Baranes D, Kay BK, et al. (2000): **The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras**

- exchange factor mSos1 in rat brain. *Embo J*, **19**:1263-1271.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**:4350-4354.
- Traub LM, Downs MA, Westrich JL, Fremont DH (1999): **Crystal structure of the alpha appendage of AP-2 reveals a recruitment platform for clathrin-coat assembly.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**:8907-8912.
- Troy CM, Rabacchi SA, Xu Z, Maroney AC, Connors TJ, Shelanski ML, Greene LA (2001): **beta-Amyloid-induced neuronal apoptosis requires c-Jun N-terminal kinase activation.** *J Neurochem*, **77**:157-164.
- Tsui-Pierchala BA, Ginty DD (1999): **Characterization of an NGF-P-TrkA retrograde-signaling complex and age-dependent regulation of TrkA phosphorylation in sympathetic neurons.** *J Neurosci*, **19**:8207-8218.
- Tucker KL, Meyer M, Barde YA (2001): **Neurotrophins are required for nerve growth during development.** *Nat Neurosci*, **4**:29-37.
- Ullrich B, Li C, Zhang JZ, McMahon H, Anderson RG, Geppert M, Südhof TC (1994): **Functional properties of multiple synaptotagmins in brain.** *Neuron*, **13**:1281-1291.
- Ungewickell E (1999): **Wrapping the package.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**:8809-8810.
- Urdiales JL, Becker E, Andrieu M, Thomas A, Jullien J, van Grunsven LA, Menut S, Evan GI, Martin-Zanca D, Rudkin BB (1998): **Cell cycle phase-specific surface expression of nerve growth factor receptors TrkA and p75(NTR).** *J Neurosci*, **18**:6767-6775.
- Urfer R, Tsoulfas P, Soppet D, Escandon E, Parada LF, Presta LG (1994): **The binding epitopes of neurotrophin-3 to its receptors trkC and gp75 and the design of a multifunctional human neurotrophin.** *Embo J*, **13**:5896-5909.
- Vaillant AR, Mazzoni I, Tudan C, Boudreau M, Kaplan DR, Miller FD (1999): **Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival.** *J Cell Biol*, **146**:955-966.
- van Renswoude J, Bridges KR, Harford JB, Klausner RD (1982): **Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells: identification of a nonlysosomal acidic compartment.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**:6186-6190.
- Vandenplas ML, Mamidipudi V, Lamar Seibenhener M, Wooten MW (2002): **Nerve growth factor activates kinases that phosphorylate atypical protein kinase C.** *Cell Signal*, **14**:359-363.
- Venkatakrishnan G, McKinnon CA, Pilapil CG, Wolf DE, Ross AH (1991): **Nerve growth factor receptors are preaggregated and immobile on responsive cells.** *Biochemistry*, **30**:2748-2753.
- Verdi JM, Birren SJ, Ibanez CF, Persson H, Kaplan DR, Benedetti M, Chao MV, Anderson DJ (1994): **p75LNGFR regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells.** *Neuron*, **12**:733-745.
- Verkade P, Harder T, Lafont F, Simons K (2000): **Induction of Caveolae in the Apical Plasma Membrane of Madin-Darby Canine Kidney Cells.** *J Cell Biol*, **148**:727-740.
- Vesa J, Kruttgen A, Shooter EM (2000): **p75 reduces TrkB tyrosine autophosphorylation in response to brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 4/5.** *J Biol Chem*, **275**:24414-24420.
- Virdee K, Xue L, Hemmings BA, Goemans C, Heumann R, Tolkovsky AM (1999): **Nerve growth factor-induced PKB/Akt activity is sustained by phosphoinositide 3-kinase dependent and independent signals in sympathetic neurons.** *Brain Res*, **837**:127-142.
- von Bartheld CS, Williams R, Lefcort F, Clary DO, Reichardt LF, Bothwell M (1996): **Retrograde transport of neurotrophins from the eye to the brain in chick embryos: roles of the p75NTR and trkB receptors.** *Journal of Neuroscience*, **16**:2995-3008.
- von Schack D, Casademunt E, Schweigreiter R, Meyer M, Bibel M, Dechant G (2001): **Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes defects both in the nervous and the vascular system.** *Nat Neurosci*, **4**:977-978.
- Wallace PJ, Packman CH, Wersto RP, Lichtman MA (1987): **The effects of sulfhydryl inhibitors and cytochalasin on the cytoplasmic and cytoskeletal actin of human neutrophils.** *J Cell Physiol*, **132**:325-330.
- Wang YL (1985): **Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling.** *J Cell Biol*, **101**:597-602.
- Ware CF, VanArsdale S, VanArsdale TL (1996): **Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families.** *J Cell Biochem*, **60**:47-55.
- Watson FL, Heerssen HM, Moheban DB, Lin MZ, Sauvageot CM, Bhattacharyya A, Pomeroy SL, Segal RA (1999): **Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex.** *J Neurosci*, **19**:7889-7900.
- Wechsler-Reya R, Sakamuro D, Zhang J, Duhadaway J, Prendergast GC (1997): **Structural analysis of the human BIN1 gene. Evidence for tissue-specific transcriptional regulation and alternate RNA splicing.** *J Biol Chem*, **272**:31453-31458.
- Weible MW, 2nd, Bartlett SE, Reynolds AJ, Hendry IA (2001): **Prolonged recycling of**

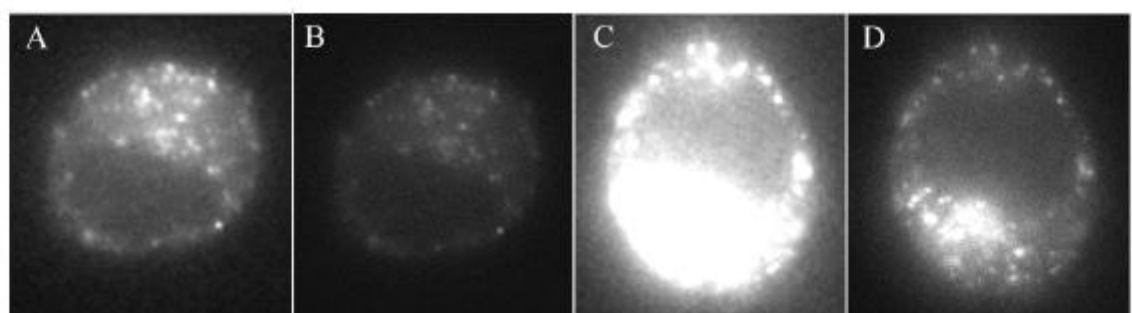
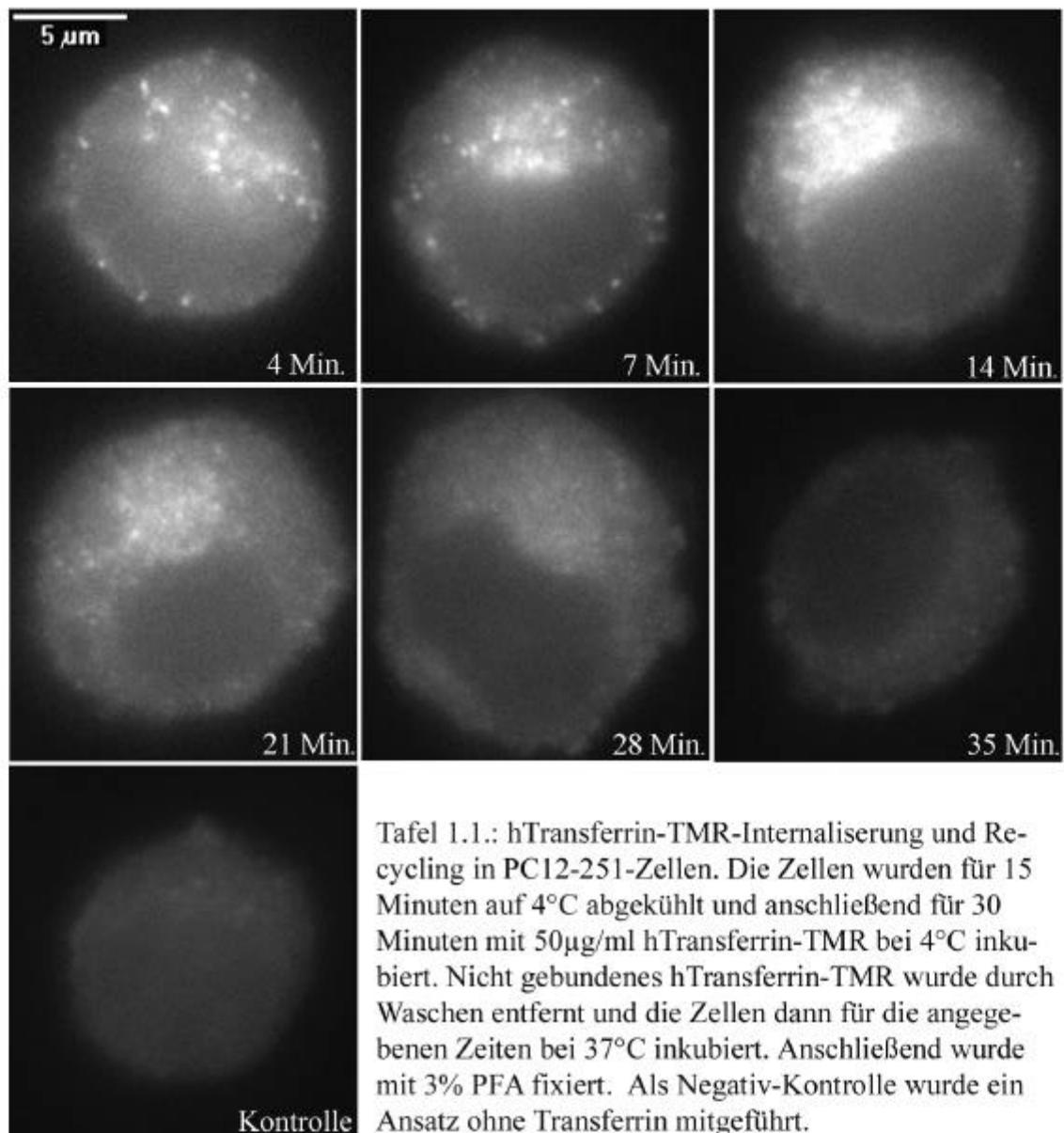
- internalized neurotrophins in the nerve terminal.** *Cytometry*, **43**:182-188.
- Weissman AM (2001): **Themes and variations on ubiquitylation.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**:169-178.
- Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ (1997): **The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly.** *Journal of Cell Biology*, **138**:375-384.
- Wendland B, Steece KE, Emr SD (1999): **Yeast epsins contain an essential N-terminal ENTH domain, bind clathrin and are required for endocytosis.** *Embo J*, **18**:4383-4393.
- Wennstrom S, Siegbahn A, Yokote K, Arvidsson AK, Heldin CH, Mori S, Claesson-Welsh L (1994): **Membrane ruffling and chemotaxis transduced by the PDGF beta-receptor require the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase.** *Oncogene*, **9**:651-660.
- Weskamp G, Reichardt LF (1991): **Evidence that biological activity of NGF is mediated through a novel subclass of high affinity receptors.** *Neuron*, **6**:649-663.
- West MA, Prescott AR, Eskelinen EL, Ridley AJ, Watts C (2000): **Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation.** *Curr Biol*, **10**:839-848.
- Wiese S, Digby MR, Gunnarsen JM, Gotz R, Pei G, Holtmann B, Lowenthal J, Sendtner M (1999): **The anti-apoptotic protein ITA is essential for NGF-mediated survival of embryonic chick neurons.** *Nat Neurosci*, **2**:978-983.
- Wiesmann C, Ultsch MH, Bass SH, de Vos AM (1999): **Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor.** *Nature*, **401**:184-188.
- Wigge P, Kohler K, Vallis Y, Doyle CA, Owen D, Hunt SP, McMahon HT (1997): **Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis.** *Mol Biol Cell*, **8**:2003-2015.
- Witke W, Podtelejnikov AV, Di Nardo A, Sutherland JD, Gurniak CB, Dotti C, Mann M (1998): **In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly.** *EMBO Journal*, **17**:967-976.
- Woo SB, Timm DE, Neet KE (1995): **Alteration of NH2-terminal residues of nerve growth factor affects activity and Trk binding without affecting stability or conformation.** *J Biol Chem*, **270**:6278-6285.
- Wooten MW, Seibenhener ML, Mamidipudi V, Diaz-Meco MT, Barker PA, Moscat J (2001): **The atypical protein kinase C-interacting protein p62 is a scaffold for NF-kappaB activation by nerve growth factor.** *J Biol Chem*, **276**:7709-7712.
- Wu C, Butz S, Ying Y, Anderson RG (1997): **Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane.** *Journal of Biological Chemistry*, **272**:3554-3559.
- Wu C, Lai CF, Mobley WC (2001): **Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes.** *J Neurosci*, **21**:5406-5416.
- Wymann MP, Pirola L (1998): **Structure and function of phosphoinositide 3-kinases.** *Biochim Biophys Acta*, **1436**:127-150.
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996): **Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase.** *Science*, **273**:959-963.
- Xu J, Ziemnicka D, Merz GS, Kotula L (2000): **Human spectrin Src homology 3 domain binding protein 1 regulates macropinocytosis in NIH 3T3 cells.** *J Cell Sci*, **113 Pt 21**:3805-3814.
- Yaar M, Zhai S, Pilch PF, Doyle SM, Eisenhauer PB, Fine RE, Gilchrest BA (1997): **Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease.** *J Clin Invest*, **100**:2333-2340.
- Yaar M, Zhai S, Fine RE, Eisenhauer PB, Arble BL, Stewart KB, Gilchrest BA (2002): **Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling.** *J Biol Chem*, **277**:7720-7725.
- Yamada M, Ohnishi H, Sano S, Araki T, Nakatani A, Ikeuchi T, Hatanaka H (1999): **Brain-derived neurotrophic factor stimulates interactions of Shp2 with phosphatidylinositol 3-kinase and Grb2 in cultured cerebral cortical neurons.** *J Neurochem*, **73**:41-49.
- Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, Mori K, Negishi M (2001): **RhoA Inhibits the Nerve Growth Factor-induced Rac1 Activation through Rho-associated Kinase-dependent Pathway.** *J Biol Chem*, **276**:18977-18983.
- Yamashiro DJ, Tycko B, Fluss SR, Maxfield FR (1984): **Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway.** *Cell*, **37**:789-800.
- Yamashita T, Tucker KL, Barde YA (1999): **Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth.** *Neuron*, **24**:585-593.
- Yan CY, Greene LA (1998): **Prevention of PC12 cell death by N-acetylcysteine requires activation of the Ras pathway.** *J Neurosci*, **18**:4042-4049.
- Yan Q, Elliott JL, Matheson C, Sun J, Zhang L, Mu X, Rex KL, Snider WD (1993): **Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons in vivo.** *J Neurobiol*, **24**:1555-1577.
- Yasui H, Katoh H, Yamaguchi Y, Aoki J, Fujita H, Mori K, Negishi M (2001): **Differential responses to nerve growth factor and epidermal growth factor in neurite outgrowth of pc12 cells are determined by rac1 activation systems.** *J Biol Chem*, **276**:15298-15305.

- Ye W, Lafer EM (1995): **Bacterially expressed F1-20/AP-3 assembles clathrin into cages with a narrow size distribution: implications for the regulation of quantal size during neurotransmission.** *Journal of Neuroscience Research*, **41**:15-26.
- Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, Shin H, Wang JJ, Leo E, Zapata J, Hauser CA, et al. (1999): **TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction.** *J Biol Chem*, **274**:30202-30208.
- Yee NS, Hsiao CW, Serve H, Vosseller K, Besmer P (1994): **Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C.** *J Biol Chem*, **269**:31991-31998.
- Yoon SO, Casaccia-Bonnett P, Carter B, Chao MV (1998): **Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival.** *J Neurosci*, **18**:3273-3281.
- York RD, Molliver DC, Grewal SS, Stenberg PE, McCleskey EW, Stork PJ (2000): **Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1.** *Mol Cell Biol*, **20**:8069-8083.
- Zaccaro MC, Ivanisevic L, Perez P, Meakin SO, Saragovi HU (2001): **p75 Co-receptors regulate ligand-dependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering Trk docking subdomains.** *J Biol Chem*, **276**:31023-31029.
- Zapf-Colby A, Olefsky JM (1998): **Nerve growth factor processing and trafficking events following TrkA-mediated endocytosis.** *Endocrinology*, **139**:3232-3240.
- Zeng G, Cai M (1999): **Regulation of the actin cytoskeleton organization in yeast by a novel serine/threonine kinase Prk1p.** *J Cell Biol*, **144**:71-82.
- Zhang JZ, Davletov BA, Sudhof TC, Anderson RG (1994): **Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling.** *Cell*, **78**:751-760.
- Zhang Y, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA (2000): **Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation.** *J Neurosci*, **20**:5671-5678.
- Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ, Pittman RN (1998): **Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis.** *J Biol Chem*, **273**:16568-16575.
- Zimmerman SB, Sundeen G (1965): *Anal Biochem*, **10**:444-449.
- Zundel W, Swiersz LM, Giaccia A (2000): **Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide.** *Mol Cell Biol*, **20**:1507-1514.

Anhang I

Anhang I enthält die im Text mit “Tafel” bezeichneten Abbildungen:

Tafel 1.1. bis Tafel 5. 31.

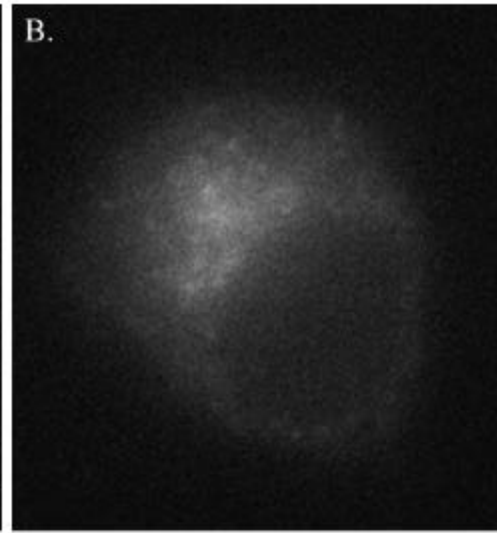
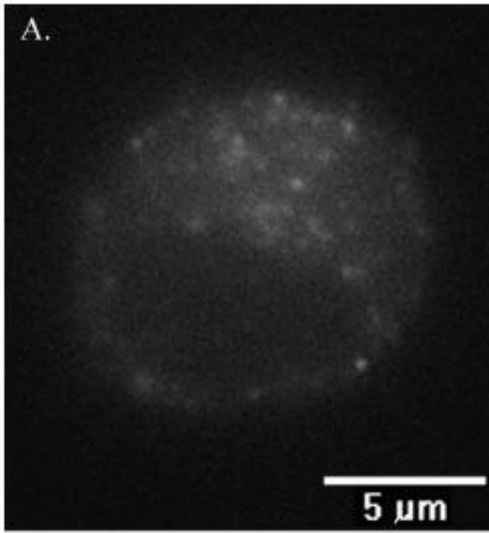


Die Bilder A-D wurden aus Tafel 1.2. entnommen und zeigen hTransferrin-TMR-Aufnahme nach 5 Minuten chase. A und B zeigt eine Kontroll-Zelle (Tafel 1.2. A) und C und D eine NGF-behandelte Zelle (Tafel 1.2. I). A und C sind in der Helligkeit dargestellt, die der Helligkeit der Zellen in dieser Abbildung (siehe oben) entspricht. B und D zeigen dieselben Zellen in der Helligkeit, die für Tafel 1.2. gewählt wurde, um NGF-behandelte Zellen besser darstellen zu können.

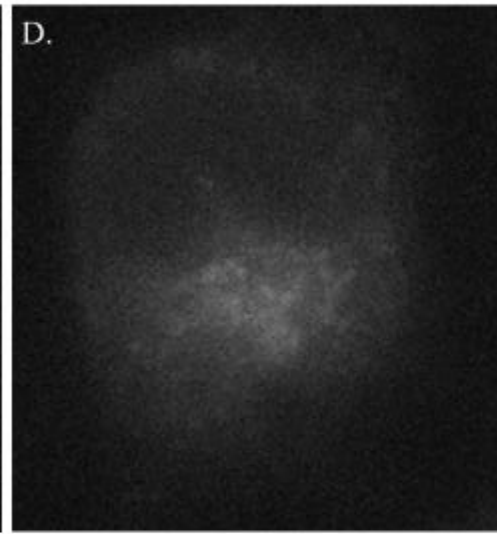
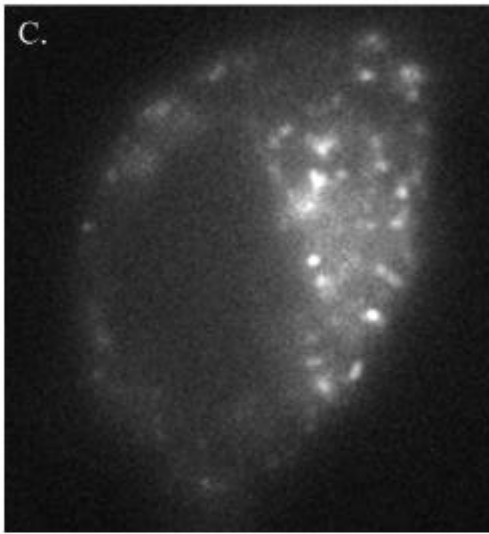
5 Minuten

15 Minuten

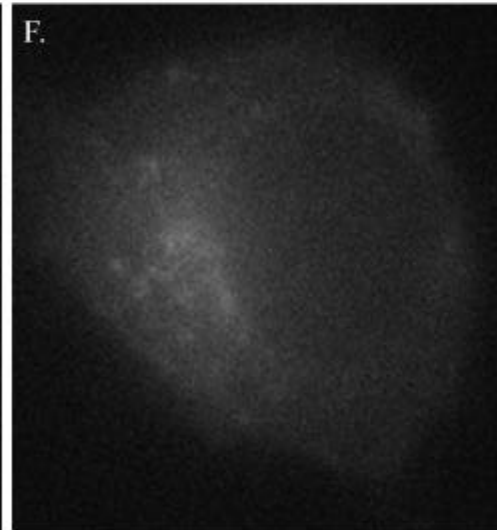
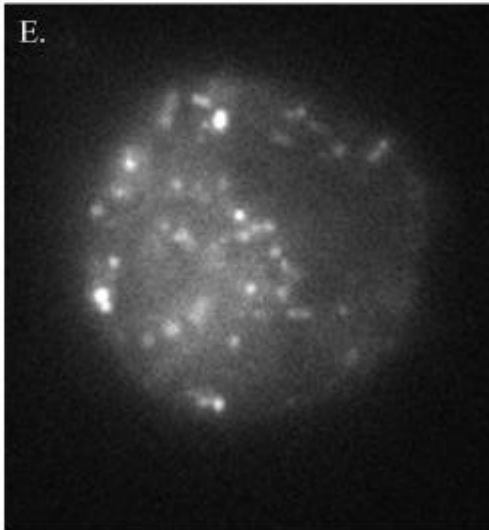
Kontrolle

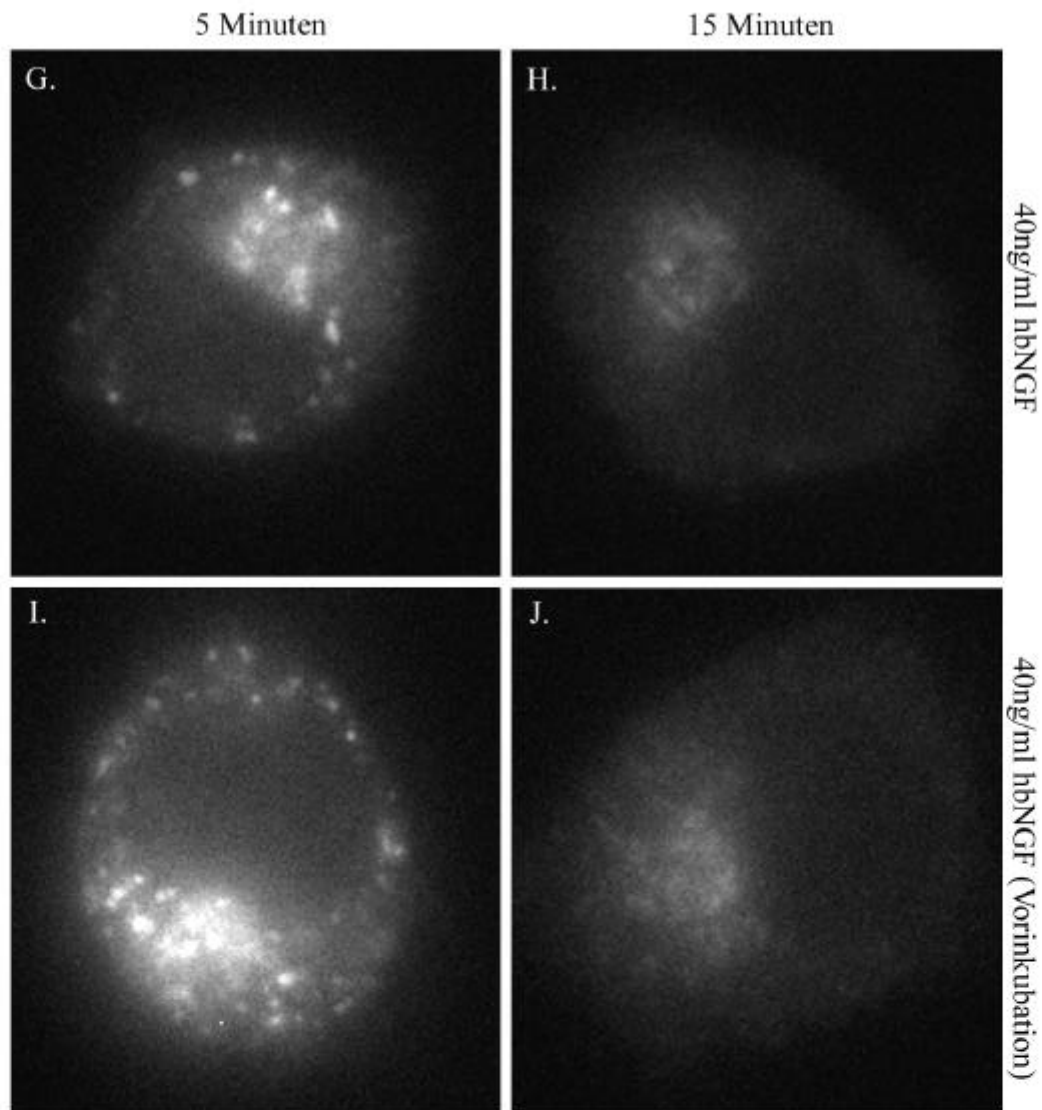


10ng/ml hbNGF

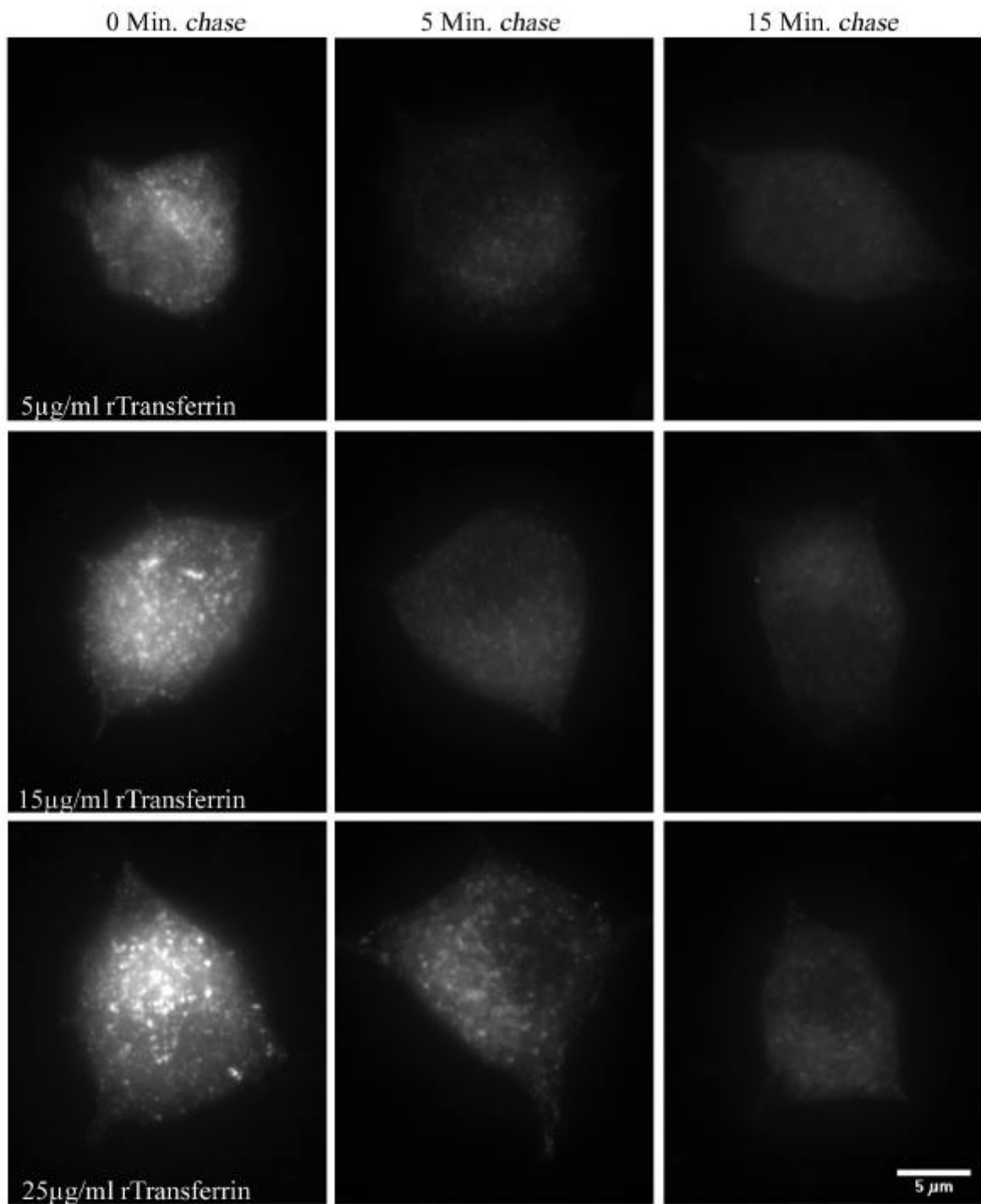


10ng/ml hbNGF (Vorinkubation)

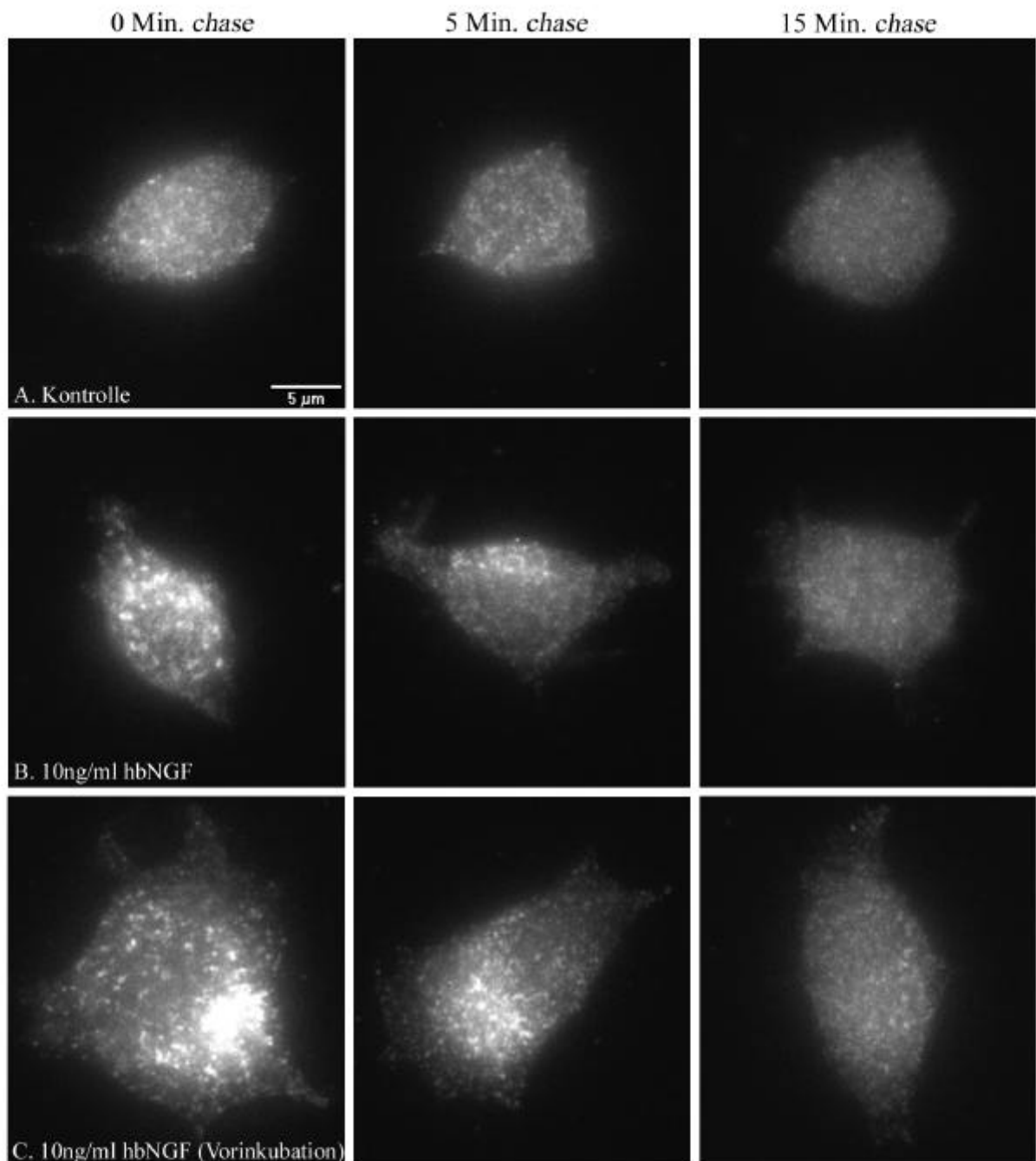




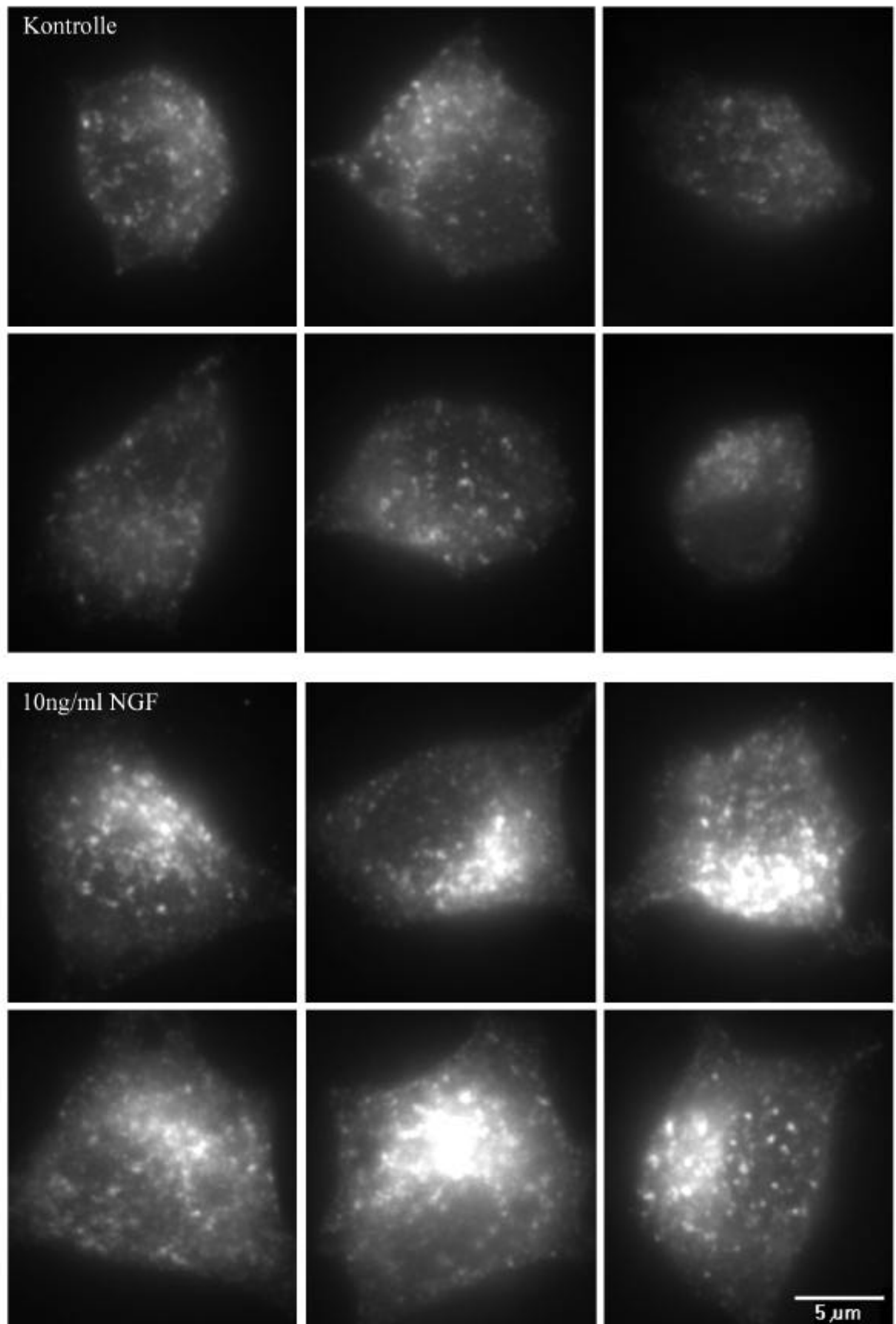
Tafel 1.2.: hbNGF induziert eine Erhöhung der hTransferrin-TMR-Aufnahme in PC12-251-Zellen. Die Zellen wurden 20 Minuten ohne (A,B,C,D,G,H) oder mit 10ng/ml hbNGF (E,F) bzw. 40ng/ml hbNGF (I,J) bei 37°C inkubiert, für 15 Minuten bei 4°C abgekühlt, gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit 50µg/ml Transferrin-TMR in Abwesenheit (A,B) oder Gegenwart von 10ng/ml hbNGF (C,D,E,F) bzw. 40ng/ml hbNGF (G,H,I,J) bei 4°C inkubiert. Ungebundenes Transferrin wurde durch Waschen entfernt und die Zellen für fünf (A,C,E, G,I) bzw. 15 Minuten (B,D,F,H,J) in Anwesenheit der entsprechenden Konzentrationen an hbNGF bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert. Die Helligkeit der Bilder wurde im Vergleich zu Abbildung.1.1. herabgesetzt, um die hbNGF-induzierte Erhöhung der hTransferrin-TMR-Internalisierung darstellen zu können (vgl. Abb. 1.1.)



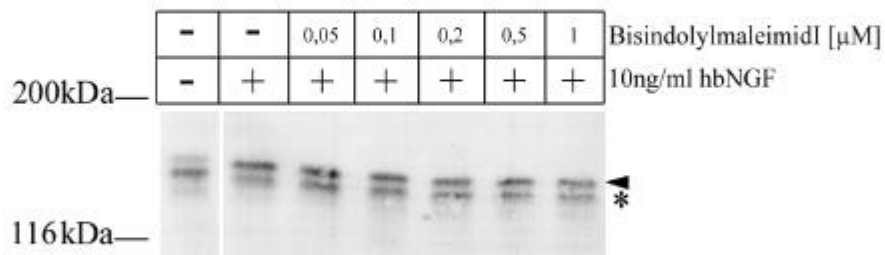
Tafel 1.3.: Aufnahme von ansteigenden Konzentrationen an rTransferrin in *pulse-chase*-Experimenten. PC12-251-Zellen wurden für 30 Minuten im Versuchsmedium und anschließend mit 5, 15 oder 25 $\mu\text{g/ml}$ rTransferrin für 5 Minuten bei 37°C inkubiert (*pulse*). Überschüssiges rTransferrin wurde durch Waschen entfernt und die Zellen für den angegebenen Zeitraum inkubiert (*chase*). Dann wurde mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit dem anti- rTransferrin Antikörper (1:200) gefärbt. Der Nachweis erfolgte über einen fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper. Die 30-minütige Vorinkubation sollte Transferrin aus dem Serum des Vollmediums entfernen. Wie sich in weiteren Experimenten herausstellte, war dieser Schritt nicht notwendig.



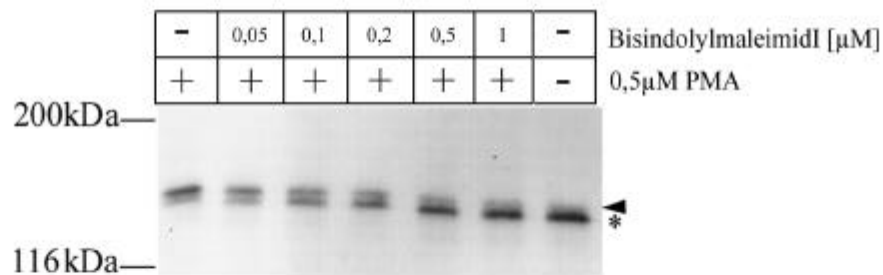
Tafel 1.4.: Durch 20-minütige Vorinkubation mit hbNGF konnte die Erhöhung der rTransferrin-Internalisierung im Vergleich zu gleichzeitig mit rTransferrin zugegebenen hbNGF gesteigert werden. PC12-251-Zellen wurden für 20 Minuten ohne (A, B) oder mit 10ng/ml hbNGF (C) bei 37°C inkubiert. Dann wurde 15μg/ml rTransferrin (A, C) bzw. 15μg/ml rTransferrin und 10ng/ml hbNGF (B) für fünf Minuten zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde gewaschen und die Zellen für den angegebenen Zeitraum ohne rTransferrin, aber mit den entsprechenden Mengen an hbNGF weiter inkubiert. Dann wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, mit TX-100 permeabilisiert und mit dem anti-rTransferrin Antikörper gefärbt. Der Nachweis erfolgte über einen sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörper. Diese Bilder wurden mit einer niedrigeren Belichtungszeit aufgenommen, als die Bilder aus Tafel 1.3.. Deshalb ist hier der Hintergrund im Vergleich zu Tafel 1.3. erhöht.



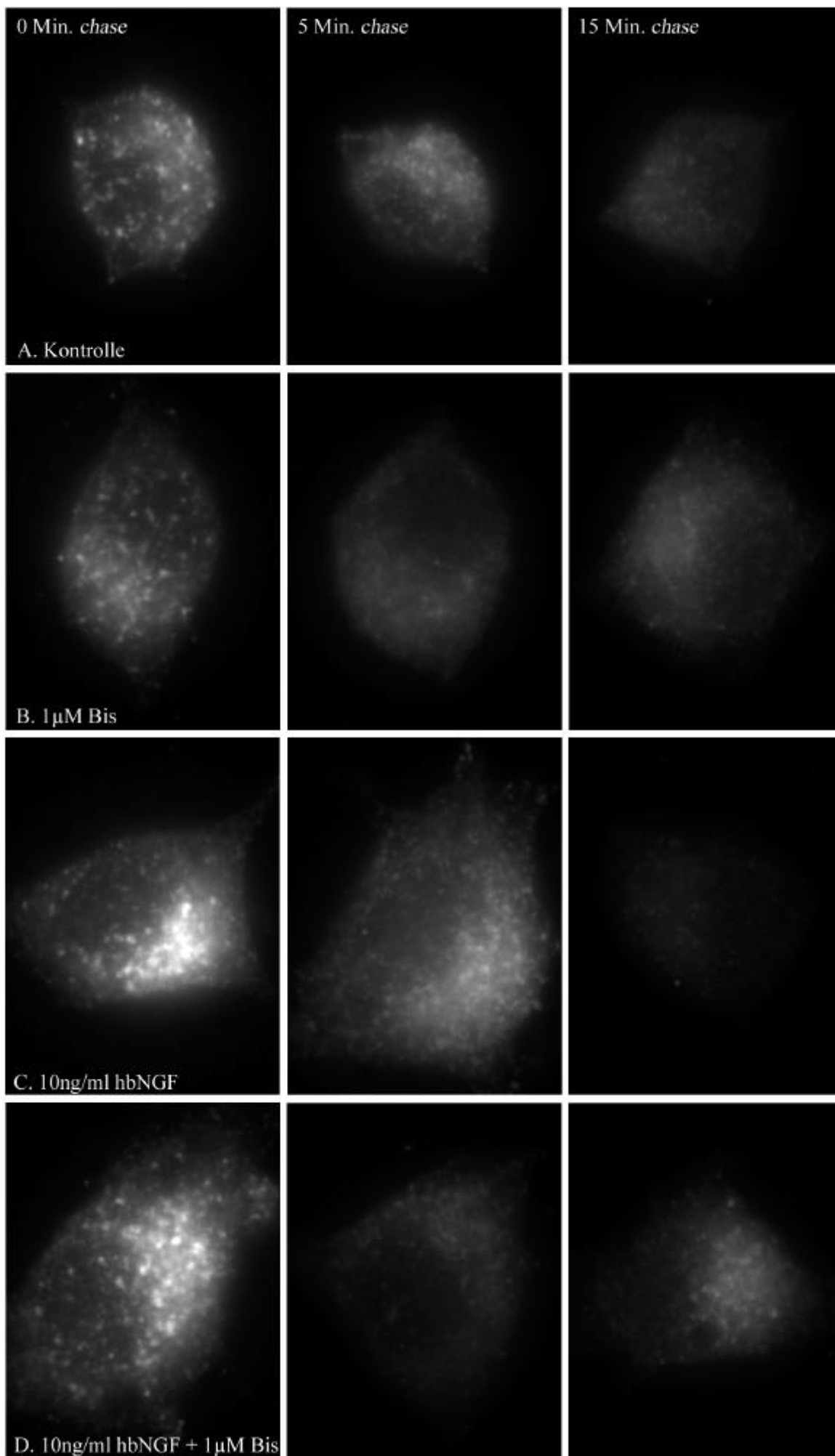
Tafel 1.5.: Heterogenität der rTransferrin-Aufnahme. Dargestellt sind je sechs Beispiele für Kontroll-Zellen (oben) und NGF-behandelte Zellen (unten). PC12-251-Zellen wurden für 5 Minuten mit 15μg/ml rTransferrin ohne (Kontrolle) oder mit 10ng/ml hbNGF inkubiert, anschließend gewaschen, mit 3% PFA fixiert und TX-100 permeabilisiert. rTransferrin wurde mit dem anti-rTransferrin-Antikörper gefärbt und mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen.

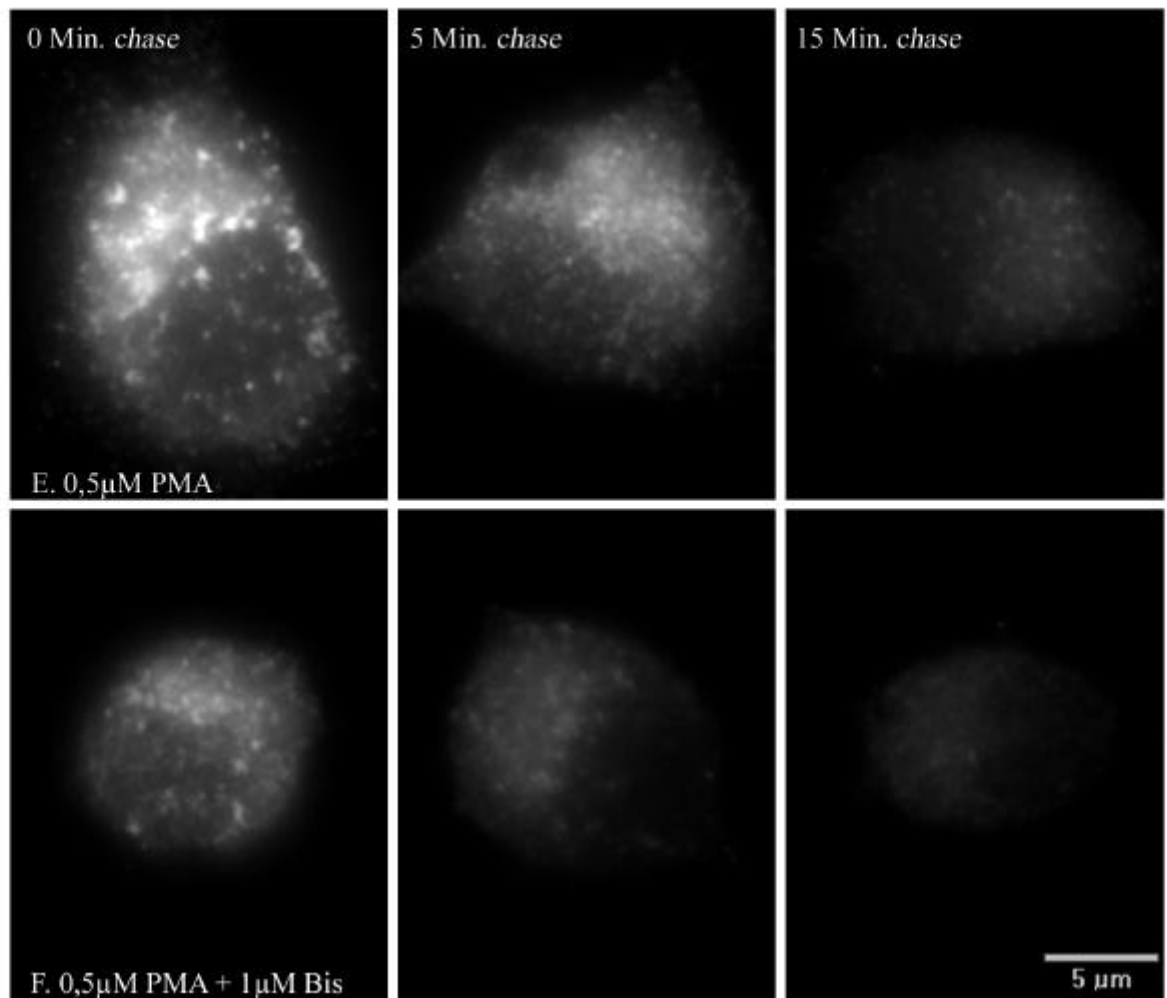


B.



Tafel 1.6.: Bisindolylmaleimid-I hemmt die PMA- aber nicht die NGF-induzierte Phosphorylierung von Amphiphysin-I. PC12-251-Zellen wurden für 20 Minuten ohne (-) oder mit den angegebenen Konzentrationen an Bisindolylmaleimid-I bei 37°C inkubiert. Dann wurden 10ng/ml NGF (A) bzw. 0,5 μ M PMA (B) zugegeben oder die Zellen ohne weitere Zusätze (-) für weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1x Laemmli-Auftragspuffer lysiert, auf einem 5,5% SDS-PAA-Gel getrennt, auf Nitrozellulose transferiert und Amphiphysin-I mit einem Antikörper (9445, 1:500) gefärbt. Der Nachweis erfolgte über einen sekundären Alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörper. Das hyperphosphorylierte Amphiphysin-I ist mit einem Pfeil, die niedriger phosphorylierte Form mit einem Stern (*) gekennzeichnet.





Tafel 1.7.: Bisindolylmaleimid-I inhibiert die PMA- und NGF-induzierte Erhöhung der rTransferrin-Endozytose. PC12-251-Zellen wurden für 20 Minuten ohne (A, C, E) oder mit 1 μM Bisindolylmaleimid-I (Bis: B,D,F) inkubiert, dann wurde 10ng/ml hbNGF (C, D), bzw. 0,5 μM PMA (E, F) zugegeben und für weitere 20 Minuten inkubiert. Als nächstes wurde für 5 Minuten 15 μg/ml rTransferrin zugegeben, dann gewaschen und für den angegebenen Zeitraum inkubiert. Anschließend wurde mit 3%PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen rTransferrin gefärbt. Der Nachweis erfolgte über einen sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörper. Alle Inkubationen wurden bei 37°C durchgeführt.

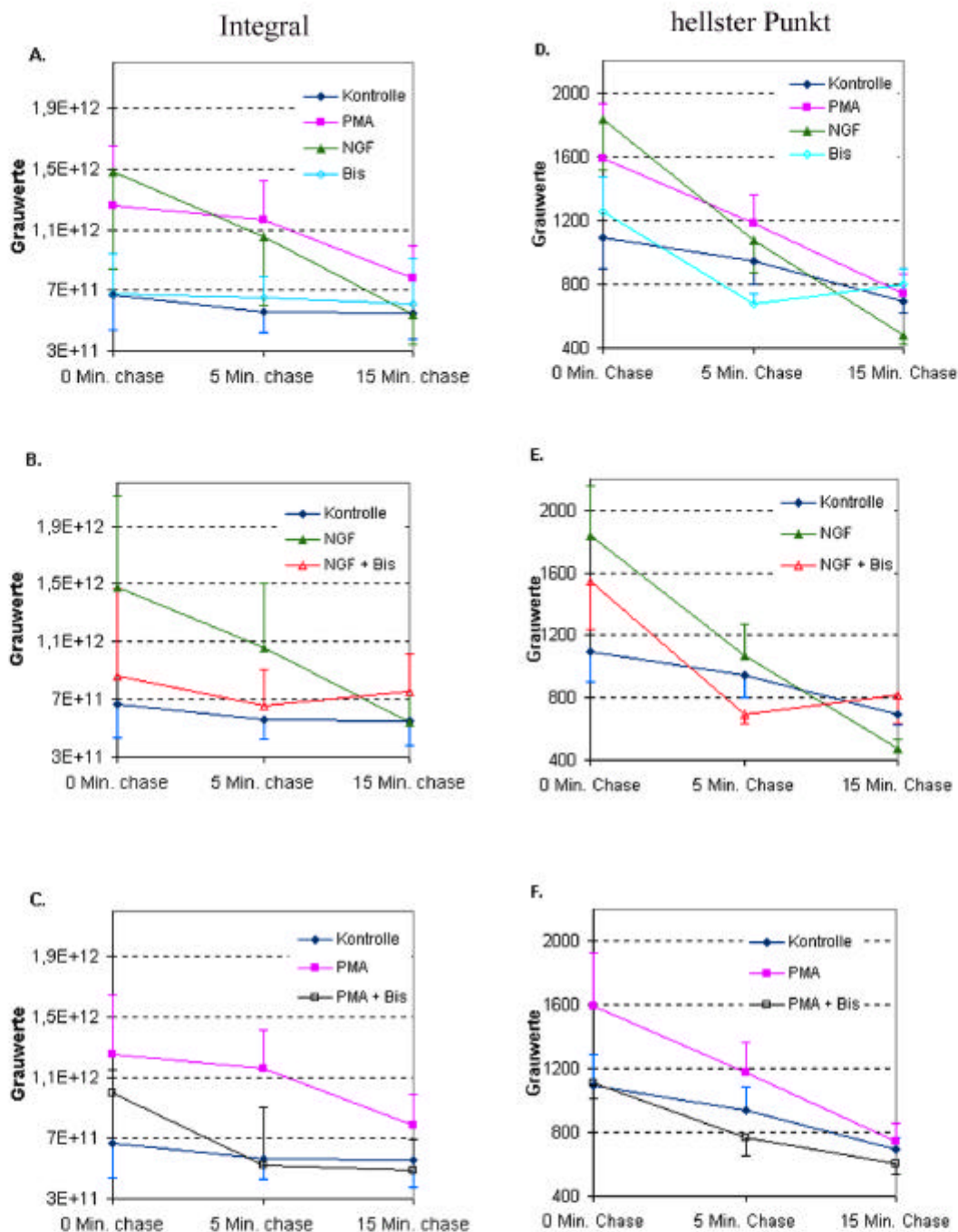


Abbildung 1.8.: Bisindolylmaleimid-I inhibiert die hbNGF- und PMA-induzierte Erhöhung der Transferrin-Endozytose. PC12-251-Zellen wurden für 20 Minuten ohne oder mit Bisindolylmaleimid-I (Bis) inkubiert. Dann wurde 10ng/ml hbNGF bzw. 0,5µM PMA zugegeben und weitere 20 Minuten inkubiert und anschließend für 5 Minuten mit 15µg/ml rTransferrin inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und für die angegebenen Zeiten weiter inkubiert. (Alle Inkubationen wurden bei 37°C ausgeführt.) Dann wurde mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen rTransferrin gefärbt. Der Nachweis erfolgte über einen sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörper. Analysiert wurden die gesamte rTransferrin-Aufnahme pro Zelle (A, B, C) sowie die maximale Signalintensität (hellster Punkt, D, E, F) anhand von digitalen Kamera-Bildern mit Hilfe des Metamorph Computer-Programms. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 10 Zellen und die Mittelwertabweichung.

Tafel 1.9.: NGF erhöht die kontinuierliche rTransferrin-Aufnahme. PC12-251-Zellen wurden für 20 Minuten ohne oder mit 13ng/ml hbNGF bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 15µg/ml rTransferrin zugegeben und die Zellen nach 3, 7, 14 und 21 Minuten dreimal bei 4°C gewaschen. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3%PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen rTransferrin gefärbt. Der Nachweis erfolgte über einen sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörper.

Kontrolle

10ng/ml hbNGF

3 Min.

3 Min.

7. Min.

7. Min.

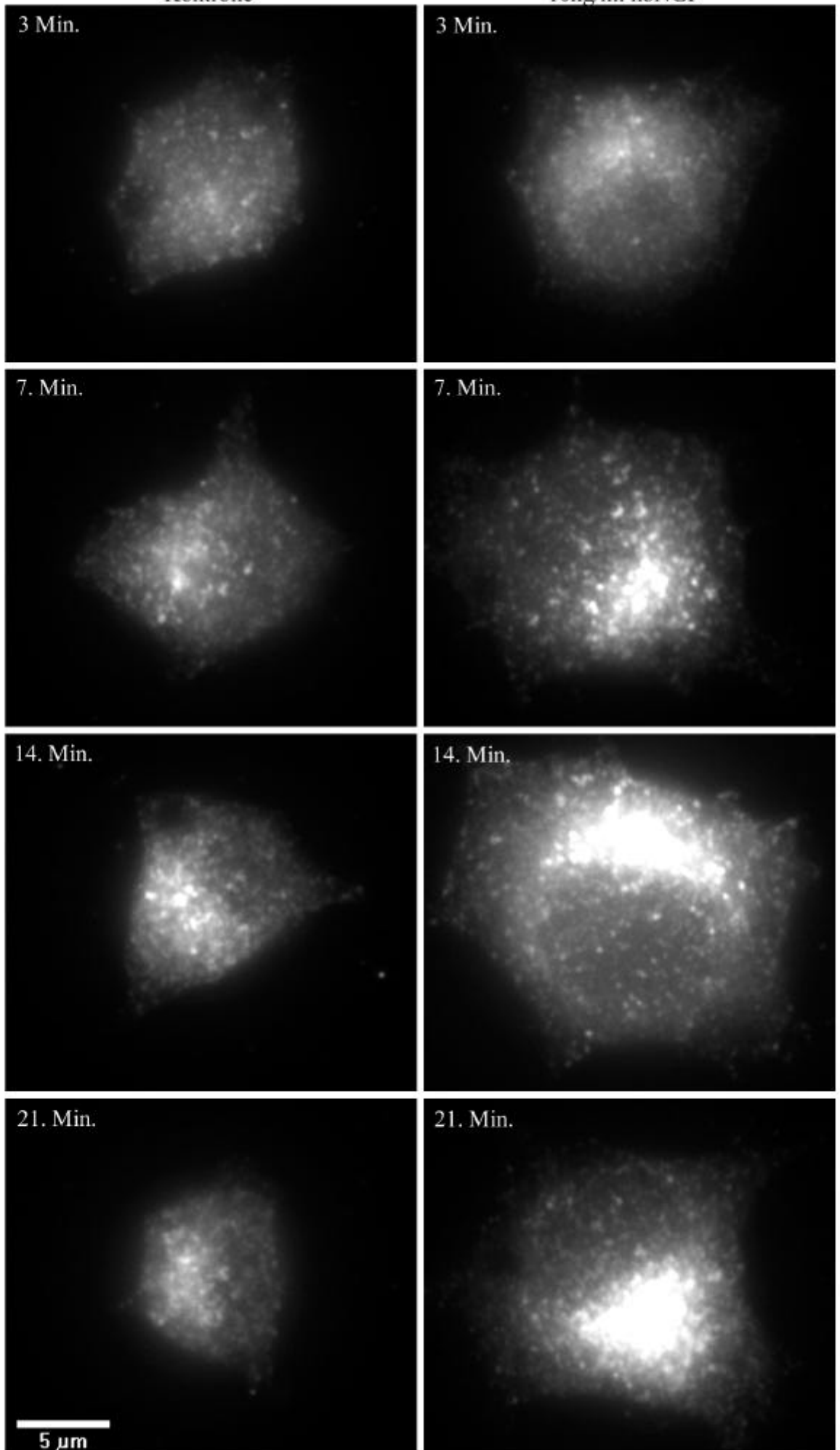
14. Min.

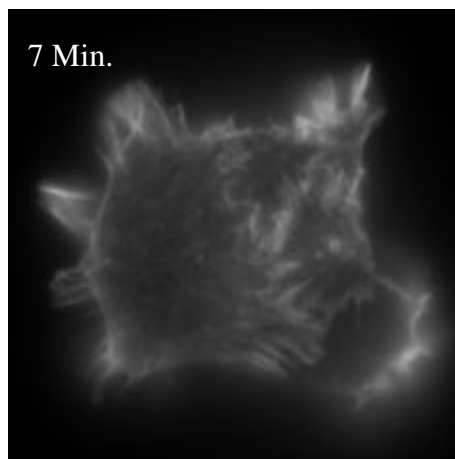
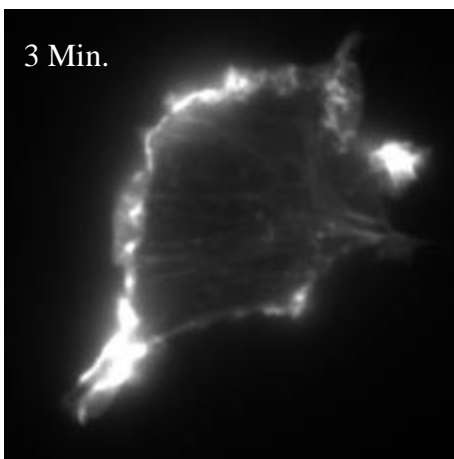
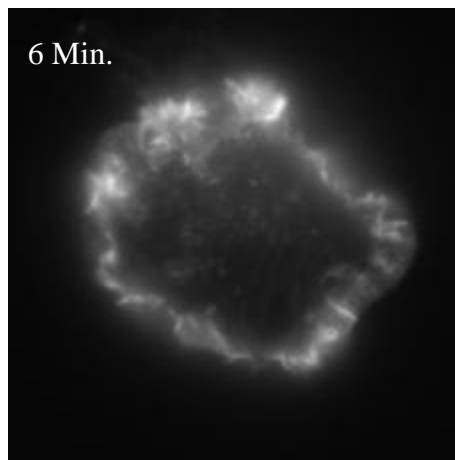
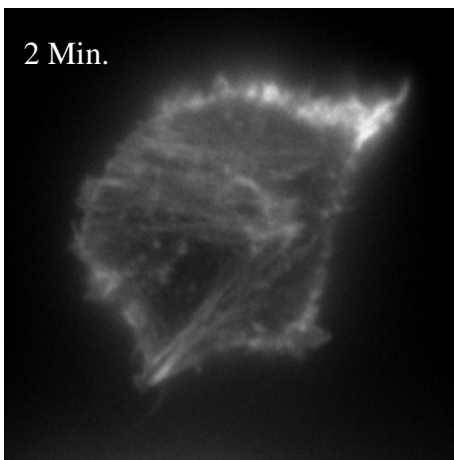
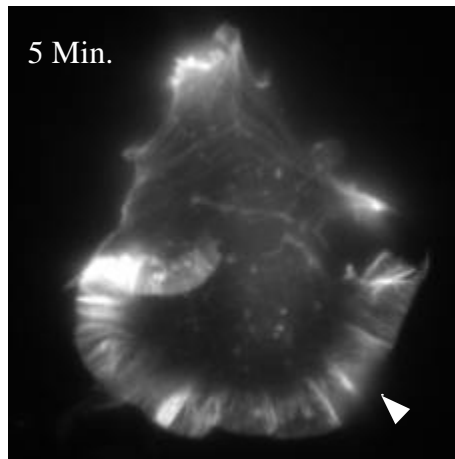
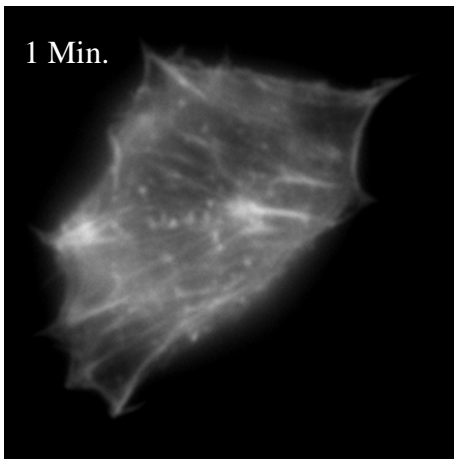
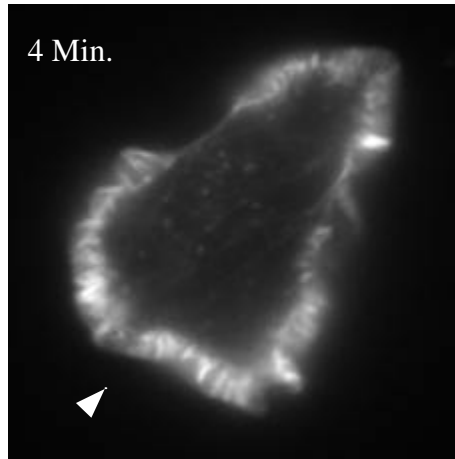
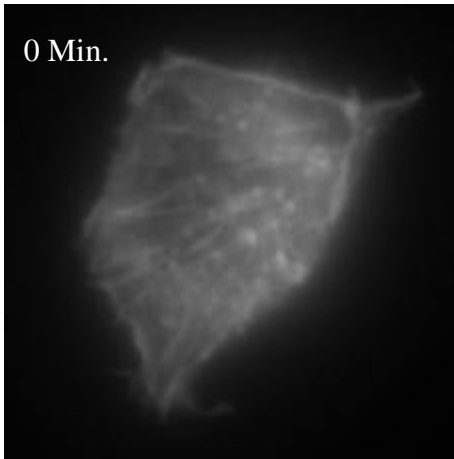
14. Min.

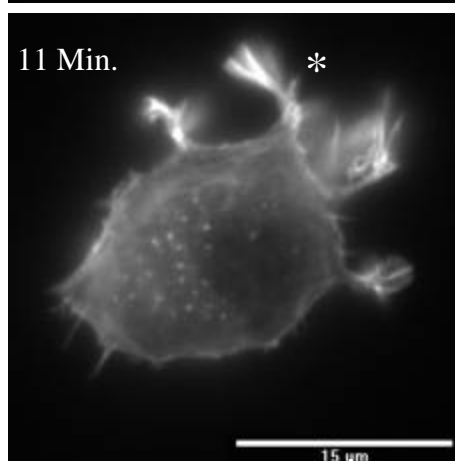
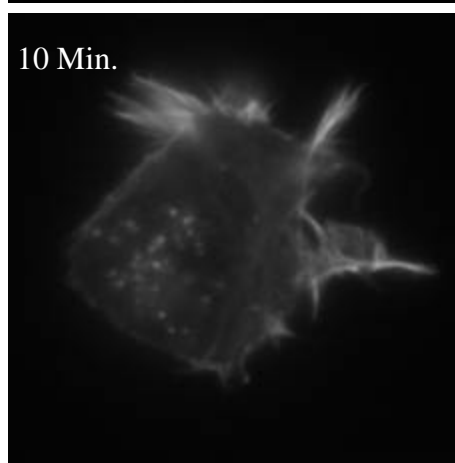
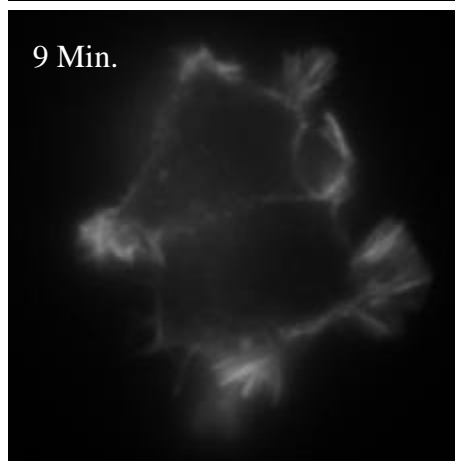
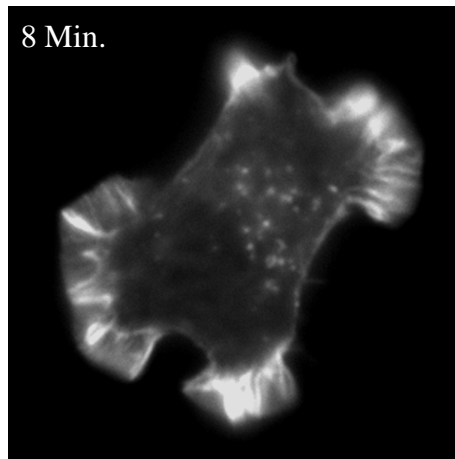
21. Min.

21. Min.

5 μ m

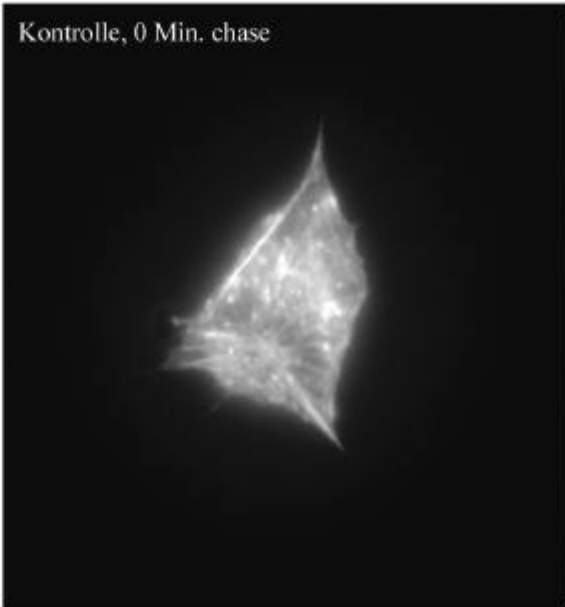




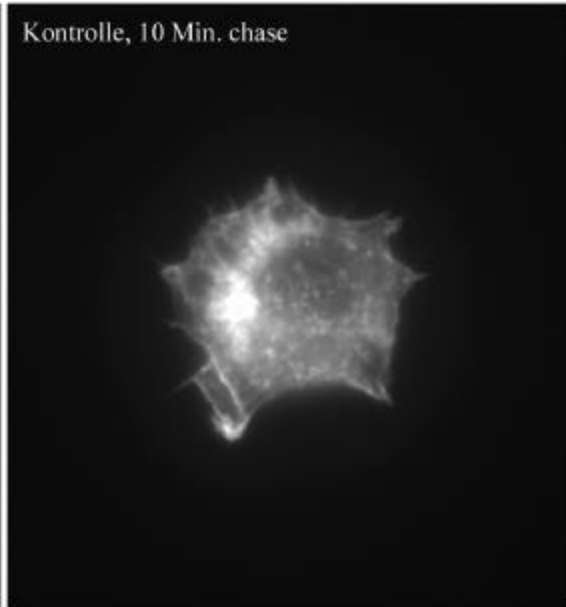


Tafel 2.1.: Kinetik der NGF-induzierten Lamellipodienbildung. PC12-251C-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 10ng/ml hbNGF bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 4% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC (1:10000) gefärbt. Die Lamellipodiensäume sind mit einem Pfeil markiert, der Stern markiert die typische Form F-Aktin angereicherter Ausläufer.

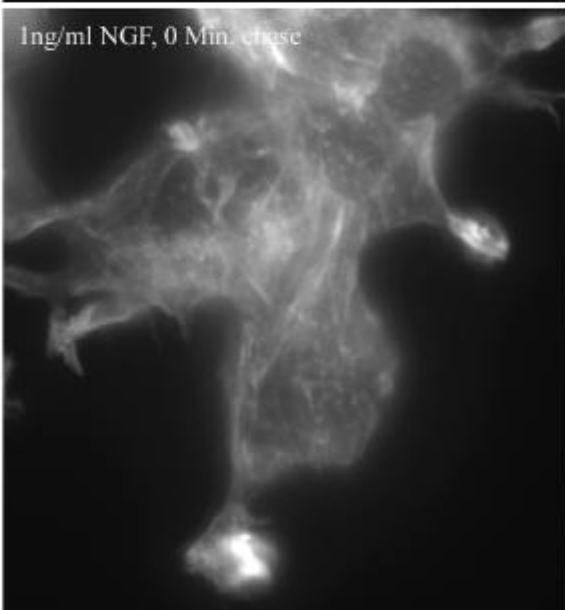
Kontrolle, 0 Min. chase



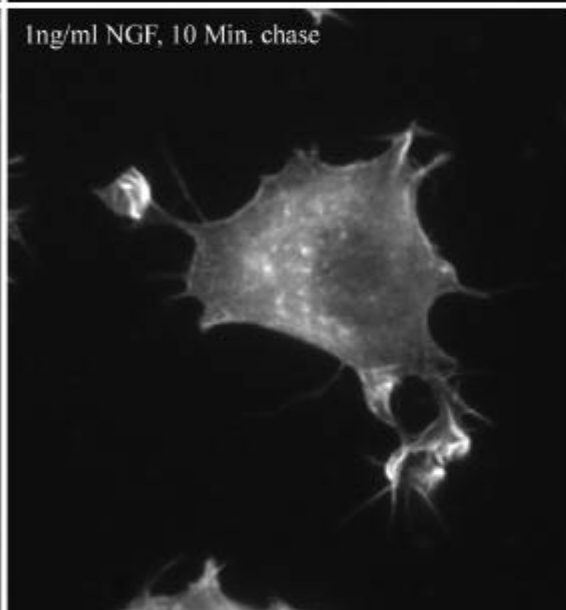
Kontrolle, 10 Min. chase



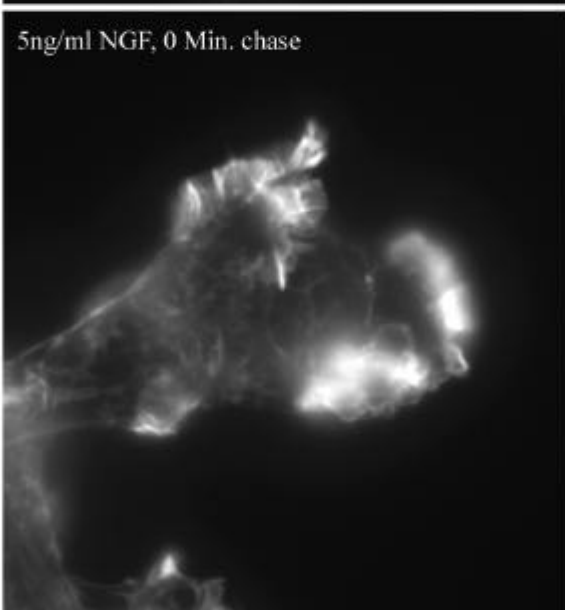
1ng/ml NGF, 0 Min. chase



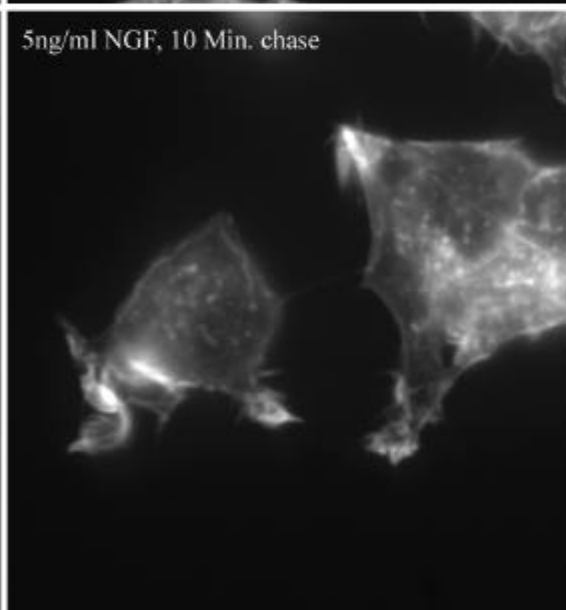
1ng/ml NGF, 10 Min. chase

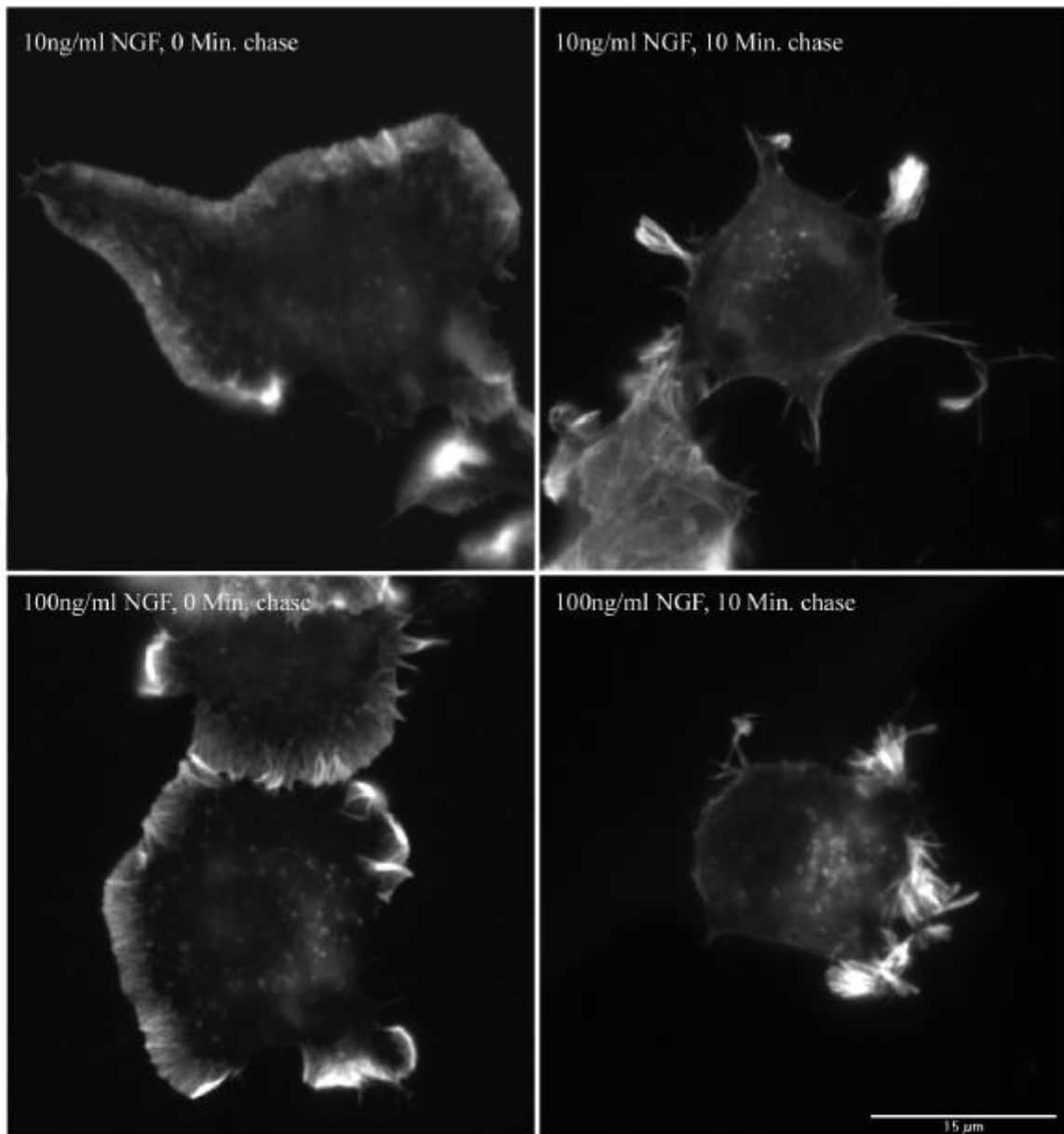


5ng/ml NGF, 0 Min. chase

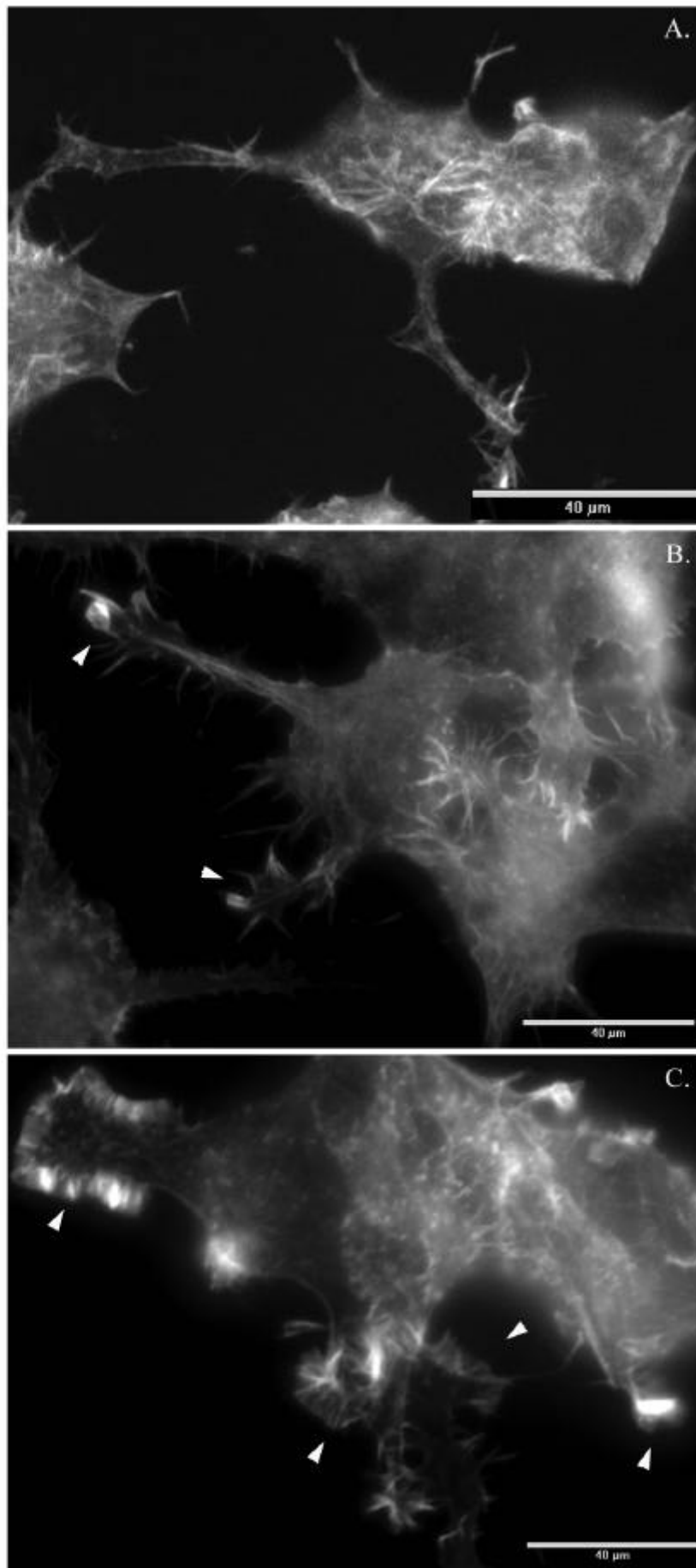


5ng/ml NGF, 10 Min. chase

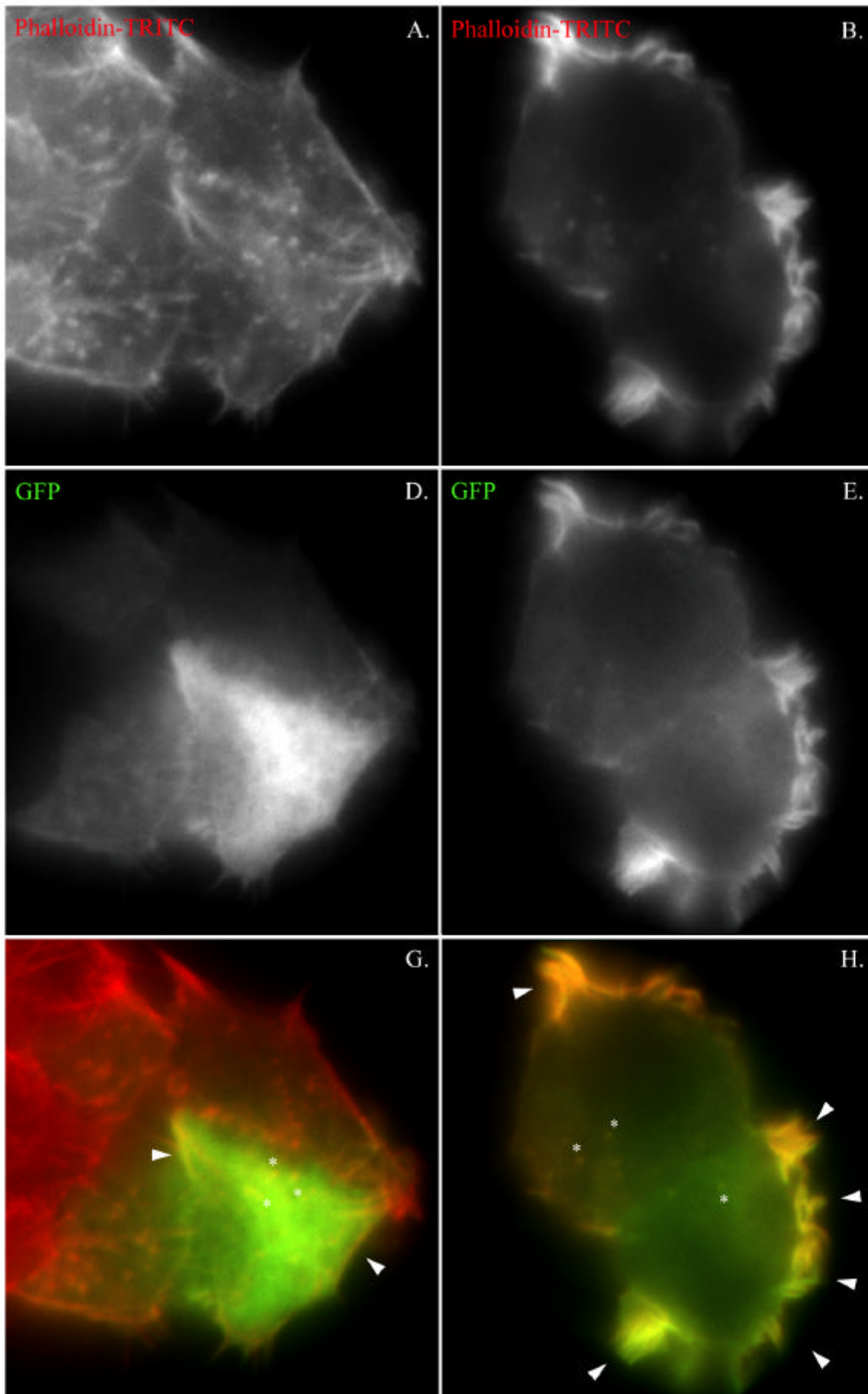


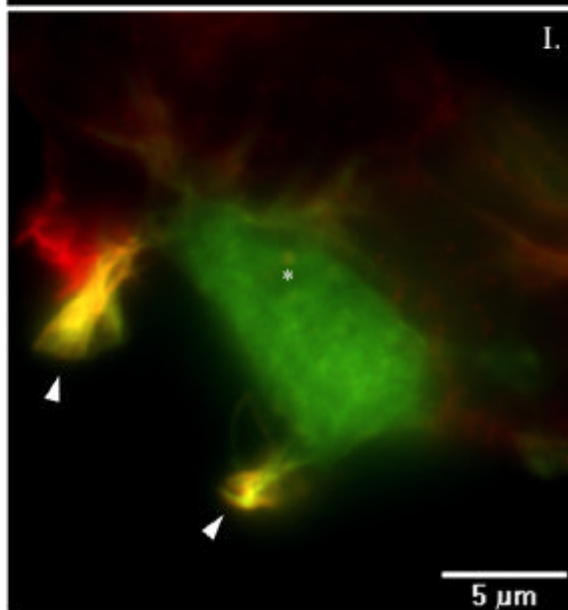
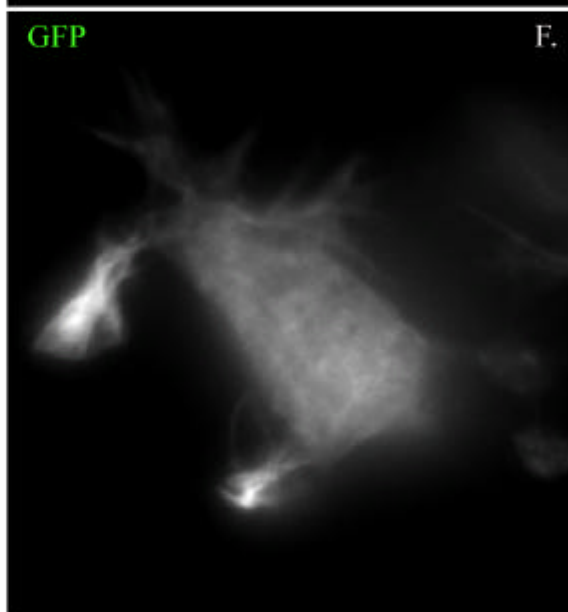
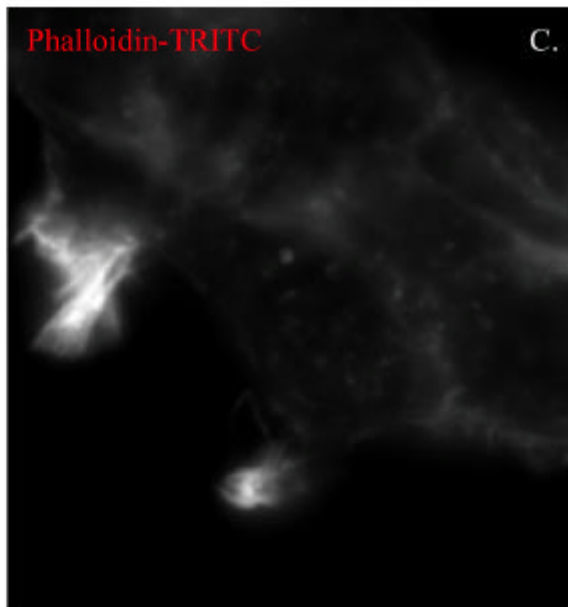


Tafel 2.2.: Konzentrationsabhängigkeit der hbNGF-induzierten Lamellipodienbildung. PC12-251C-Zellen wurden für fünf Minuten ohne bzw. mit verschiedenen Konzentrationen von hbNGF bei 37°C inkubiert, gewaschen, und für weitere 10 Minuten ohne hbNGF inkubiert. Anschließend wurde mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC (1:2000) gefärbt.

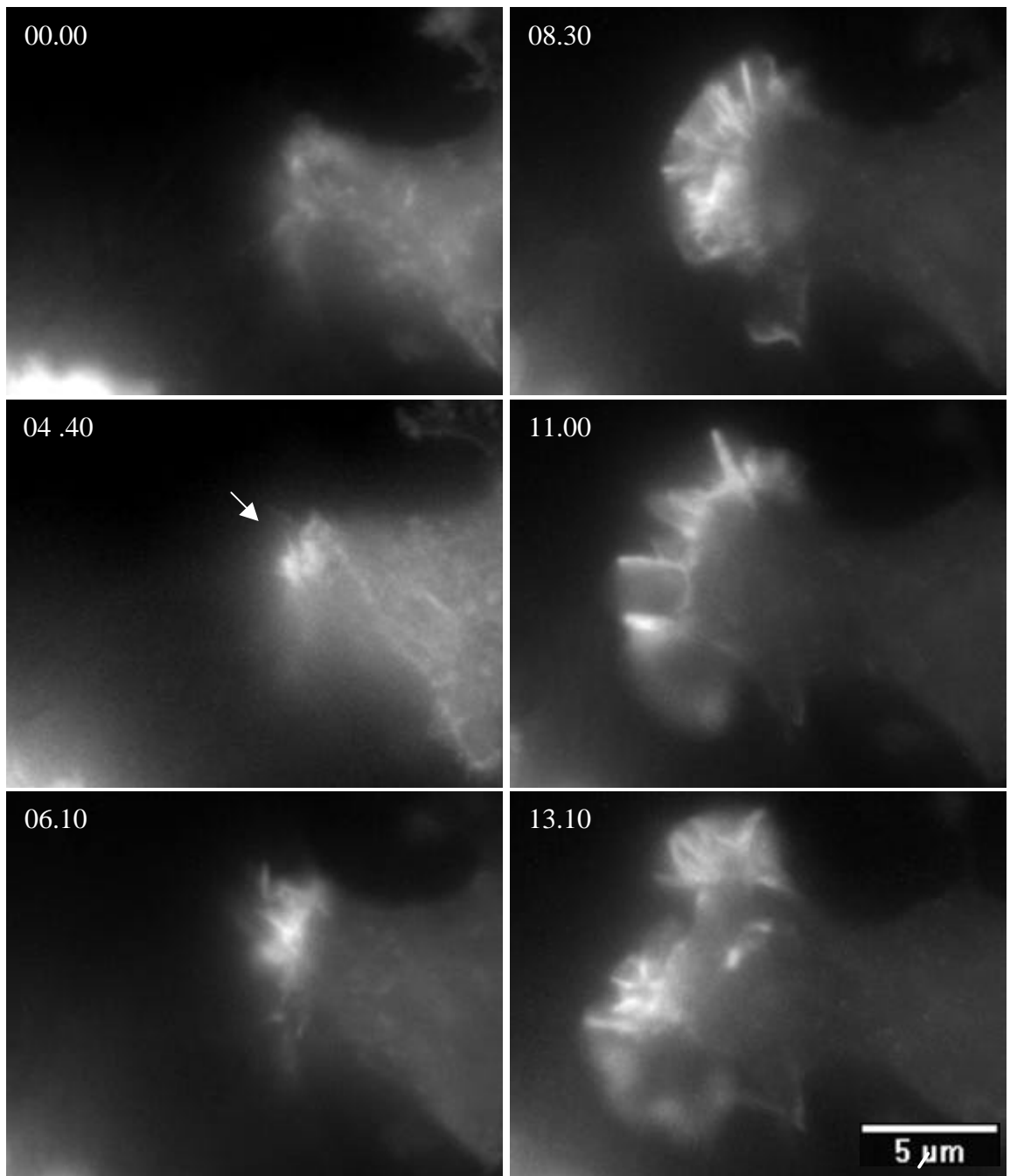


Tafel 2.3.: NGF-induzierte Lamellipodienbildung bei NGF-differenzierten Zellen. PC12-251C-Zellen wurden für 16 Stunden mit hbNGF (10ng/ml) exponiert, das Medium gewechselt und für 5 Minuten ohne (A) bzw. mit 10ng/ml NGF (B, C) inkubiert, mit 4% PFA-fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC (1: 5000) gefärbt. Abgebildet sind jeweils Gruppen von PC12-Zellen, hbNGF-induzierte Veränderungen sind mit Pfeilen markiert.

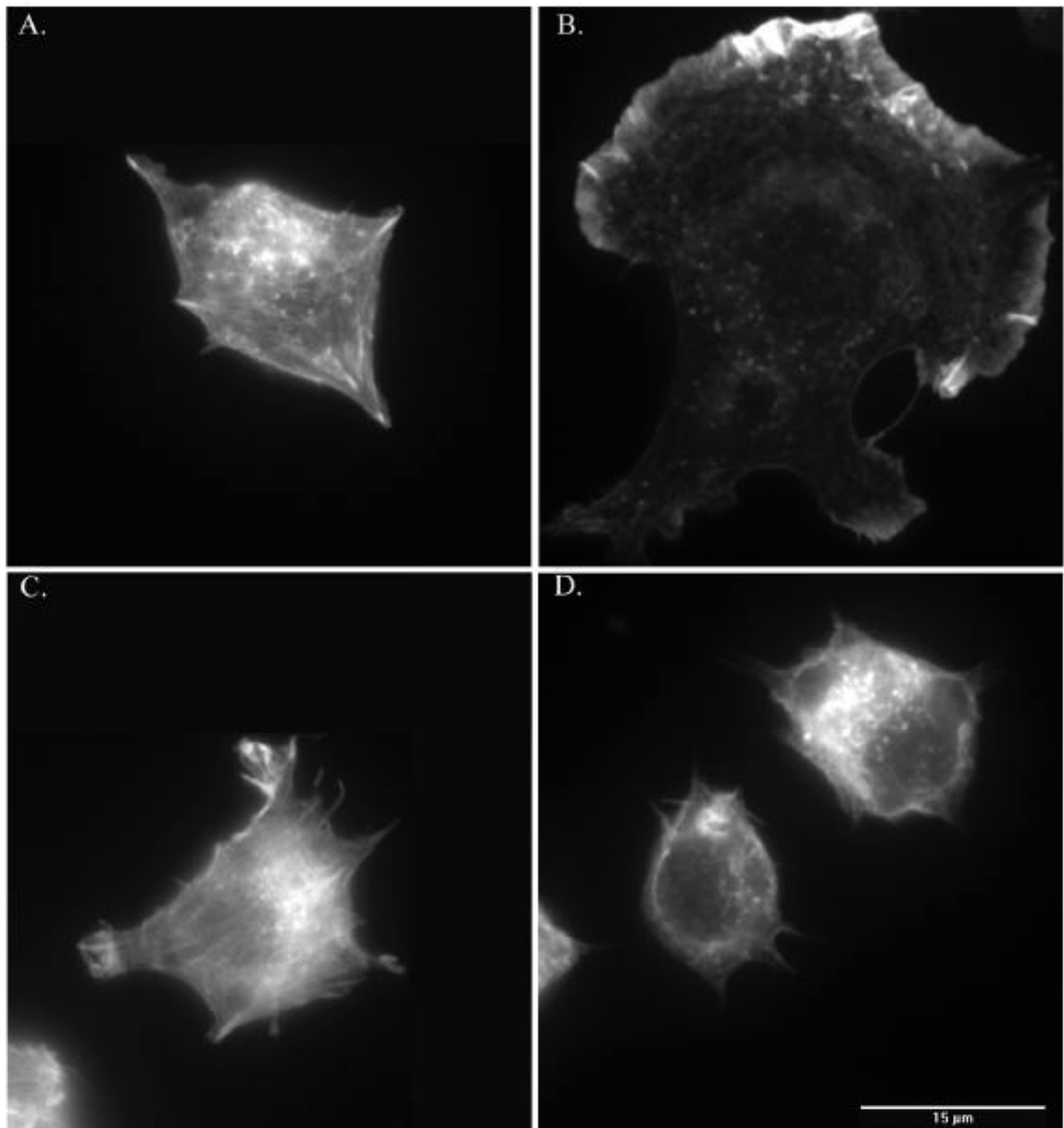




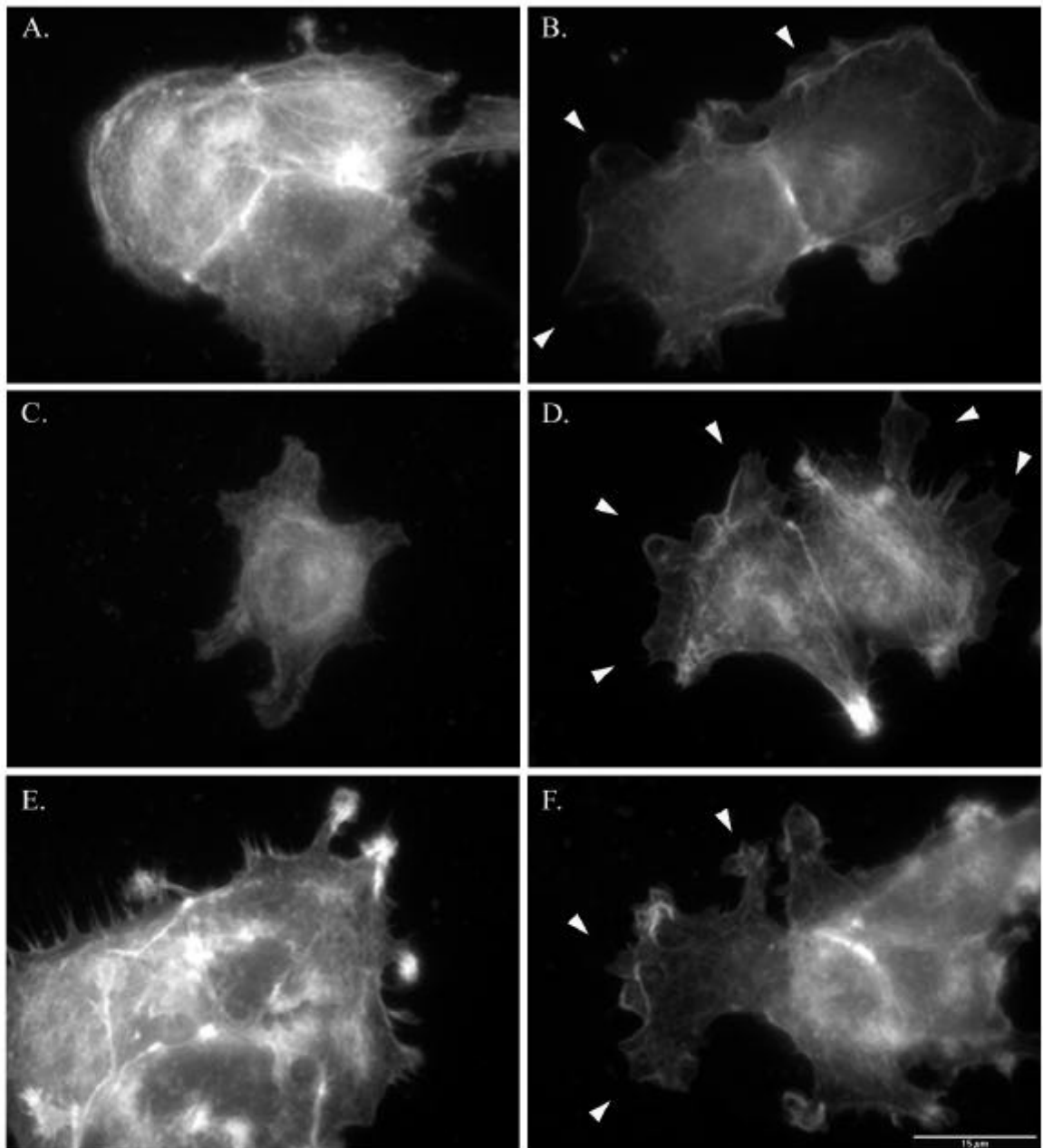
Tafel 2.4.: hbNGF-induzierte Lamellipodienbildung bei transient GFP-Aktin-transfizierten PC12-251C-Zellen. 21 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für fünf Minuten ohne (A, D, G) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, C, E, F, H, I) inkubiert, anschließend mit 4%PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC (1:5000) gefärbt. Beispiele für Kollokalisierung von Phalloidin-TRITC und GFP sind mit Pfeilen bzw. mit * (Kollokalisierung in zytoplasmatischen Punkten) gekennzeichnet.



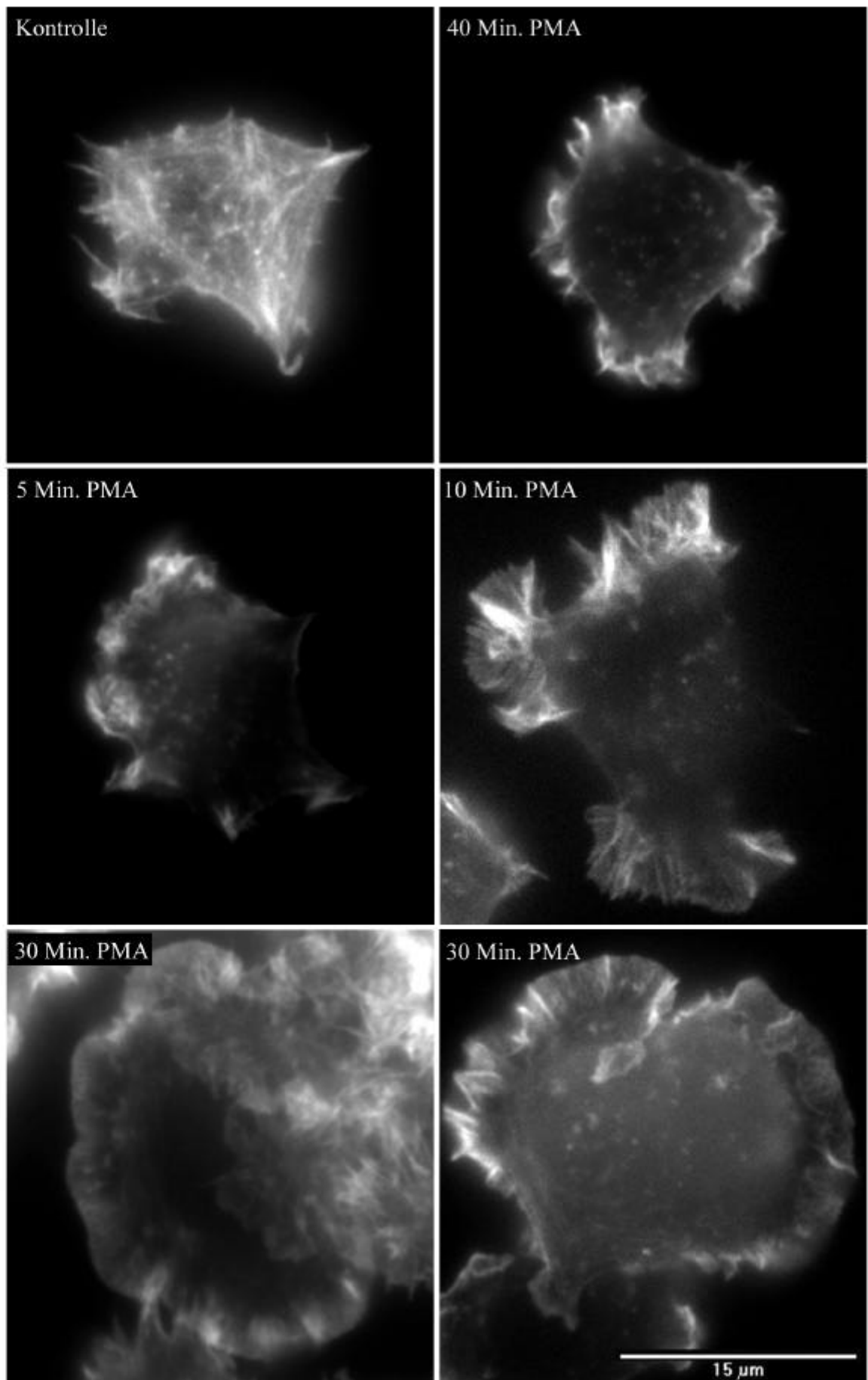
Tafel 2.5.: NGF-induzierte Lamellipodienbildung bei GFP-Aktin-transfizierten PC12-251C-Zellen. Transient GFP-Aktin-transfizierte Zellen wurden 20 Stunden nach der Transfektion mit 10ng/ml hbNGF bei 34,5 °C in Anwesenheit von OSS inkubiert. Die Bilder wurden einer Serie fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen entnommen (Film 2), die Zeit nach Zugabe von NGF ist in Minuten und Sekunden angegeben.



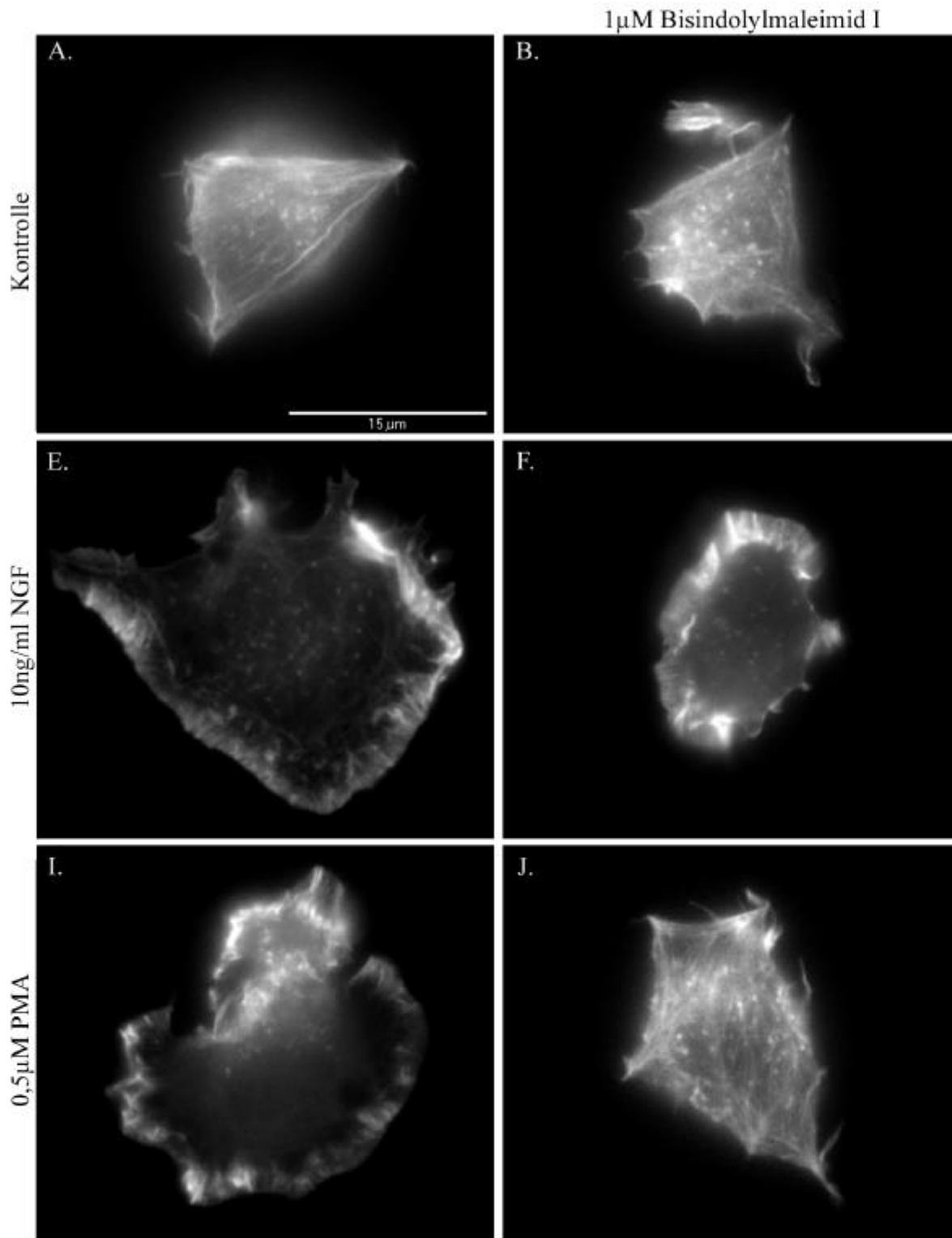
Tafel 2.6.: Anti-trkA-Antikörper induzieren Lamellipodien in PC12-Zellen. PC12-251C-Zellen wurden für fünf Minuten ohne (A) oder in Gegenwart von anti-trkA (B, 20 µg/ml), Rex (C, 1:1000) oder 9651 (D, 1:750) Antikörpern bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC (1:1000) gefärbt.



Tafel 2.7.: NGF-induzierte Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts von NRA5-Zellen. NRA5-Zellen wurden für fünf Minuten bei 37°C ohne (A, C, E) bzw. mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-FITC (1:1000) gefärbt. Dargestellt sind jeweils drei Beispiele für NGF-stimulierte und unstimulierte Zellen. NGF-induzierte Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts sind mit Pfeilen markiert. Der Balken entspricht 15µm.



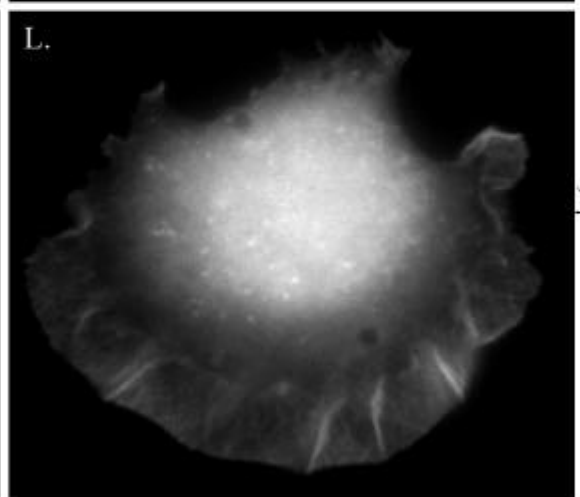
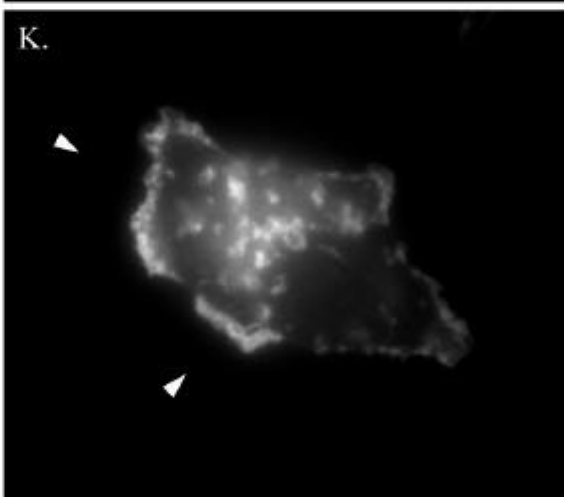
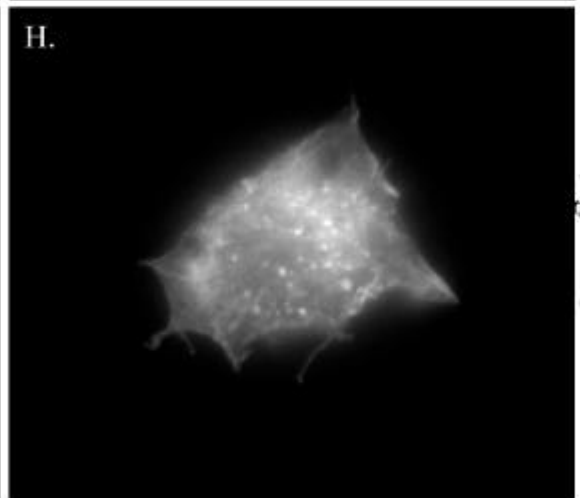
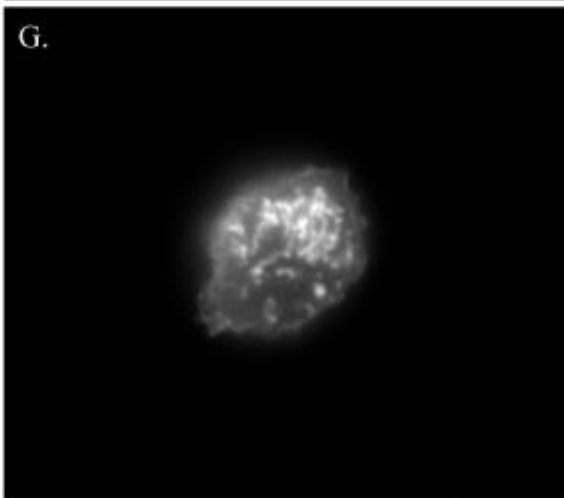
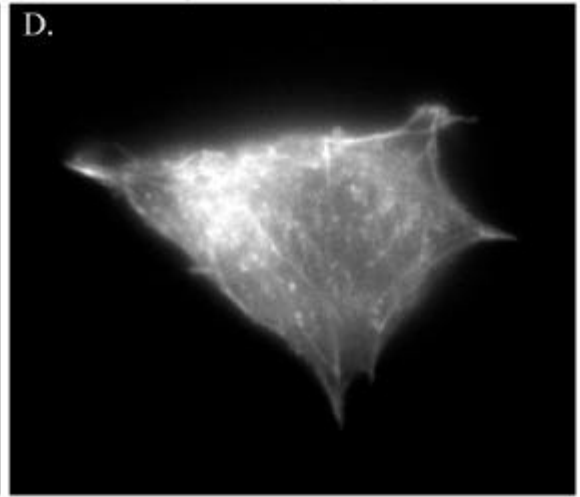
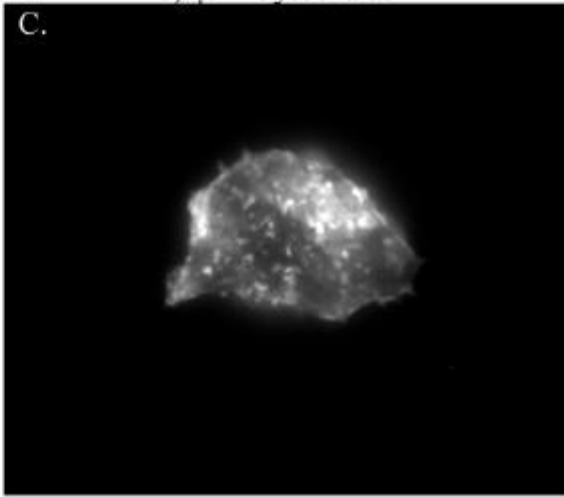
Tafel 2.8.: PMA induziert Lamellipodien in PC12-Zellen. PC12-251-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 1µM PMA bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC (1:10000) gefärbt.

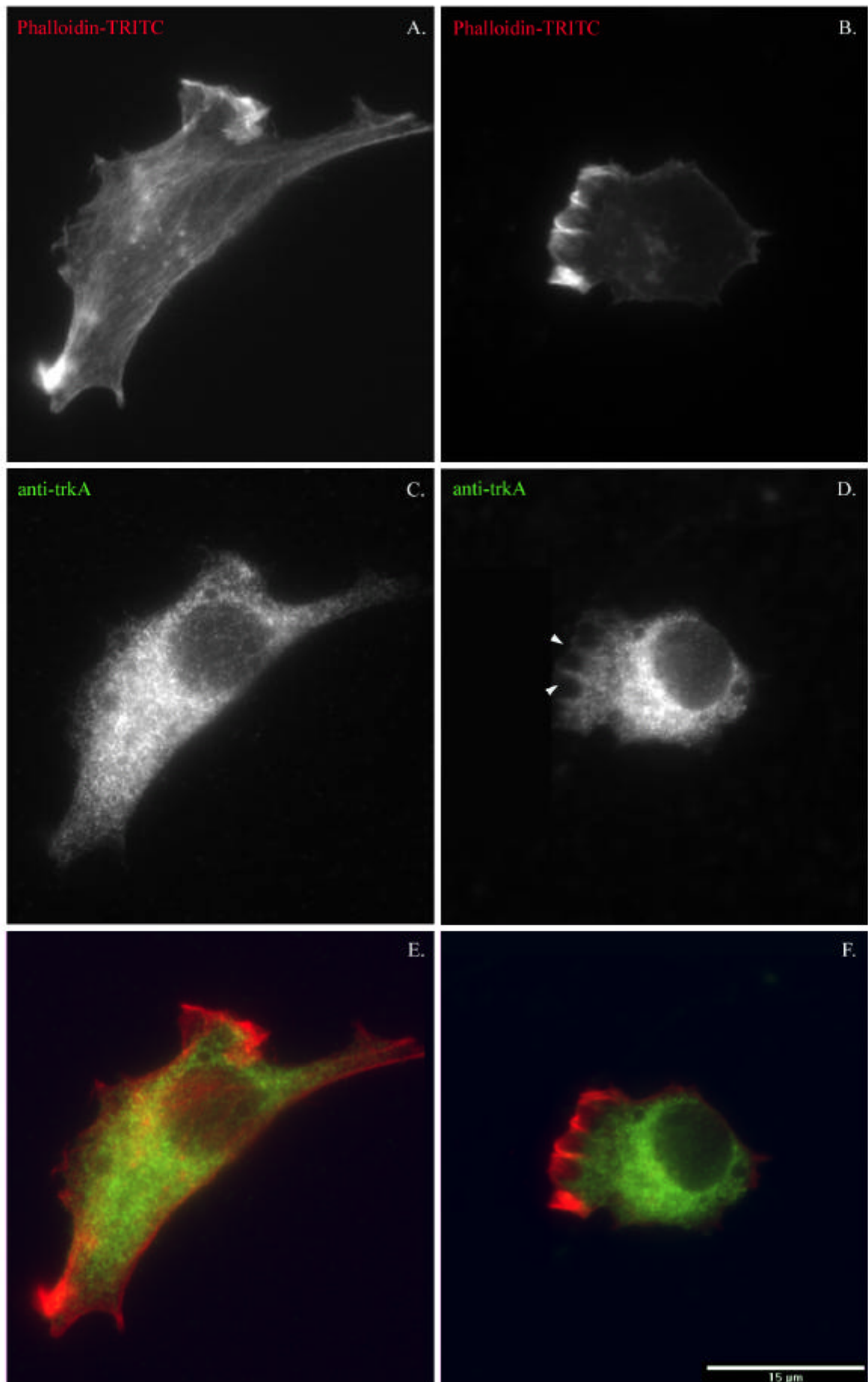


Tafel 2.9.: Einfluß von Bisindolylmaleimid-I, Cytochalasin D und Amilorid auf die NGF und PMA-induzierte Lamellipodienbildung. PC12-251C-Zellen wurden 20 Minuten bei 37°C ohne (A, E, I) oder mit 1 μ M Bisindolylmaleimid-I (B, F, J), 0,1 μ M Cytochalasin D (C, G, K) bzw. für eine Stunde mit 3mM Amilorid (D, H, L) vorinkubiert. Dann wurde für fünf Minuten mit 10ng/ml hbNGF (E, F, G, H) bzw. 20 Minuten mit 0,5 μ M PMA (I, J, K, L) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA-fixiert, mit TX-100 permeabilisiert und mit Phalloidin-FITC (1:1000) gefärbt. Die Pfeile markieren verbleibende Aktin-Motilität an der Plasmamembran von Cytochalasin D vorbehandelten PMA-stimulierten Zellen.

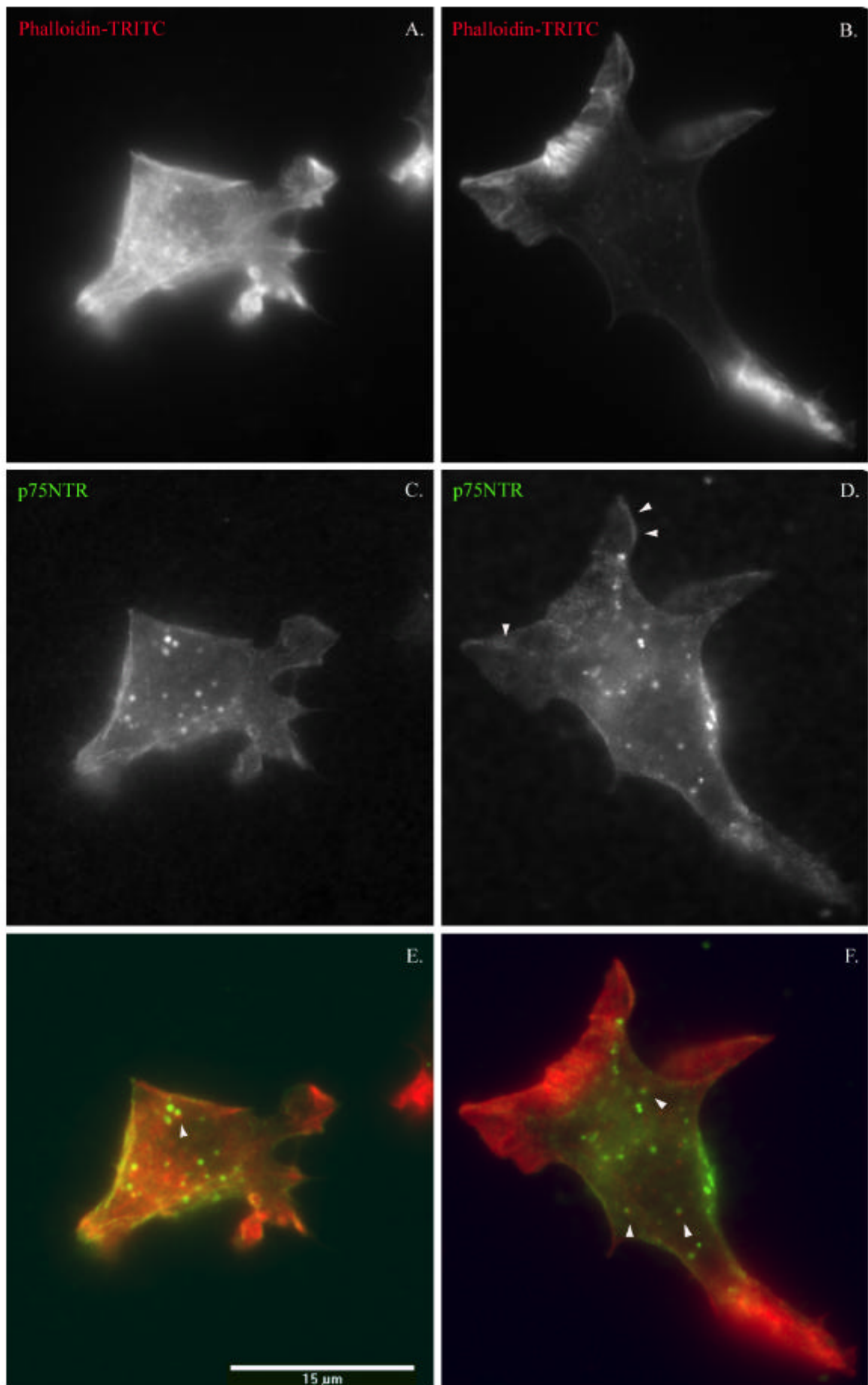
0,1 μ M Cytochalasin D

3 mM Amilorid

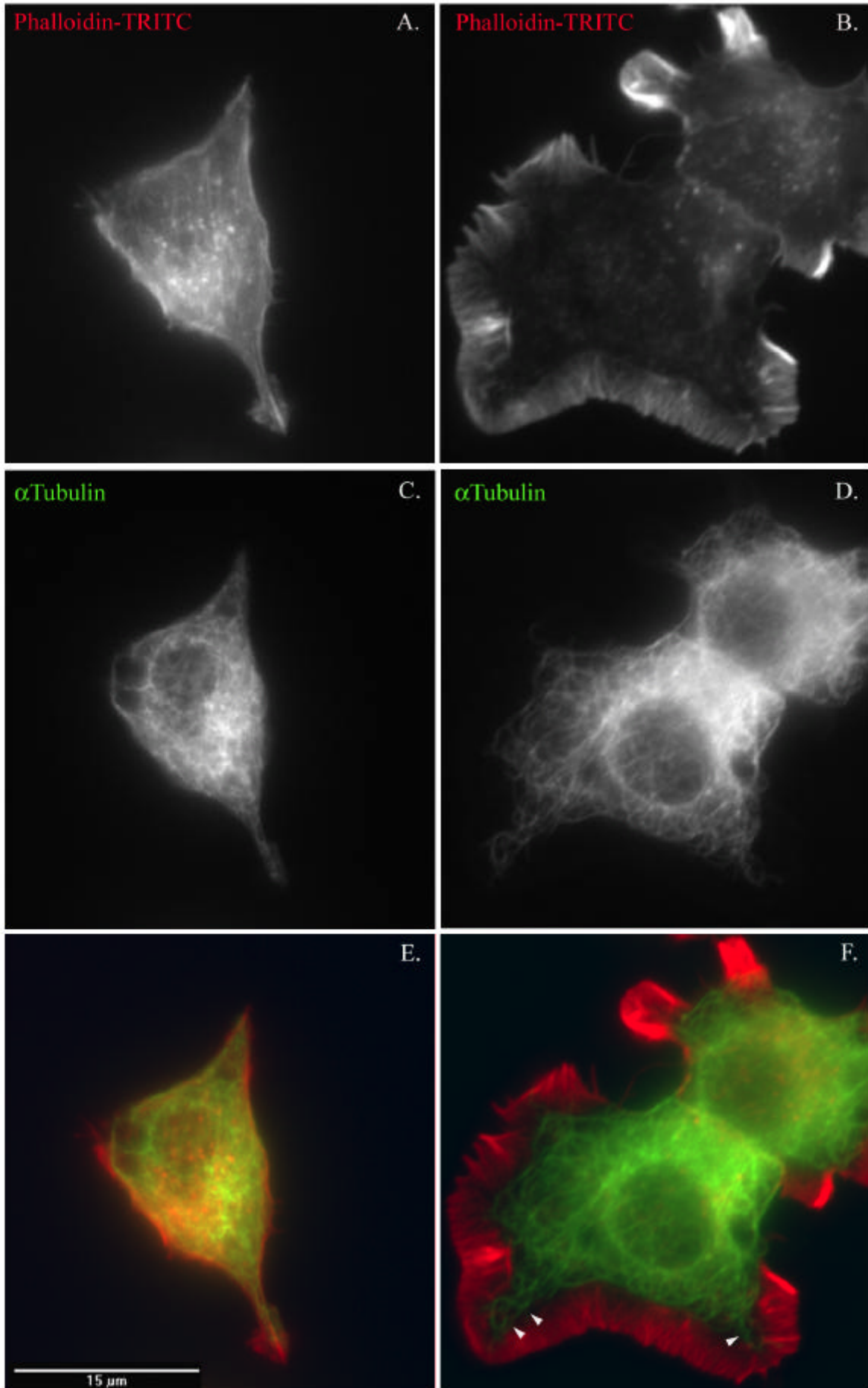




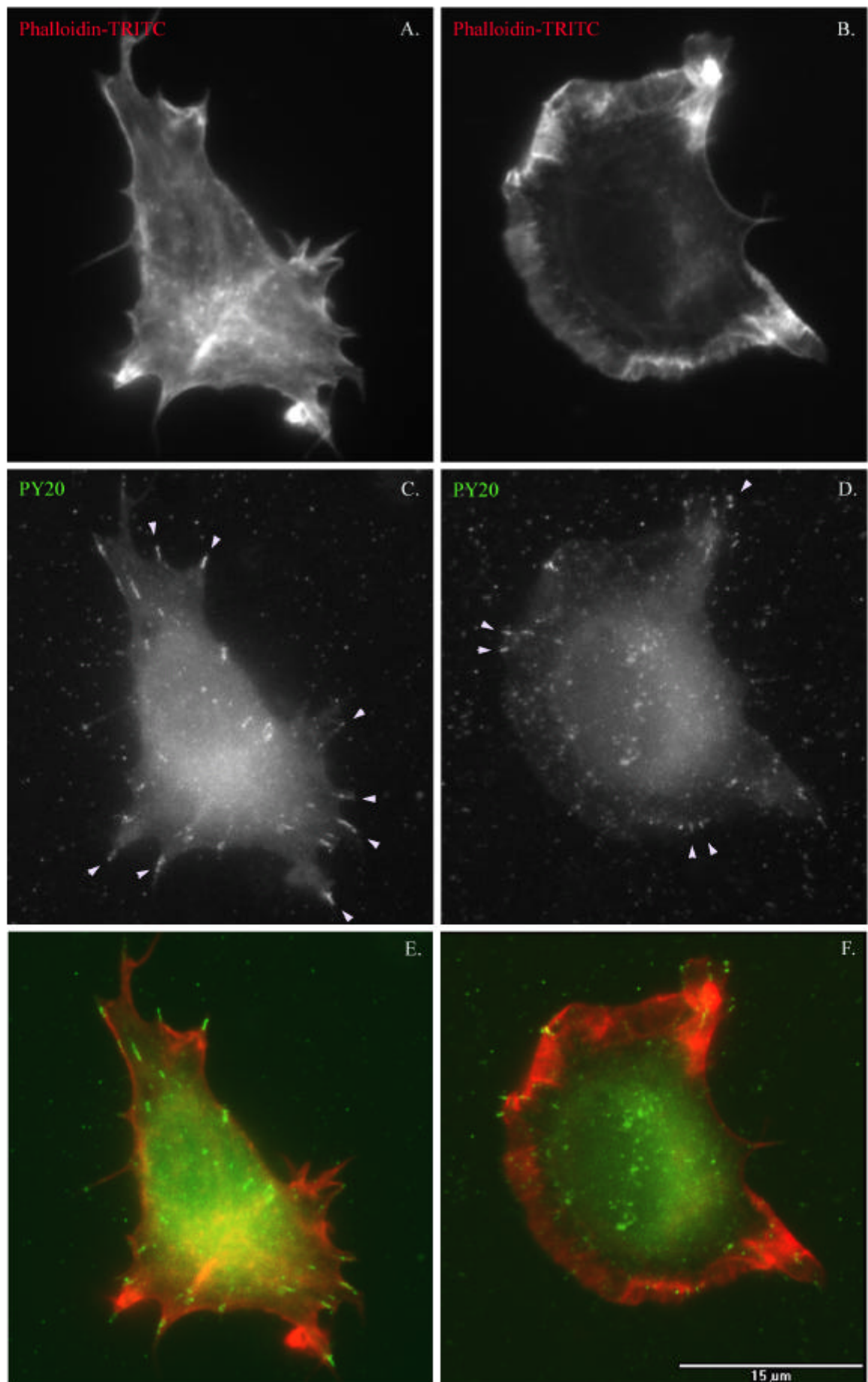
Tafel 2.10.: Lokalisation von trkA während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung. Die Zellen wurden fünf Minuten ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX100-permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen trkA (anti-trkA) sowie sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörpern und Phalloidin-FITC gefärbt. In der Zweikanal-darstellung (E, F) ist Phalloidin-TRITC rot und anti-trkA Färbung grün dargestellt. Beispiele für Kolokalisation sind mit Pfeilen markiert.



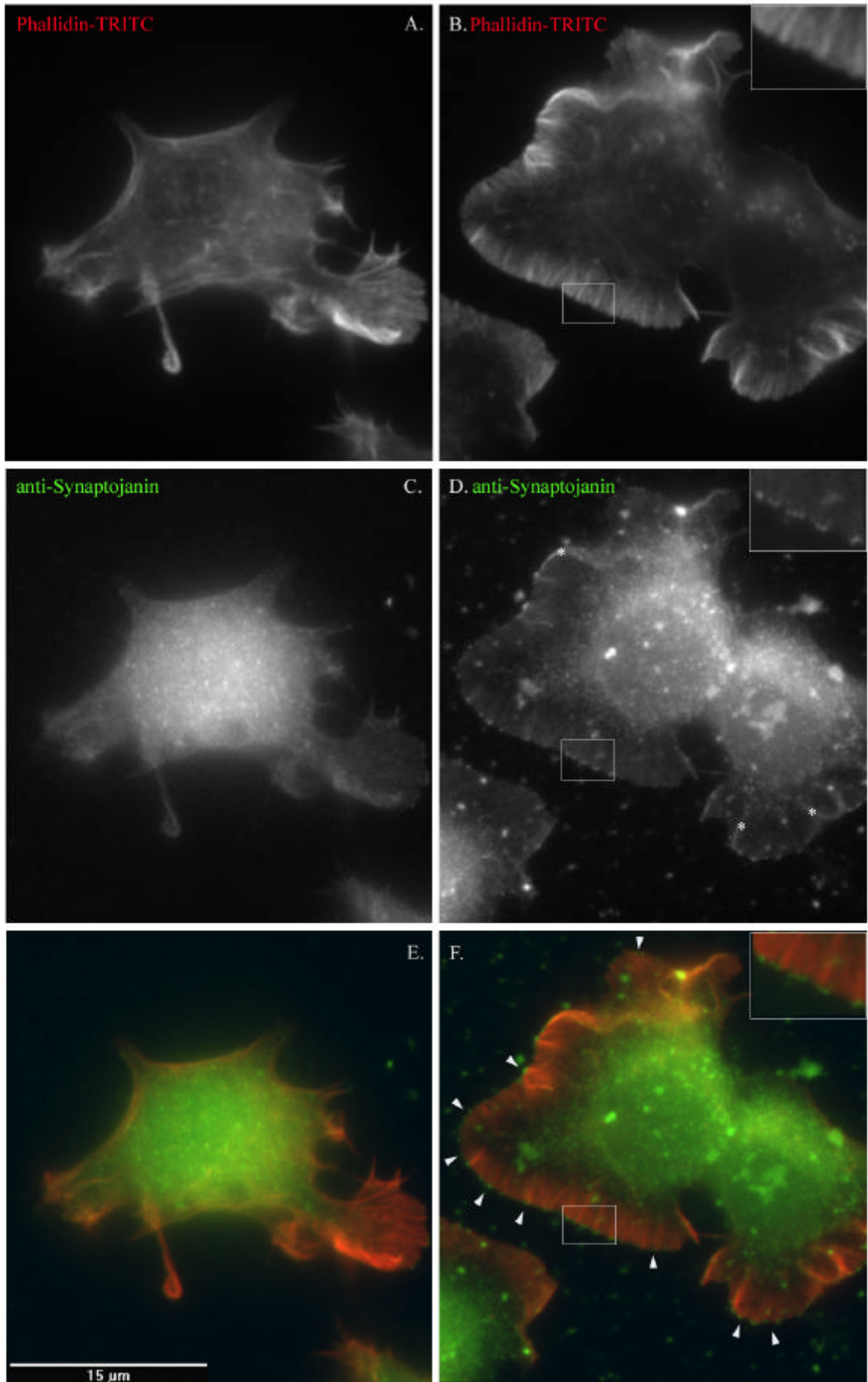
Tafel 2.11.: Lokalisation von p75NTR während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung. PC12-251C-Zellen wurden fünf Minuten ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, mit TX-100 permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen p75NTR (REX, 1:1000) sowie sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörpern und Phalloidin-TRITC gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist Phalloidin-TRITC rot und REX-Färbung grün dargestellt. Beispiele für Kolokalisation sind mit Pfeilen markiert(D, F).



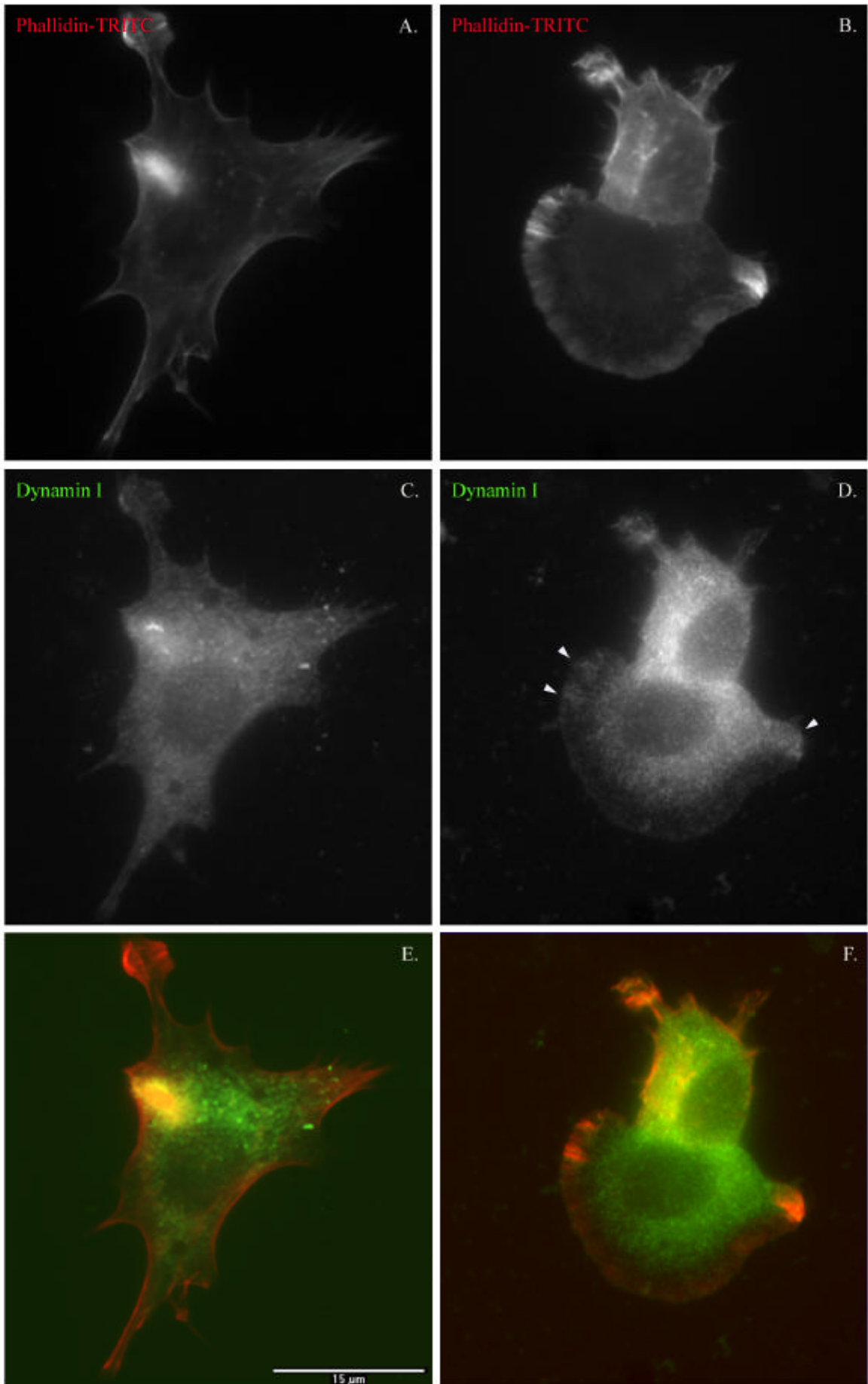
Tafel 2.12.: Lokalisation der Mikrotubuli während der hbNGF-induzierten Lamellipodienbildung. PC12-251C-Zellen wurden fünf Minuten ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, mit TX-100 permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC (1:1000) und mit einem Antikörper gegen α Tubulin (DM1A, 1:1000) gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist Phalloidin-TRITC rot und die Tubulin-Färbung grün dargestellt. Bis an das Lamellipodium heranreichende Mikrotubuli sind durch Pfeile markiert.



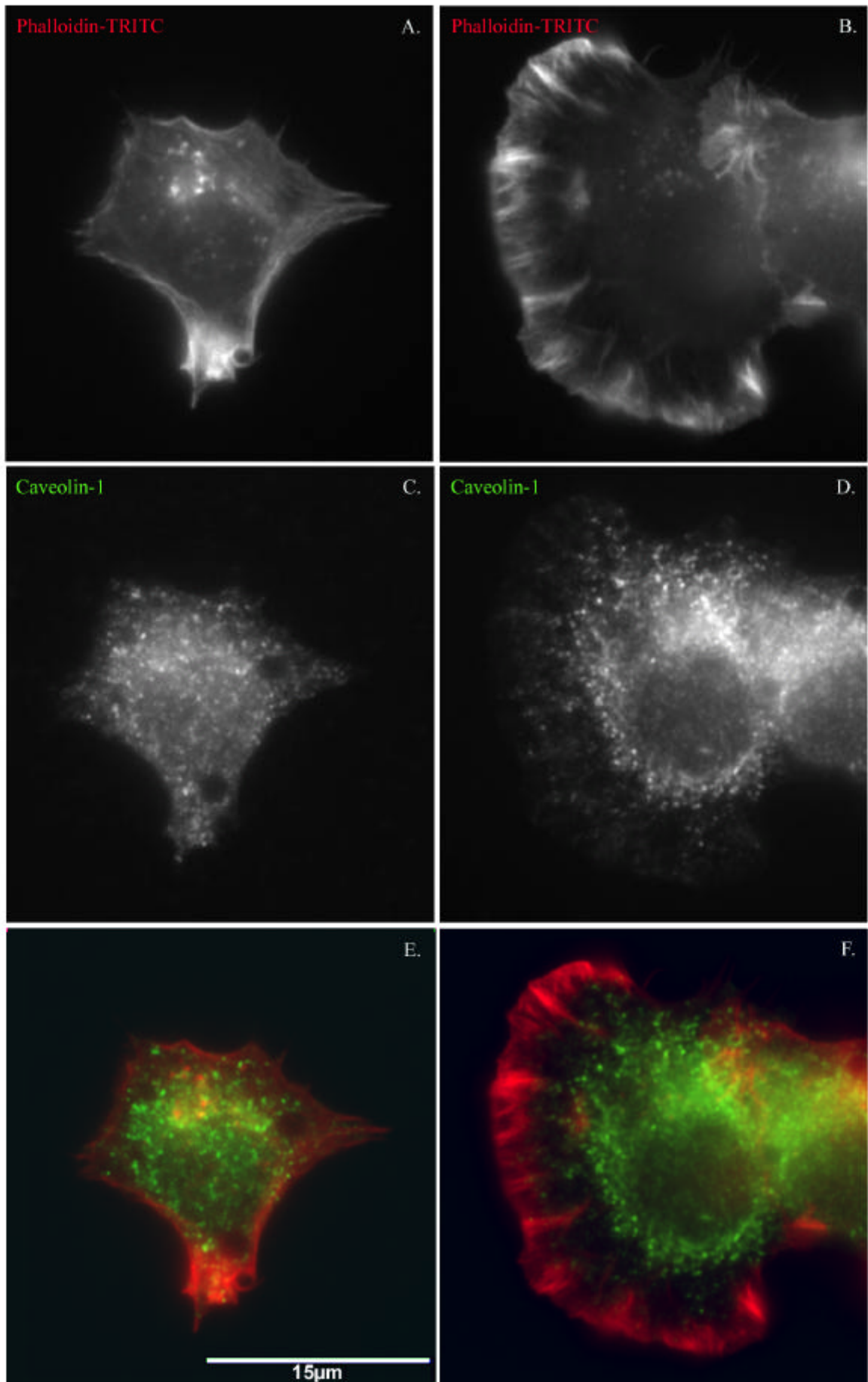
Tafel 2.13.: Veränderung der Lokalisation der Tyrosin-Phosphorylierung während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung. Die Zellen wurden fünf Minuten ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosine (PY20, 1:100) sowie sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörpern und Phalloidin-FITC gefärbt. In der Zweikanaldarstellung (E, F) ist Phalloidin-TRITC rot und PY20-Färbung grün dargestellt.



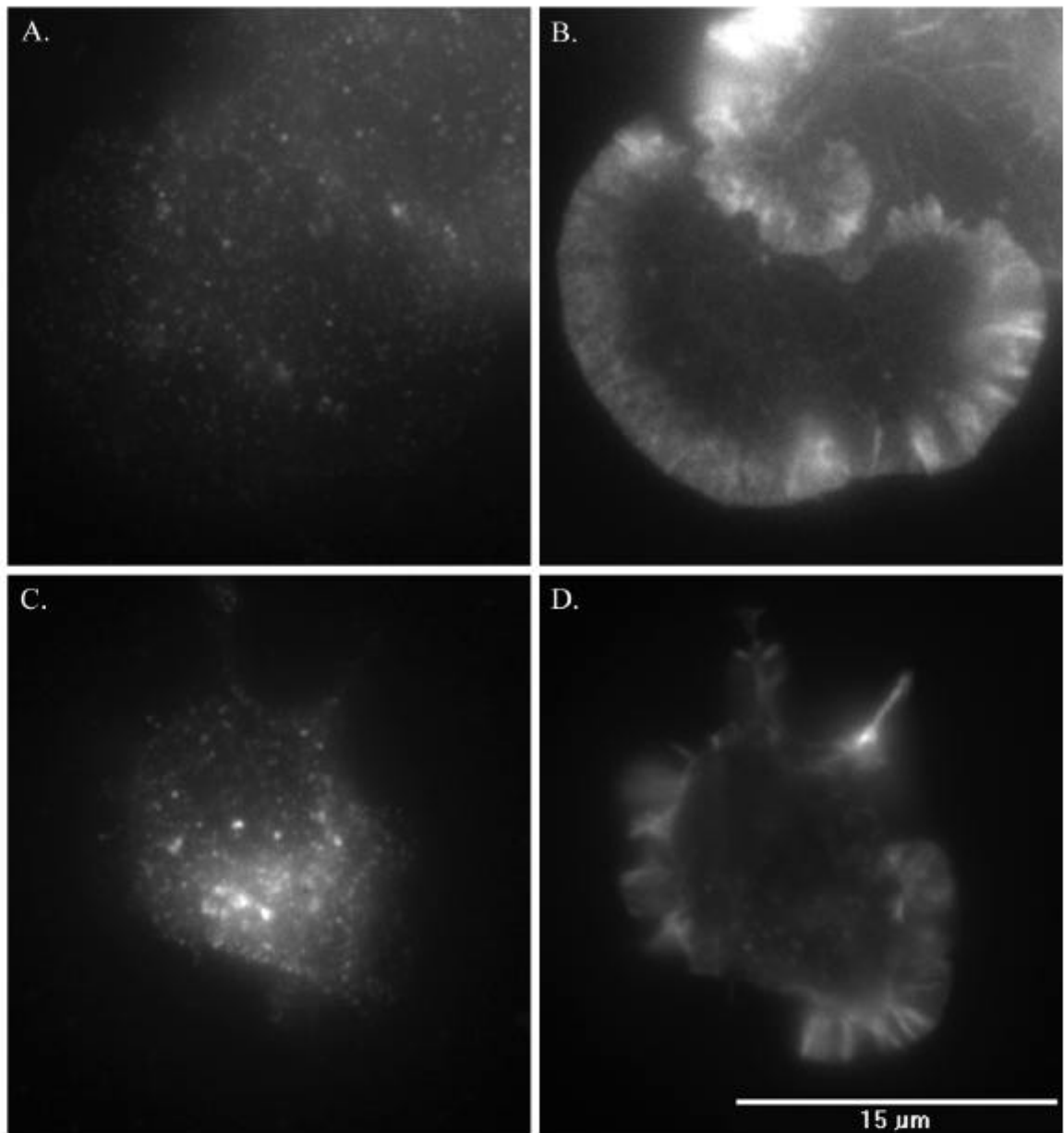
Tafel 2.14.: Lokalisation von Synaptojanin während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung. PC12-251C-Zellen wurden 5 Minuten ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC (1:1000) bzw. mit anti-Synaptojanin (1:100) und einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist Phalloidin-TRITC rot und anti-Synaptojanin grün dargestellt. Der Ausschnitt ist um den Faktor zwei vergrößert. Das am Lamellipodiensaum lokalisierte Synaptojanin-Signal ist mit Pfeilen gekennzeichnet.



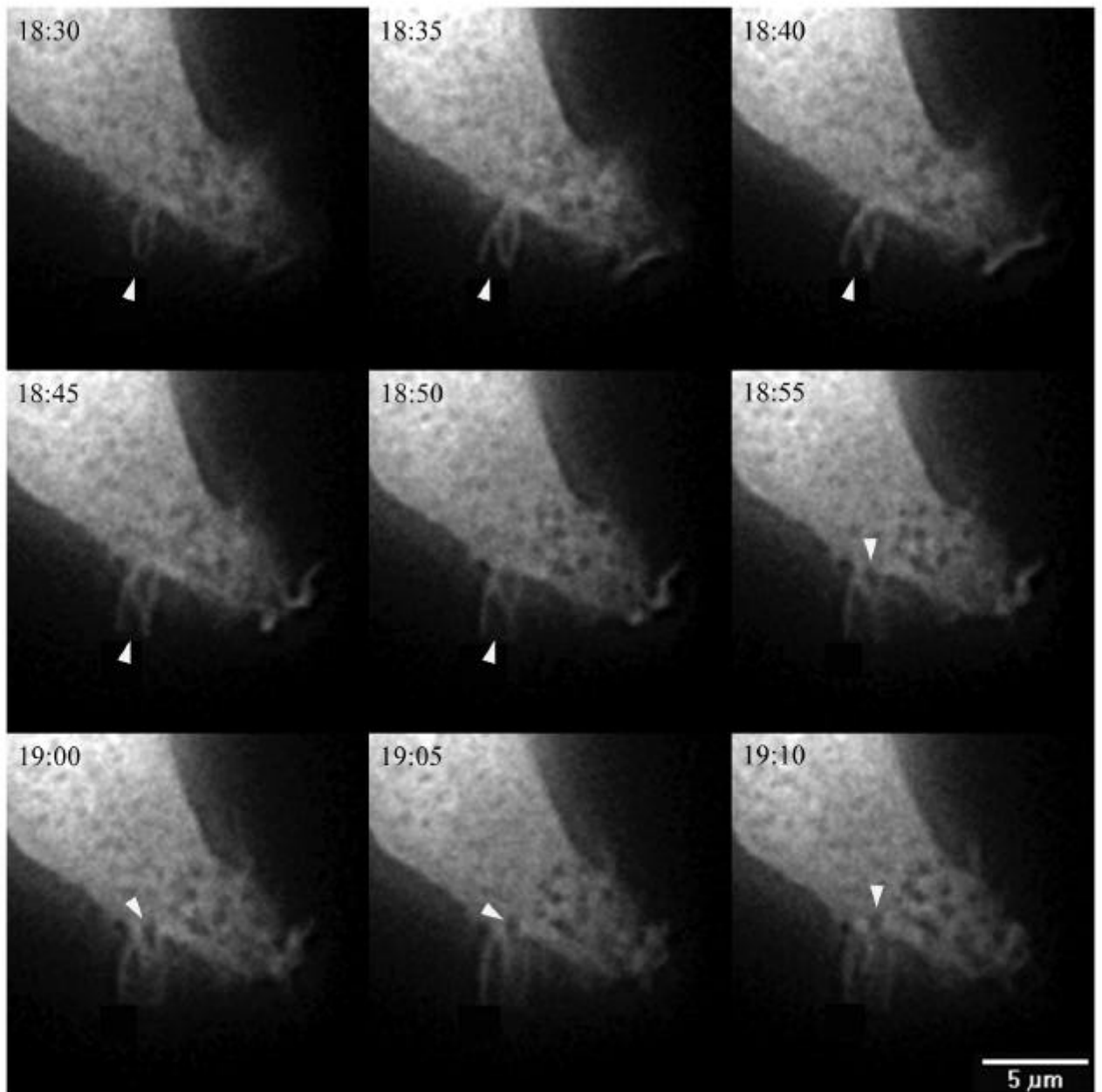
Tafel 2.15.: Lokalisation von Dynamin-I während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung. PC12-251C-Zellen wurden 5 Minuten ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, mit TX-100 permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC (1:1000) bzw. mit anti-Dynamin-I (1:100) und einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist Phalloidin-TRITC rot und anti-Dynamin-I grün dargestellt. Beispiele für Kolokalisation sind mit einem Pfeil markiert.



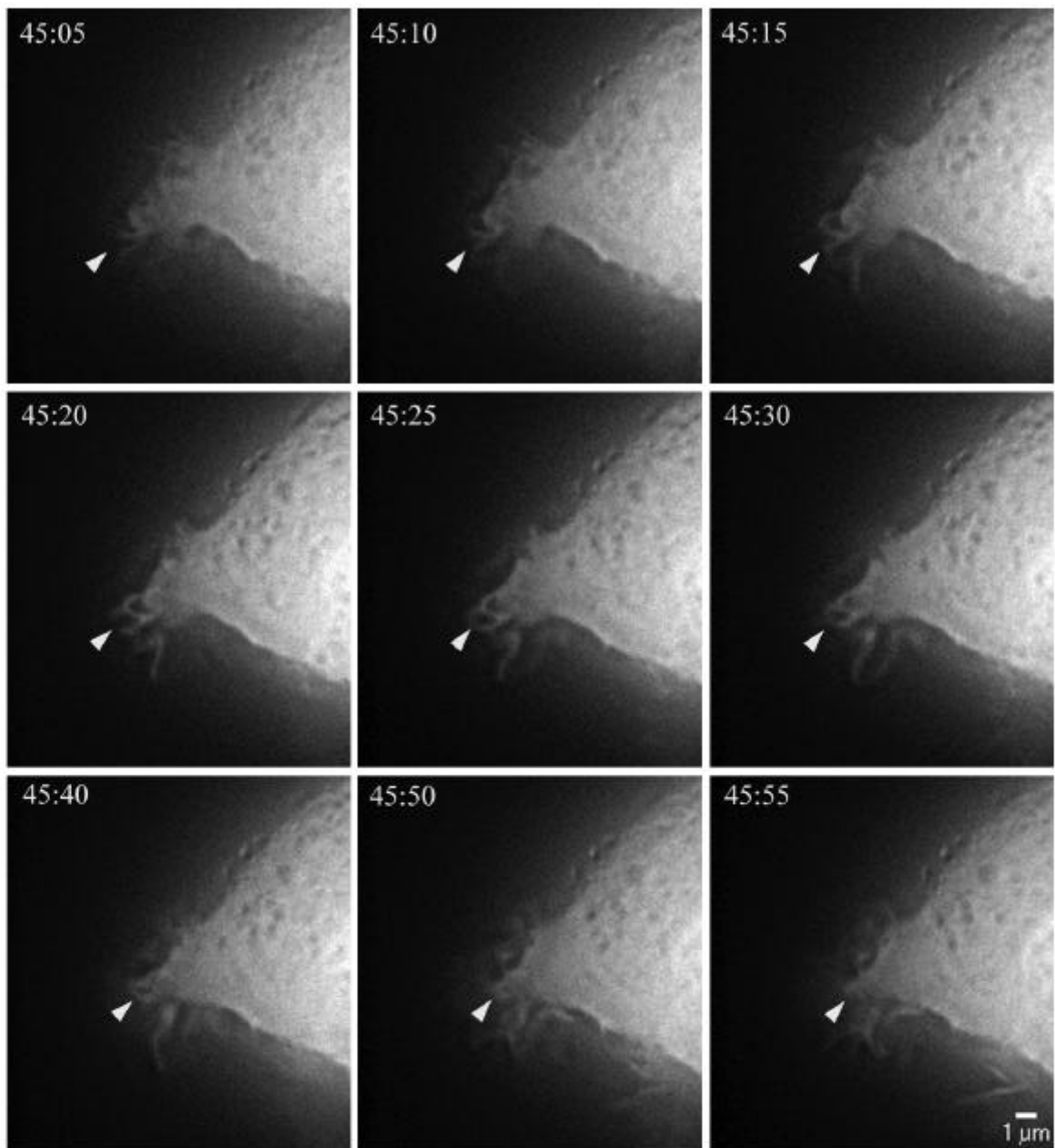
Tafel 2.16.: Lokalisation von Caveolin-1 während der NGF-induzierten Lamellipodienbildung. PC12-251C-Zellen wurden 20 Minuten ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen Caveolin-1 sowie sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörpern und Phalloidin-FITC gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist Phalloidin-TRITC rot und Caveolin-1 grün dargestellt.



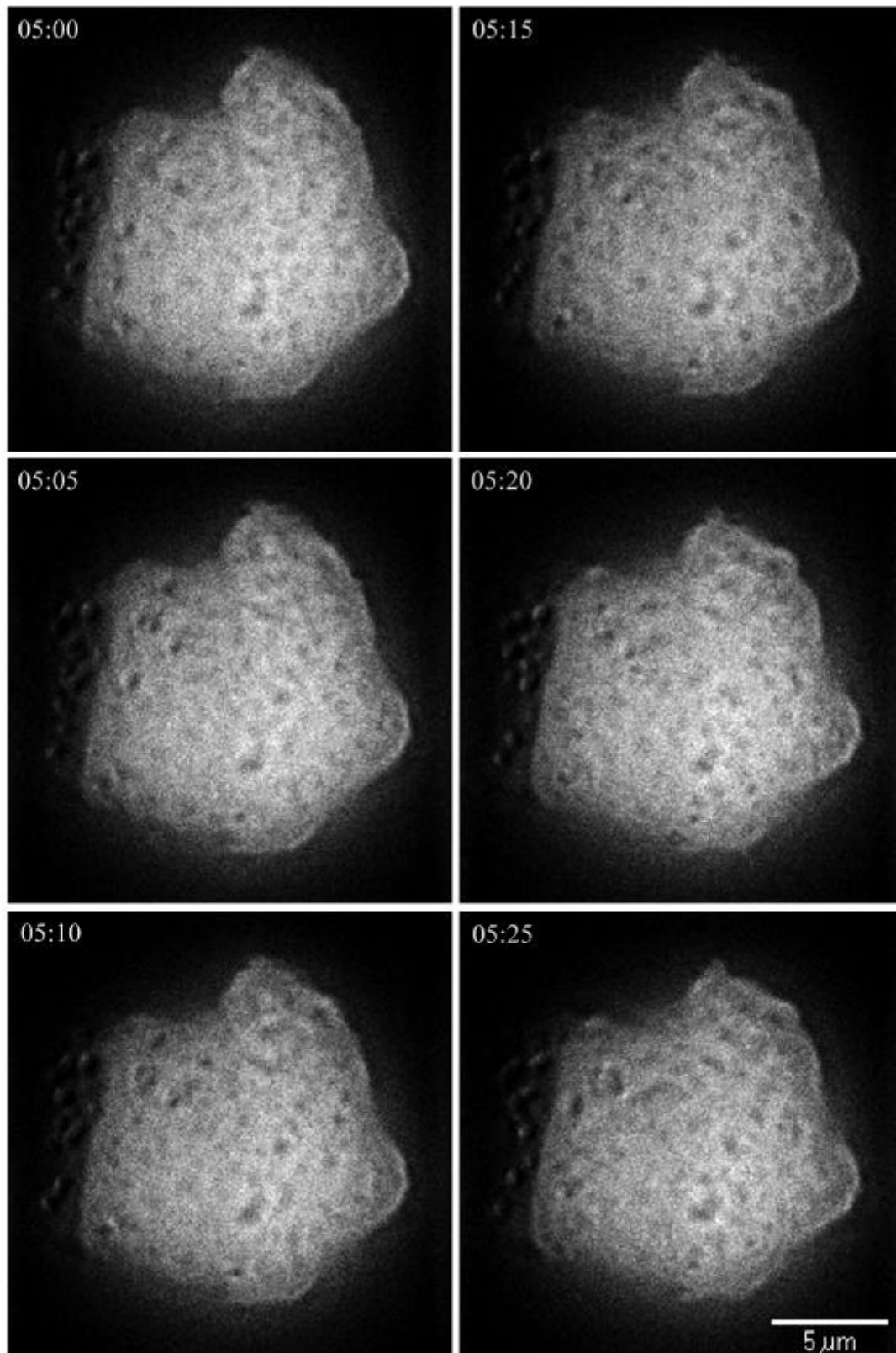
Tafel 2.17.: Die NGF-induzierte Erhöhung der rTransferrin-Aufnahme tritt nach dem Kollabieren der Lamellipodien auf. PC12-251-Zellen wurden für fünf Minuten mit 10ng/ml hbNGF und 15μg/ml rTransferrin bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX100-permeabilisiert und mit einem Anti-rTransferrin Antikörper gefärbt. Der Nachweis erfolgte mit einem fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper (A, C). F-Aktin wurde mit Phalloidin-TRITC angefärbt (B, D).



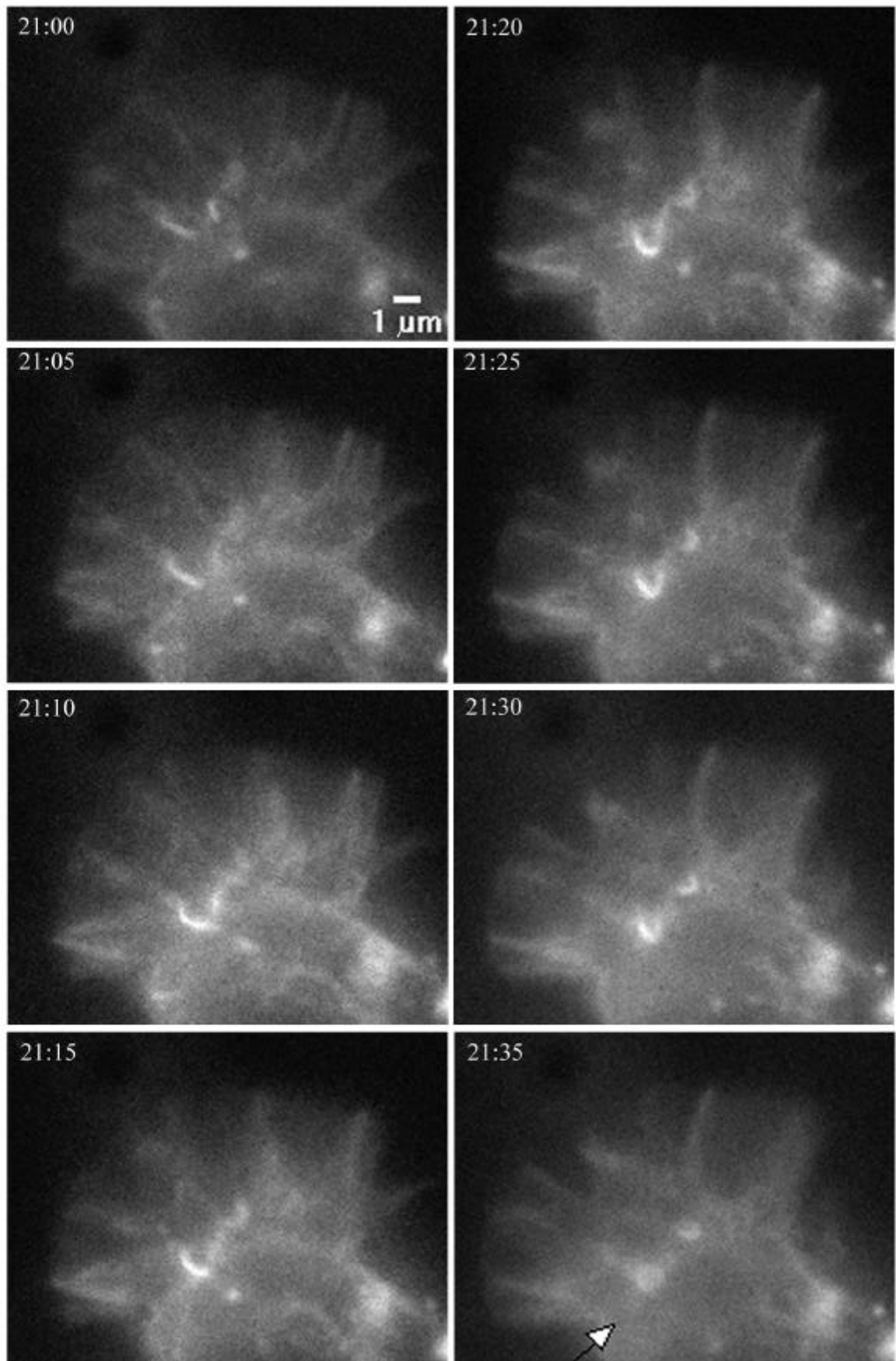
Tafel 3.1.: Vesikel-Abschnürung und Internalisierung nach Stimulation mit NGF. Transient GFP-transfizierte PC12-251C-Zellen wurden 19 Stunden nach Transfektion mit 10ng/ml hbNGF bei 37°C inkubiert und mit Hilfe von Videomikroskopie analysiert. Die Bilder wurden Film 6 entnommen, die Zeit nach Stimulation mit NGF ist angegeben in Minuten und Sekunden. Ein sich bildendes Vesikel ist mit einem Pfeil markiert.



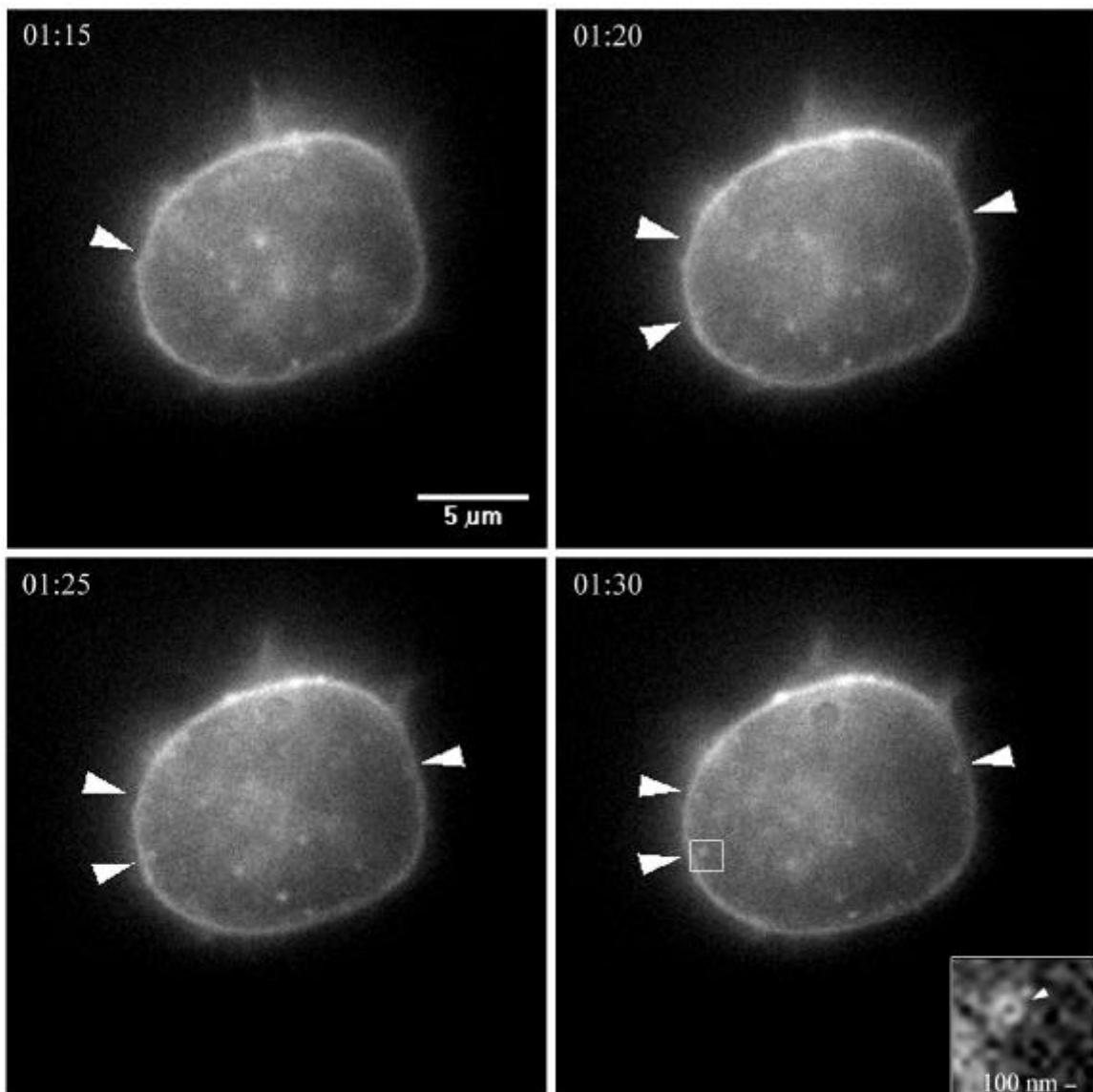
Tafel 3.2.: Vesikel-Abschnürung und Internalisierung nach Stimulation mit PMA. Transient GFP-transfizierte PC12-251C-Zellen wurden 20 Stunden nach Transfektion mit 0,5 μM PMA bei 37°C inkubiert und mit Hilfe von Videomikroskopie analysiert. Die Zeit nach Stimulation mit PMA ist angegeben in Minuten und Sekunden. Sich abschnürende Vesikel sind mit einem Pfeil markiert.



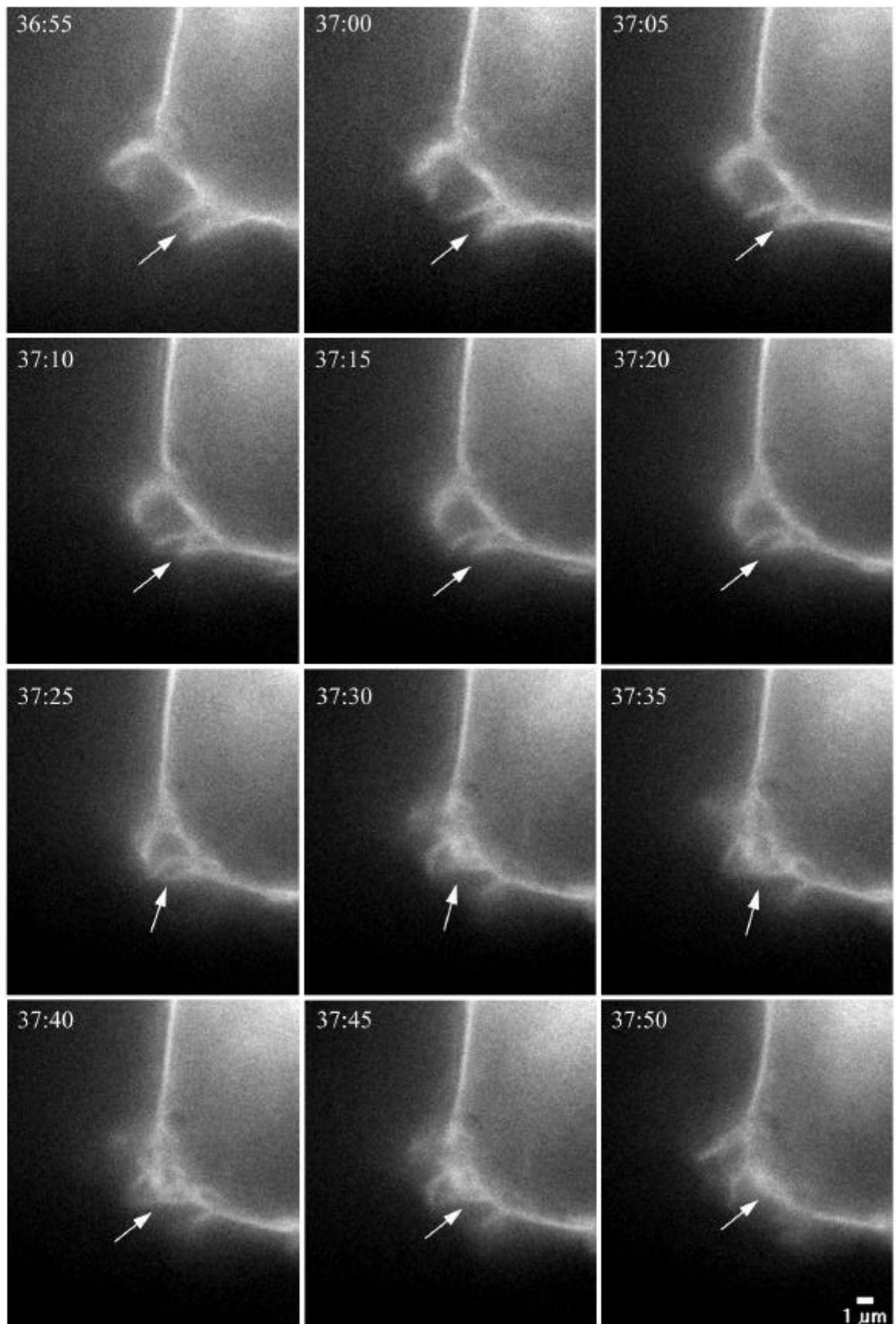
Tafel 3.3.: Einfluß von Cytochalasin D auf NGF-induzierte Makropinozytose. Transient GFP-transfizierte PC12-251C-Zellen wurden 16,5 Stunden nach Transfektion 25 Minuten bei 35-37°C mit 0,05µM Cytochalasin D inkubiert. Dann wurde 10ng/ml hbNGF zugegeben und die Zelle mit Hilfe von Videomikroskopie analysiert. Die Zeit nach Zugabe von hbNGF ist in Minuten und Sekunden angegeben. Die Zelle verändert sich über die gesamte Aufnahme-Zeit von 15 Minuten kaum in ihrer Morphologie.



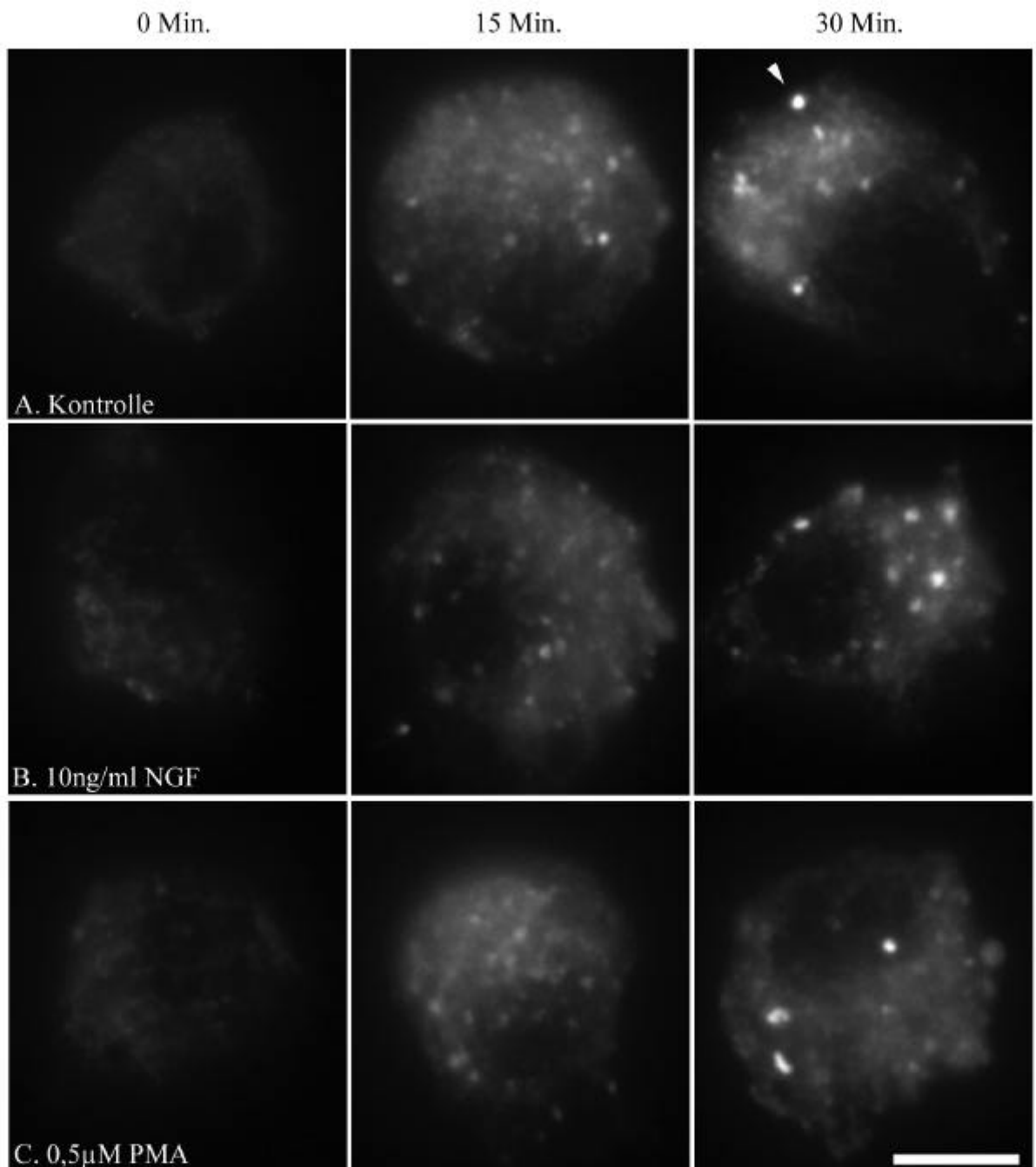
Tafel 3.4.: Internalisierung von Vesikeln in Abhängigkeit von NGF Stimulation. PC12-251C-Zellen wurden für 18 Minuten bei 32°C mit 10ng/ml hbNGF inkubiert. Dann wurde der Farbstoff FM-143 (1,3μM) und OSS zugegeben und die Zellen mit Hilfe von Videomikroskopie analysiert. Die Bilder wurden Film 8 entnommen. Angegeben ist die Zeit nach hbNGF-Zugabe in Minuten und Sekunden. Neugebildete Vesikel sind mit einem Pfeil markiert. Der Durchmesser dieser Vesikel betrug 0,94 bzw. 0,54μM.



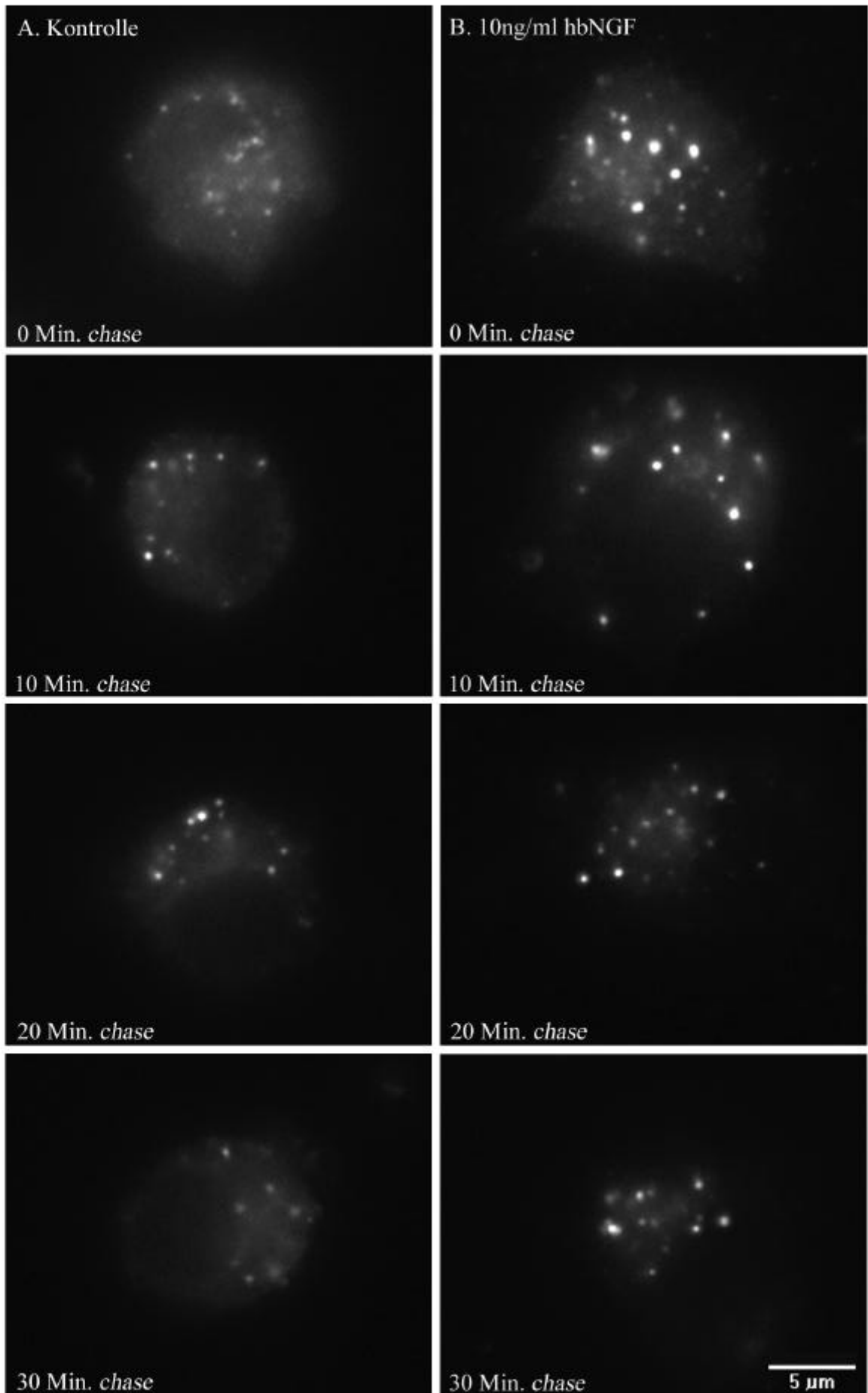
Tafel 3.5.: Internalisierung von Vesikeln in PC12-Zellen. PC12-251C-Zellen wurden in Gegenwart von FM1-43 ($1,3\mu\text{M}$) und OSS bei 36°C inkubiert und mit Hilfe von Videomikroskopie analysiert. Die Bilder wurden Film 9 entnommen. Angegeben sind die Zeiten nach Zugabe des Farbstoffs in Minuten und Sekunden. Sich abschnürende Vesikel sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Ausschnitt zeigt eine 4-fache Vergrößerung eines Vesikels, der Balken entspricht 100 nm.



Tafel 3.6.: Internalisierung von Vesikeln nach PMA-Stimulation. PC12-251C-Zellen wurden 35 Minuten und 50 Sekunden mit $0,5\mu\text{M}$ PMA bei 36°C in-kubiert. Dann wurde $1,3\mu\text{M}$ FM-143 und OSS zugegeben und die Zellen mittels Videomikroskopie analysiert. Die Bilderserie beginnt 1 Minute und 5 Sekunden nach Zugabe des Farbstoffs. Sich bildende Vesikel sind mit einem Pfeil markiert. Die Zeit nach PMA-Zugabe ist in Minuten und Sekunden angegeben.



Tafel 3.7.: Untersuchung des Einflusses von hbNGF und PMA auf PC12-Zellen nach Oberflächen-Biotinylierung. Die PC12-251-Zellen wurden durch 15-minütige Inkubation bei 4°C abgekühlt und dann für 30 Minuten mit 0,35mg/ml NHS-SS-Sulfo-Biotin bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes Biotin wurde durch 15-minütige Inkubation mit 50mM Glycin-haltigem Puffer deaktiviert, die Zellen gewaschen und für die angegebenen Zeiträume bei 37°C ohne (A) bzw. in Anwesenheit von 10ng/ml hbNGF (B) oder 0,5µM PMA (C) inkubiert. Oberflächlich gebundenes Biotin wurde anschließend durch eine zwei mal 30 Minuten lange Inkubation bei 4°C mit 50mM Glutathion entfernt. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Streptavidin-FITC (1:1000) gefärbt. Sehr intensiv leuchtende Punkte (Pfeil) erscheinen auf dem Bild größer. Der Balken entspricht 5µm.



Tafel 3.8.: Dextran-TMR-Aufnahme in Abhängigkeit von NGF. PC12-251-Zellen wurden 20 Minuten ohne (A) oder mit 10ng/ml hbNGF (B) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 10 Minuten 2mg/ml Dextran-TMR zugegeben, anschließend gewaschen und über die angegebenen Zeiträume weiter inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert.

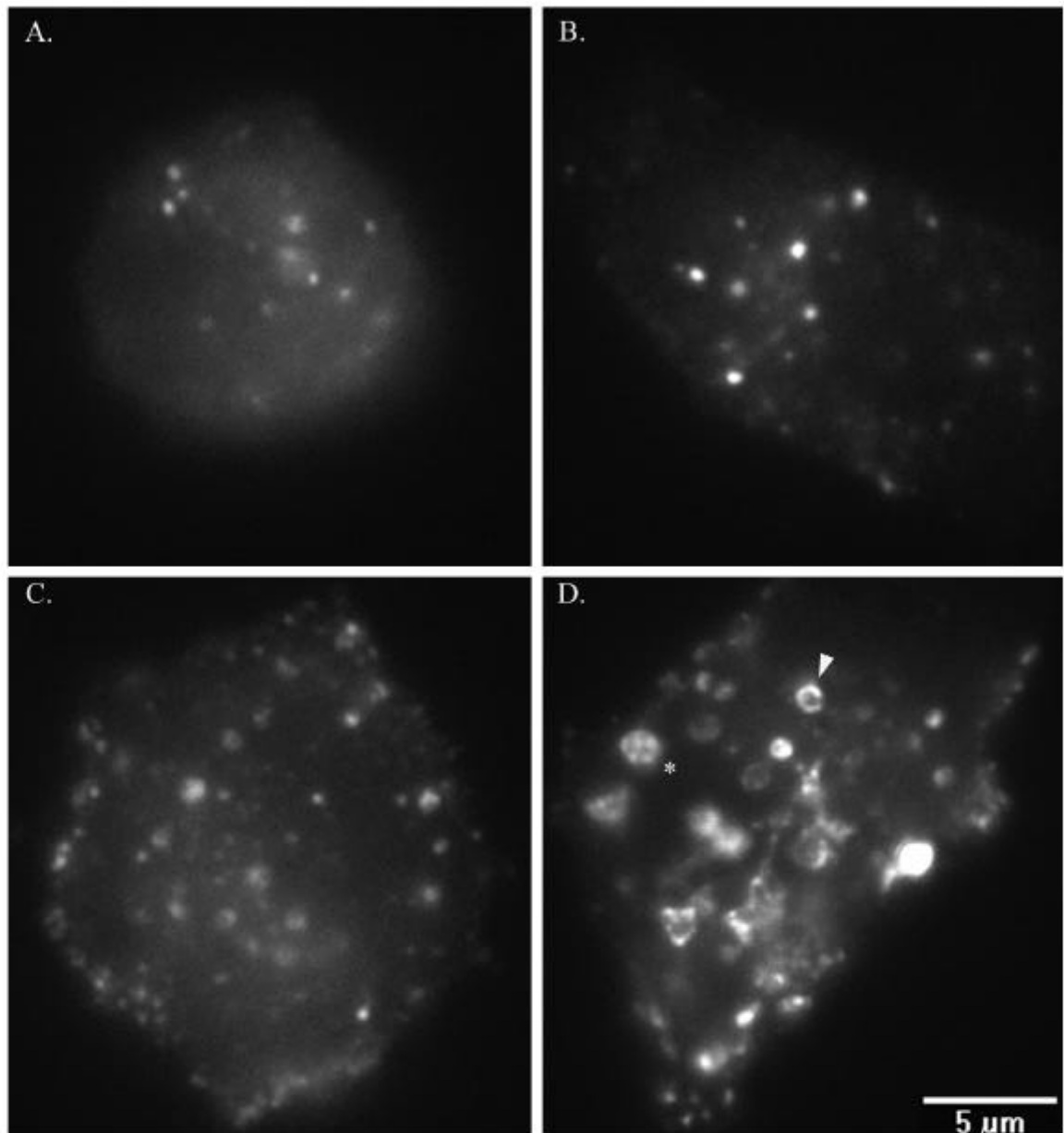
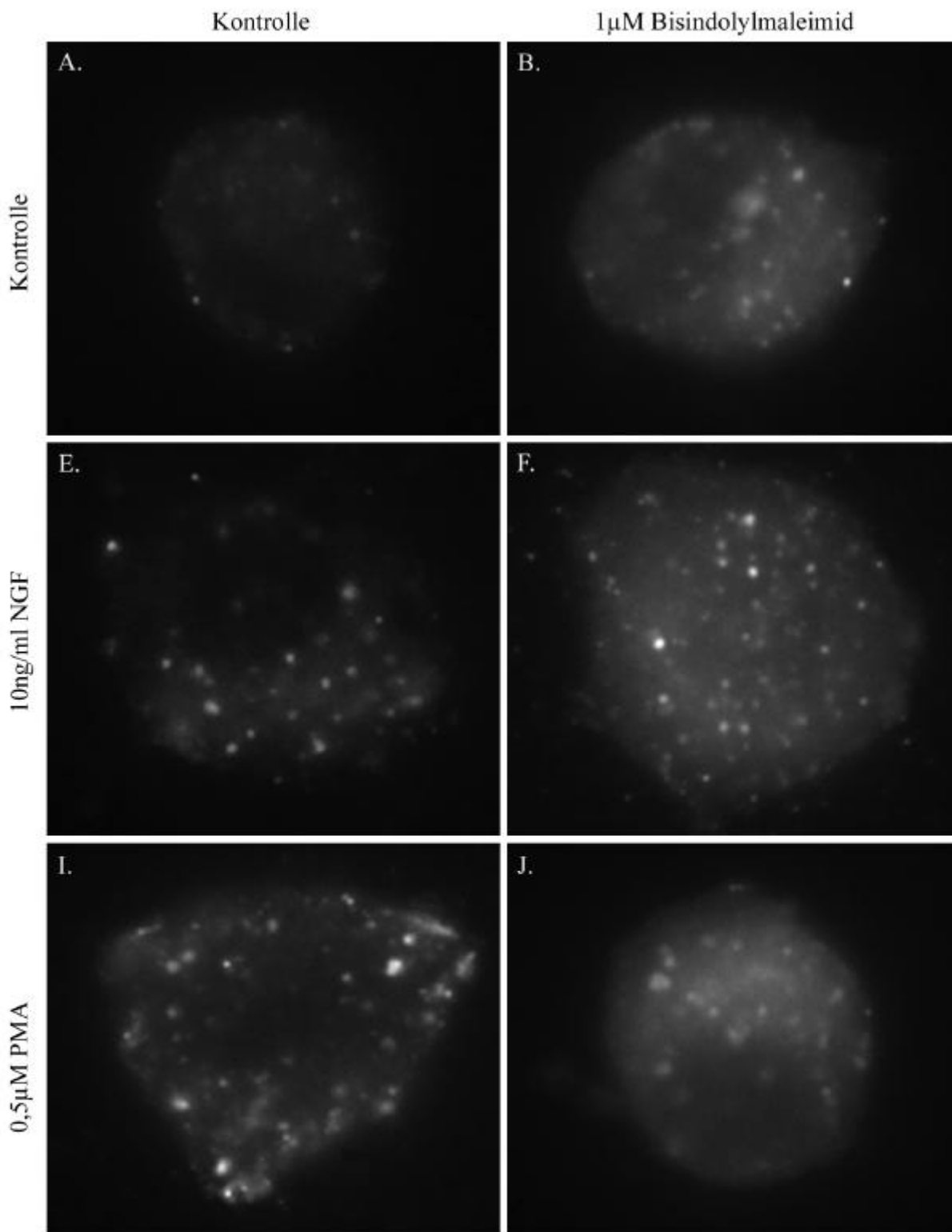


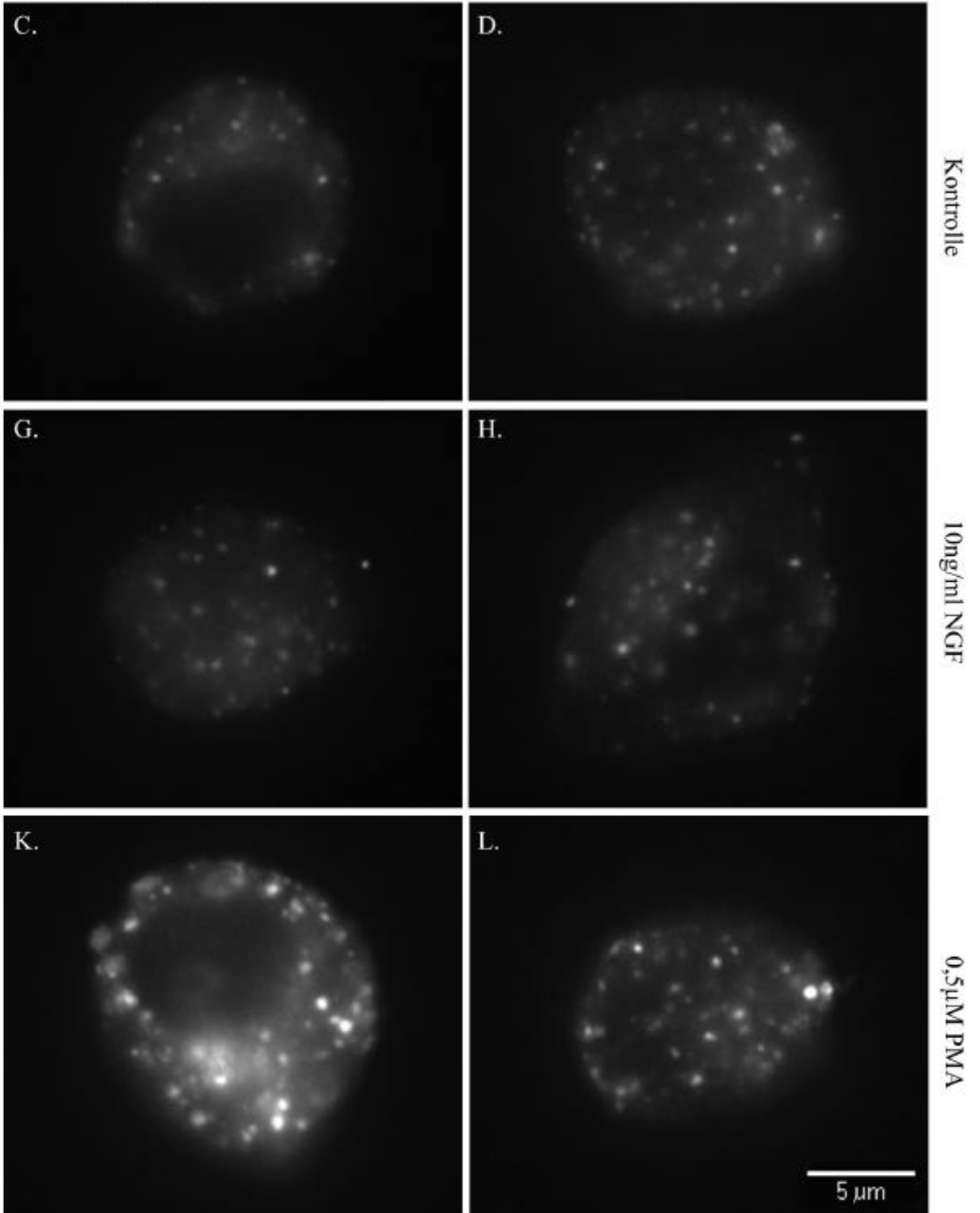
Abbildung 3.9.: Dextran-TMR-Aufnahme in Abhängigkeit von NGF und PMA. PC12-251C-Zellen wurden für 20 Minuten ohne (A) oder mit 10ng/ml hbNGF (B) bzw. 0,5µM PMA (C und D) bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 10 Minuten 2mg/ml Dextran-TMR zugegeben, anschließend gewaschen und bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert. PMA-behandelte Zellen zeigten ein heterogenes Erscheinungsbild. Eine typische Ausprägung des Dextran-TMR-Signals ist in Bild C gezeigt. Die Zelle in Bild D stellt ein extremes Beispiel da, Zellen mit Dextran-TMR-positiven Vesikeln in Form von Ringen (Pfeil) oder Rädern (Stern) finden sich zu diesem Zeitpunkt bei etwa 30% der Zellen. Der Anteil von Zellen mit diesem Phänotyp wurde durch längere *chase*-Zeiten reduziert. Dieses Phänomen wurde auch bei 251-Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).



Tafel 3.10.: Untersuchung des NGF-induzierten Anstiegs der Dextran-Aufnahme. PC12-251C-Zellen wurden für 20 Minuten mit Versuchsmedium (A, E, I), 1 μ M Bisindolylnmaleimid (B, F, J), 0,1 μ M Cytochalasin D (C, G, K) oder 3mM Amilorid (D, H, L) bei 37°C inkubiert. Dann wurden 10ng/ml NGF (E, F, G, H) oder 0,5 μ M PMA (I, J, K, L) zugegeben und für weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 2mg/ml Dextran-TMR zu den Zellen gegeben und für 10 Minuten inkubiert, 3-mal gewaschen und abschließend bei Raumtemperatur mit 3 % PFA fixiert.

0,1 μ M Cytochalasin D

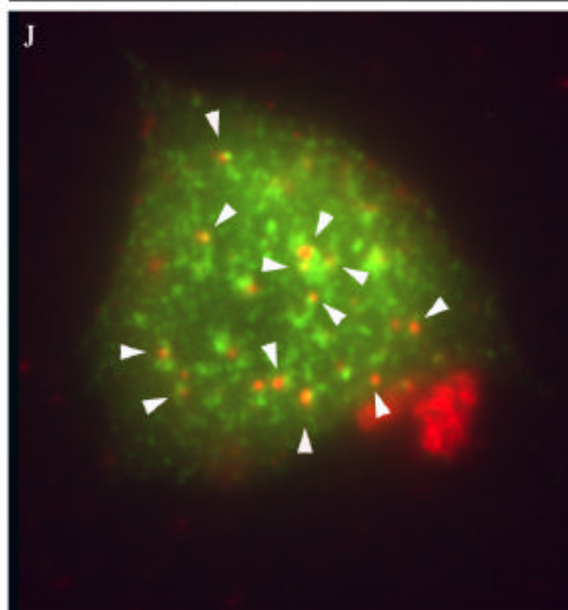
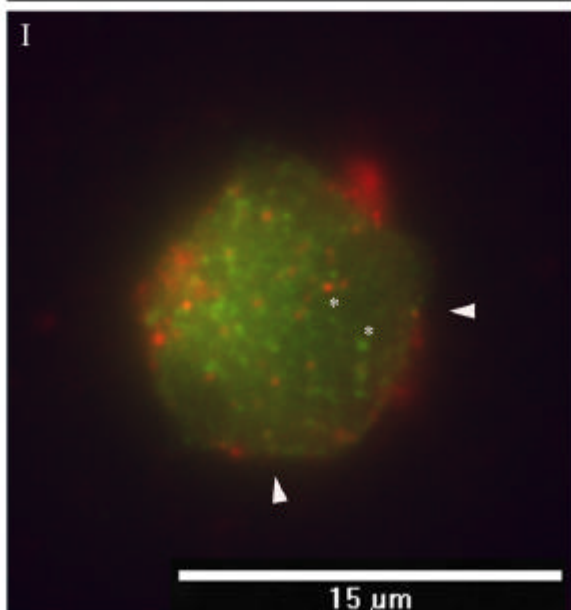
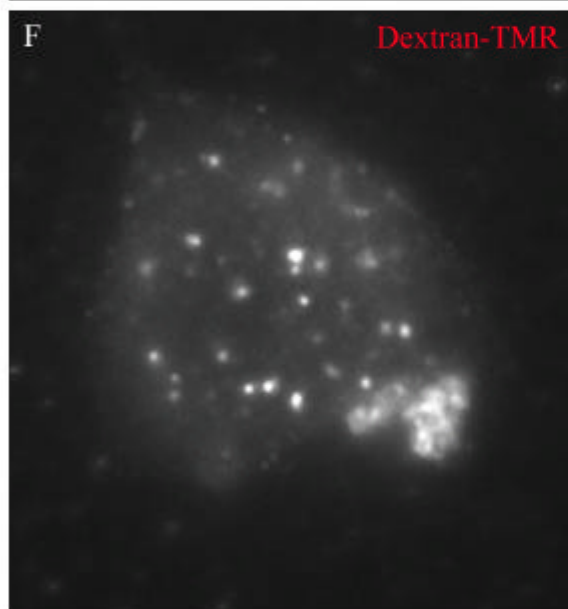
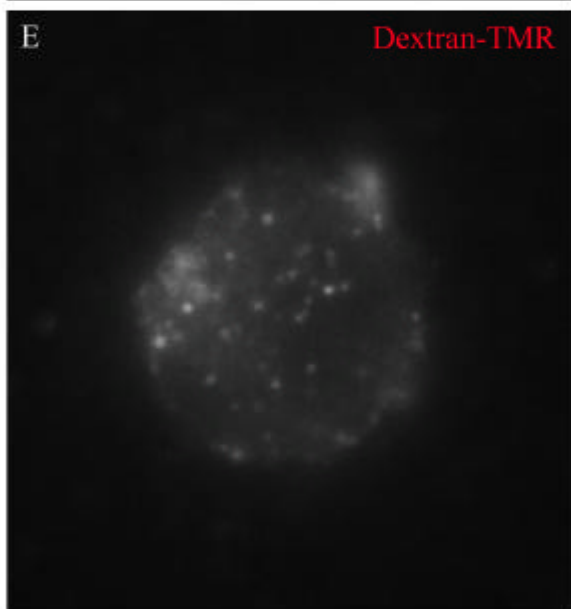
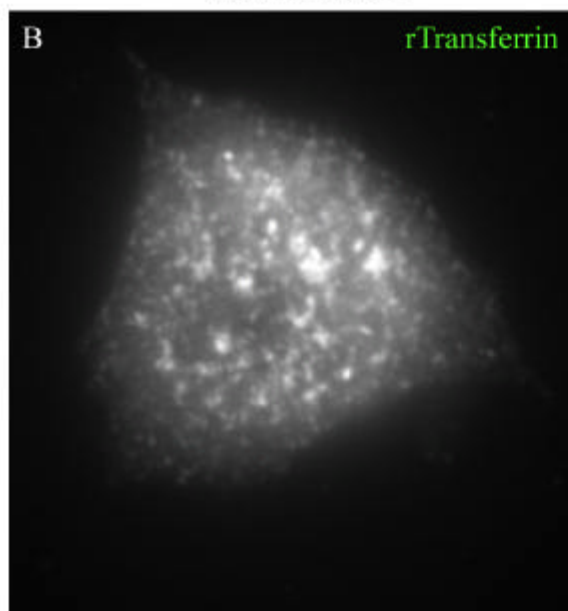
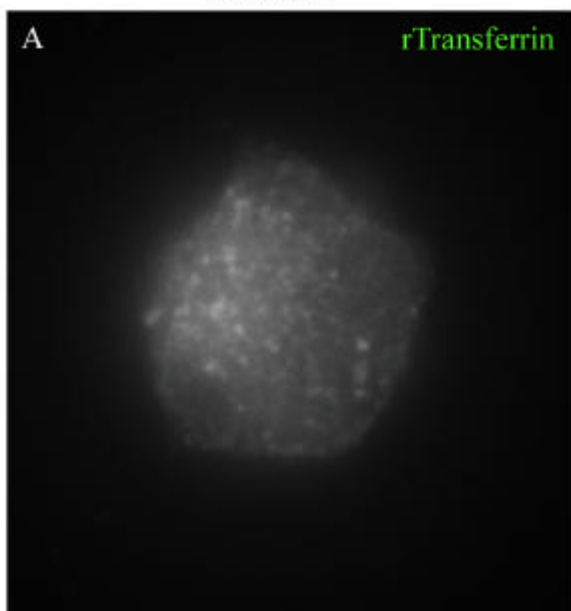
3mM Amilorid



Tafel 3.11.: Kolokalisation von Dextran und Transferrin. PC12-251-Zellen wurden für 20 Minuten ohne (A, E, I) bzw. mit 10ng/ml NGF (B, C, F, G, J, K) oder 0,5µg/ml PMA (D, H, L) bei 37°C inkubiert, dann wurde für 5 Minuten 2mg/ml Dextran-TMR zugegeben. Danach wurde für weitere 5 Minuten mit 15µg/ml rTransferrin und 2mg/ml Dextran-TMR bei 37°C inkubiert. Anschließend die Zellen gewaschen, bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert und TX-100 permeabilisiert. Der Nachweis von rTransferrin erfolgte mit dem anti-Transferrin Antikörper und einem sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörper. In der Zweikanalardarstellung (I, J, K, L) ist rTransferrin grün und Dextran-TMR rot dargestellt. Pfeile kennzeichnen Beispiele für Kolokalisation, Sterne Beispiele für nicht kolokalisierende Punkte.

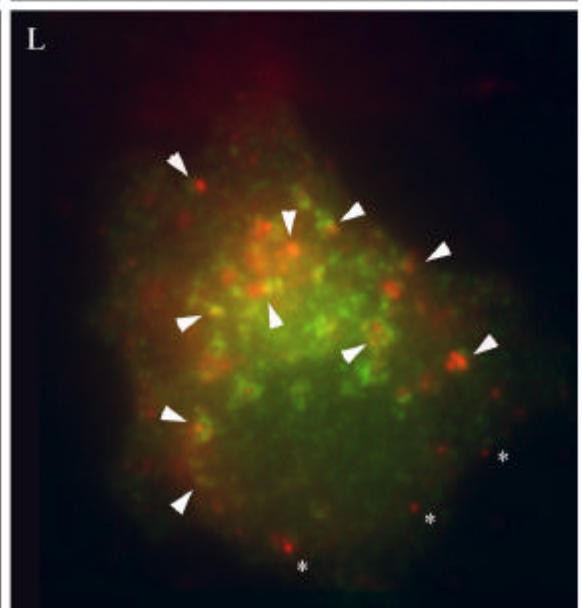
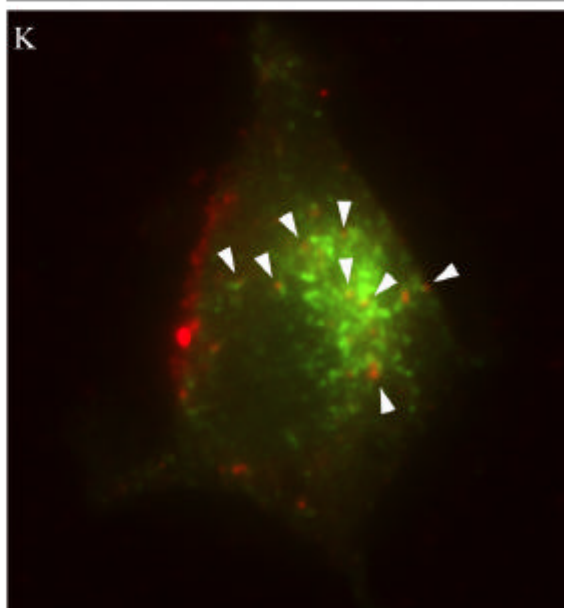
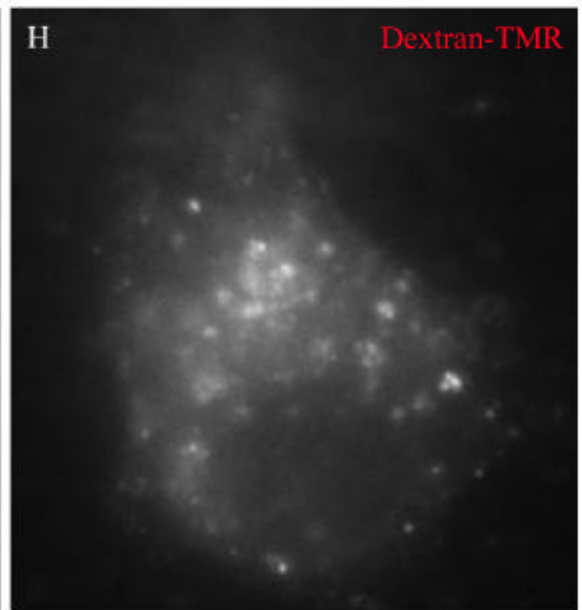
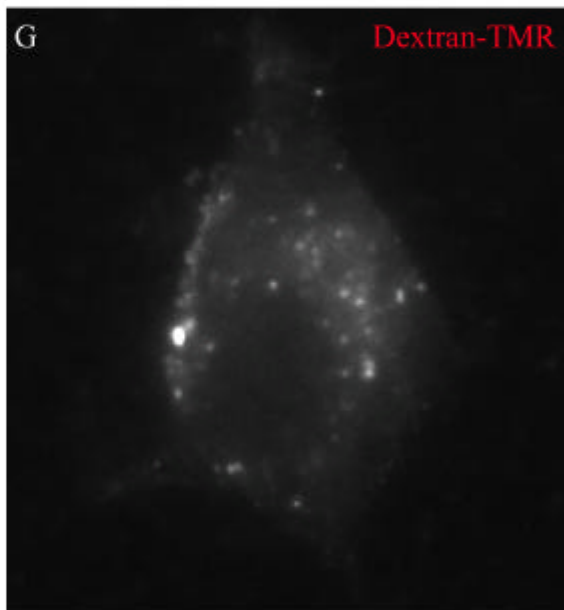
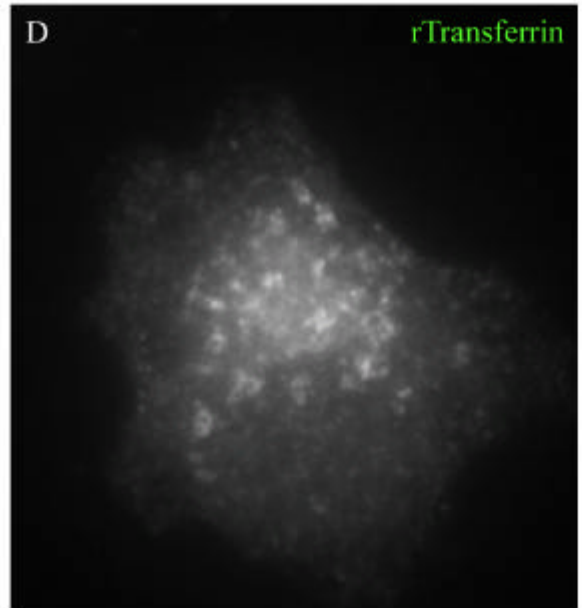
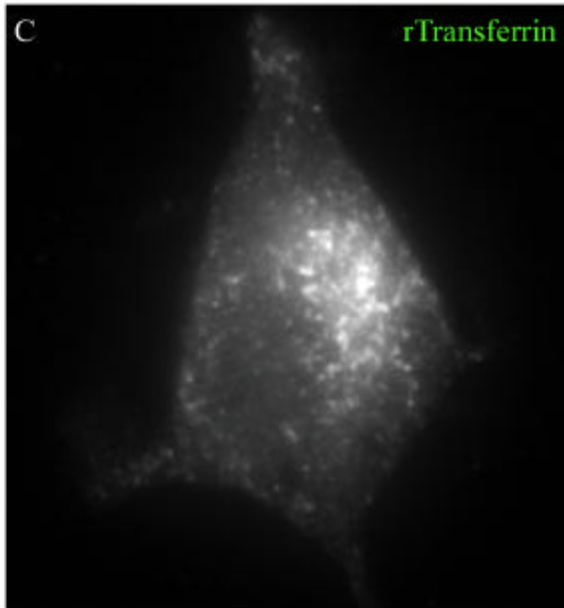
Kontrolle

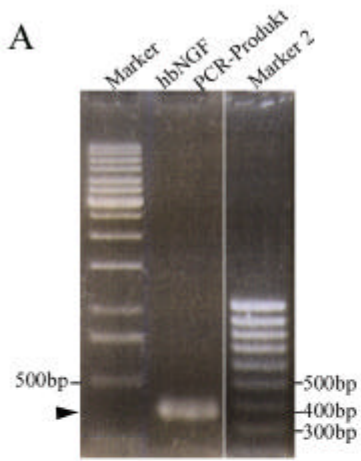
10ng/ml hbNGF



10ng/ml hbNGF

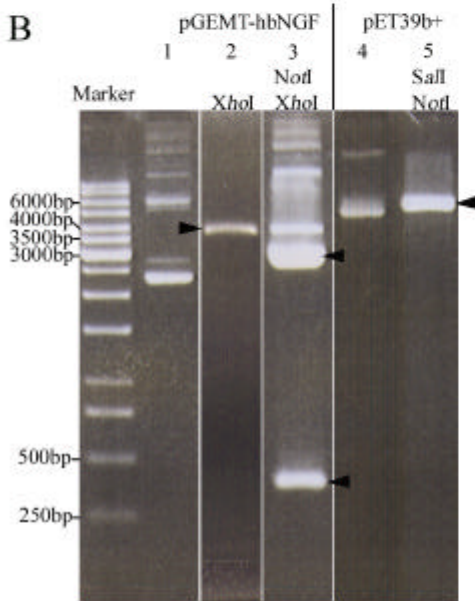
0,5 μ M PMA



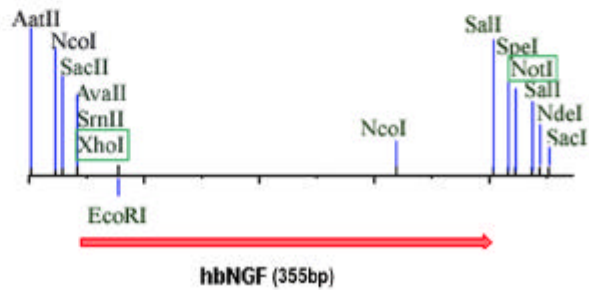


hbNGF Amplifizierung und Einfügen einer *XhoI* und *SalI* Schnittstelle durch PCR (A)

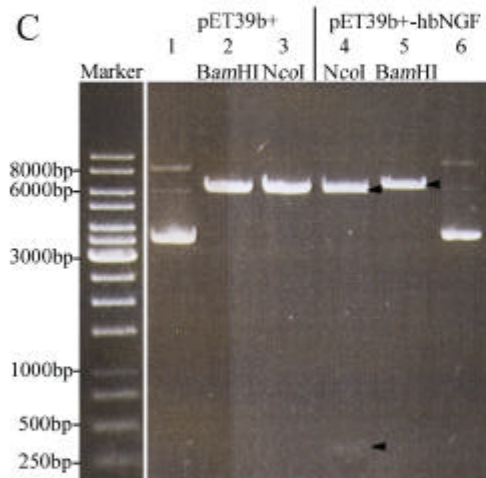
Ligation über den Poly-A-Überhang mit pGEMT



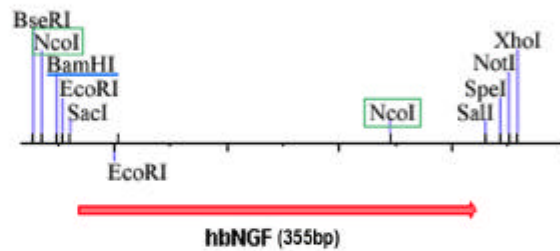
hbNGF in pGEMT (3376bp), MCS



Isolierung eines 335bp großen hbNGF-enthaltenden Fragmentes aus pGEMT-hbNGF mit *XhoI* und *NotI*, (B, Bahn 3), Ligation mit *SalI* und *NotI* linearisiertem pET39b+-Vektor (B, Bahn 5, 6106bp). Dabei wurde die *SalI*-Schnittstelle des Vektors zerstört, die *NotI*-Schnittstelle blieb erhalten.

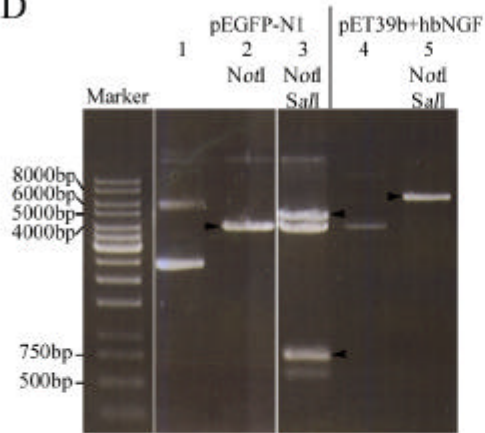


hbNGF in pET39b+ (6475bp), MCS

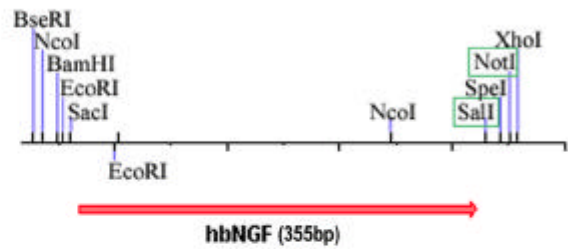


Analyse von pET39b+-hbNGF. Durch Verdau mit *BamHI* wurde der Vektor linearisiert (C, Bahn 5, 6475bp), *NcoI*-Inkubation führte zur Bildung eines 6166bp und 309bp Spaltproduktes (C, Bahn 4).

D



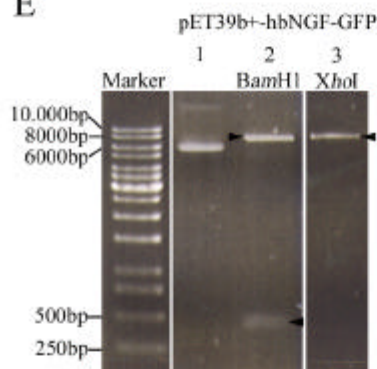
hbNGF in pET39b+ (6475bp), MCS



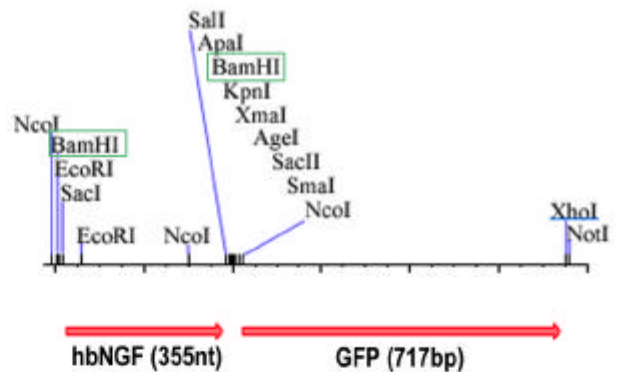
Isolierung der GFP-cDNA (D, Bahn 3, 762bp) aus pEGFP-N1 (D, Bahn 1 und 2, 4733bp) durch *NotI/SalI*-Restriktionsverdau und Ligation mit dem *NotI/SalI* geschnittenen pET39b+-hbNGF Vektor (D, Bahn 4 und 5, 6475bp). Beide Schnittstellen bleiben erhalten.



E

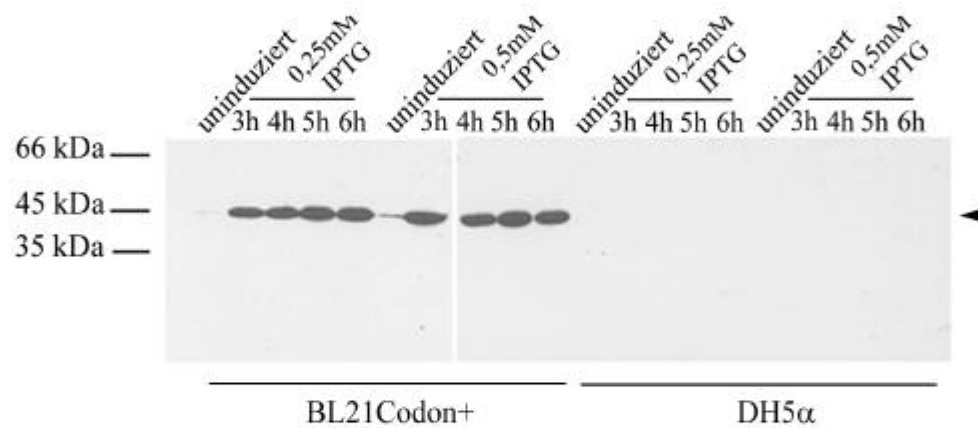


hbNGF-GFP-pET39b+ (7217bp), MCS

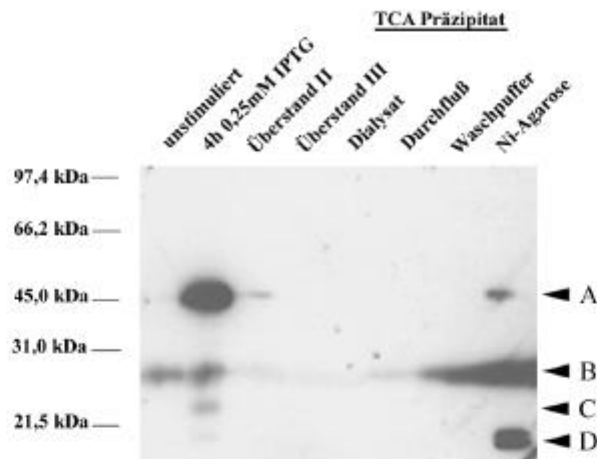


Restriktionsanalyse von pET39b+-hbNGF-GFP mit *BamHI* (E, Bahn 2, 6815 und 402bp) und mit *XhoI* (E, Bahn 3, 7217bp).

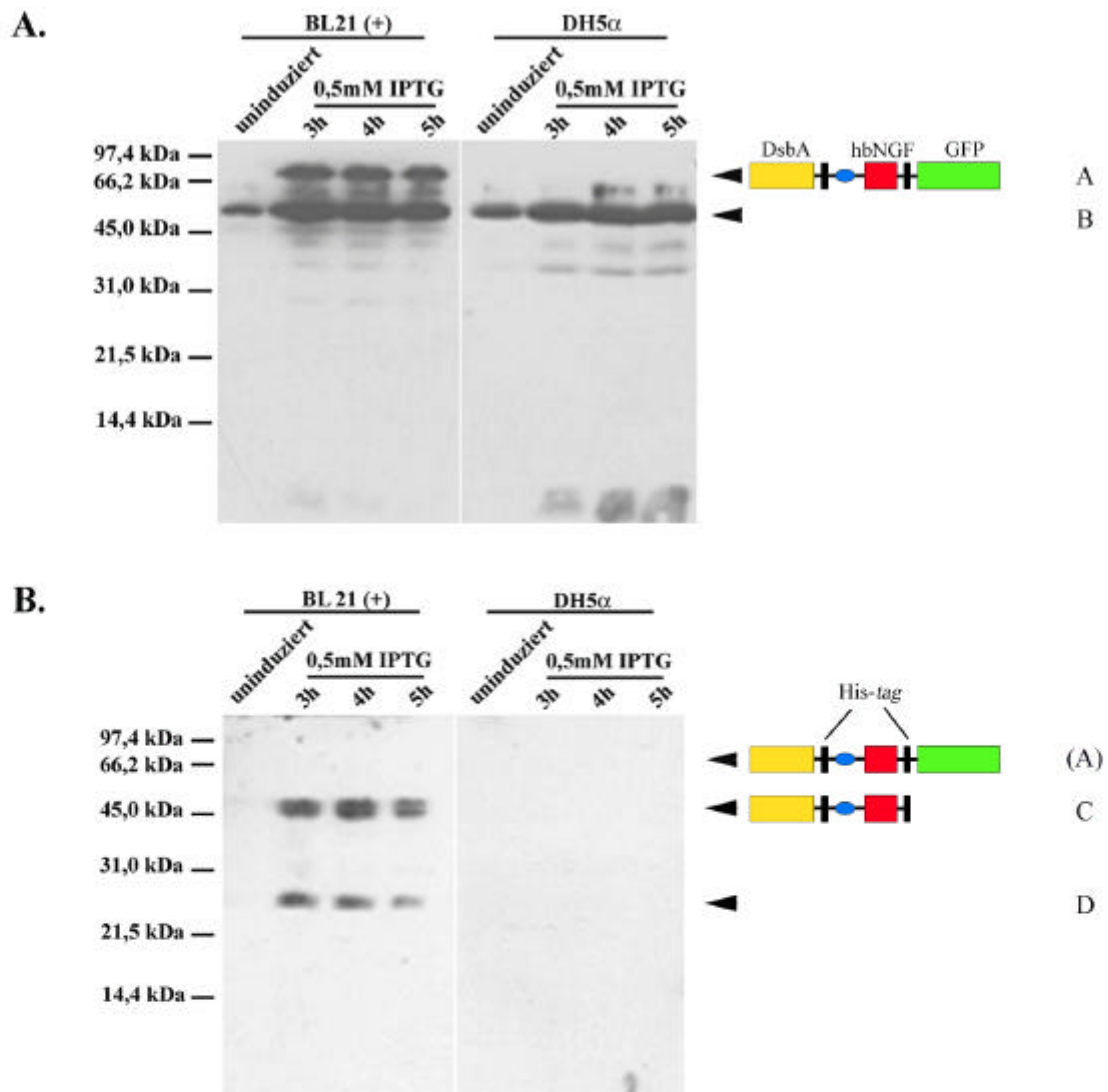
Tafel 4.1.: Übersicht über die durchgeführten Schritte bei der Klonierung des hbNGF-GFP-Fusionsproteins. Auf der linken Seite sind Ethidiumbromid gefärbte Agarose-Gele dargestellt. Die Beschreibung befindet sich jeweils rechts daneben.



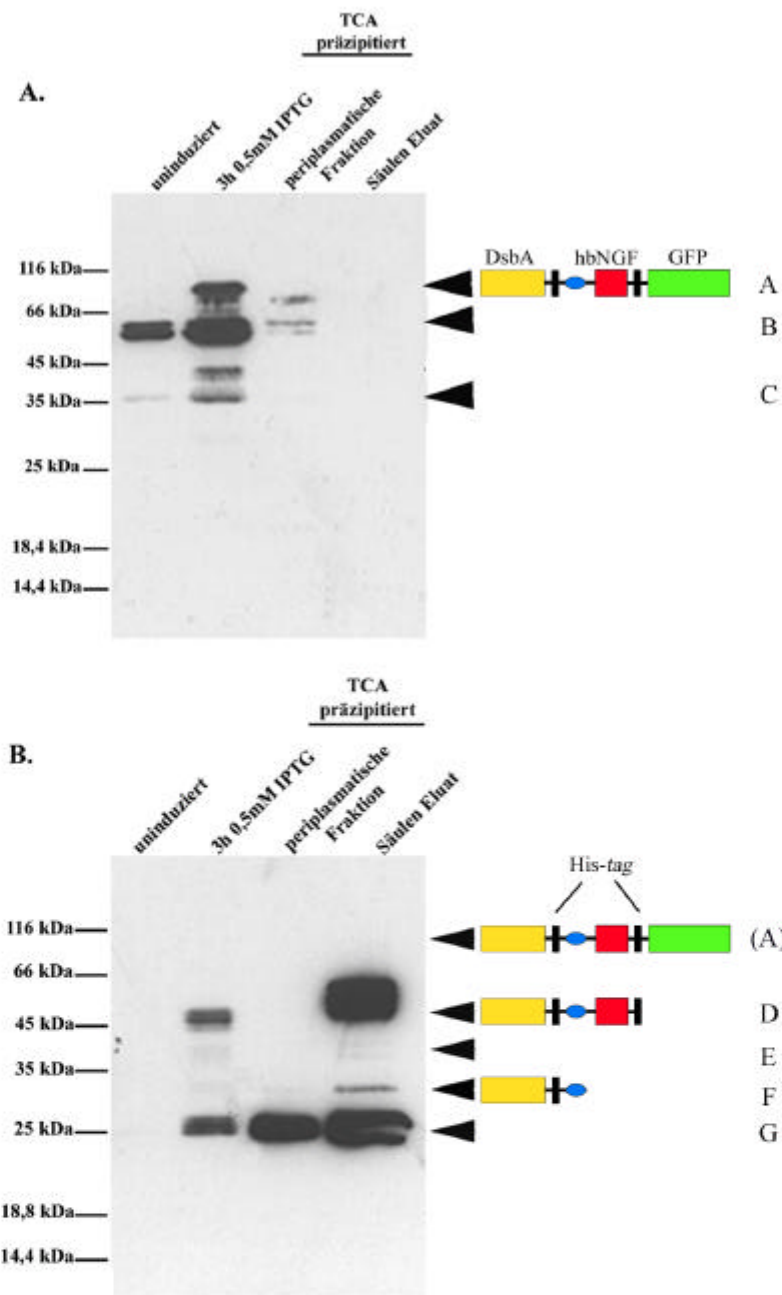
Tafel 4.2.: Expression von DsbA-hbNGF in *E. coli* BL21Codon+ und *E. coli* DH5alpha. Beide Stämme wurden mit pET39b+-hbNGF transformiert. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,35 bis 0,4 bei 600nm wurde die Expression des DsbA-hbNGF-Fusionsproteins mit 0,25 bzw. 0,5m M IPTG für die angegebenen Zeiträume induziert (Pfeil). Dann wurden die Bakterien pelletiert und für die SDS-PAGE vorbereitet. Die Bakterienlysate wurden auf einem 12% SDS-PAA-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und durch Inkubation mit dem monoklonalen Penta-His-Antikörper (1:1000) und einem sekundären anti-Maus HRP-gekoppelten Antikörper (1:1000) über ECL nachgewiesen.



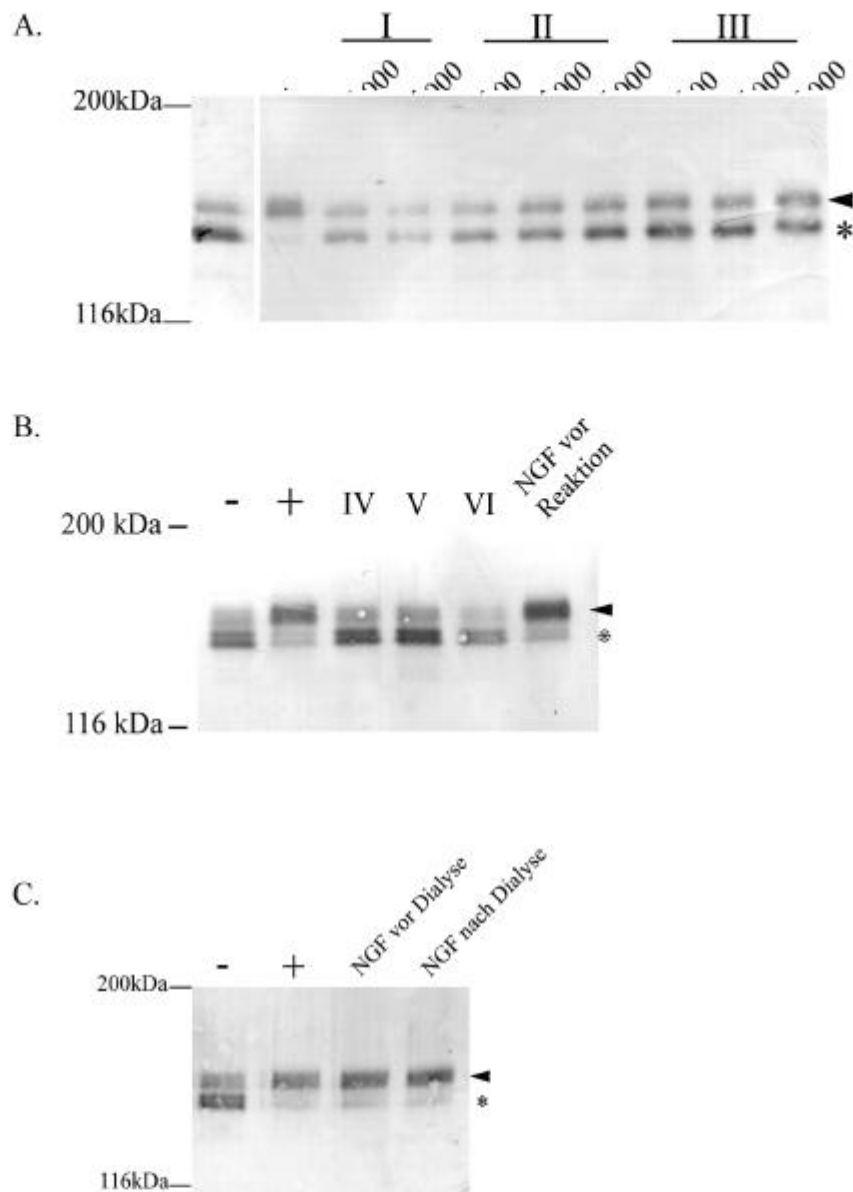
Tafel 4.3.: Expression und Isolierung von DsbA-hbNGF. *E. coli* BL21Codon+- Bakterien wurden mit pET39b+ transformiert. 500 ml Bakterienkultur wurden nach Erreichen einer OD (600nm) von 0,56 für 4h mit 0,25 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert, gewaschen (Überstand II) und die periplasmatischen Proteine durch osmotischen Schock freigesetzt (Überstand III). 1/3 (100 ml) des periplasmatischen Überstandes wurde über Nacht dialysiert. Das Dialysat wurde mit 10mM Imidazol versetzt und auf eine mit Ni-NTA-Perlen beladenen Säule aufgetragen. Nicht gebundene Proteine befanden sich anschließend im Durchfluß. Die Säule wurde mit 20mM Imidazol-haltigem Puffer gewaschen (Waschpuffer). Proteine für die Westernblot-Analyse wurden anschließend aus Aliquots von Dialysat, Durchfluß und Waschpuffer TCA-präzipitiert. Je 1/12000 des Gesamtvolumens der unstimulierten und IPTG-stimulierten Bakterien, 1/7000 der Überstände II und III, 1/700 des Dialysates und des Durchflusses, je 1/700 sowie 1/140 des Waschpuffers und 1/700 der Beads wurden auf ein 12% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Das DsbA-hbNGF wurde nach anschließendem Transfer auf Nitrozellulose durch den monoklonalen Penta-His-Antikörper (1:1000) und einem sekundären anti-Maus HRP-gekoppelten Antikörper(1:1000) mittels ECL nachgewiesen.



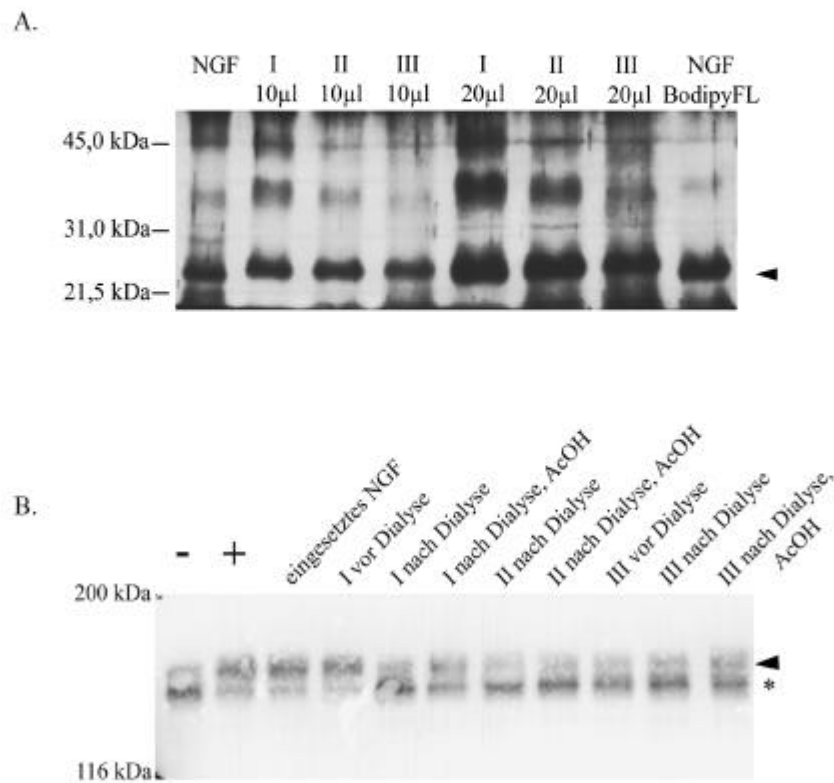
Tafel 4.4.: Expression von pET39b+-hbNGF-GFP in *E. coli* BL21Codon+ und *E. coli* DH5alpha. Beide Stämme wurden mit pET39b+-hbNGF-GFP transformiert, selektiert und amplifiziert. Bei einer OD (600nm) zwischen 0,5 und 0,6 wurde die Expression von DsbA-hbNGF-GFP durch 0,5mM IPTG für die angegebenen Zeiten bei Raumtemperatur induziert. Die Bakterien wurden anschließend pelletiert und für die SDS-PAGE vorbereitet. Dann wurden die Lysate auf einem 15% PAA-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. **A.** Färbung mit dem anti-core-GFP-Antikörper (denaturiert 1:5000). **B.** Färbung mit dem anti-Penta-His-Antikörper (1:1000). Die Entwicklung erfolgte mittels ECL durch anti-Maus bzw. anti-Kaninchen HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper (1:1000 bzw. 1:25000).



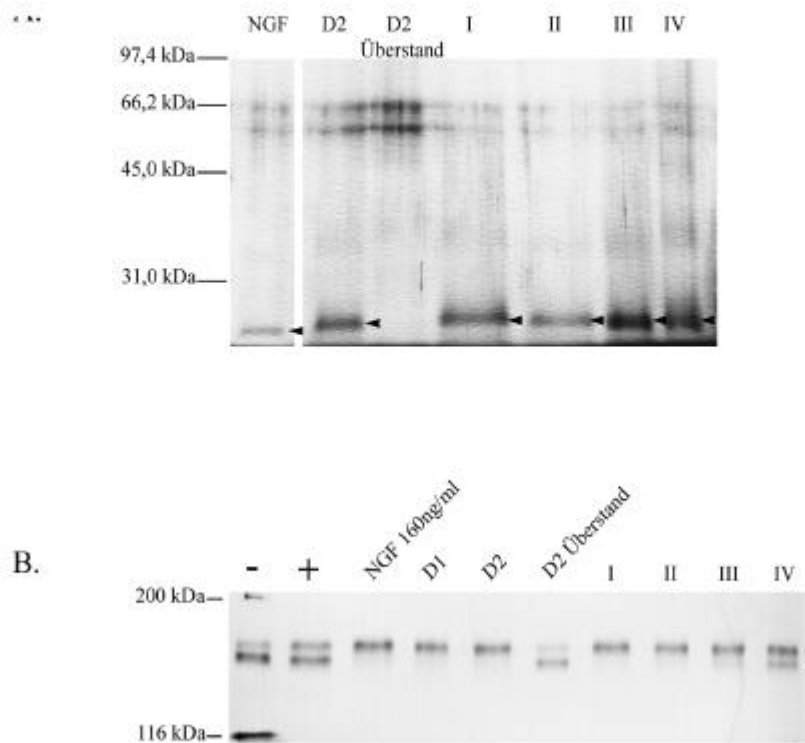
Tafel 4.5.: Expression und Isolierung von DsBA-hbNGF-GFP aus *E.coli* BL21Codon+. Die Bakterien wurden mit pET39b+hbNGF-GFP transformiert. Bei einer OD (600nm) von 0,6 wurde mit 0,25 mM IPTG für 4h bei Raumtemperatur induziert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert, gewaschen, und die Proteine durch osmotischen Schock aus dem periplasmatischen Raum freigesetzt (periplasmatische Fraktion). Die Fraktion wurde dialysiert, mit 10mM Imidazol versetzt und auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen. Die Säule wurde in Anwesenheit von 20mM Imidazol gewaschen und anschließend mit 250mM Imidazol-haltigem Puffer eluiert (Säulen Eluat). Von der periplasmatischen Fraktion wurden die Proteine aus einem Aliquot und aus dem Eluat vollständig TCA-präzipitiert. Die Lysate und Präzipitate wurden für die SDS-PAGE vorbereitet und auf einem 12% SDS-PAA-Gel getrennt. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert (ohne SDS) und mit dem anti-core-GFP (denaturiert, 1:5000, **A.**) und anti-Penta-His-Antikörpern (1:1000, **B.**) markiert. Der Nachweis erfolgte mittels ECL mit sekundären anti-Maus bzw. anti-Kaninchen HRP-gekoppelten Antikörpern (1:1000 bzw. 1:25000). Die aufgetragene Menge entsprach etwa 1/500 der periplasmatischen Fraktion und 1/13 des Säulen-Eluats. Die Kontrollen stammen aus einem vergleichbar durchgeführten Experiment mit kleinerem Kulturvolumen und erlauben deshalb nur qualitative Aussagen.



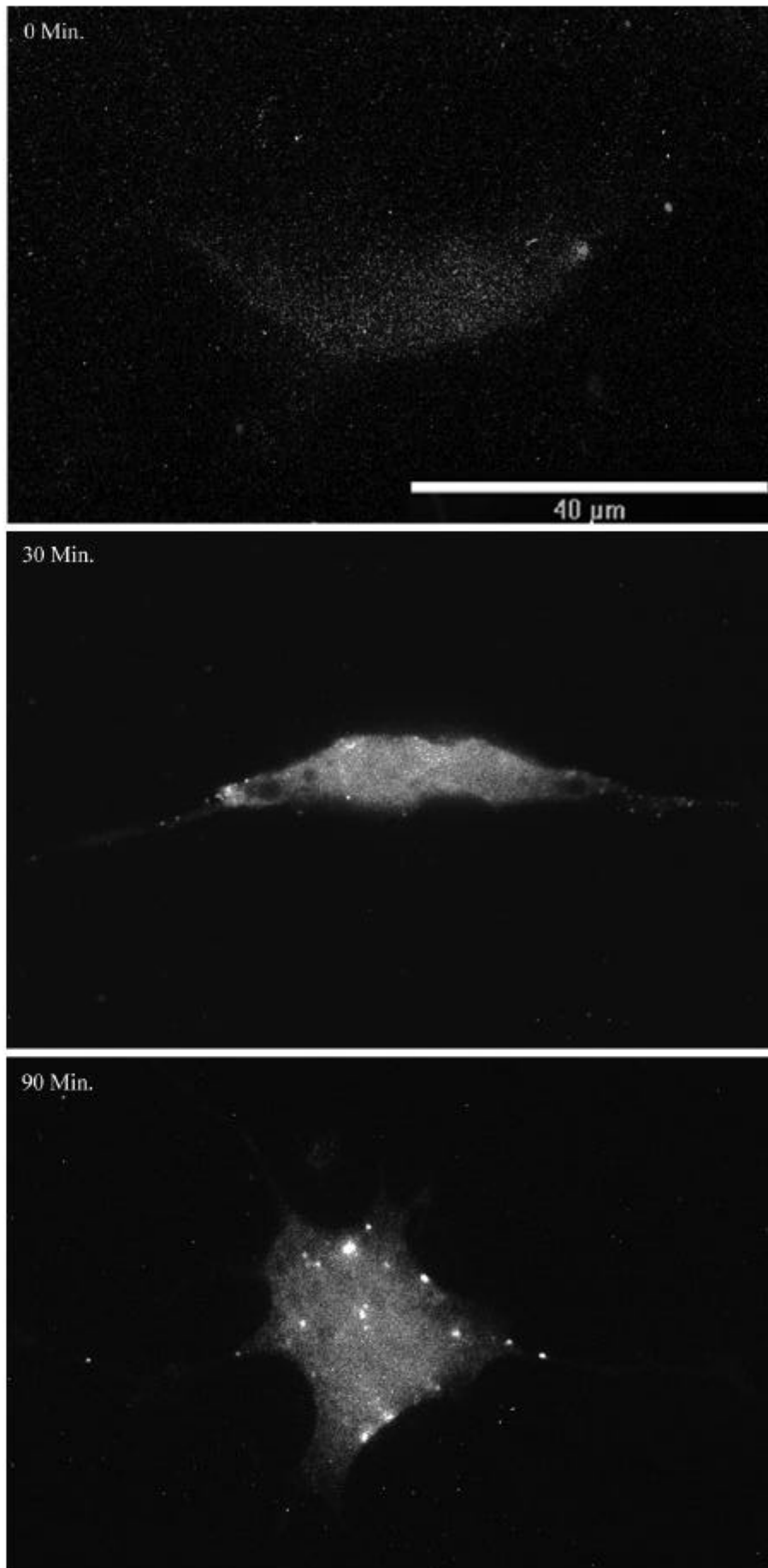
Tafel 4.6.: Untersuchung von Bodipy-TMRX-hbNGF und Bodipy-FL-hbNGF auf biologische Aktivität. PC12-251C-Zellen wurden für 20 Minuten ohne (-) oder mit (+) 10ng/ml NGF bzw. den entsprechend gekennzeichneten Fluorochromierungsansätzen inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und im PAA-Gel (3-10%) aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem Antikörper gegen Amphiphysin-I (CD5 1:500) gefärbt. Der Nachweis erfolgte über einen sekundären anti-Kaninchen Alkalische Phosphatasegekoppelten Antikörper (1:2500). Die hyperphosphorylierte Bande ist mit einem Pfeil markiert, die niedriger phosphorylierte Bande mit einem *. **A.** Fluorochromierung mit Bodipy-TMR-X, Ansätze I bis III. Eingesetzte Konzentrationen sind angegeben. **B.** Fluorochromierung mit Bodipy-TMR-X, Ansätze IV bis VI. Reaktionsansätze wurden jeweils 1:1000 eingesetzt. **C.** Fluorochromierung mit Bodipy-FL-CASE, die Reaktionsansätze wurden jeweils 1:1000 eingesetzt.



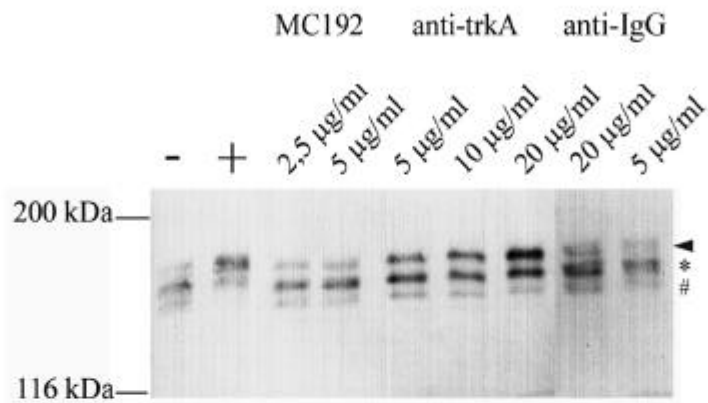
Tafel 4.7.: Analyse der Reaktionsansätze nach Fluorochromierung von hbNGF mit Bodipy-TMR-STP und Bodipy-FL. **A.** Auftrennung im PAA-Gel (3-10%), Nachweis der Protein-Banden durch Silberfärbung. Die eingesetzten Mengen betragen für NGF etwa 1,6 µg und für NGF-Bodipy-FL etwa 1,3 µg. Die Proteinkonzentration der Ansätze I bis III wurden nach der Reaktion nicht bestimmt, deswegen können nur Volumenangaben gemacht werden. hbNGF ist mit einem Pfeil markiert. **B.** PC12-251C-Zellen wurden ohne (-) oder mit 10ng/ml NGF (+) bzw. den Reaktionsansätzen für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, die Lysate auf einem PAA-Gel (3-10%) aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit einem Antikörper gegen Amphiphysin-I (CD5, 1:500) gefärbt. Der Nachweis erfolgte über einen Alkalische Phosphatase-gekoppelten sekundären anti-Kanichen Antikörper (1:2500). Die hyperphosphorylierte Bande ist mit einem Pfeil markiert, die niedriger phosphorylierte Bande mit einem *. Die mit 3% Essigsäure versetzten Proben sind mit "AcOH" gekennzeichnet.



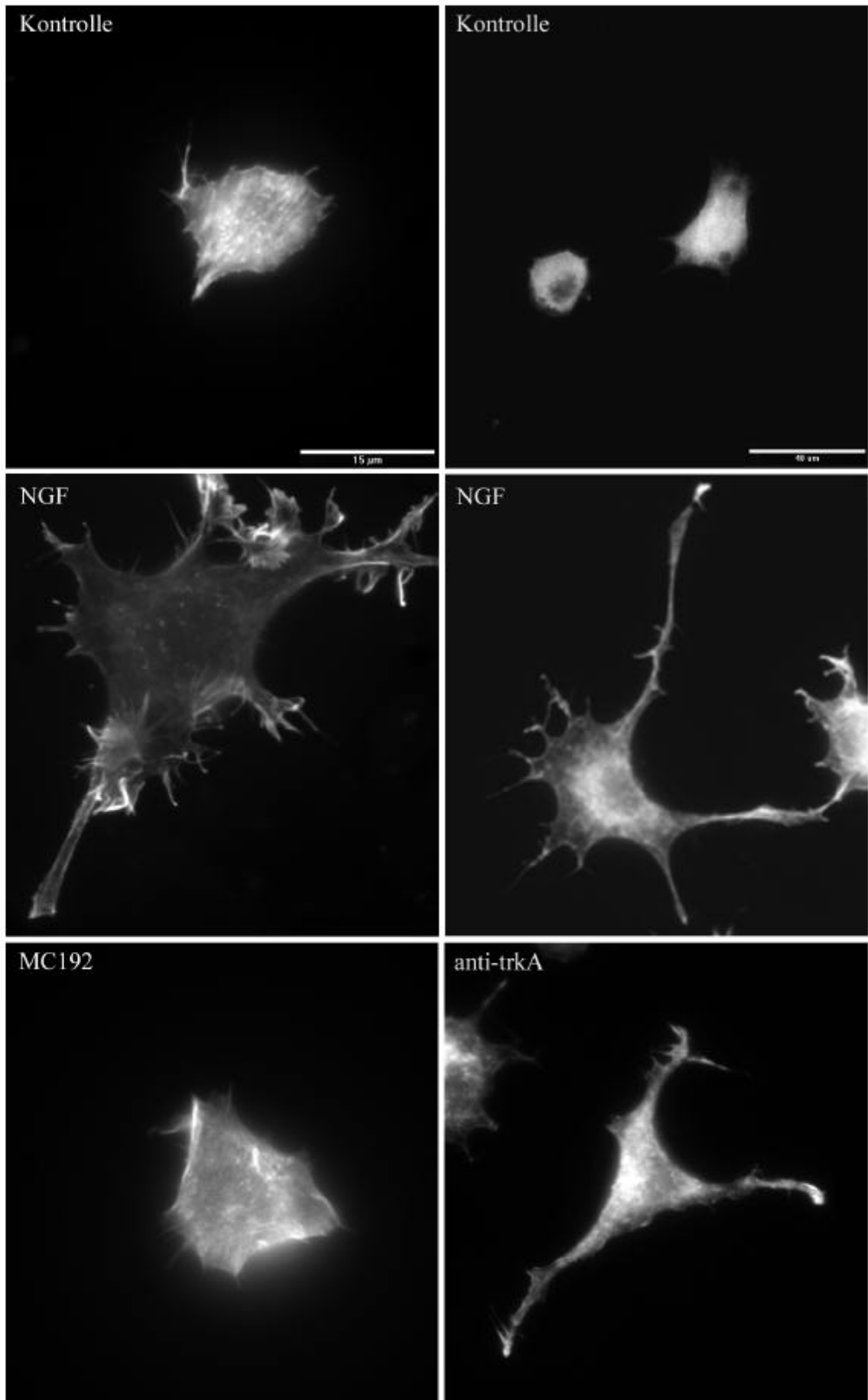
Tafel 4.8.: Analyse des Alexa488Maleimid markierten hbNGF. Fluorochromiertes hbNGF (D2) wurde entweder mit 3% Essigsäure versetzt (I) oder unverändert zwei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand von Probe I wurde abgenommen (II). Von den nicht angesäuerten Proben wurde nach der Zentrifugation das Pellet in DMSO (III) bzw. 10% DMSO (IV) gelöst. A. 225 ng Protein aus Ansatz D2 (2,5 µl), 5 µl vom D2-Überstand und I bis IV sowie 10µl D3 wurden in einem 12 % SDS-PAA-Gel getrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Auffällig ist das unterschiedliche Laufverhalten der Proben (D2 bis IV) im Vergleich zu unmarkiertem hbNGF (Pfeil). B. PC12-251C-Zellen wurden für 20 Minuten ohne (-) oder mit 10ng/ml hbNGF (+) bzw. je 160ng D1 und D2 sowie den entsprechenden Volumina an D2-Überstand und I bis IV bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Lysate auf einem 5% SDS-PAA-Gel getrennt, auf Nitrozellulose transferiert und Amphiphysin-I durch einen Antikörper (CD5 1:500) markiert. Der Nachweis erfolgte über einen sekundären Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper (1:2500). Das hyperphosphorylierte Amphiphysin-I ist durch einen Pfeil und die niedriger phosphorylierte Form durch einen * gekennzeichnet.



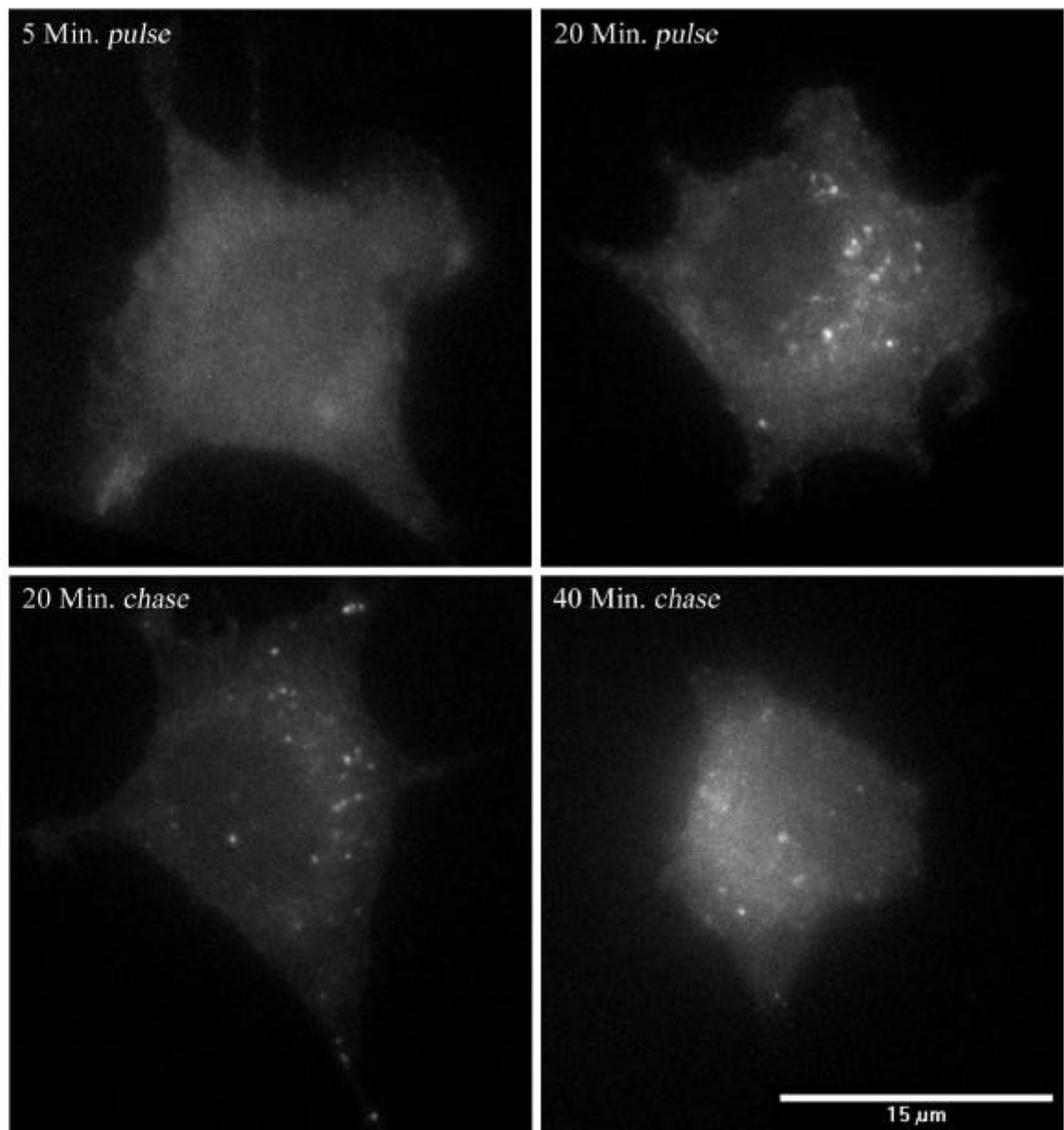
Tafel 4.9.: Internalisierung von Alexa488C5-markiertem hbNGF. 16 Stunden NGF-differenzierte PC12-251C-Zellen wurden 15 Minuten bei 4°C inkubiert und dann 30 Minuten mit 3% Essigsäure-versetzten fluorochromiertem hbNGF (1:100) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde gewaschen, der Nullwert bei 4°C mit 3% PFA fixiert und die übrigen Zellen für die angegebenen Zeiträume bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert und TX-100-permeabilisiert.



Tafel 5.1.: Anti-trkA induziert die Phosphorylierung von Amphiphysin-I. PC12-251C-Zellen wurden für 20 Minuten ohne (-) oder mit (+) 10ng/ml hbNGF bzw. MC192 (dialysiert), anti-trkA oder als Kontrolle Kaninchen anti-Maus IgG in den angegebenen Konzentrationen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1x Laemmli-Auftragspuffer lysiert, in einem 5,5% PAA-Gel elektrophoretisch getrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Anschließend wurde Amphiphysin-I durch einen Antikörper (CD5 1:500) angefärbt und durch Bindung eines an Alkalische Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörper nachgewiesen. Das hyperphosphorylierte Amphiphysin-I ist durch einen Pfeil und die niedriger phosphorylierte Form durch einen Stern (*) markiert. Die dritte Bande (#) kommt vermutlich durch unzureichendes Denaturieren der Proteine zu stande.



Tafel 5.2.: Differenzierung von PC12-Zellen durch anti-p75NTR und anti-trkA-Antikörper. PC12-251C-Zellen wurden über 24 Stunden ohne (Kontrolle) oder mit 10ng/ml NGF, MC192 (dialysiert, 1:10) bzw. 20μg/ml anti-trkA in Wachstumsmedium bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC (1:1000) gefärbt. Der Balken für die Bilder auf der linken Seite entspricht 15μm, der für die Bilder auf der rechten Seite 40μm.



Tafel 5.3.: Internalisierung von anti-trkA Antikörpern. PC12-251C-Zellen wurden für fünf bzw. 20 Minuten kontinuierlich mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-trkA bei 37°C inkubiert (*pulse*). Nach 20 Minuten wurde ungebundener Antikörper durch Waschen entfernt und die Zellen für weitere 20 bzw. 40 Minuten bei 37°C inkubiert (*chase*). Anschließend wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und anti-trkA mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper nachgewiesen.

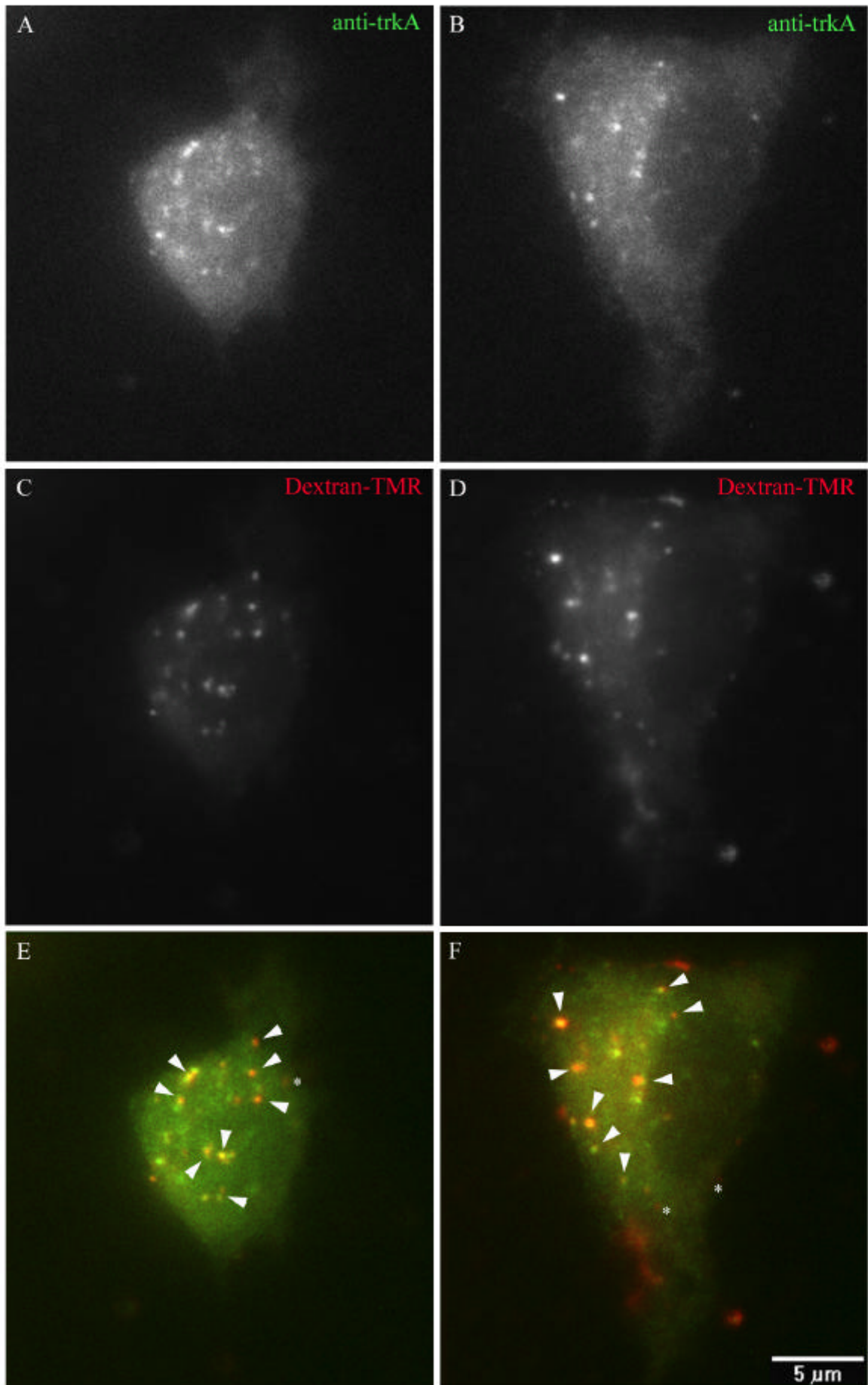
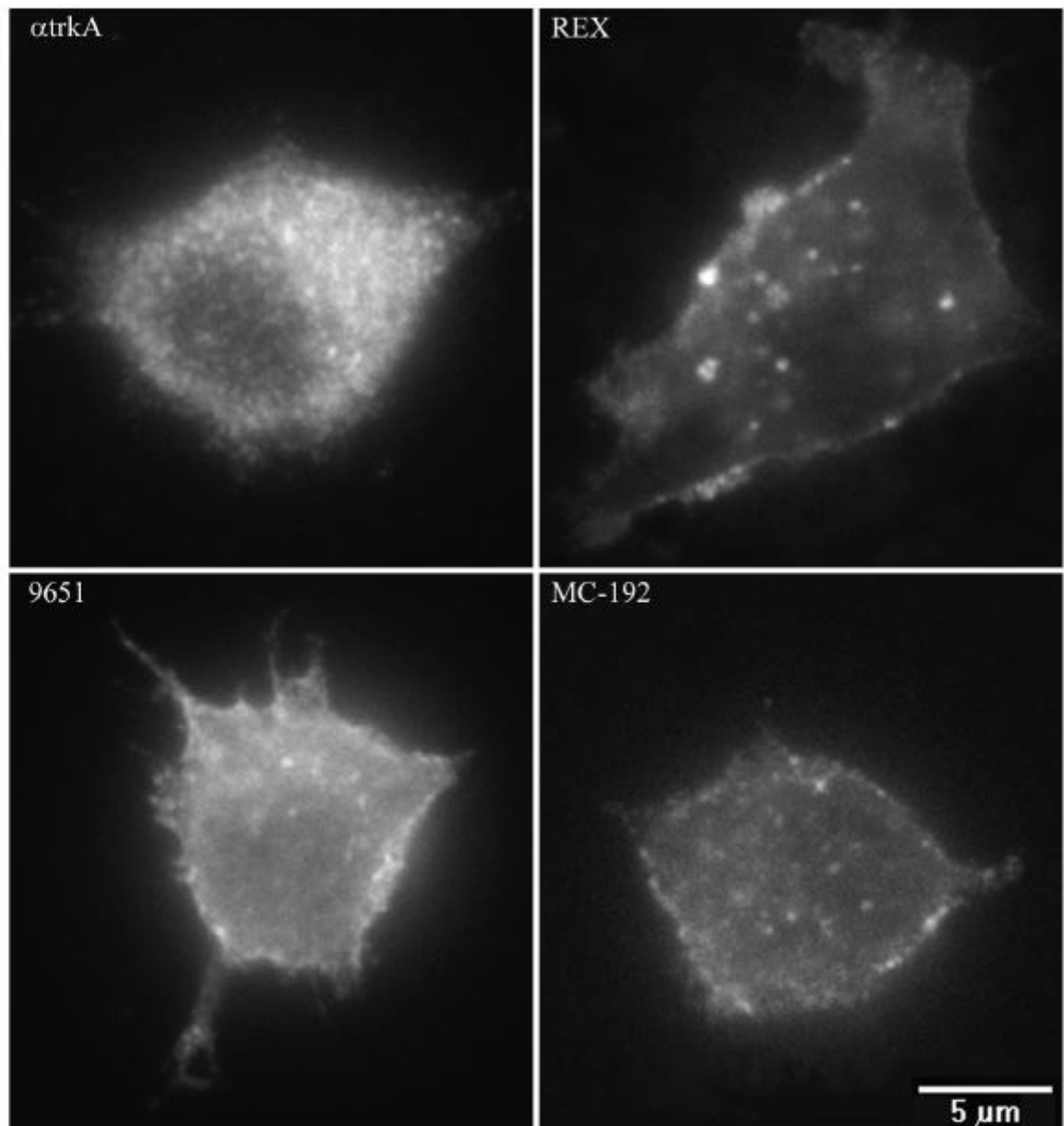
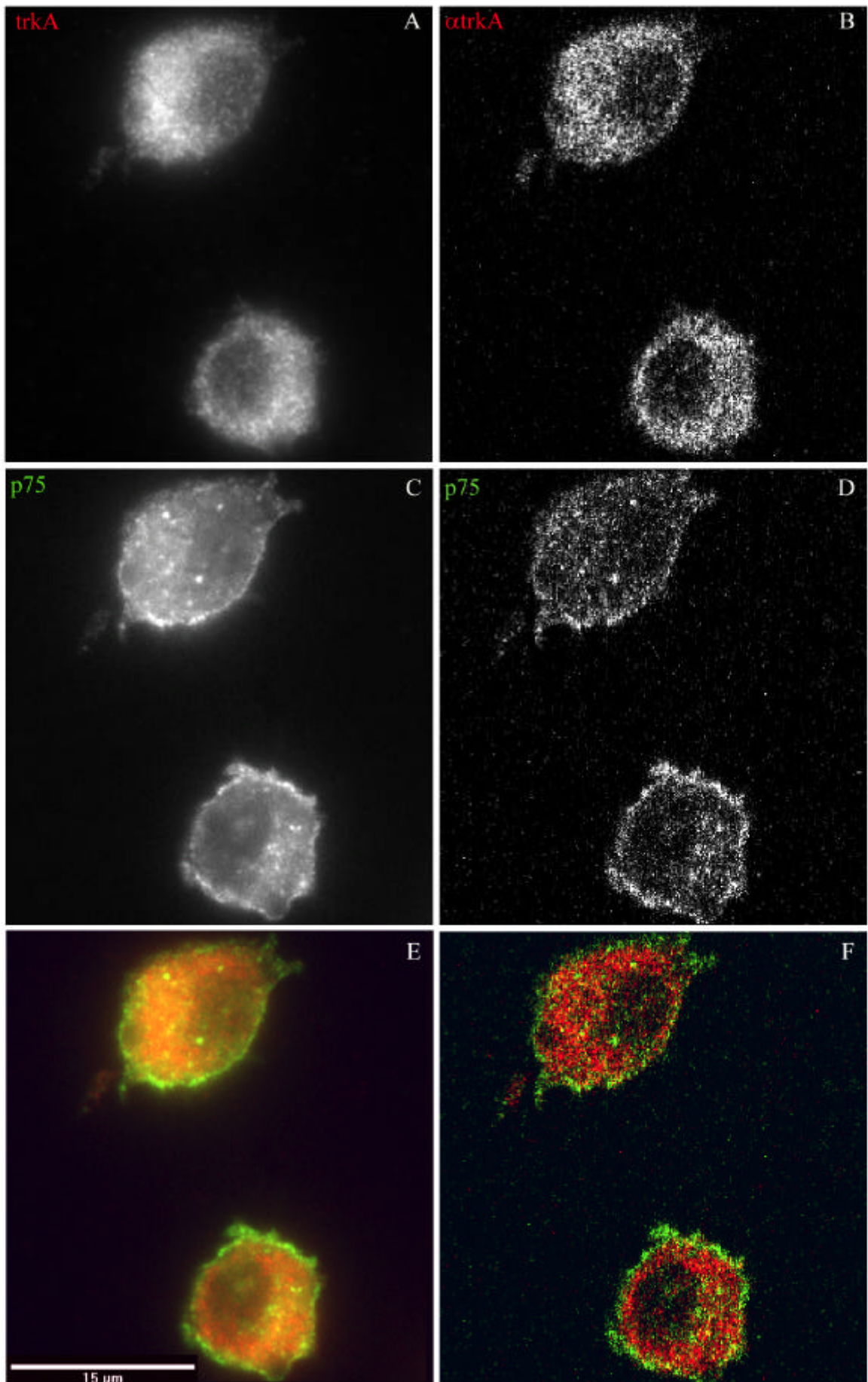


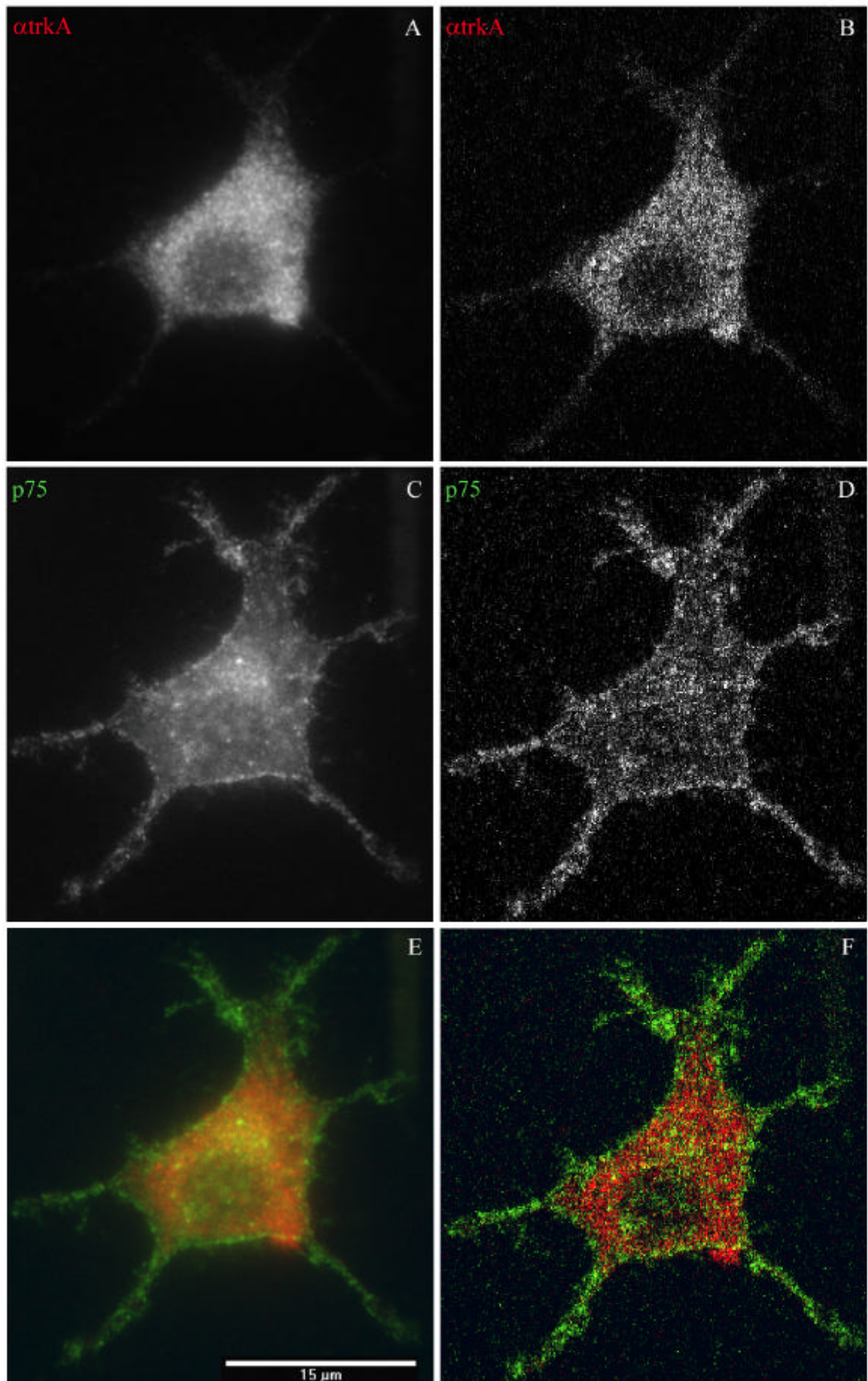
Abbildung 5.4.: Internalisierter anti-TrkA Antikörper kolokalisiert mit Dextran-positiven Vesikeln. PC12-251C-Zellen wurden 20 Minuten mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-trkA und 2 mg/ml Dextran-TMR ohne (A, C, E) oder mit 10 ng/ml hBNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert sowie mit TX-100-permeabilisiert. Anti-trkA wurde mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen. In der Zweikanalardarstellung ist Dextran-TMR rot und anti-trkA grün dargestellt. Pfeile markieren Beispiele für Kolokalisation.



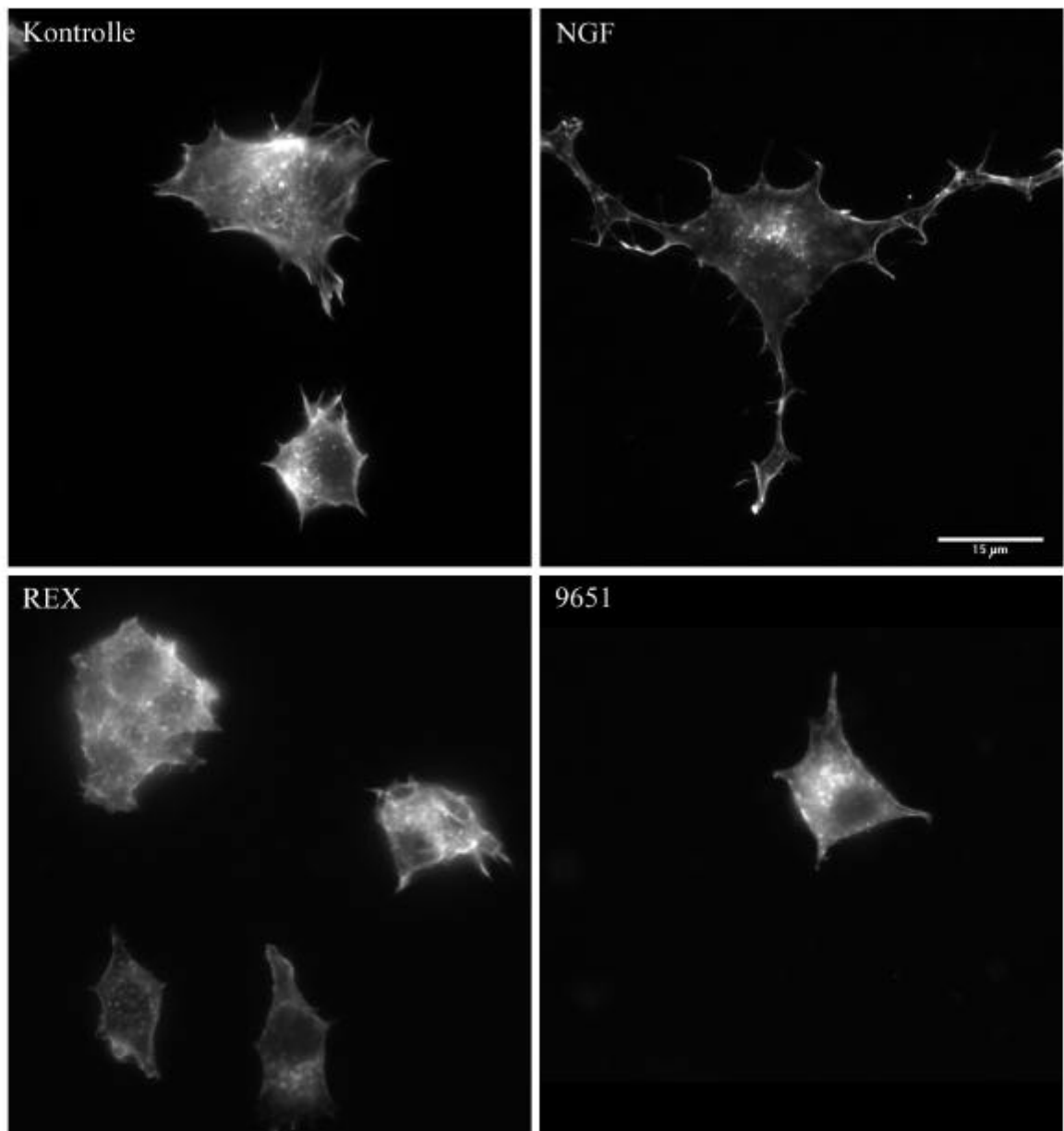
Tafel 5.5.: Lokalisation von trkA und p75NTR in PC12-Zellen. PC12-251C-Zellen wurden mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Antikörpern gegen trkA (anti-trkA) bzw. Antikörpern gegen p75NTR (Rex 1:1000, 9651 1:750 bzw. MC192 5 μ g/ml) gefärbt.



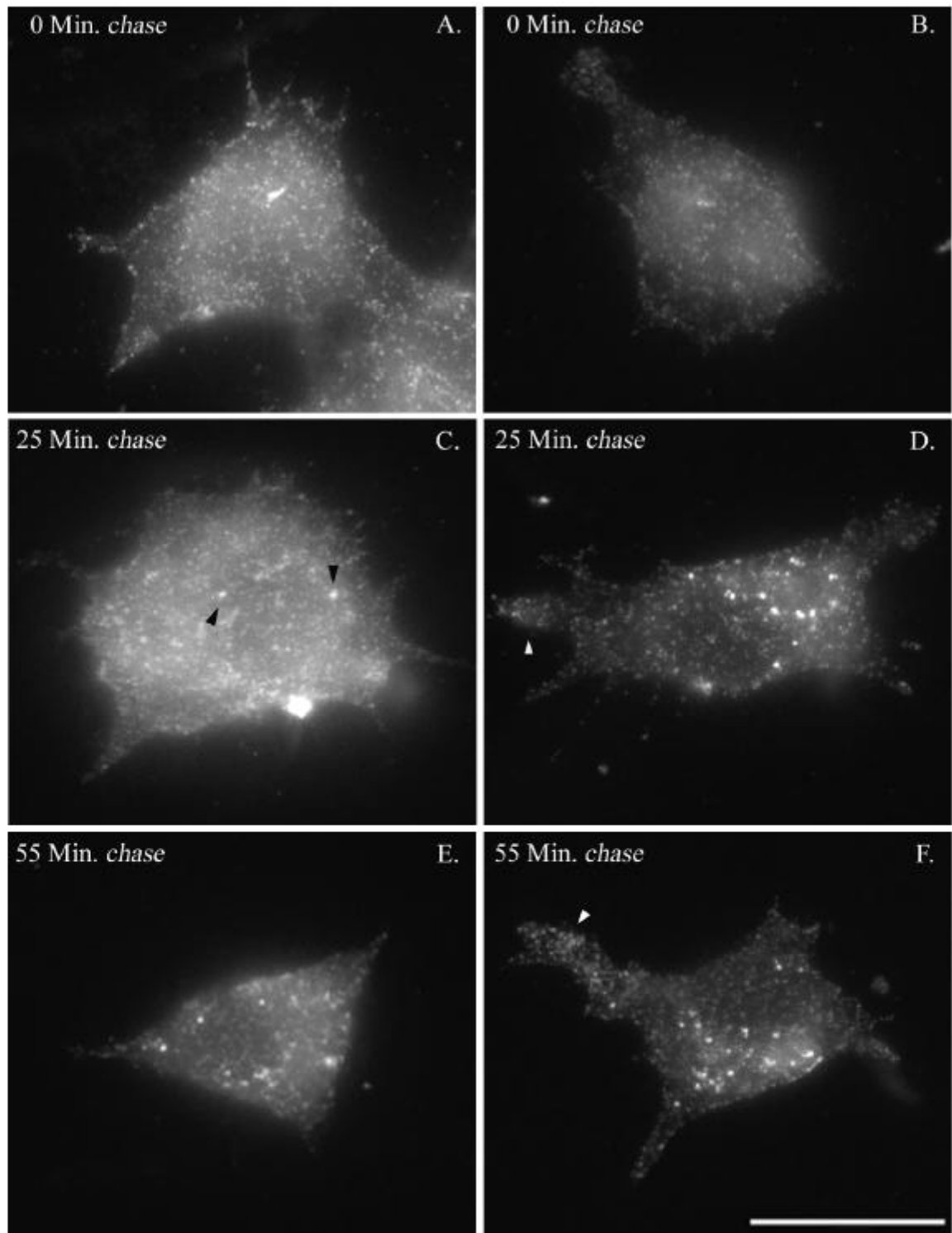
Tafel 5.6.: Lokalisation von trkA und p75NTR in PC12-Zellen. PC12-251C-Zellen wurden mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und parallel mit Antikörpern gegen p75NTR (MC192, 5µg/ml, C und D) und trkA (anti-trkA, 20µg/ml A und B) gefärbt. Darstellung links mit konventioneller (A, C, E), rechts mit konfokaler (B, D, F) Fluoreszenzmikroskopie. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist trkA rot und p75NTR grün dargestellt.



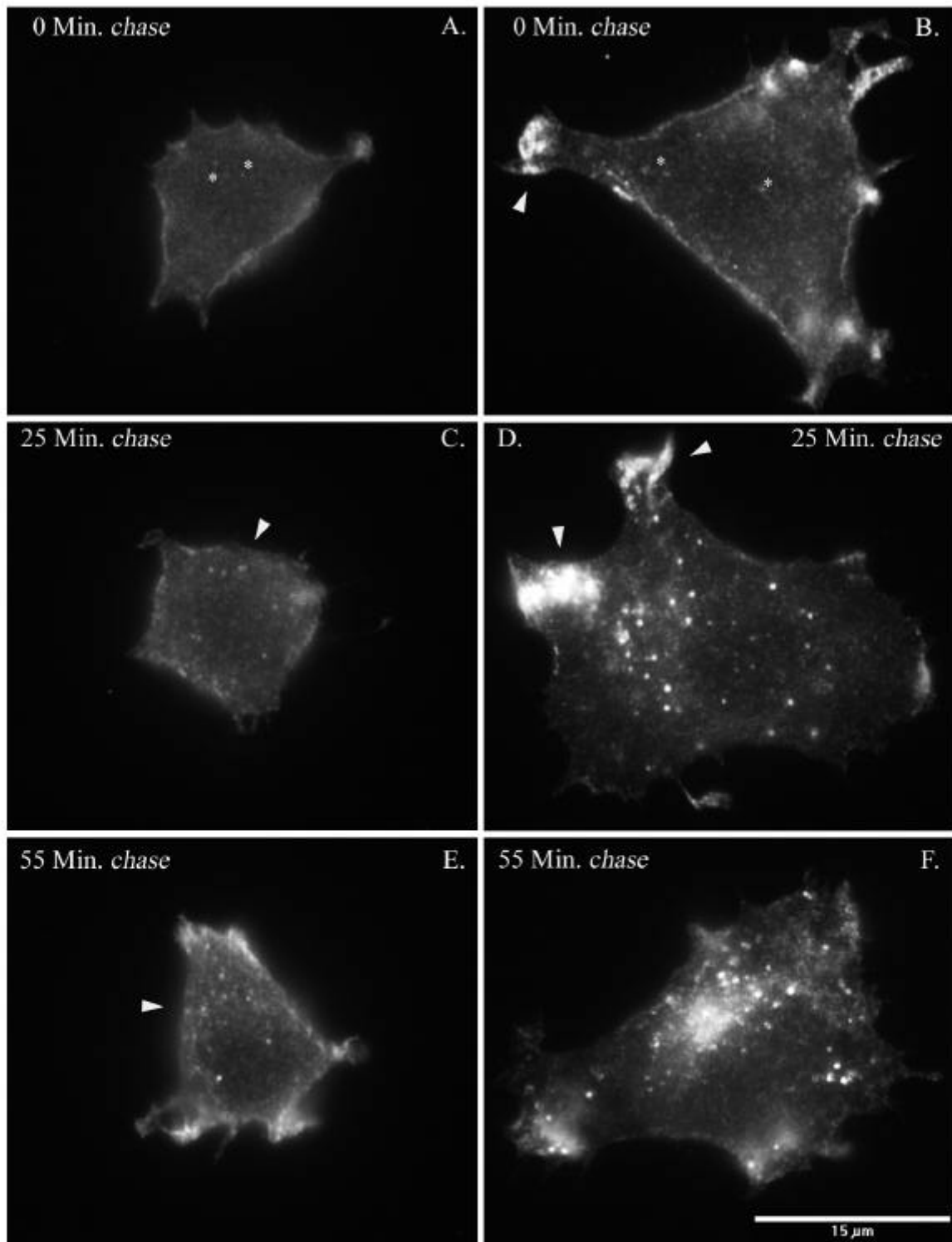
Tafel 5.7.: Kolokalisation von p75NTR und trkA in NGF-differenzierten PC12-Zellen. PC12-251C-Zellen wurden für 16 Stunden mit 10ng/ml hbNGF inkubiert, anschließend mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Antikörpern gegen trkA (anti-trkA, 20µg/ml, A und B) und p75NTR (MC-192, 5µg/ml, C und D) gefärbt. Links Darstellung mit konventioneller (A, C, E), rechts mit konfokaler (B, D, F) Fluoreszenzmikroskopie. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist trkA rot und p75NTR grün markiert.



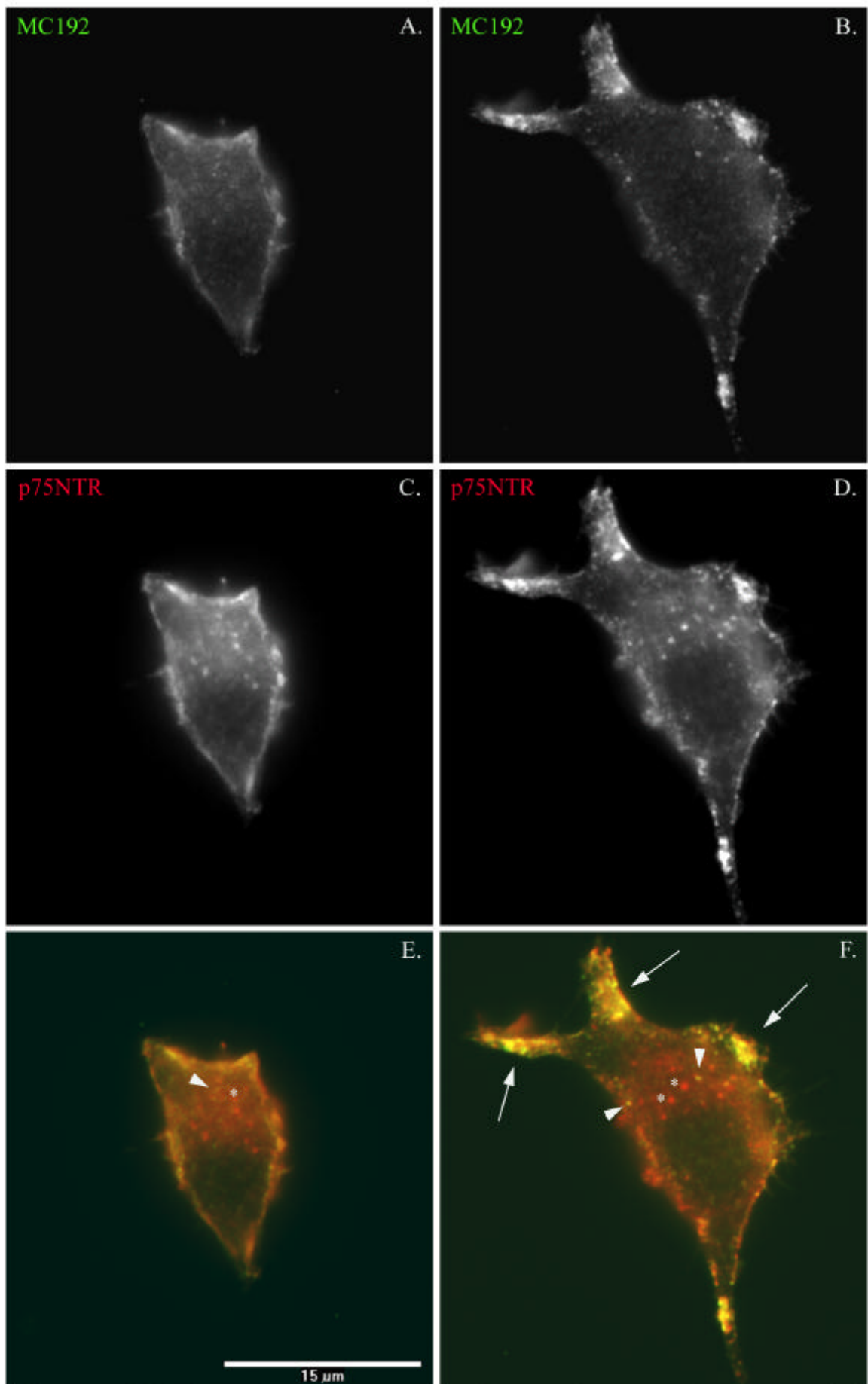
Tafel 5.8.: REX- und 9651-Antikörper induzieren keine Differenzierung von PC12-Zellen. PC12-251C-Zellen wurden für 24 Stunden ohne (Kontrolle) oder mit 10ng/ml hbNGF bzw. den p75NTR-Antikörpern REX (1:1000) bzw. 9651 (1:1000) in Wachstumsmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC gefärbt.



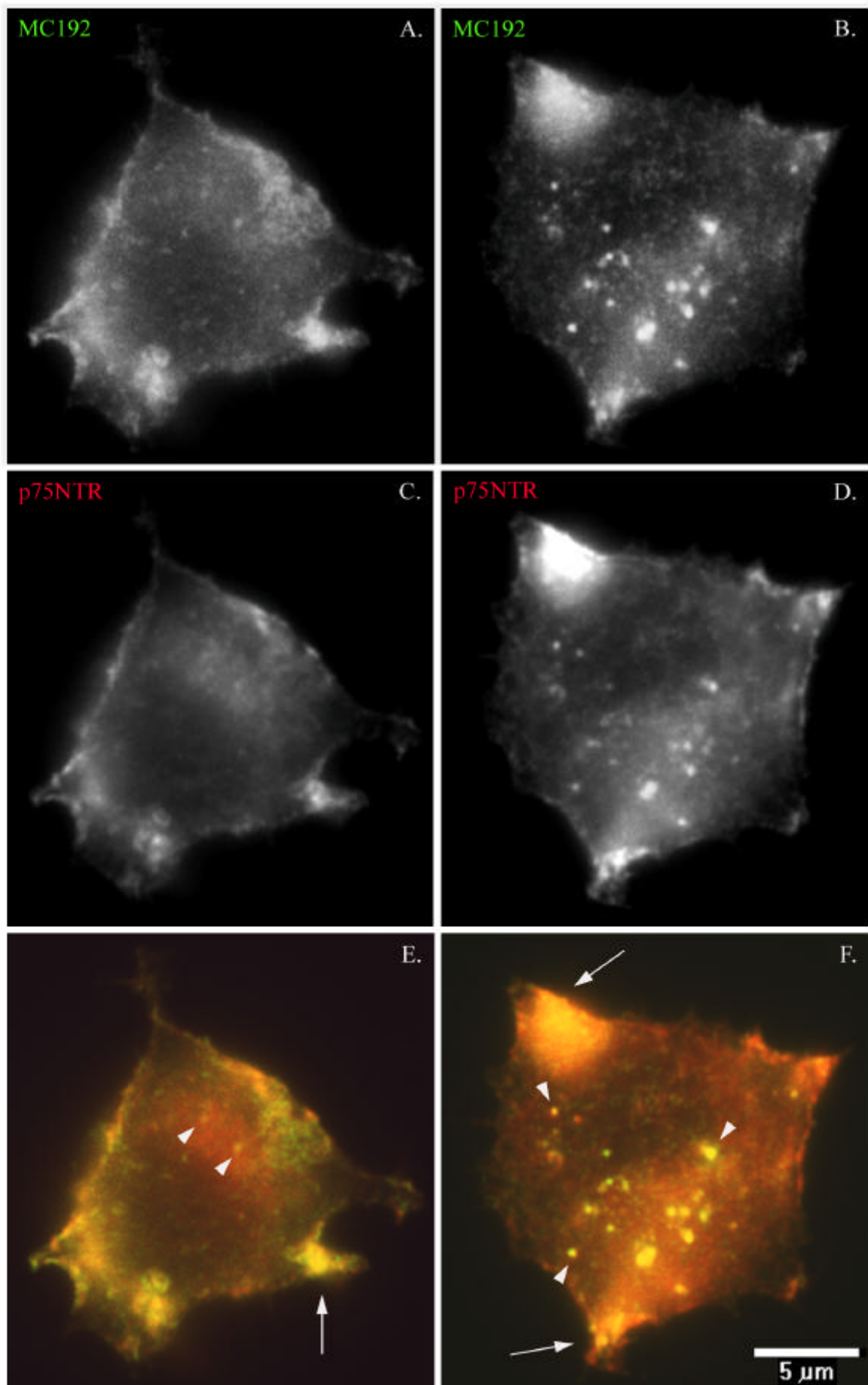
Tafel 5.9.: NGF induziert eine erhöhte Internalisierung von p75NTR-aktivierenden Antikörpern. PC12-251C-Zellen wurden für fünf Minuten mit p75NTR-aktivierenden Antikörpern (9651 1:750) ohne (A, C, E) oder mit 100ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert, nicht gebundener Antikörper und gegebenenfalls hbNGF durch Waschen entfernt und die Zellen für die angegebenen Zeiträume bei 37°C inkubiert (*chase*). Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen. Schwarze Pfeile markieren sich vom Hintergrund abhebende größere p75NTR-positive Punkte nach 25 Minuten chase (C). Weiße Pfeile markieren eine Anreicherung des p75NTR-Signals in Ausläufern von hbNGF-behandelten Zellen (D, F). Der Balken entspricht 15µm.



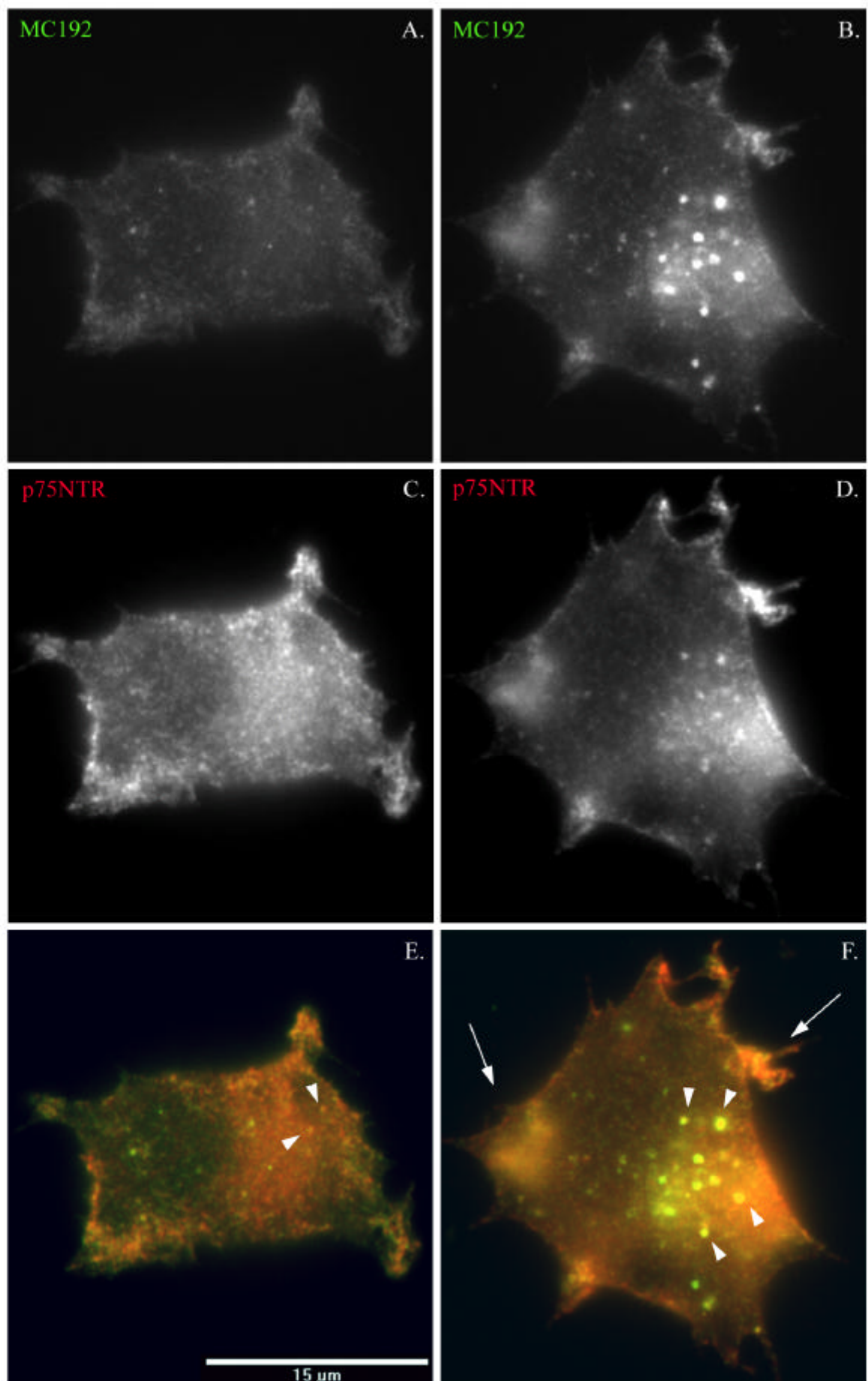
Tafel 5.10.: Internalisierung von nicht p75NTR-aktivierenden Antikörpern in Abhängigkeit von NGF-Vorstimulation. PC12-251C-Zellen wurden für fünf Minuten mit 5µg/ml MC192-Antikörpern ohne (A, C, E) oder mit (B, D, F) 10ng/ml hbNGF bei 37°C inkubiert. Überschüssiger Antikörper und NGF wurden durch Waschen entfernt und die Zellen für die angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert (*chase*). Pfeilspitzen markieren größere, intensiver leuchtende Punkte nach 25 und 55 Minuten *chase* (C, E). Pfeile markieren p75NTR-angereicherte Bereiche in Zellausläufern nach hbNGF-Stimulation (B, D). Punkte, die sich nach 0 Minuten *chase* in Größe und/oder Intensität vom Hintergrund abheben, sind durch einen * gekennzeichnet (A, B).



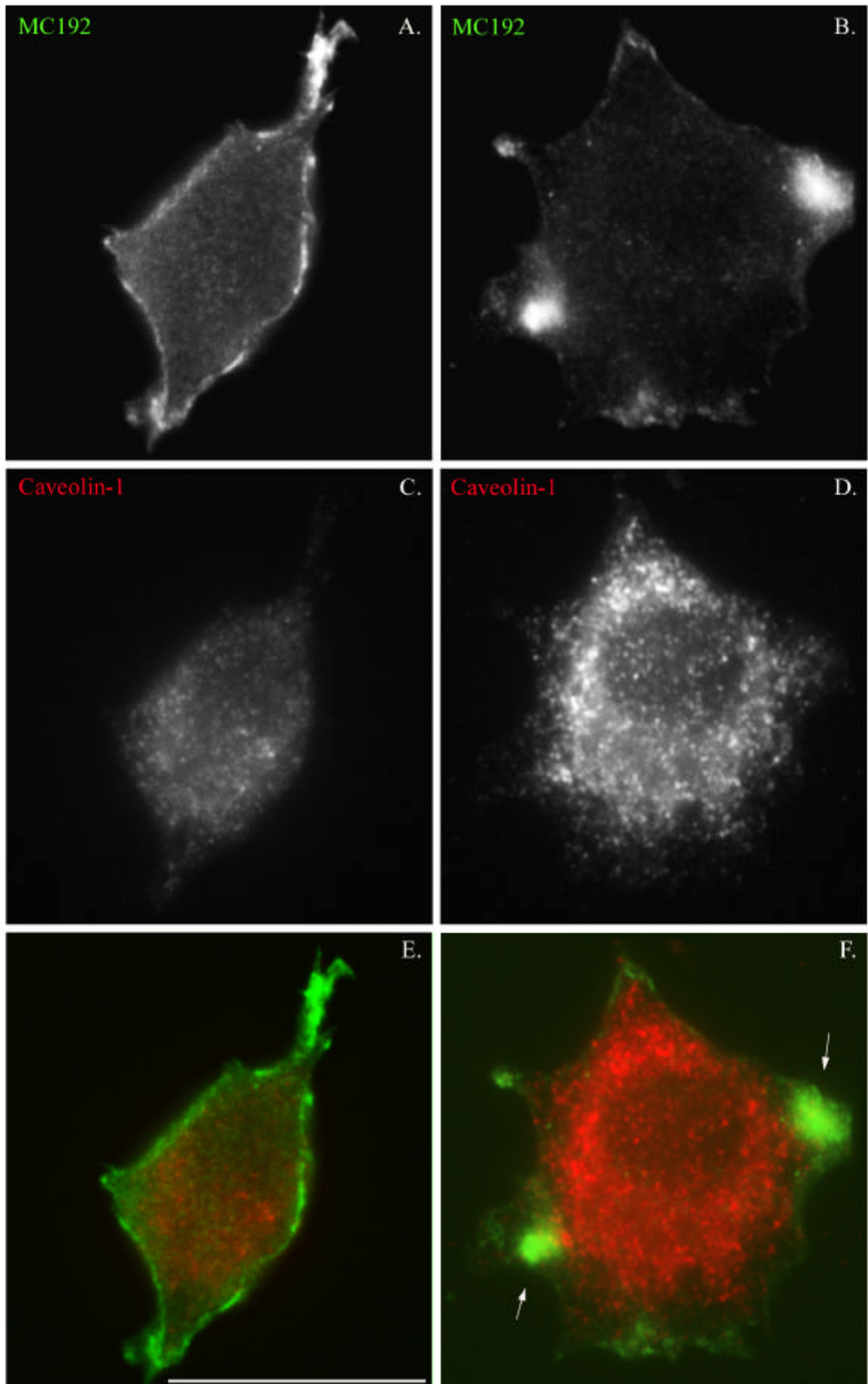
Tafel 5.11.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und p75NTR nach 5 Minuten *pulse* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*), danach die Zellen gewaschen, bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit anti-p75NTR-Antikörpern (9651) sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanal-darstellung (E, F) ist MC192 grün und p75NTR rot dargestellt. Beispiele für Kolokalisation sind mit Pfeilspitzen markiert. Die Pfeile markieren MC192-angereicherte Regionen, die ebenfalls p75NTR-positiv sind. Beispiele für p75NTR-positive Punkte, die nicht MC192 enthalten sind mit * markiert.



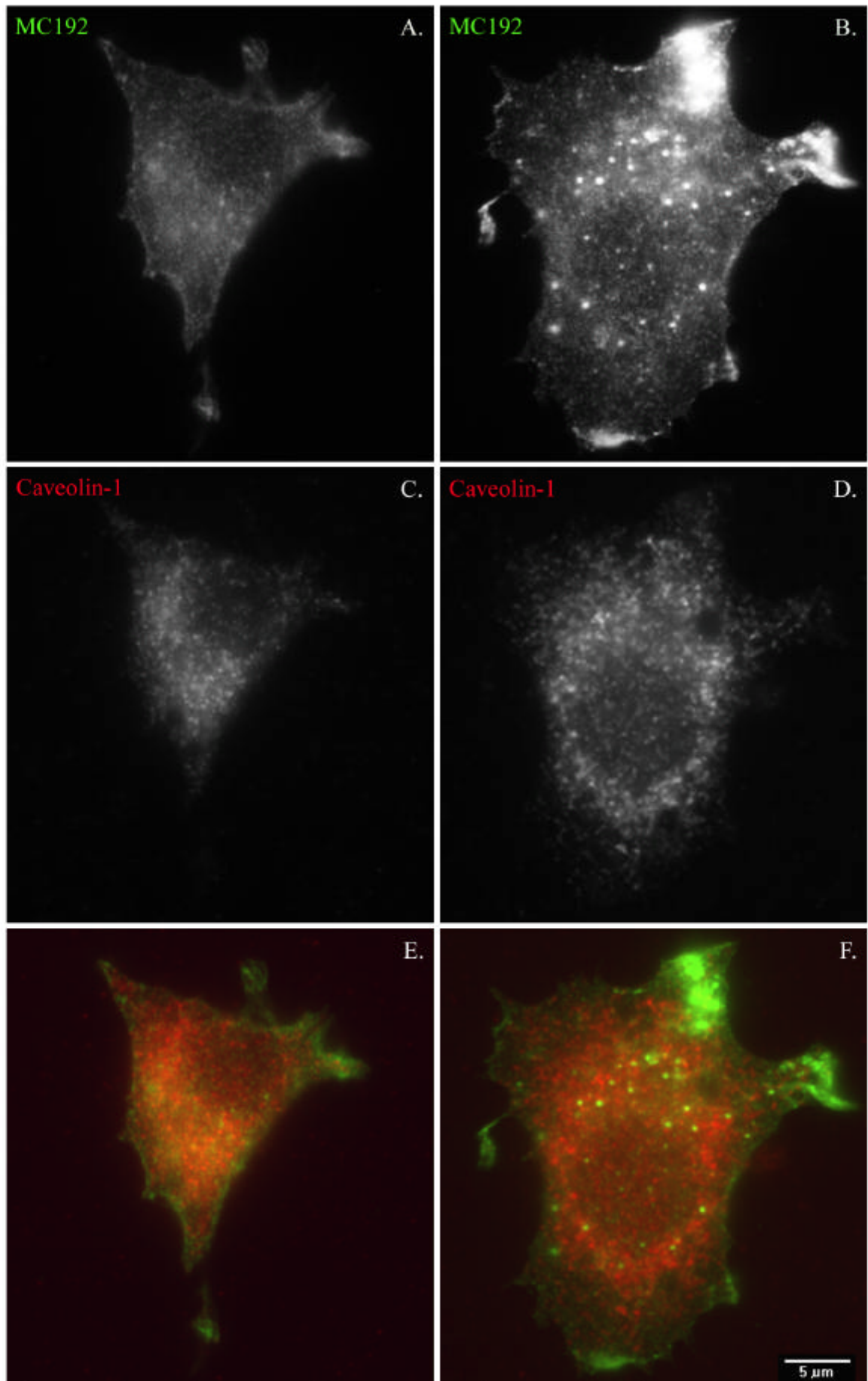
Tafel 5.12.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und p75NTR nach 25 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*), danach die Zellen gewaschen und für weitere 25 Minuten in Gegenwart von 10ng/ml hbNGF bei 37°C inkubiert (*chase*). Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit anti-p75NTR-Antikörpern (9651) sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist MC192 grün und p75NTR rot dargestellt. Beispiele für Kolokalisation sind mit Pfeilspitzen markiert. Die Pfeile markieren MC192-angereicherte Regionen, die ebenfalls p75NTR-positiv sind.



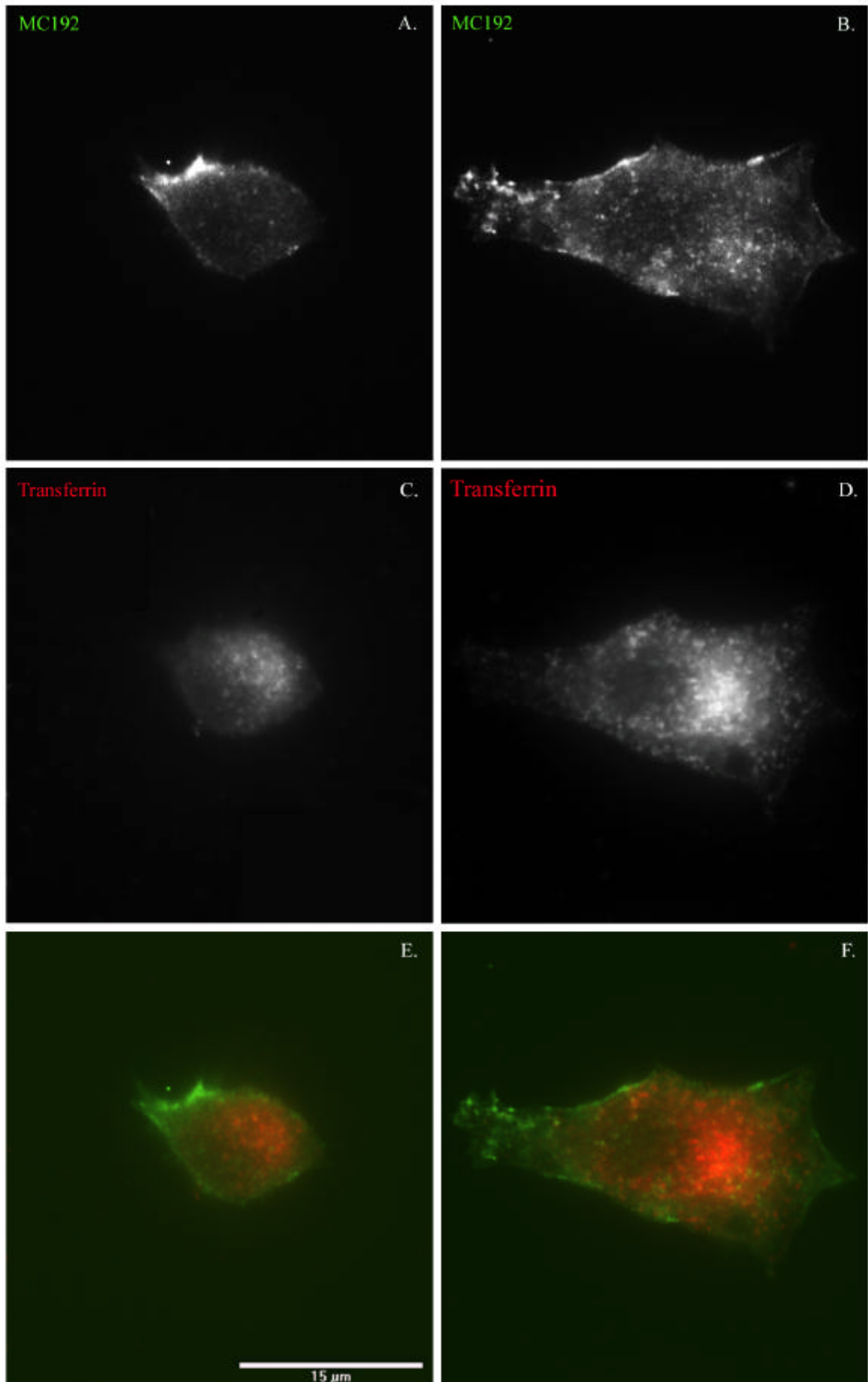
Tafel 5.13.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und p75NTR nach 55 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*), danach die Zellen gewaschen und für weitere 55 Minuten in Gegenwart von 10ng/ml hbNGF bei 37°C inkubiert (*chase*). Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit anti-p75NTR-Antikörpern (9651) sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist MC192 grün und p75NTR rot dargestellt. Beispiele für Kolokalisation sind mit Pfeilspitzen markiert. Die Pfeile markieren MC192-angereicherte Regionen, die ebenfalls p75NTR-positiv sind.



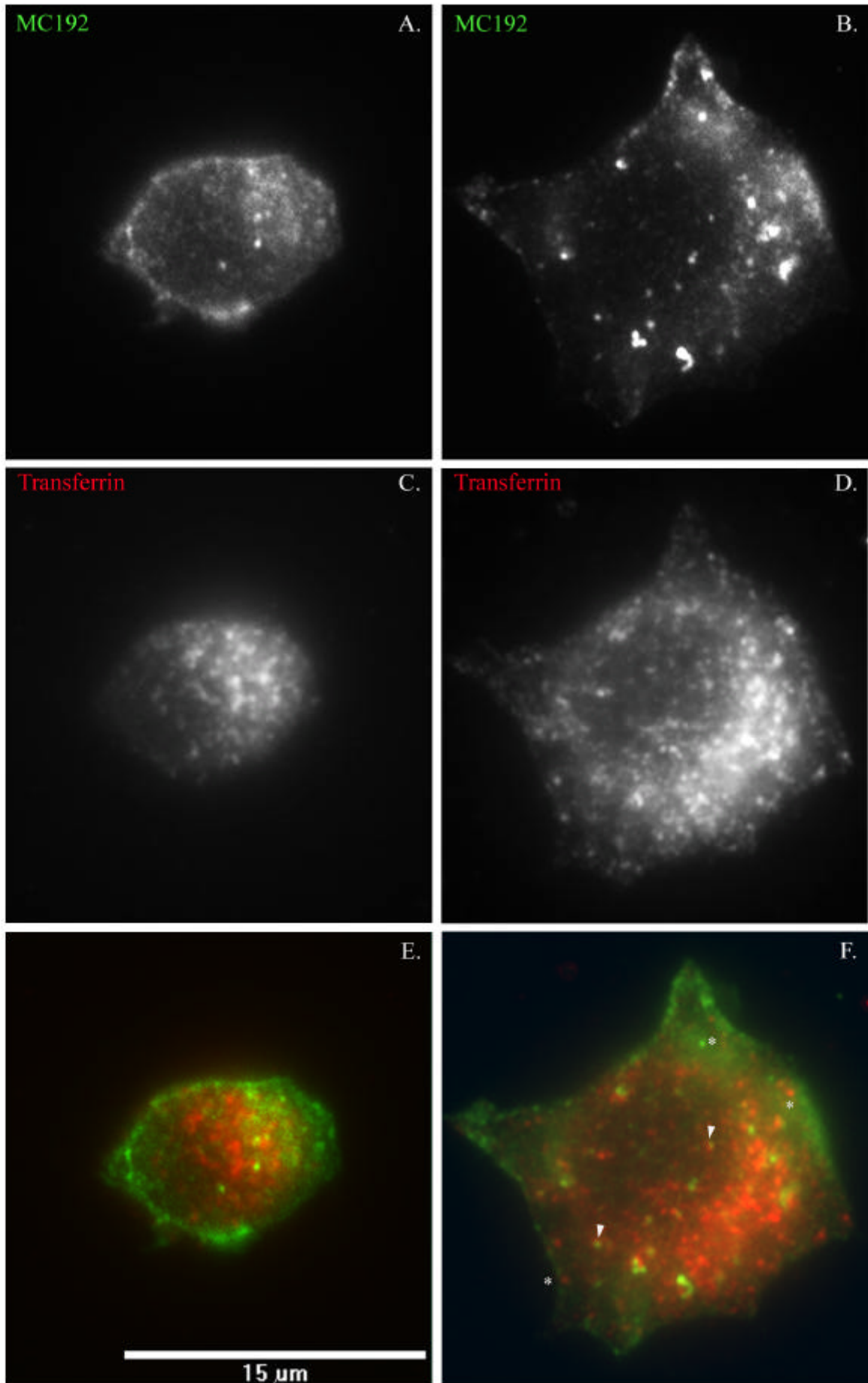
Tafel 5.14.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und Caveolin-1 nach 5 Minuten *pulse* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*), danach die Zellen gewaschen, bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit anti-Caveolin-1-Antikörpern sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanal-darstellung (E, F) ist MC192 grün und Caveolin-1 rot dargestellt. MC192-angereicherte Regionen sind mit einem Pfeil markiert. Der Balken entspricht 15µm.



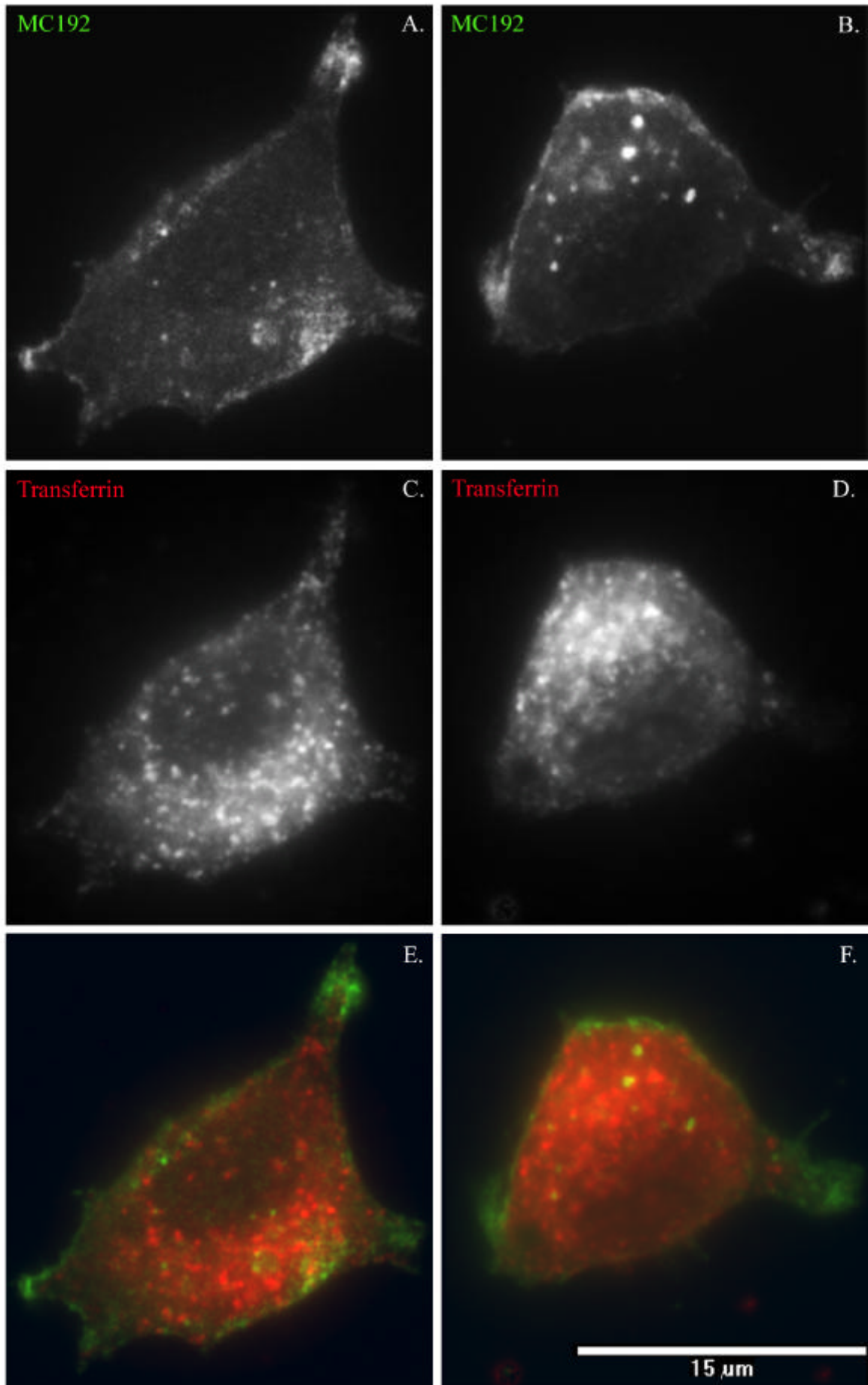
Tafel 5.15.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und Caveolin-1 nach 25 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*), danach die Zellen gewaschen und für weitere 25 Minuten in Gegenwart von 10ng/ml hbNGF bei 37°C inkubiert (*chase*). Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit anti-Caveolin-1-Antikörpern sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanal-darstellung (E, F) ist MC192 grün und Caveolin-1 rot dargestellt.



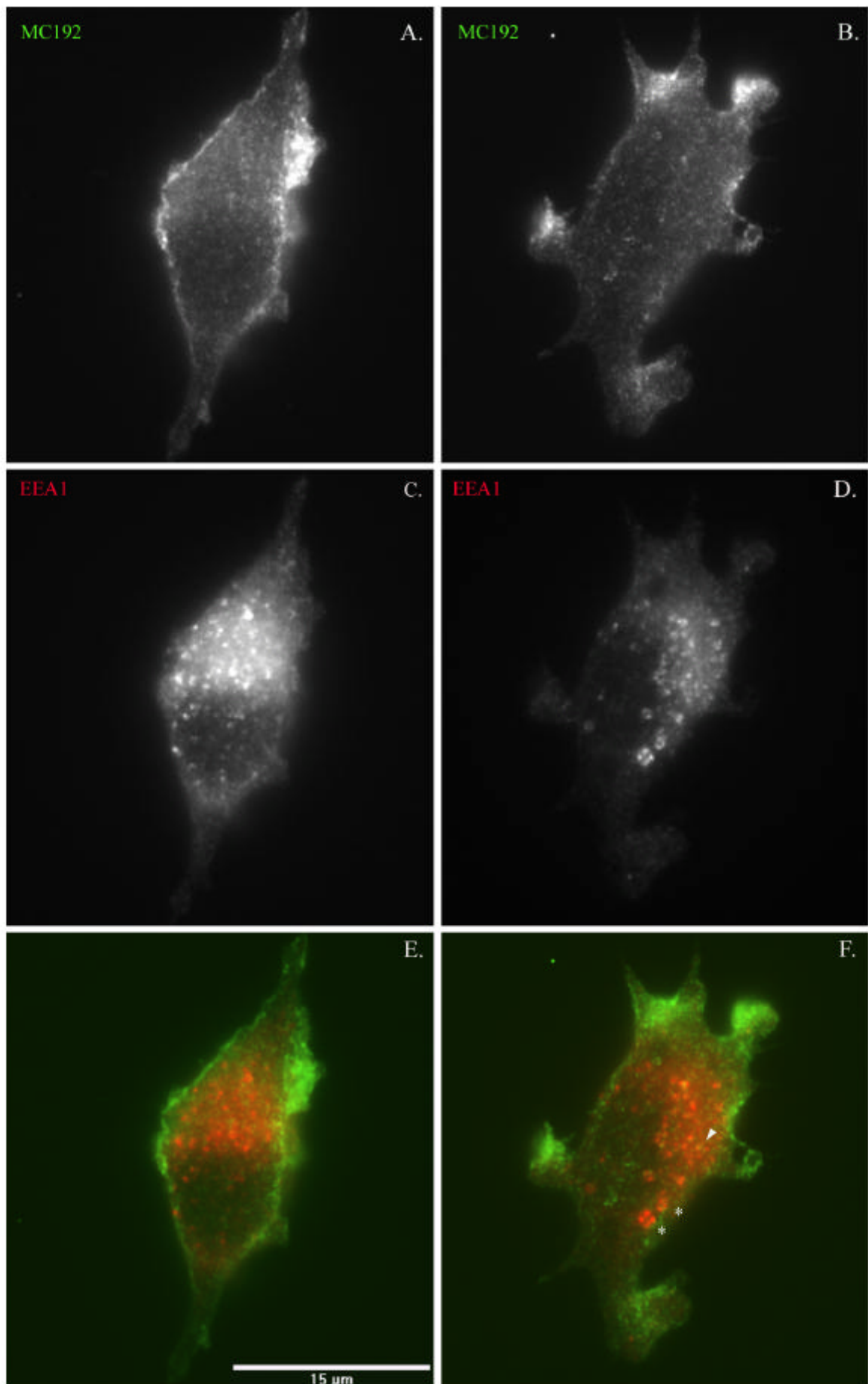
Tafel 5.16.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit rTransferrin nach 5 Minuten *pulse* in Abhängigkeit von hbNGF-Vorstimulation. PC12-251-Zellen wurden 20 Minuten ohne (A, C, E) oder mit (B, D, F) 10ng/ml hbNGF bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde für fünf Minuten 5µg/ml MC192 und 15µg/ml rTransferrin zugegeben (*pulse*), danach die Zellen gewaschen, mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit anti-rTransferrin Antikörpern sowie sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist Transferrin rot und MC192 grün dargestellt.



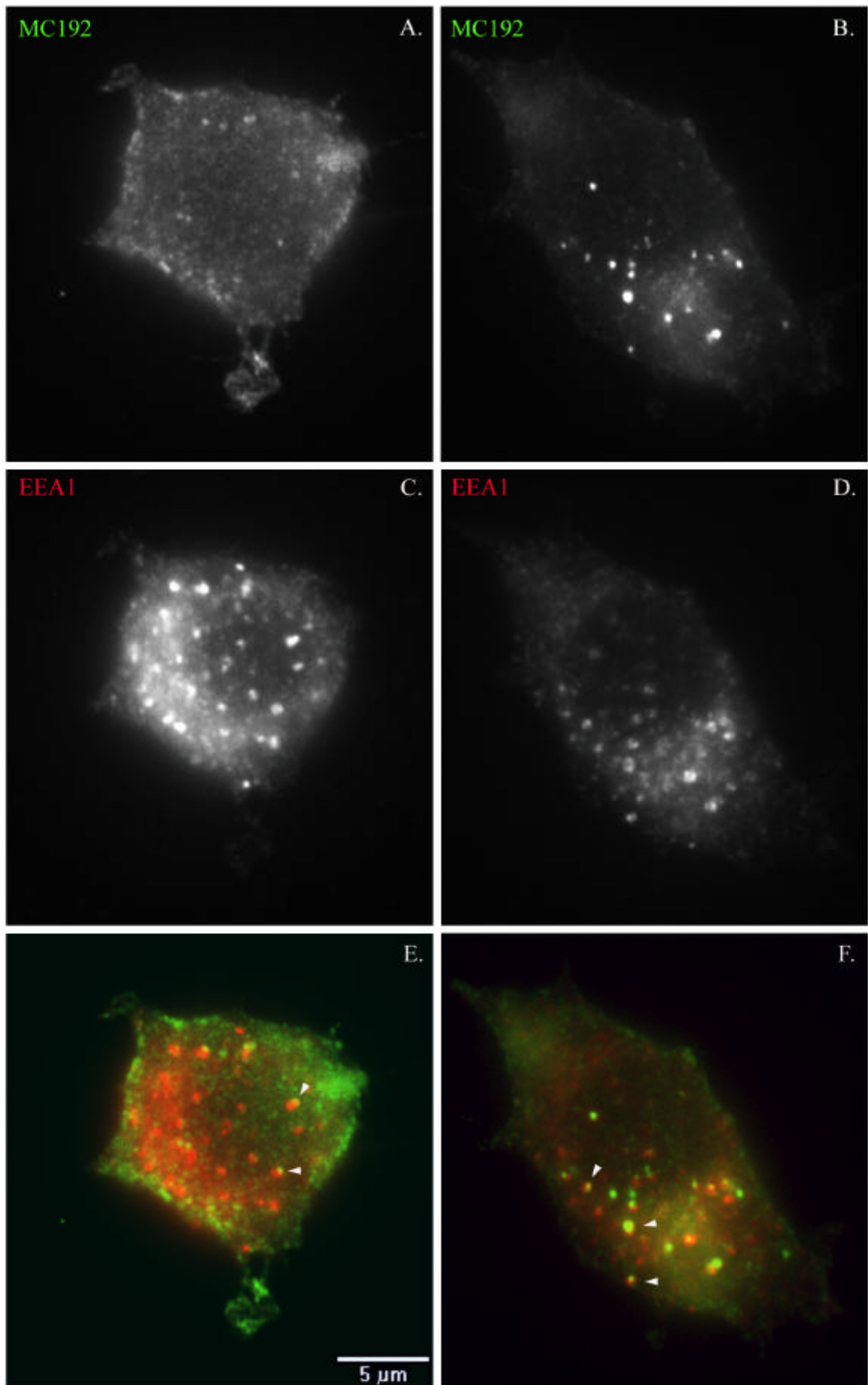
Tafel 5.17.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit rTransferrin nach 25 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF. PC12-251-Zellen wurden für 20 Minuten ohne (A, C, E) bzw. mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Dann wurde für fünf Minuten 5µg/ml MC192 zugeben (*pulse*), gewaschen und weitere 25 Minuten bei 37°C inkubiert (*chase*). Für die letzten fünf Minuten wurde 15µg/ml Transferrin zugegeben, danach gewaschen und die Zellen bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100 permeabilisiert und mit Antikörpern gegen rTransferrin und fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist Transferrin rot und MC192 grün dargestellt. Beispiele für Kolokalisation sind mit einem Pfeil, Beispiele für nur Transferrin- oder nur MC192-positive Vesikel mit einem * markiert.



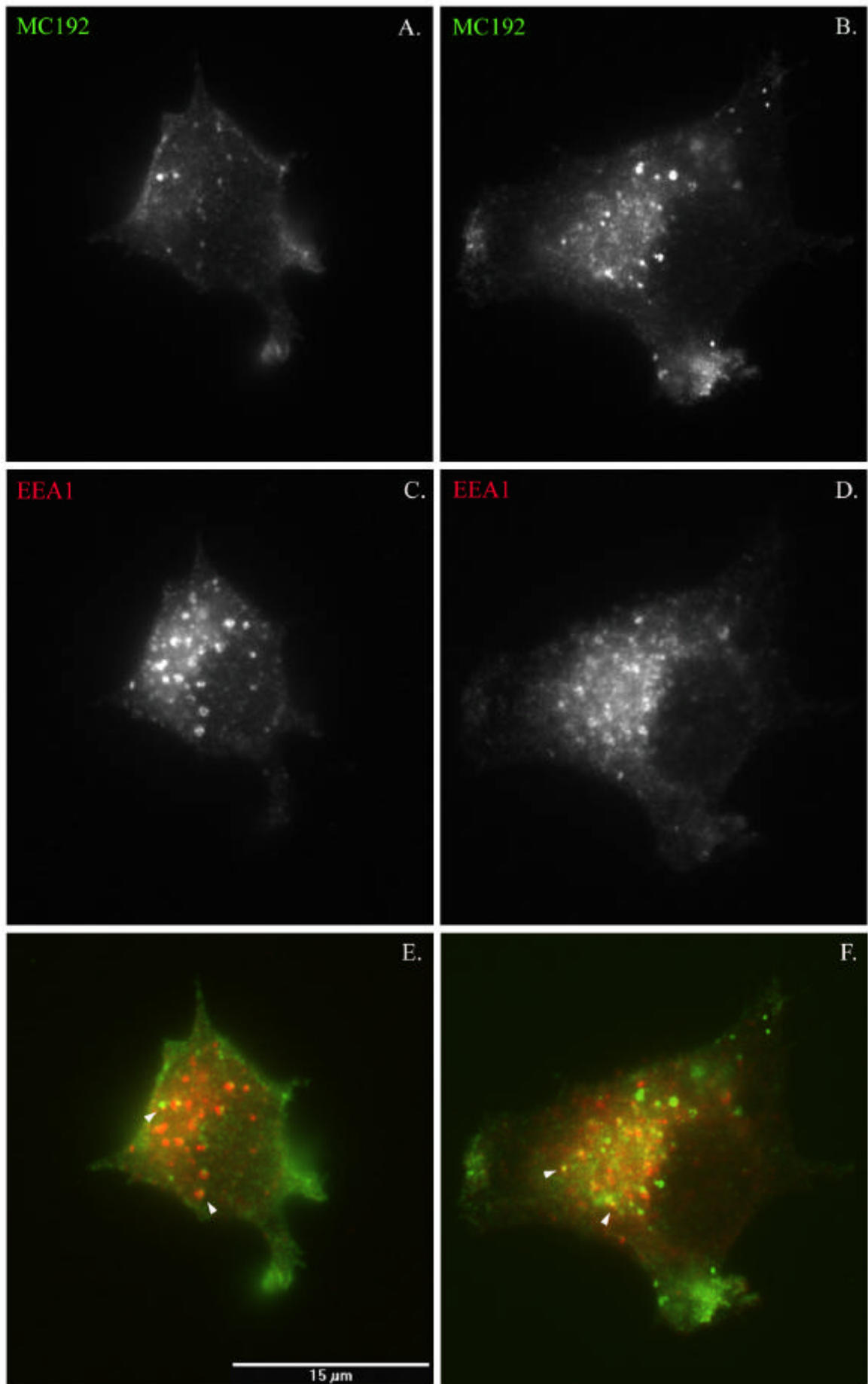
Tafel 5.18.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit rTransferrin nach 55 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF. PC12-251-Zellen wurden für 20 Minuten ohne (A, C, E) bzw. mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Dann wurde für fünf Minuten 5µg/ml MC192 zugeben (*pulse*), gewaschen und weitere 55 Minuten bei 37°C inkubiert (*chase*). Für die letzten fünf Minuten wurde 15µg/ml Transferrin zugegeben, danach gewaschen und die Zellen bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100 permeabilisiert und mit Antikörpern gegen rTransferrin und fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist Transferrin rot und MC192 grün dargestellt.



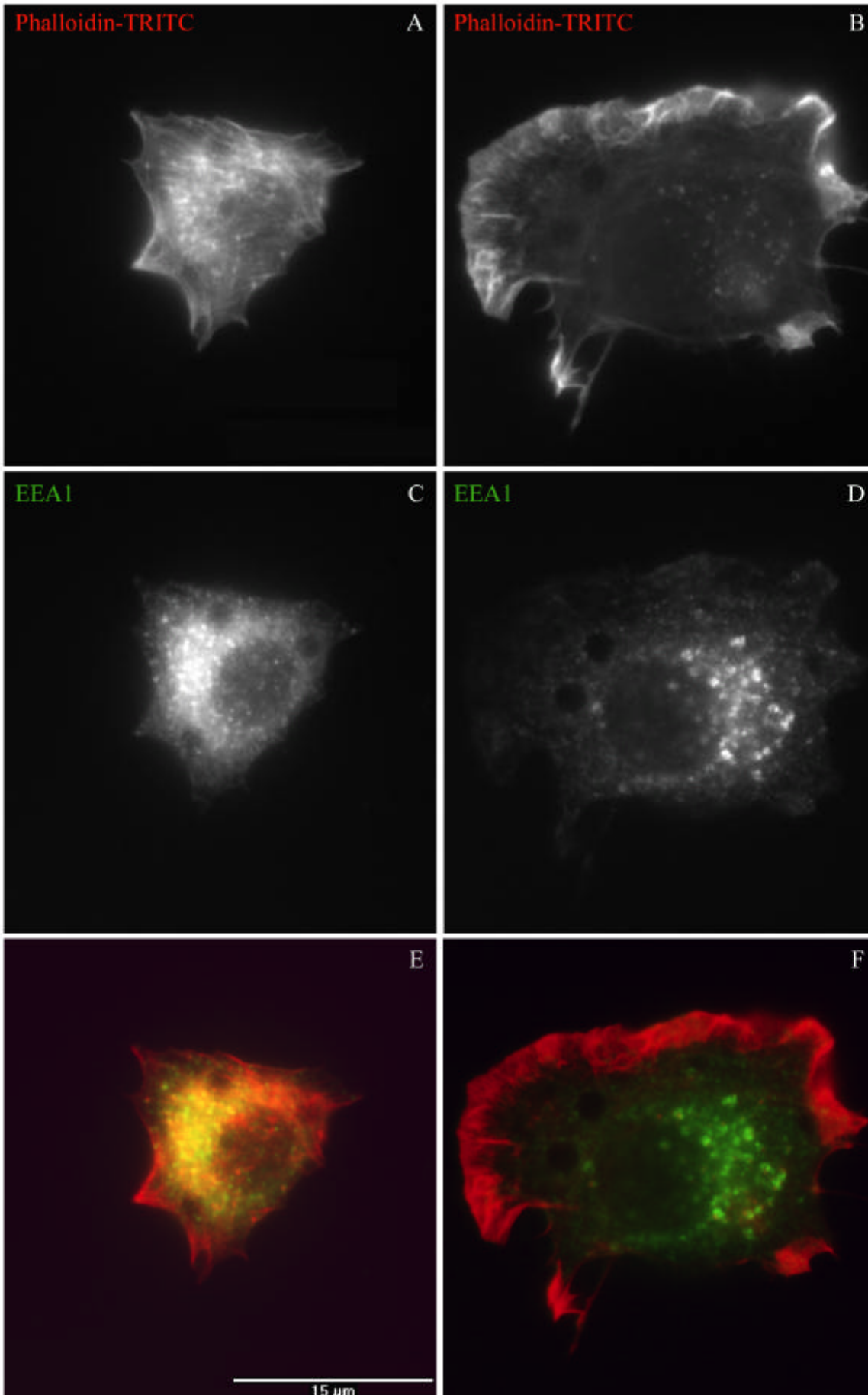
Tafel 5.19.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und EEA1 nach 5 Minuten *pulse* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*), danach die Zellen gewaschen, bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit anti-EEA1-Antikörpern sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist MC192 grün und EEA1 rot dargestellt. Veränderungen der EEA1-positiven Kompartimente sind mit einem *, Beispiele für Kolokalisation mit einem Pfeil gekennzeichnet.



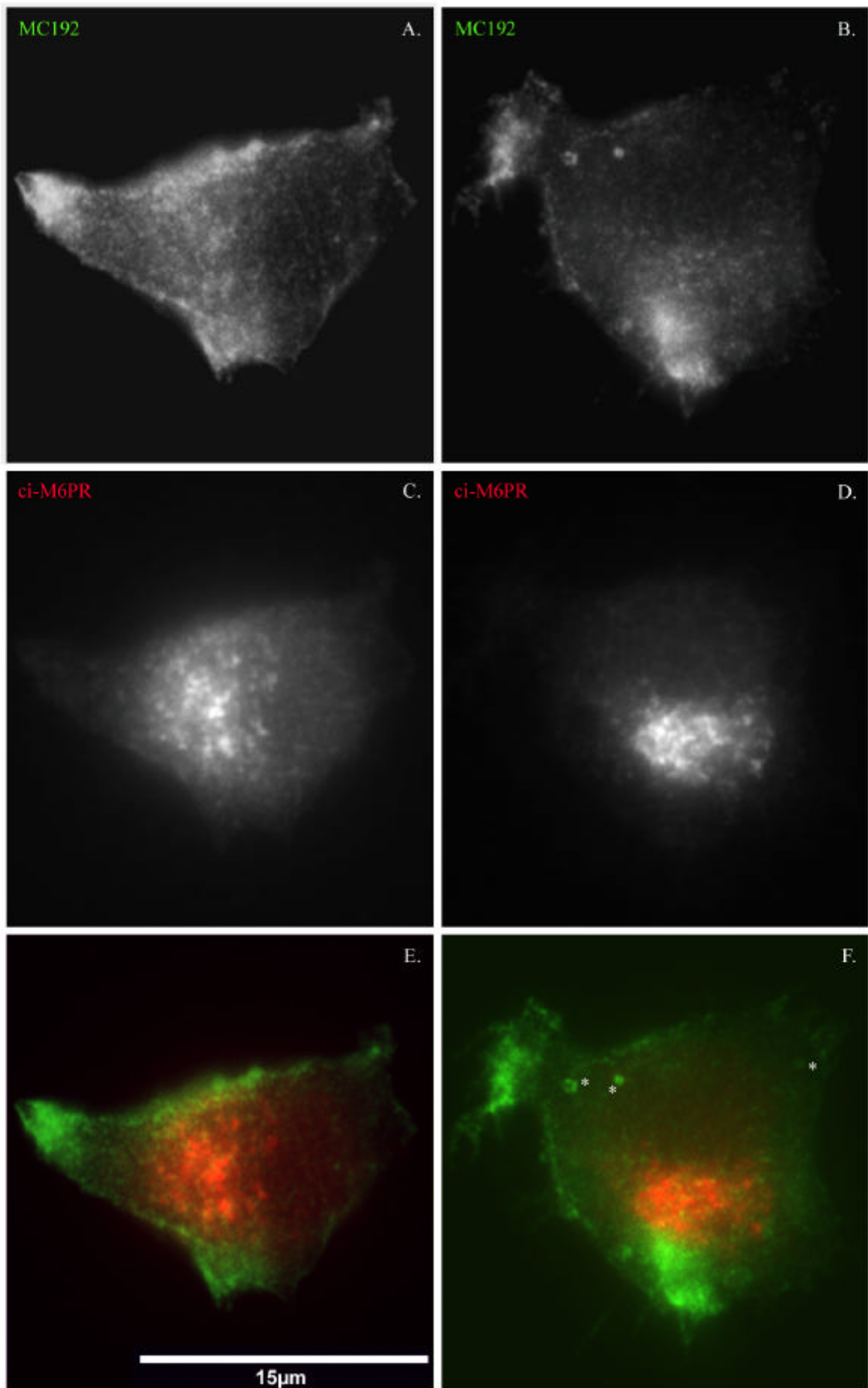
Tafel 5.20.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und EEA1 nach 25 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten 5μg/ml MC192 zugegeben (*pulse*), danach die Zellen gewaschen und für weitere 25 Minuten in Gegenwart von 10ng/ml hbNGF bei 37°C inkubiert (*chase*). Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit anti-EEA1-Antikörpern sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist MC192 grün und EEA1 rot dargestellt. Beispiele für Kolokalisation sind mit einem Pfeil markiert.



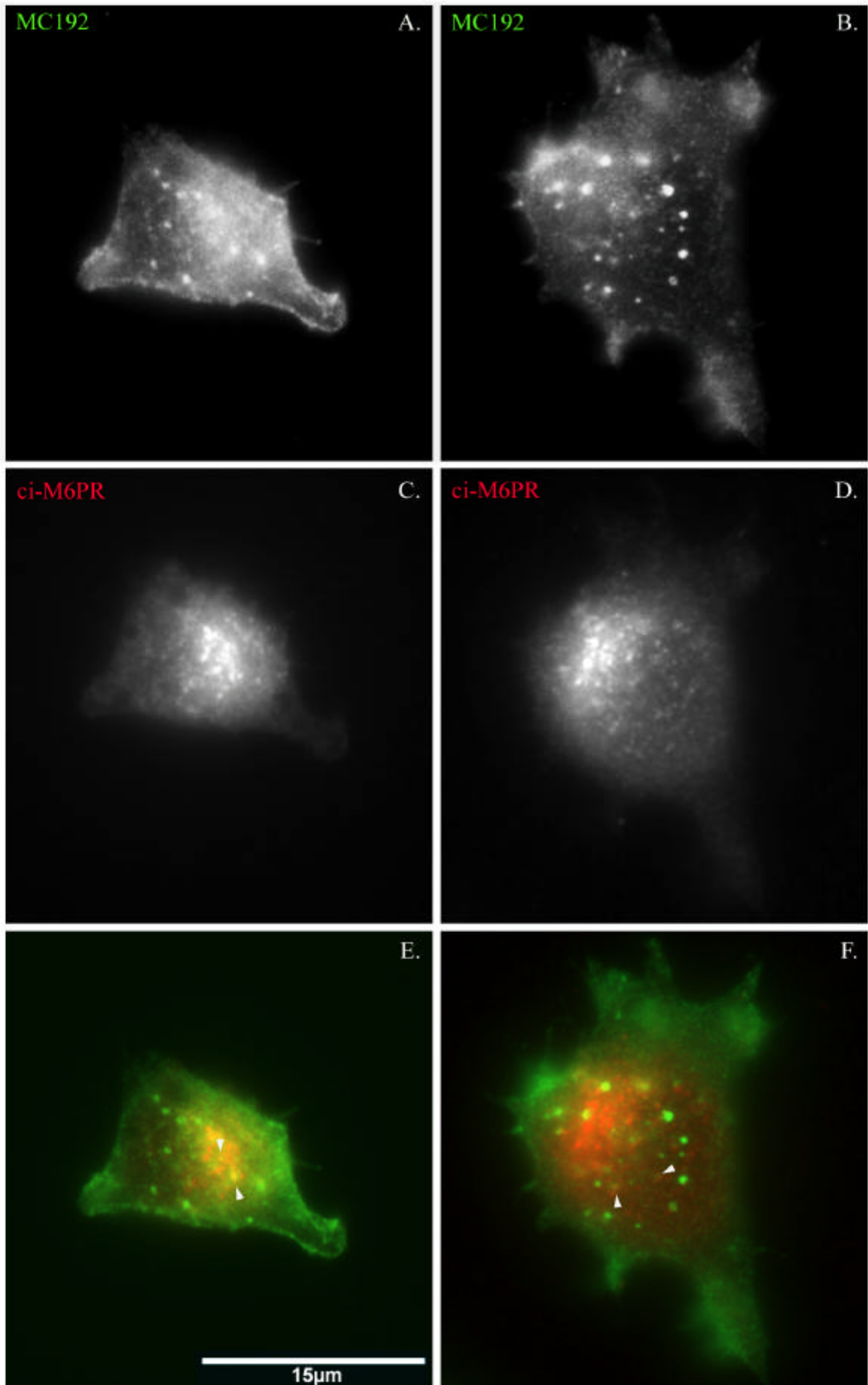
Tafel 5.21.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und EEA1 nach 55 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*), danach die Zellen gewaschen und für weitere 55 Minuten in Gegenwart von 10ng/ml hbNGF bei 37°C inkubiert (*chase*). Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit anti-EEA1-Antikörpern sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist MC192 grün und EEA1 rot dargestellt. Beispiele für Kolokalisation sind mit einem Pfeil markiert.



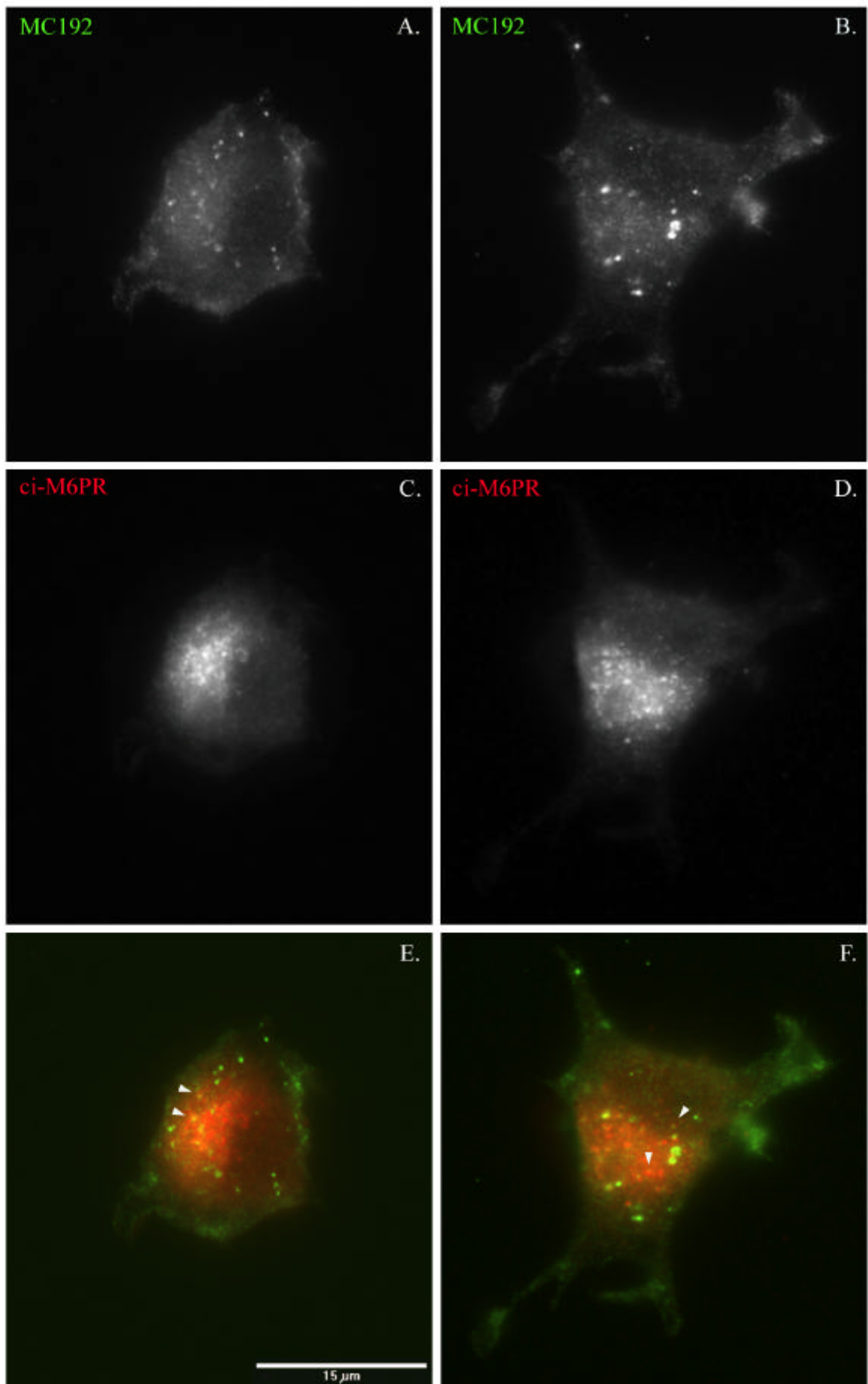
Tafel 5.22.: Einfluß von NGF auf das EEA1-Signal. PC12-251C-Zellen wurden für 20 Minuten ohne (A, C, E) oder mit 10 ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3%PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen EEA1 und Phalloidin-TRITC gefärbt. Der Nachweis von EEA1 erfolgte über einen sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper. In der Zweikanaldarstellung ist EEA1 grün und Phalloidin-TRITC rot dargestellt.



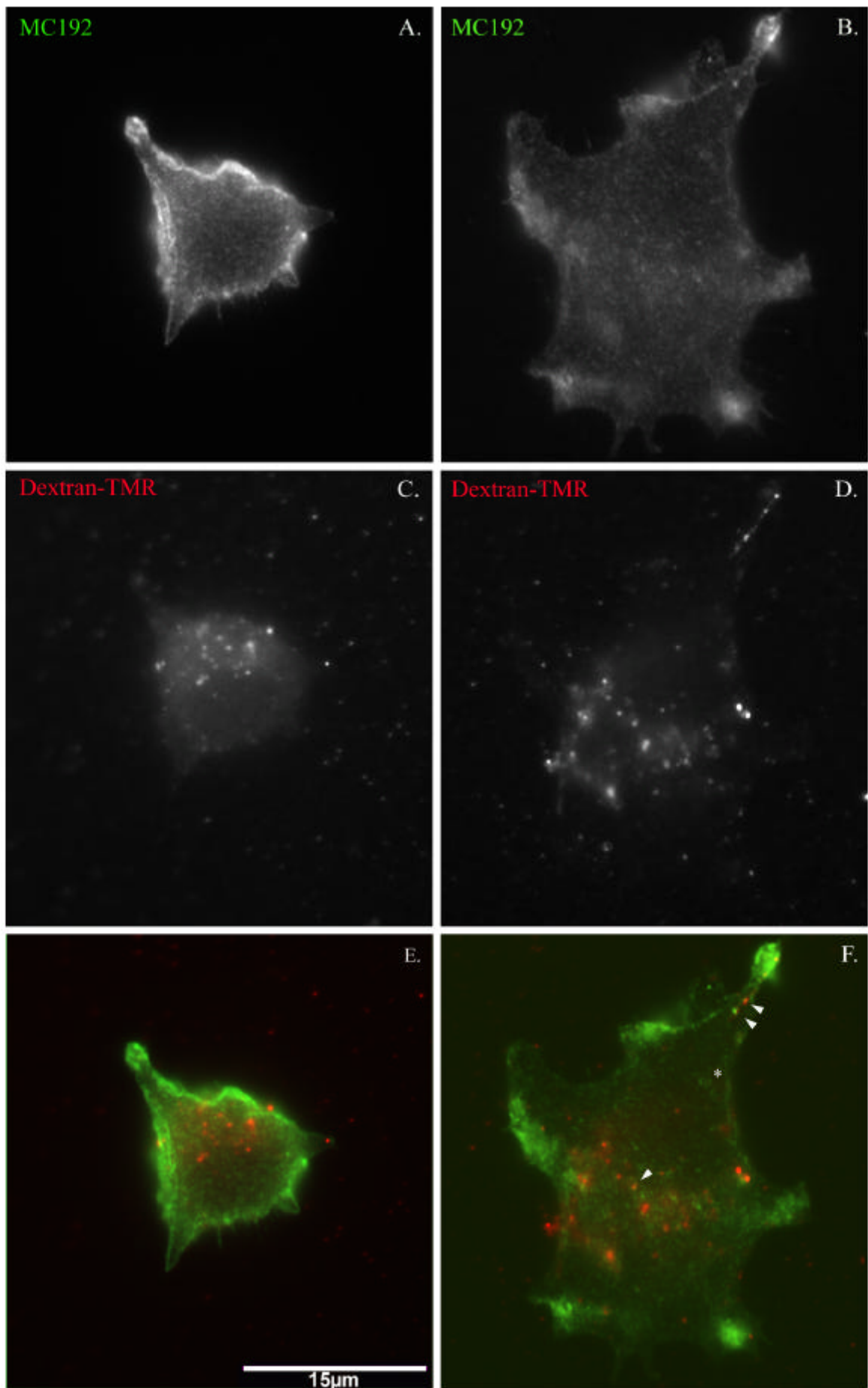
Tafel 5.23.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und ci-M6PR nach 5 Minuten *pulse* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*), danach die Zellen gewaschen, bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit anti-ci-M6PR-Antikörpern sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanal-darstellung (E, F) ist MC192 grün und ci-M6PR rot dargestellt. NGF-induzierte ringartige Strukturen sind mit * gekennzeichnet.



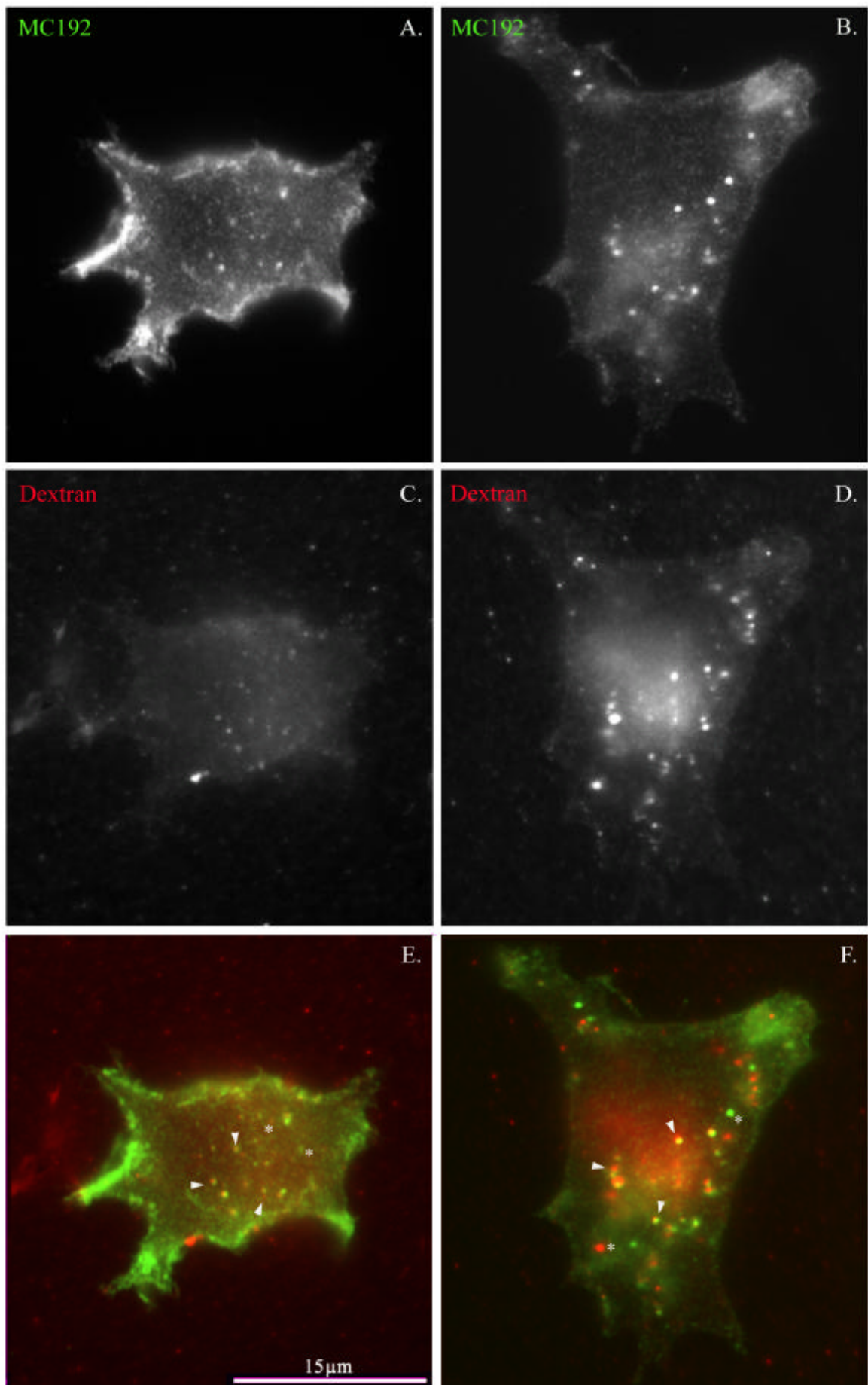
Tafel 5.24.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und ci-M6PR nach 25 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*), danach die Zellen gewaschen und für weitere 25 Minuten in Gegenwart von 10ng/ml hbNGF bei 37°C inkubiert (*chase*). Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit anti-ci-M6PR-Antikörpern sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanaldarstellung (E, F) ist MC192 grün und ci-M6PR rot dargestellt. Pfeile markieren Beispiele für Kolokalisation.



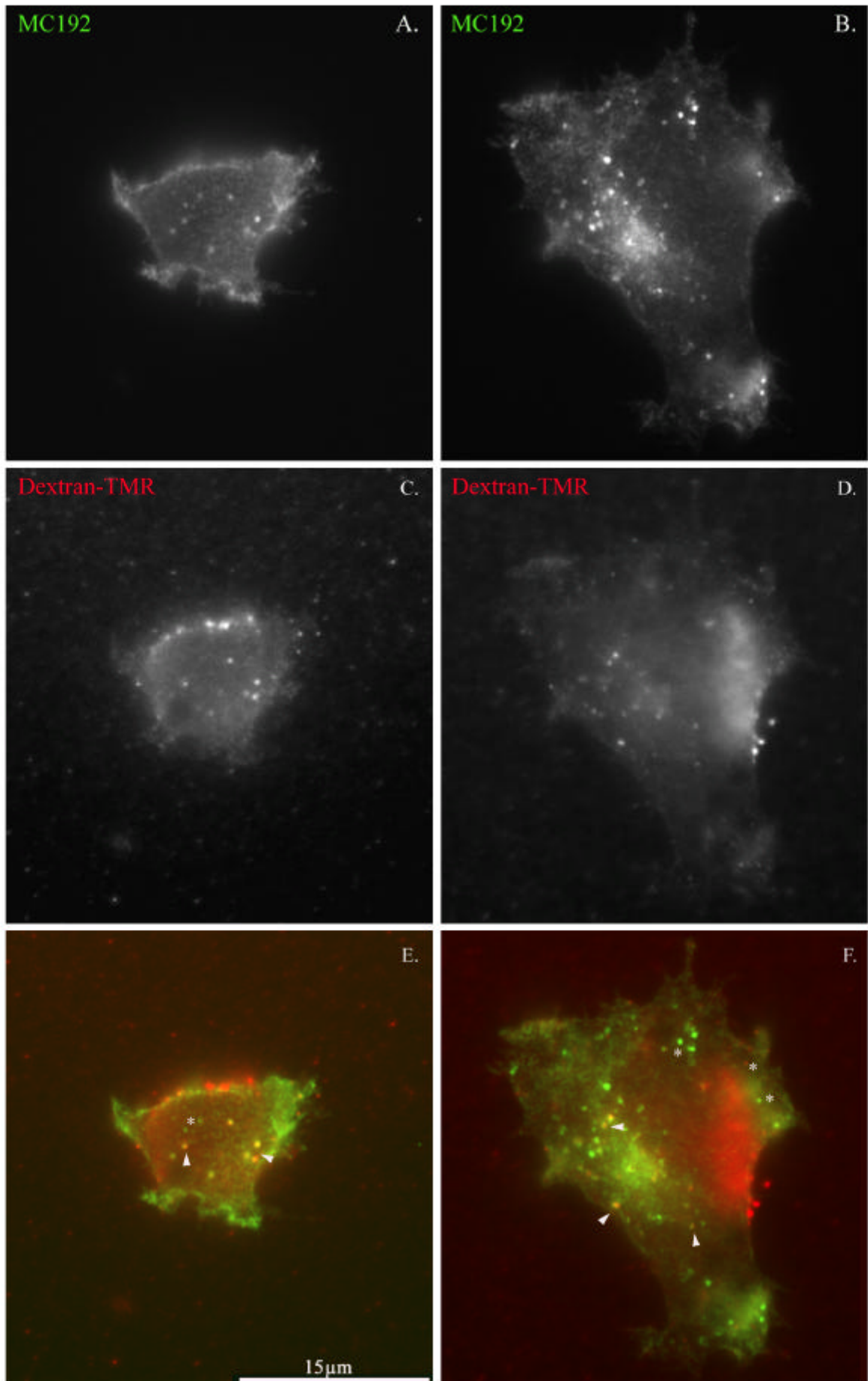
Tafel 5.25.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und ci-M6PR nach 55 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*), danach die Zellen gewaschen und für weitere 55 Minuten in Gegenwart von 10ng/ml hbNGF bei 37°C inkubiert (*chase*). Anschließend wurde bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit anti-ci-M6PR-Antikörpern sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist MC192 grün und ci-M6PR rot dargestellt. Beispiele für Kolokalisation sind mit einem Pfeil markiert.



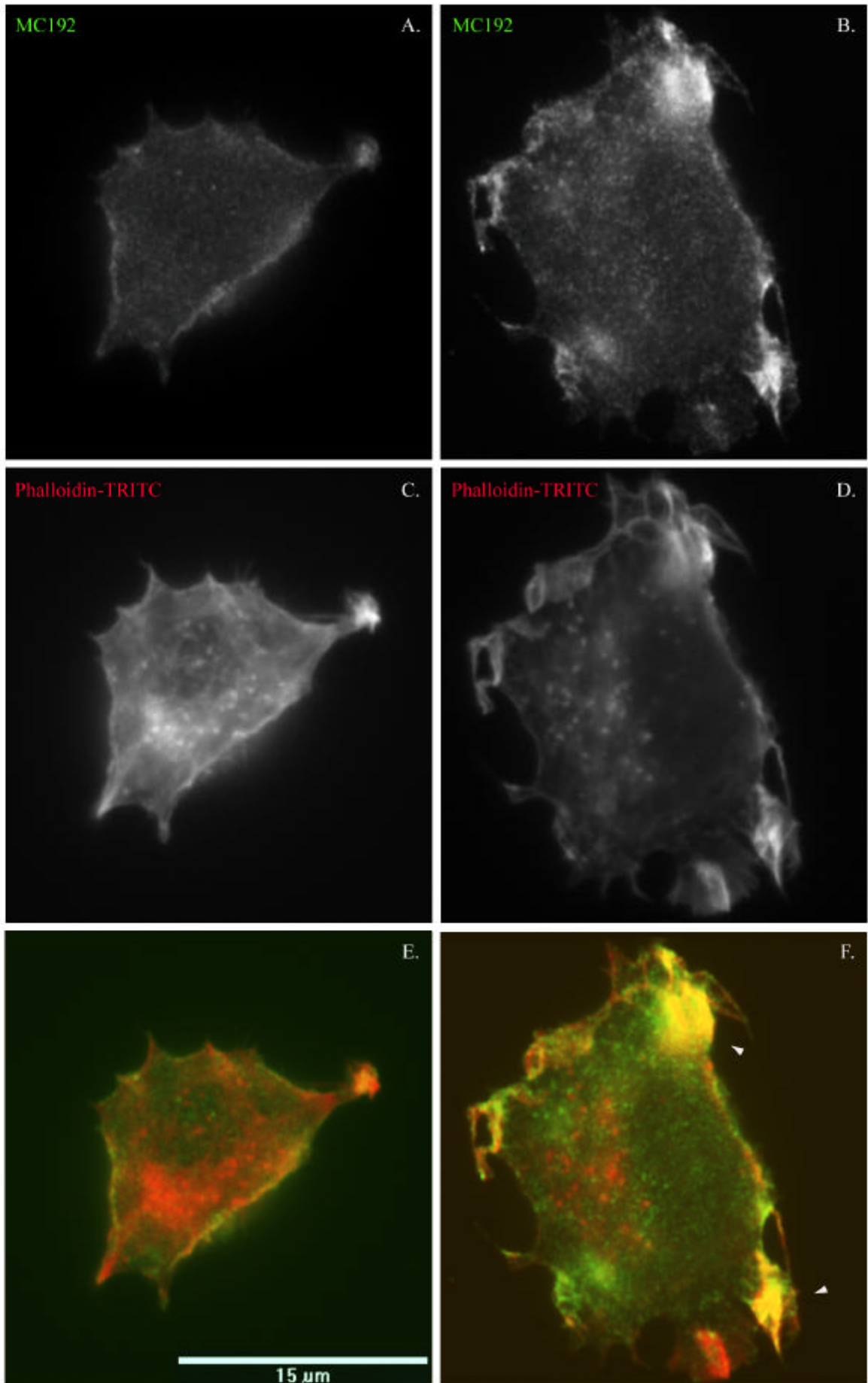
Tafel 5.26.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern mit Dextran nach 5 Minuten *pulse* in Abhängigkeit von NGF-Vorstimulation. PC12-251-Zellen wurden 15 Minuten ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Dann wurde 2mg/ml Dextran-TMR zugegeben und weitere 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde für 5 Minuten 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*), danach gewaschen und bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und MC192 mit einem sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörper nachgewiesen. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist MC192 grün und Dextran rot dargestellt. Pfeile markieren Beispiele für Kolokalisation, NGF-induzierte ringartige Strukturen sind durch * gekennzeichnet.



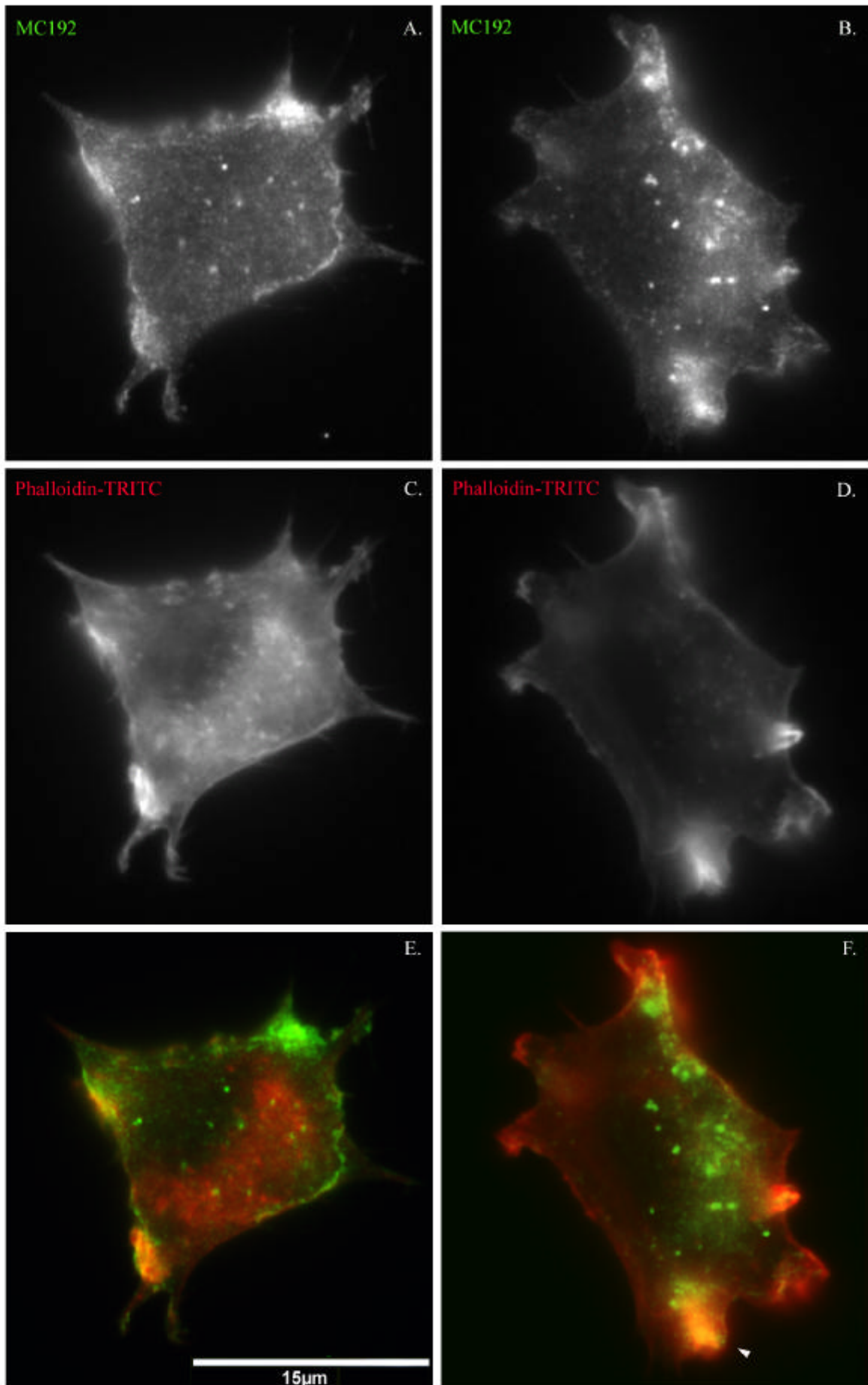
Tafel 5.27.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und Dextran nach 25 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden 20 Minuten ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Dann wurde 5µg/ml MC192 zugegeben und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert (*pulse*). Die Zellen wurden gewaschen und für weitere 25 Minuten in Gegenwart von 10ng/ml NGF inkubiert (*chase*). In den letzten 10 Minuten dieser Inkubation wurde 2mg/ml Dextran-TMR zugegeben. Dann wurden die Zellen gewaschen und bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit einem sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörper gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist MC192 grün und Dextran-TMR rot dargestellt. Hier wurde die Signale des roten Kanals in E und F jeweils um zwei Pixel nach rechts und zwei Pixel nach unten gegen die Signale des grünen Kanals versetzt. Pfeile markieren Beispiele für Kolokalisation, Beispiele für nur Dextran-TMR oder MC192-positive Punkte sind durch einen * gekennzeichnet.



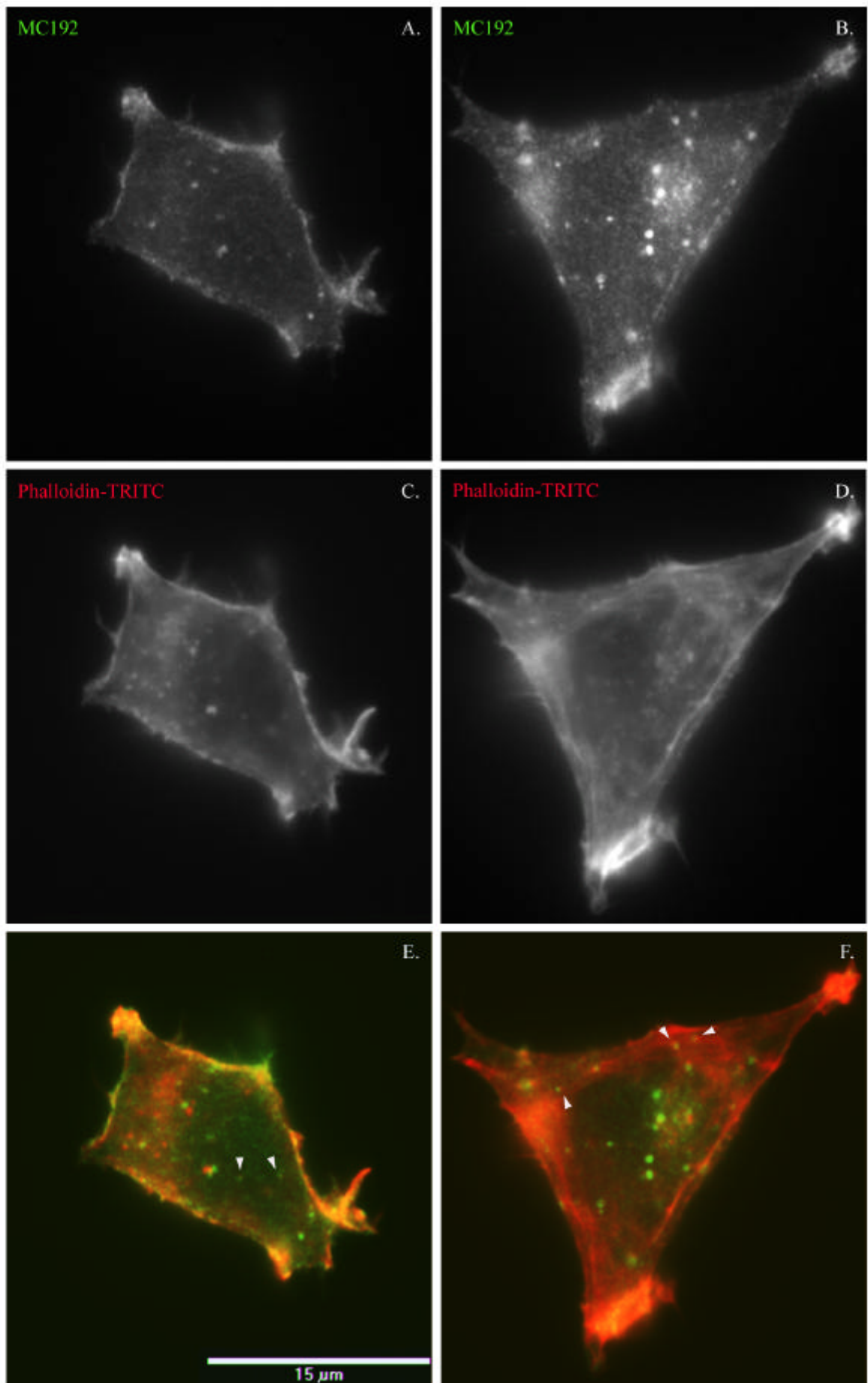
Tafel 5.28.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und Dextran nach 55 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden 20 Minuten ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) bei 37°C inkubiert. Dann wurde 5µg/ml MC192 zugegeben und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert (*pulse*). Die Zellen wurden gewaschen und für weitere 55 Minuten in Gegenwart von 10ng/ml NGF inkubiert (*chase*). In den letzten 10 Minuten dieser Inkubation wurde 2mg/ml Dextran-TMR zugegeben. Dann wurden die Zellen gewaschen und bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit einem sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörper gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist MC192 grün und Dextran-TMR rot dargestellt. Pfeile markieren Beispiele für Kolokalisation, Beispiele für nur Dextran-TMR oder MC192-positive Punkte sind durch einen * gekennzeichnet.



Tafel 5.29.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörper mit F-Aktin nach 5 Minuten *pulse* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, B, C) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten 5µg/ml MC192 zugegeben. Anschließend wurde bei Raumtemperatur gewaschen, mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC sowie einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist MC192 grün und F-Aktin rot dargestellt. Beispiele für Kolokalisation sind mit einem Pfeil markiert.



Tafel 5.30.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und F-Aktin nach 25 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten mit 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*). Dann wurde gewaschen und weitere 25 Minuten in Gegenwart von 10ng/ml NGF bei 37°C inkubiert (*chase*). Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC sowie einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper gefärbt. In der Zweikanal-darstellung (E, F) ist MC192 grün und F-Aktin rot dargestellt. Der Pfeil markiert eine F-Aktin-angereicherte Region, in der auch MC192 angereichert ist.



Tafel 5.31.: Kolokalisation von internalisierten MC192-Antikörpern und F-Aktin nach 55 Minuten *chase* in Abhängigkeit von NGF-Vorinkubation. PC12-251-Zellen wurden ohne (A, C, E) oder mit 10ng/ml hbNGF (B, D, F) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde für 5 Minuten mit 5µg/ml MC192 zugegeben (*pulse*). Danach wurde gewaschen und weitere 55 Minuten in Gegenwart von 10ng/ml NGF bei 37°C inkubiert (*chase*). Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 3% PFA fixiert, TX-100-permeabilisiert und mit Phalloidin-TRITC sowie einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper gefärbt. In der Zweikanalardarstellung (E, F) ist MC192 grün und F-Aktin rot dargestellt. Beispiele für Kolokalisation sind mit einem Pfeil markiert.

Anhang II: Film 1-9

Zum Abspielen der Filme muß zunächst der “Movie-Werkzeug”-Knopf (Symbol-Leiste, links) gedrückt werden. Dann wird mit der rechten Maustaste der Film angeklickt und der Menüpunkt “ Movie wiedergeben” gewählt. Der Film wird dann in einer Endlos-Schleife abgespielt.

Die Legenden sind durch das Symbol gekennzeichnet, zum Lesen muß das Symbol angeklickt (Doppelklick, linke Maustaste) werden.

















