

Analyse und Modifikation der RET- vermittelten Signalweiterleitung in Neuroblastomazellen

Dissertation

zur Erlangung des

akademischen Grades zum

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Chemie

der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Roland Armin Seibt

Bielefeld, März 2011

“Only the fool would take trouble to verify that his sentence was composed of ten a's, three b's, four c's, four d's, forty-six e's, sixteen f's, four g's, thirteen h's, fifteen i's, two k's, nine l's, four m's, twenty-five n's, twenty-four o's, five p's, sixteen r's, forty-one s's, thirty-seven t's, ten u's, eight v's, eight w's, four x's, eleven y's, twenty-seven commas, twenty-three apostrophes, seven hyphens and, last but not least, a single !”

Analyse und Modifikation der RET- vermittelten Signalweiterleitung in Neuroblastomazellen

Dissertation

zur Erlangung des

akademischen Grades zum

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Chemie

der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Roland Armin Seibt

Bielefeld, März 2011

1. Gutachten: Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard
Biochemie III, Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld

2. Gutachten: Prof. Dr. Thomas Dierks
Biochemie I, Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld

Tag der Disputation:

Erklärung

Die Dissertation mit dem Titel „Analyse und Modifikation der RET-vermittelten Signalweiterleitung in Neuroblastomazellen“ wurde im Zeitraum Mai 2007 bis März 2011 in der Arbeitsgruppe Biochemie III unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Ort, Datum

Unterschrift

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung.....	1
1.1 Aufbau des Nervensystems.....	1
1.1.1 Neuronen.....	1
1.1.2 Gliazellen.....	2
1.2 Neurotrophe Faktoren.....	3
1.2.1 Der Nervenwachstumsfaktor NGF.....	4
1.2.2 Die GDNF-Familie neurotropher Faktoren.....	4
1.2.2.1 <i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>	6
1.2.2.2 Neurturin.....	6
1.3 Rezeptor-Tyrosinkinasen.....	7
1.3.1 RET-Rezeptor-Tyrosinkinase.....	8
1.3.1.1 Struktur des RET-Rezeptors.....	8
1.3.1.2 RET-vermittelte Signaltransduktion.....	11
1.3.1.2.1 Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges.....	15
1.3.1.2.2 Aktivierung des Akt/PKB-Signalweges.....	15
1.3.1.2.3 Alternative Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges über Rap1.....	16
1.3.1.3 Pathogenese RET-assoziiierter Krankheiten.....	19
1.4 Endozytose.....	20
1.4.1 Endosomale Signalweiterleitung.....	23
1.4.2 Modifikation der Endozytose.....	27
1.5 Reporterproteine.....	31
1.6 <i>Förster resonance energy transfer</i>	32
2 Material.....	33
2.1 Verbrauchsmaterial.....	33
2.2 Reagenziensätze.....	33
2.3 Geräte.....	34
2.4 Chemikalien.....	35
2.5 Medien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	36
2.6 Zellkulturmedien.....	36
2.7 Puffer und andere Lösungen.....	37
2.8 Enzyme, Standards.....	38
2.9 Antibiotika.....	38
2.10 Wachstumsfaktoren.....	39
2.11 Antikörper.....	39
2.12 Bakterienstämme.....	39

2.13 Zelllinien.....	40
2.13.1 N18TG2.....	40
2.13.2 N4TG3	40
2.13.3 NS20Y.....	40
2.13.4 NH15-CA2.....	40
2.13.5 NG108-15	41
2.13.6 Neuro-2a	41
2.13.7 B104.....	41
2.14 Vektoren und cDNAs	42
2.15 Oligonukleotide	43
2.16 Software und Internetseiten.....	45
3 Methoden	46
3.1 Molekularbiologische Methoden	46
3.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	46
3.1.2 Kryokonservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	46
3.1.3 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Flüssigkulturen	46
3.1.4 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentration und -Reinheitsgrad.....	46
3.1.5 Enzymatische Restriktion von DNA	47
3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	48
3.1.7 DNA-Isolierung aus Agarose-Gelfragmenten	48
3.1.8 Dephosphorylierung plasmidischer DNA	49
3.1.9 Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation von DNA	49
3.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten.....	49
3.1.11 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	50
3.1.12 Transformation durch Elektroporation.....	50
3.1.13 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	50
3.1.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
3.1.14.1 Ortsspezifische Mutagenese.....	51
3.1.14.2 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion.....	52
3.1.15 A/T-Klonierung.....	53
3.1.16 Blau-Weiß-Selektion	54
3.1.17 Sequenzierung von DNA-Konstrukten	54
3.1.18 Reverse Transkription von RNA für PCR	54
3.1.19 Reinigung von RNA aus adultem Mäuseherzgewebe	55
3.1.20 Reinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen	56
3.1.21 Agarose-Gelelektrophorese von RNA	56
3.2 Zellbiochemische Methoden.....	57
3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen in Zellkultur	57
3.2.2 Passagieren eukaryotischer Zellen.....	57
3.2.3 Bestimmung der Zellzahl.....	57

3.2.4 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	57
3.2.5 Revitalisierung kryokonservierter, eukaryotischer Zellen	58
3.2.6 PLL-Beschichtung von Deckgläsern und Zellkulturplatten.....	58
3.2.7 Laminin-Beschichtung von Deckgläsern und Zellkulturplatten.....	58
3.2.8 PFA-Fixierung adhärenter, Fluorophor-transfizierter Zellen	59
3.2.9 PFA-Fixierung eukaryotischer Zellen zur Immunfluoreszenz	59
3.2.10 Transfektion eukaryotischer Zellen	59
3.2.10.1 Transfektion durch Lipofektion	59
3.2.10.2 Transfektion mit FuGENE HD	60
3.2.10.3 Transfektion mit NeuroFECT	60
3.2.10.4 Nukleofektion von B104 Säugerzellen	61
3.2.12 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen	62
3.2.13 Stimulation von Neuro-2a Säugerzellen.....	62
3.2.14 Stimulation von B104 Säugerzellen	63
3.2.15 Färbung der Lysosomen mit LysoTracker	63
3.2.16 Bestimmung der Zellvitalität.....	63
3.2.16.1 Bestimmung der Zellvitalität über Calcein-AM und Propidiumiodid	63
3.2.16.2 Bestimmung der Zellvitalität über Trypanblau	64
3.2.16.3 Bestimmung der Zellvitalität über Resazurin.....	65
3.2.17 Neuritenwachstumstest	65
3.2.18 Endozytose von Fluoreszenz-markiertem Transferrin.....	66
3.3 Proteinbiochemische Methoden	67
3.3.1 Herstellung von Proteinextrakten	67
3.3.2 Bradford-Proteinkonzentrationsbestimmung.....	67
3.3.3 SDS-Gelelektrophorese.....	68
3.3.4 Western Blot	68
3.3.5 Immunfärbung eines Western Blots	69
3.3.6 Densitometrische Quantifizierung von ECL-Signalen.....	69
3.3.7 Strippen von Nitrozellulosemembranen.....	70
4 Ergebnisse.....	71
4.1 Modellsysteme zur Untersuchung und Modifikation RET-vermittelter Signaltransduktion.....	71
4.1.1 Expression von Komponenten der GFL-induzierten Signaltransduktion	71
4.1.2 Vitalitätstests nach GDNF-Stimulation	73
4.1.3 Neuritenwachstum nach GDNF-Stimulation	76
4.1.4 Aktivierung Signalweg-spezifischer Kinasen nach GDNF-Stimulation.....	77
4.1.5 Herstellung stabil transfizierter Neuro-2a Gfr α 1 und Gfr α 2 Zellen	78
4.1.6 Herstellung stabil transfizierter B104 RET9 und RET51 Zellen	82
4.2 Das Neuro-2a Gfr α Neuroblastoma-Modellsystem	84

4.2.1 Vitalitätstests von Neuro-2a Gfr α 1 Neuroblastomazellen.....	84
4.2.2 Neuritenwachstum von N2a Gfr α 1 und Gfr α 2 nach GFL-Stimulation.....	85
4.2.3 Aktivierung spezifischer Signalkaskaden in N2a Gfr α 1 und Gfr α 2 nach GFL-Stimulation	87
4.2.4 Modulation GFL-vermittelter Signalweiterleitung in N2a Zellen	89
4.3 Das B104 RET Neuroblastoma-Modellsystem	90
4.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der RET-Lokalisation	90
4.3.2 Vitalitätstests von B104 Neuroblastomazellen.....	94
4.3.3 Neuritenwachstum von B104 Zellen nach GFL-Stimulation.....	95
4.3.3 Aktivierung spezifischer Signalkaskaden in B104 RET9 und RET51 nach GFL-Stimulation	96
4.3.3 Der Rap1/MAPK-Signalweg in der GDNF-vermittelten Zellaktivierung neuronaler Zellsysteme.....	100
4.3.4 Modulation GFL-vermittelter Signalweiterleitung in B104 Zellen.....	102
4.3.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zum Einfluss der Endozytose auf die GFL-Signalgebung.....	102
4.3.4.2 Proteinbiochemische Untersuchungen zum Einfluss der Endozytose auf die GFL-Signalgebung	104
4.3.4.3 Einfluss von Heparansulfaten auf GDNF-vermittelte Signalwege.....	112
5 Diskussion.....	115
5.1 Etablierung neuronaler Modellsysteme	115
5.1.1 Neuro-2a Gfr α 1 und Neuro-2a Gfr α 2	122
5.1.2 B104 RET9 und B104 RET51.....	127
5.1.2.1 RET-Lokalisation in B104 Zellen	130
5.2 Komponenten des Rap1/MAPK-vermittelten Signalwegs	134
5.3 Endosomales <i>Signaling</i>	141
5.4 Heparansulfat-Einfluss auf die RET-vermittelte Signalgebung	153
6 Zusammenfassung.....	156
7 Summary	158
8 Literaturverzeichnis	160
Anhang.....	V
I Verwendete Plasmide.....	V
II Sequenzierungen	VII
II.I RET9 +Kozaksequenz –Stoppcodon.....	VII
II.II RET51 +Kozaksequenz –Stoppcodon.....	X
II.III Elektropherogramme	XI
Abbildungsverzeichnis	XIII
Abkürzungsverzeichnis.....	XV

1 EINLEITUNG

Viele Krankheiten, die im Zusammenhang mit dem menschlichen Nervensystem stehen, sind bis heute nur im Ansatz verstanden. Zu den bekanntesten Vertretern zählen die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), *Morbus Parkinson* und *Morbus Alzheimer*. Die Degeneration bestimmter Nervenzellpopulationen steht dabei im Vordergrund. Bei der ALS sind motorische, bei der Parkinson-Krankheit motorische dopaminerge und bei der Alzheimer-Krankheit cholinerge Nervenzellen (Neuronen; 1.1.1) betroffen. Der Unterschied zwischen einem intakten und einem apoptotischen Neuron, das einen programmierten Zelltod durchläuft, liegt meist nur in dem Signal begründet, das es von anderen Neuronen oder Gliazellen (1.1.2) erhält bzw. nicht erhält. Diese Signale werden durch neuronale Wachstumsfaktoren vermittelt. Nahezu jeder neuronalen Krankheit liegt ein Defekt in zumindest einem dieser Faktoren oder deren Signalgebung zugrunde. Ein weiterführendes Verständnis der neuronalen Signalweiterleitung ist damit für die Entwicklung möglicher Therapien von zentralem Interesse.

1.1 AUFBAU DES NERVENSYSTEMS

Die Gesamtheit aller Nerven- und Gliazellen eines Organismus wird als Nervensystem bezeichnet, wobei bei Wirbeltieren zwischen zentralem und peripherem Nervensystem unterschieden wird. Das zentrale Nervensystem (ZNS) wird durch die Zellen des Gehirns und des Rückenmarks, das periphere Nervensystem (PNS) durch die übrigen Nerven- und Gliazellen gebildet. Das menschliche Gehirn ist in einer nahezu äquivalenten Verteilung aus fast 10^{11} Neuronen und der gleichen Anzahl nicht-neuronaler Zellen aufgebaut (Azevedo *et al.*, 2009).

1.1.1 NEURONEN

Neuronen sind morphologisch heterogene Zellen des Nervensystems. Der typische Aufbau von Wirbeltierneuronen wird durch verhältnismäßig große Zellkerne, das den Zellkern umgebende Zytoplasma (*Zellkörper*, *Perikaryon* bzw. *Soma*) und eine aus Myelinscheiden aufgebaute Nervenfasern, das *Axon*, bestimmt. Zusätzlich zu dem zentralen Axon geht eine Vielzahl weiterer, feinerer Fortsätze, die *Dendriten*, vom Zellkörper aus. Die meisten Neuronen geben Signale zu vernetzten Zielneuronen über

das Axon weiter und nehmen über die Dendriten synaptischen Kontakt zu anderen Neuronen auf.

Zur Klassifizierung von Neuronen gibt es unterschiedliche Prinzipien. Die Funktion der Neuronen bestimmt die Einteilung in sensorische, motorische oder Interneuronen. Sensorische Neuronen leiten Informationen von Sinnesrezeptoren oder Zellrezeptoren der jeweiligen Organe an das Gehirn oder Rückenmark weiter. Motorische Neuronen wiederum vermitteln Impulse vom Gehirn oder vom Rückenmark an Organe oder Muskeln und sorgen dort für spezifische Effekte wie z. B. die Muskelkontraktion. Interneuronen können keiner dieser beiden Klassen zugeordnet werden und besitzen meist nur informationsvermittelnde Funktionen. Weiterhin können die Form (z. B. Pyramiden-, Mitralzellen) oder die Lokalisation (z. B. kortikal, spinal) für eine Klassifikation ausschlaggebend sein. Die gebräuchlichste Einteilung der Neuronen erfolgt anhand der Neurotransmitter, die die Zellen synthetisieren und freisetzen. Dabei wird in dopaminerge, adrenerge, glutamaterge, cholinerge, serotonerge, glycinerge, peptiderge oder GABA-erge (γ -Aminobuttersäure) Neuronen unterschieden.

1.1.2 GLIAZELLEN

Die Gliazellen (*glia*: griech. für Leim) wurden lange Zeit lediglich als strukturfördernde, gerüstbildende Zellen des Nervensystems angesehen. Gliazellen weisen jedoch weitaus mehr Neuronen-unterstützende Eigenschaften auf, denn sie sorgen unter anderem für die elektrische Isolation, den Stoff- und Flüssigkeitsaustausch, die Aktivierung, die Inhibierung und die Homöostase von Neuronen (Seifert *et al.*, 2006; Araque und Navarrete, 2010). Sie sind kleiner als die Neuronen, bilden aber etwa die Hälfte der Masse des menschlichen Gehirns. Zu den Gliazellen des ZNS werden die Astroglia (Astrozyten), die Oligodendrozyten, die Ependym- und die Plexusepithelzellen, die Radialglia und die Mikroglia gezählt (Araque und Navarrete, 2010). Zum PNS gehören weiterhin die Schwannschen Zellen, die Mantel- und Müllerzellen sowie die Teloglia der motorischen Endplatte.

Der Nachweis einer bidirektionalen Signalgebung zwischen Astrozyten und Neuronen führte zu einem neuen Konzept der Physiologie von Synapsen. In diesem Modell einer dreigliedrigen, sogenannten tripartiten Synapse tauschen Astrozyten Informationen zwischen prä- und postsynaptischen Elementen aus und agieren somit regulatorisch

als Neuromodulator (Perea und Araque, 2005; Perea *et al.*, 2009; Araque und Navarrete, 2010).

1.2 NEUROTROPHE FAKTOREN

Neurotrophe Faktoren sind körpereigene Signalproteine, die für das Überleben von Nervenzellen und für eine zielgerichtete Ausbildung von Axonen sorgen. Neuronen ohne eine synaptische Verbindung werden durch neurotrophe Faktoren unzureichend stimuliert und apoptotisch entfernt. Rita Levi-Montalcini *et al.* identifizierten den ersten neurotrophen Wachstumsfaktor in den 1950er Jahren, den Nervenwachstumsfaktor NGF (*nerve growth factor*; (Cohen *et al.*, 1954)). Es folgte die Entdeckung weiterer NGF-verwandter Proteine, die zur wichtigsten Klasse neurotropher Faktoren, der NGF-Familie, gehören. Mitglieder dieser Familie kleiner, basischer Proteine mit einer Größe von ca. 13 kDa werden auch als Neurotrophine bezeichnet und sind für das Überleben, die Differenzierung und das Wachstum vieler Neuronen des ZNS und des PNS verantwortlich (Eide *et al.*, 1993). Zu der Superfamilie neurotropher Faktoren werden neben den Neurotrophinen zudem die Neurokine (z. B. *ciliary neurotrophic factor* CNTF) und die *glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands* (GFL; 1.2.2) gezählt.

Die Familie der Neurotrophine umfasst NGF, den *brain-derived neurotrophic factor* BDNF (Leibrock *et al.*, 1989), Neurotrophin-3 (NT-3; (Hohn *et al.*, 1990)) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5; (Ip *et al.*, 1991; Berkemeier *et al.*, 1992)). Neurotrophine können mit geringer Affinität an den p75 Neurotrophin-Rezeptor (p75NTR) oder mit hoher Affinität an die Rezeptoren der Rezeptor-Tyrosinkinasefamilie TrkA, TrkB oder TrkC (*tropomyosin-receptor-kinase*) binden (Rodriguez-Tebar *et al.*, 1991). Über das Expressionsmuster der drei verschiedenen Trk-Rezeptoren in Säugerzellen werden die reguläre Entwicklung und die Homöostase der jeweiligen, unterschiedlichen Neuronenpopulationen des zentralen und des peripheren Nervensystems sichergestellt. Die Bindung von Neurotrophinen an Trk-Rezeptoren löst in der Regel Überlebenssignale und die Bindung an p75NTR in Abwesenheit von Trk-Rezeptoren Apoptose aus (Dechant und Barde, 1997). Die Bindung an Trk-Rezeptoren erfolgt spezifisch, wobei TrkA vornehmlich NGF (Hempstead *et al.*, 1991; Kaplan *et al.*, 1991), TrkC ausschließlich NT-3 (Lamballe *et al.*, 1991) und TrkB sowohl BDNF als auch NT-3 und NT-4/5 binden kann (Soppet *et al.*, 1991; Squinto *et al.*, 1991; Eide *et al.*, 1993).

1.2.1 DER NERVENWACHSTUMSFAKTOR NGF

Während die Ausbildung von Axonen in Richtung sympathischer Zielorgane über neurotrophe Faktoren wie Artemin (1.2.2) oder NT-3 vermittelt wird, erfolgt die endgültige Innervation durch NGF, das das Überleben und die Differenzierung sensorischer Neuronen der Neuralleiste, sympathischer Neuronen des PNS sowie einiger cholinergischer Neuronen des ZNS reguliert (Mori *et al.*, 1990; Knusel *et al.*, 1992; Korsching, 1993). Das von den Zielzellen gebildete NGF wird spezifisch von sympathischen Neuronen gebunden, als Rezeptor-Ligandenkomplex endozytiert und retrograd vom Axon zum Zellkörper transportiert (Korsching und Thoenen, 1983; DiStefano *et al.*, 1992), um dort durch Regulation von Transkriptionsfaktoren, hauptsächlich CREB (*cAMP response element-binding protein*), zu wirken (Levi-Montalcini, 1987; Thoenen *et al.*, 1987; Riccio *et al.*, 1997). Die exakte Signalweiterleitung von NGF erfolgt primär durch Bindung an die Rezeptor-Tyrosinkinase (1.3) TrkA auf der Plasmamembran der Zielzellen, wodurch eine Dimerisierung des Rezeptors erfolgt. Durch eine Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosinreste des Rezeptors wird ein Signalkomplex, bestehend aus SOS (*son of sevenless*), einem für das kleine G-Protein Ras (*rat sarcoma*) spezifischen GEF, Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), einem Adapterprotein für SOS, und Shc (*Src homology 2 domain containing*), einem plasmamembranständigen Linkerprotein zwischen Grb2 und TrkA, rekrutiert (Kao *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). Die nachfolgende kooperative Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und der Proteinkinase C (PKC) ist essenziell für das Überleben sympathischer Neuronen (Pierchala *et al.*, 2004). Eine transiente Aktivierung von Ras, durch SOS zur Plasmamembran rekrutiert, führt außerdem zur Anschaltung des c-Raf-Mek-Erk1/2-Signalwegs (1.3.1.2.1; (Thomas *et al.*, 1992; Wood *et al.*, 1992)).

1.2.2 DIE GDNF-FAMILIE NEUROTROPHER FAKTOREN

Neurotrophe Faktoren können sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen sezerniert werden. Wie die Neurotrophine beeinflussen auch die Wachstumsfaktoren der Gliazellen die Entwicklung und das Überleben einer Vielzahl von Neuronenpopulationen. Der zuerst identifizierte, von Gliazellen sezernierte neurotrophe Faktor ist der *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF; (Lin *et al.*, 1993)). Weitere Mitglieder der GDNF-Familie neurotropher Faktoren sind Neurturin

(NRTN; (Kotzbauer *et al.*, 1996)), Artemin (ARTN; (Baloh *et al.*, 1998; Andres *et al.*, 2001)) und Persephin (PSPN; (Milbrandt *et al.*, 1998)). Sie werden zu den GDNF-Familie-Liganden (GFL) zusammengefasst. Die GFL sind kleine, sekretierte, glykosylierte Polypeptide, die Homodimere bilden und als solche nach Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren mehrere Signalwege in Zielzellen aktivieren können. Als hauptsächliche Bindungspartner wurden die Gfra (*GDNF family receptor α*)-Korezeptoren und die Rezeptor-Tyrosinkinase RET (*rearranged during transfection*) identifiziert (1.3.1).

Die Aminosäuresequenz aller GFL besitzt sieben Cysteinreste, die im gleichen Abstand zueinander stehen und aufgrund derer GFL zur Familie der Cystinknotenproteine gezählt werden und strukturell entfernt verwandt mit der TGF- β (*transforming growth factor- β*)-Superfamilie sind (Bottner *et al.*, 2000). Da GFL allerdings nicht zur Signalisierung über TGF- β -Rezeptoren in der Lage sind, werden sie nicht direkt der TGF- β -Superfamilie zugeordnet. Gliazellen synthetisieren GFL als einen *preproGFL*, dessen Signalsequenz bei der Sekretion abgespalten wird. Das hierdurch entstehende jeweilige *proGFL* wird im Gegensatz zu den Wachstumsfaktoren NGF und BDNF nicht durch die Serinprotease Plasmin und spezifische Matrixmetalloproteasen (Lee *et al.*, 2001; Oh-hashii *et al.*, 2009), sondern durch Furinendoproteinasen und andere Proprotein-Konvertasen extrazellulär gespalten und aktiviert (Lonka-Nevalaita *et al.*, 2010).

Aktive GFL binden über ihre Heparin-Bindungsdomänen an die Heparansulfate (HS) der extrazellulären Proteoglykan-Matrix, wodurch ihre Diffusion eingeschränkt und ihre lokale Konzentration erhöht wird (Hamilton *et al.*, 2001; Rickard *et al.*, 2003). Die extrazellulären HS 6-O-Endosulfatasen Sulf1 und Sulf2 entfernen selektiv die 6-O-Sulfatgruppen trisulfatierter Disaccharide der Seitenketten von Oberflächen- und Matrix-gebundenen Heparansulfaten. Somit verändern sie deren Fähigkeit, spezifische Signalwege über die hohe Bindungsaffinität zu einigen Wachstumsfaktoren zu regulieren (Ai *et al.*, 2003; Ai *et al.*, 2006). Einige Signalwege, z. B. die für die Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren FGF (*fibroblast growth factor*; (Schlessinger *et al.*, 2000)), sind darauf angewiesen, dass aktive HS 6-O-Sulfatgruppen auf den Zielzellen existieren, damit funktionale ternäre Signalprotein-HS-Rezeptorkomplexe entstehen können. Sulf1 und Sulf2 agieren in diesem Fall als Signalrepressor (Wang *et al.*, 2004b; Frese *et al.*, 2009). Im Fall von GDNF und anderen GFL hingegen bedingen die Endosulfatasen eine enzymatische Verringerung

der GFL-HS-Bindungsaffinität, wodurch sie für eine höhere Bioverfügbarkeit sorgen und somit zu einer Signalverstärkung in der Zielzelle führen (Morimoto-Tomita *et al.*, 2002; Ai *et al.*, 2003; Ai *et al.*, 2007; Nawroth *et al.*, 2007; Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2010). Im Einklang mit diesem Mechanismus zeigten Experimente an Zellen embryonaler *Sulf1*^{-/-} *Sulf2*^{-/-}-Mäuse, dass ein vermindertes Neuritenwachstum enterischer Zielneuronen, hervorgerufen durch eine verhinderte Freisetzung von GDNF aus der Proteoglykanmatrix der glatten Muskelzellen der Speiseröhre, durch einen GDNF-Überschuss vollständig wiederhergestellt werden konnte, was mehr auf einen quantitativen als einen qualitativen Effekt der Sulfatasen Sulf1/2 im GDNF-Signalweg schließen lässt (Ai *et al.*, 2007; Kalus *et al.*, 2009; Langsdorf *et al.*, 2011).

1.2.2.1 *Glial cell line-derived neurotrophic factor*

Der *glial cell line-derived neurotrophic factor* GDNF wurde ursprünglich als ein wichtiger neurotropher Faktor für das Proliferations-unabhängige Überleben dopaminergener Neuronen aus dem Mittelhirn identifiziert (Lin *et al.*, 1993). Diese funktionelle Eigenschaft von GDNF konnte mittlerweile auf viele weitere Neuronen des ZNS und des PNS ausgeweitet werden. GDNF ist maßgeblich an der embryonalen Entwicklung des Nervensystems beteiligt und gilt als wichtiger neurotropher Faktor für das Überleben und die Differenzierung sowohl zentraler noradrenerger (Arenas *et al.*, 1995), motorischer (Henderson *et al.*, 1994), sympathischer (Arenas *et al.*, 1995), sensorischer (Buj-Bello *et al.*, 1995; Airaksinen *et al.*, 1999) und enterischer Neuronen (Rodrigues *et al.*, 2010) als auch embryonaler Stammzellen (Lee *et al.*, 2005). Außerhalb des Nervensystems ist GDNF maßgeblich an der Nierenentwicklung und der Spermatogenese beteiligt (Moore *et al.*, 1996; Pichel *et al.*, 1996; Meng *et al.*, 2000) und in klinischen Studien als negativer Regulator gegen Suchtkrankheiten im Einsatz (Ghitza *et al.*, 2010).

1.2.2.2 Neurturin

Neurturin (NRTN) ist ein ca. 11.5 kDa großes Protein, das in einer Konzentration von 30 pM den Effekt von NGF auf das Überleben NGF-sensitiver Neuronen vollständig kompensieren kann. Die Aminosäuresequenz des reifen NRTN zeigt eine 42 %ige Übereinstimmung mit GDNF und weniger als 20 % Gemeinsamkeit mit Mitgliedern der TGF- β -Familie. Wie GDNF wurde Neurturin primär als Überlebensfaktor für sympathische dopaminerge Neuronen klassifiziert (Kotzbauer *et al.*, 1996). Aber auch viele cholinerge parasympathische und enterische Neuronen benötigen eine

Neurturin-vermittelte Signalgebung über den GDNF-Familienrezeptor Gfr α 2 für eine korrekte Innervation der Zielzellen. Beispielsweise ist eine normale Innervation des Herzens ohne den Gfr α 2/RET-Signalweg nicht möglich (Hiltunen *et al.*, 2000). Sympathische cholinerge Neuronen ohne den Gfr α 2-Korezeptor sind von einer Verminderung der Somagröße, des Wachstums oder der Aufrechterhaltung der Zielinnervation, nicht jedoch von einer Verminderung der Anzahl betroffen. Dies spricht dafür, dass von Zielzellen sezerniertes Neurturin als innervierender Faktor für postganglionische cholinerge Neuronen in allen Teilen des autonomen Nervensystems wirkt (Hiltunen und Airaksinen, 2004). Mäuse mit einem Gen-Knockout der im Nervensystem wirkenden Wachstumsfaktoren Neurturin (Heuckeroth *et al.*, 1999), Artemin, Persephin (Tomic *et al.*, 2002) oder deren Korezeptoren bleiben lebensfähig und fertil, während GDNF- (Moore *et al.*, 1996; Pichel *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1996) oder Gfr α 1-Knockout-Mäuse (Cacalano *et al.*, 1998; Enomoto *et al.*, 1998) kurz nach der Geburt an einer Fehlentwicklung der Nieren sterben (Rossi *et al.*, 1999; Airaksinen und Saarma, 2002).

1.3 REZEPTOR-TYROSINKINASEN

Extrazelluläre Informationen und Signale müssen in eine spezifische Zellantwort übersetzt und verarbeitet werden. Hierzu ist eine Vielzahl variabler und gleichzeitig spezifischer Oberflächenrezeptoren auf der Plasmamembran erforderlich, die diese extrazelluläre Information in Form signalauslösender Faktoren bzw. Liganden binden. Eine große Familie dieser Oberflächenrezeptoren stellen die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) dar. Sowohl Neurotrophine als auch neurotrophe Faktoren der GDNF-Familie binden an Rezeptor-Tyrosinkinasen. Nach deren Bindung dimerisieren die Rezeptoren, woraufhin mittels einer intrinsischen Tyrosinkinasedomäne eine Autophosphorylierung durch Transphosphorylierung an intrazellulären Tyrosinresten initiiert wird. Dies löst eine interne Signalkaskade über die Rekrutierung weiterer Kinasen und Adapterproteine mit geeigneten Bindedomänen aus, wodurch letztendlich Transkriptionsfaktoren zur spezifischen Genregulation aktiviert werden. Der aktivierte Rezeptor wird als Rezeptor-Ligandenkomplex über Endozytose internalisiert und zur Signaltermination entweder recycelt oder im Lysosom degradiert.

Mit Ausnahme des Insulinrezeptors und des IGF1-Rezeptors (*insulin-like growth factor 1*) liegen alle bekannten Rezeptor-Tyrosinkinasen als Monomer in der

Plasmamembran vor (Van Obberghen, 1994). RTK werden anhand ihrer extrazellulären Domänen in drei Klassen eingeteilt: Die Klasse der Insulinrezeptoren, die aus je zwei extrazellulär über Disulfidbrücken miteinander verknüpften α - und zwei β -Ketten bestehen, die Klasse der NGF-Rezeptoren mit einer Immunglobulin-ähnlichen, extrazellulären Domäne und einer intrazellulären Kinasedomäne und die Klasse der EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptoren als einkettige Rezeptoren mit einer Cystein-reichen extrazellulären Domäne. Bei allen drei RTK-Klassen weist der N-Terminus in den Extrazellularraum und der C-Terminus ins Zytoplasma.

1.3.1 RET-REZEPTOR-TYROSINKINASE

RET ist eine membrandurchspannende RTK aus der Klasse der EGF-Rezeptoren, die den Kern des kanonischen GFL-Rezeptorkomplexes bildet. In Mäuseembryonen wird RET während der Entwicklung der Nieren, des zentralen und des peripheren Nervensystems exprimiert (Pachnis *et al.*, 1993; Avantaggiato *et al.*, 1994). Knockout-Mäuse, bei denen beide *RET*-Allele ausgeschaltet sind, weisen eine Nieren-Dysplasie und Störungen des enterischen Nervensystems auf und sterben direkt nach der Geburt (Schuchardt *et al.*, 1994). Interessanterweise stellte sich dieser Effekt im Nachhinein als Isoform-spezifisch heraus (1.3.1.1). Monoisoforme RET9-Mäuse sind lebendig und erscheinen normal, während monoisoforme RET51-Mäuse ohne RET9 denselben Phänotyp wie die RET-Knockout-Mäuse aufweisen (de Graaff *et al.*, 2001). Im Menschen wird RET im gesunden Gewebe des Nebennierenmarks, im Nervengewebe und in Tumoren, die sich von Zellen des Neuroektoderms ableiten, exprimiert (Nakamura *et al.*, 1994). Hierzu zählen neben den medullären Schilddrüsenkarzinomen MTC (*medullary thyroid carcinoma*) und den Phäochromozytomen auch die Neuroblastome (Ikeda *et al.*, 1990; Santoro *et al.*, 1990).

1.3.1.1 Struktur des RET-Rezeptors

Der extrazelluläre Bereich des RET-Rezeptors besteht aus einer Liganden-bindenden Domäne, vier Cadherin-ähnlichen Domänen und einer Cystein-reichen Domäne. Die Cadherin-ähnlichen Domänen sind für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen verantwortlich und für den Transport des Proteins zur Zellmembran von Bedeutung (van Weering *et al.*, 1998b). Für GDNF und Neurturin wurde bereits gezeigt, dass auch die Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch den Liganden Calcium-abhängig ist (Nozaki *et al.*, 1998), da die Ca^{2+} -Ionen für die Bindung des GFL/Gfr α -Komplexes an den RET-

Rezeptor benötigt werden (Anders *et al.*, 2001). Die Cysteinreste der Cystein-reichen Region vermitteln die intermolekulare Interaktion durch korrekte Ausbildung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken und sind so an der Struktur des Rezeptors maßgeblich beteiligt (Takeda *et al.*, 2001). Der intrazelluläre, C-terminale Bereich besitzt zwei Tyrosinkinasedomänen, die durch eine Kinase-Insert-Region voneinander getrennt sind (Pasini *et al.*, 1997). Es sind drei Isoformen des humanen RET-Rezeptors bekannt, die durch alternatives Spleißen der 3'-Exons entstehen und sich jeweils nur in den letzten Aminosäuren ihrer C-Termini ab dem Rest Gly1063 unterscheiden. RET9 (1073 AS) weist neun individuelle Aminosäurereste auf, RET43 (1107 AS) und RET51 (1115 AS) besitzen entsprechende Sequenzen von 43 und 51 AS (Abb. 1.1; (Myers *et al.*, 1995; Carter *et al.*, 2001)).

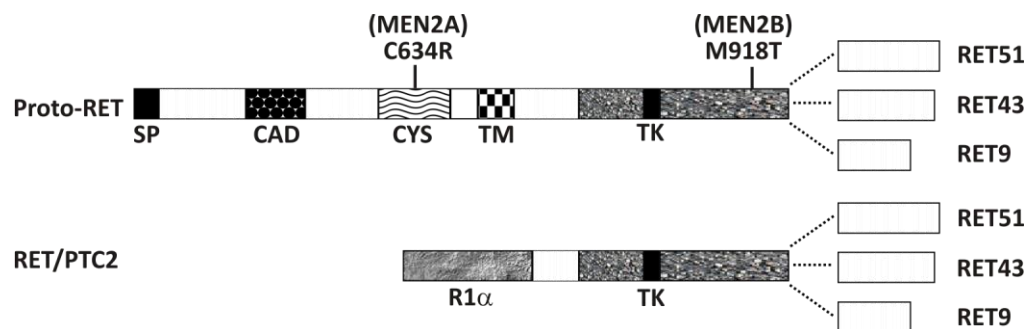


Abb. 1.1: Strukturen der RET-Isoformen und des chimären Onkoproteins RET/PTC2

Dargestellt sind die Strukturen der RET-Isoformen RET51, RET43 und RET9, die sich ab dem Aminosäurerest Gly1063 unterscheiden (oben), die Struktur des R1 α -RET chimären Onkoproteins RET/PTC2 (unten) und die Aminosäure-Mutationen, die mit dem MEN2 Syndrom (1.3.1.3) assoziiert sind. SP: Signalpeptid; CAD: Cadherin-ähnliche Domänen; CYS: Cystein-reiche Domänen; TK: Tyrosinkinasedomänen.

Für RET43 ist bisher keine besondere biologische Funktion nachgewiesen worden, wohingegen RET9 und RET51 unabhängige Rezeptorkomplexe bilden können, die an unterschiedliche Adapterproteine binden und somit verschiedene Zellantworten bewirken können (Carter *et al.*, 2001; Tsui-Pierchala *et al.*, 2002a). Beispielsweise bindet das ENIGMA-Protein, das mit einer N-terminalen PDZ (*postsynaptic density* 95, PSD-95; *discs large*, Dlg; *zonula occludens*-1, ZO-1)- und drei LIM (Lin-1, Isl-1 and Mec-3)-Domänen als Adapter für Kinasen und das Zytoskelett wirken kann, unabhängig vom Phosphorylierungsstatus fast ausschließlich die RET9-Isoform (Durick *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996; Guy *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999; Vallenius *et al.*, 2000; Borrello *et al.*, 2002). ENIGMA ist für die subzelluläre Lokalisation zytosolischer RET/PTC2-Mutanten (1.3.1.3) in der Zellperipherie verantwortlich (Durick *et al.*, 1998), kann aber vermutlich auch membranständiges RET zu spezialisierten Membranbereichen rekrutieren (Borrello *et al.*, 2002). Diese These zur

Isoform-abhängigen Plasmamembranlokalisation wird durch die Entdeckung gestützt, dass endogene RET9- und RET51-Rezeptoren nach GDNF-Stimulation in sympathischen Neuronen nicht assoziieren, obwohl sie identische extrazelluläre Domänen besitzen (Tsui-Pierchala *et al.*, 2002a). Interessanterweise werden die Hauptisoformen des RET-Rezeptors auch unterschiedlich in der Zelle abgebaut. Durch eine GDNF-Stimulation sympathischer Neuronen wird RET schnell und anhaltend in *lipid-raft*-Domänen überführt, wo es vor Polyubiquitinierung und proteasomalem Abbau weitestgehend geschützt wird (Pierchala *et al.*, 2007). Eine geringere Polyubiquitinierung von aktiviertem RET9 als von RET51 führt zum proteasomalem Abbau von RET51 und zu einem langsameren, lysosomalen und proteasomalen Abbau von RET9 (Pierchala *et al.*, 2006). Eine Erklärung liegt in der höheren Komplexaffinität von RET51 mit Ubiquitin-übertragenden Cbl (*casitas b-lineage lymphoma*)-E3 Ligasen außerhalb *lipid rafts* als von RET9 innerhalb der *rafts* (1.3.1.2; (Scott *et al.*, 2005)).

Die zytoplasmatische Domäne der langen RET51-Isoform enthält 18, die der kurzen RET9-Isoform 16 Tyrosinreste (Jhiang, 2000). Deren wesentliche Interaktionspartner sind nachfolgend dargestellt (Abb. 1.2).

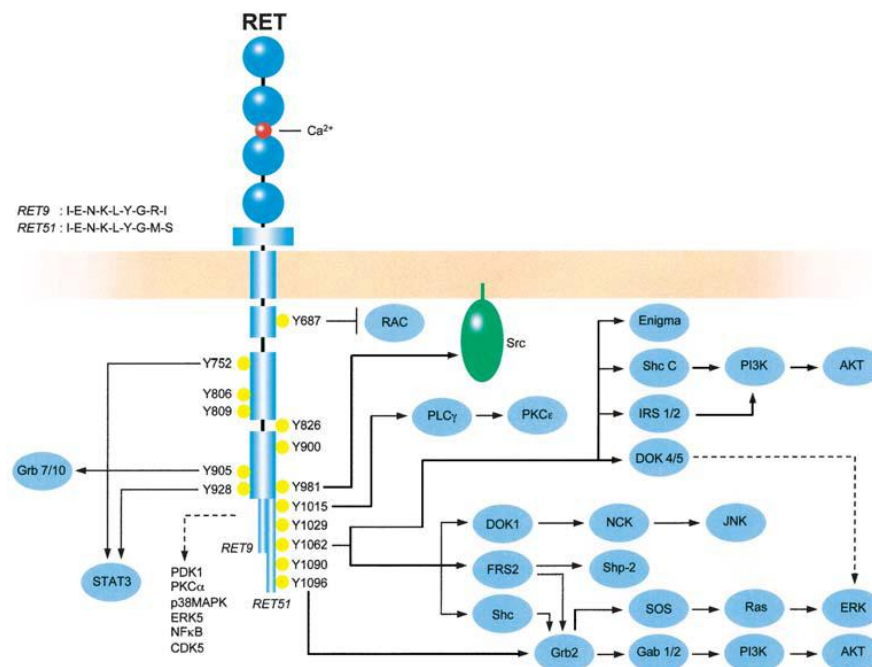


Abb. 1.2: Übersicht der RET-Autophosphorylierungsstellen und deren Interaktionsproteine

Die RET-Autophosphorylierungsstellen der Isoformen RET9 und RET51 sind mit ihren direkten Interaktionspartnern und den nachfolgenden Signalwegen dargestellt. Gestrichelte Linien deuten Signalmechanismen an, die noch nicht vollständig untersucht sind. Die Aminosäuresequenzen von RET9 und RET51 sind von dem Glycinrest 1063 angegeben, ab dem sie sich unterscheiden. Die NKLY(1062)-Sequenz, die von beiden Isoformen geteilt wird, ist eine Konsensussequenz zur Bindung von PTB (*phosphotyrosin-binding*)-Domänen (Santoro *et al.*, 2004).

In Abwesenheit eines Liganden spaltet die Caspase-3 die zytoplasmatische Domäne des RET-Rezeptors an zwei Stellen, wodurch ein pro-apoptotisches Fragment entsteht (Bordeaux *et al.*, 2000; Porter und Dhakshinamoorthy, 2004).

1.3.1.2 RET-vermittelte Signaltransduktion

Die RET-vermittelte Signaltransduktion wird durch die Bindung eines GFL-Homodimers an seinen respektiven Korezeptor Gfr α 1-4 eingeleitet. Hierbei bindet GDNF vorwiegend Gfr α 1 (Jing *et al.*, 1996), NRTN vorwiegend Gfr α 2 (Baloh *et al.*, 1997; Creedon *et al.*, 1997), ARTN Gfr α 3 (Baloh *et al.*, 1998; Worby *et al.*, 1998) und PSPN Gfr α 4 (Lindahl *et al.*, 2001). Mit geringer Affinität können die jeweiligen Wachstumsfaktoren auch andere der vier genannten Korezeptoren stimulieren (Scott und Ibanez, 2001). Gfr α 1-4 sind über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Rest in *lipid raft*-Mikrodomänen (1.4.1; Tab.1.1) der Plasmamembran verankert (Abb. 1.3).

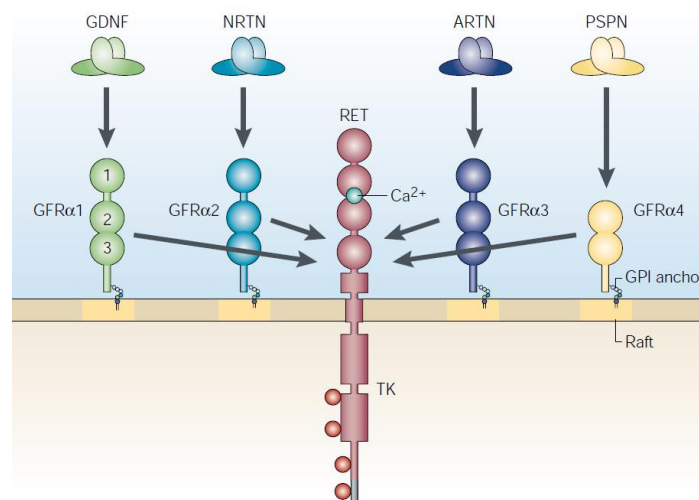


Abb. 1.3: GDNF-Familie Liganden und ihre Rezeptorinteraktionen

Homodimere GFL aktivieren RET, indem sie zuerst ihren entsprechenden Gfr α -Korezeptor binden. Die Korezeptoren sind über einen GPI-Anker in *lipid rafts* befestigt. Sie besitzen drei Cystein-reiche Domänen, Gfr α 4 lediglich zwei. Die Bindung der GFL erfolgt zumeist an der zweiten Domäne eines Gfr α , welche auch für die Bindung an RET wichtig ist (Airaksinen und Saarma, 2002).

Durch die Bindung der GFL-Dimere an die jeweiligen Korezeptoren wird die Rekrutierung des RET-Rezeptors in die *lipid raft*-Mikrodomänen eingeleitet, dessen Bindung sich über den gesamten Bereich der zweiten und dritten Cystein-reichen Domäne des Korezeptors erstreckt (Parkash *et al.*, 2008). Die Anwesenheit von RET innerhalb dieser Signalplattformen ist für eine effektive GDNF-vermittelte, intrazelluläre Signalweiterleitung, für die Differenzierung und das Überleben von Neuronen notwendig (Tansey *et al.*, 2000). Ein intrazellulärer Feedback-

Mechanismus zur Regulation des neuronalen Neuritenwachstums ist über die alternativ gespleißten Isoformen Gfra1b und Gfra2b der GFL-Korezeptoren möglich, die sich anhand der Aktivierung von RhoA (1.3.1.2.3) inhibitorisch auf das durch GDNF oder Neurturin hervorgerufene Gfra1a-, Gfra2a- und Gfra2c-vermittelte Neuritenwachstum auswirken können (Yoong und Too, 2007; Yoong *et al.*, 2009).

Eine Interaktion von RET mit Mitgliedern der Src-Kinasefamilie konnte nur in *lipid rafts* nachgewiesen werden (Tansey *et al.*, 2000; Encinas *et al.*, 2001). Die Src-Kinase c-Src (*cellular sarcoma*) nimmt hierbei eine entscheidende Rolle ein, da sie über einen PI3-Kinase-abhängigen Signalweg für das GFL-vermittelte neuronale Überleben verantwortlich ist (Encinas *et al.*, 2001).

Ein wesentlicher Teil der neurogenen Eigenschaften von NGF ist ebenfalls auf den RET-Rezeptor zurückzuführen, wobei das NGF-Signal eine Phosphorylierung der heterologen RTK auslöst. NGF, selektiv auf distale Axone sympathischer Neuronen appliziert, ist dort in der Lage, RET zu aktivieren. Interessanterweise wird hierdurch nur die lange RET51-Isoform aktiviert. Dabei nimmt die Aktivierung von RET51 trotz gleichbleibender Expression mit steigendem Alter der Neuronen zu. Während der postnatalen Entwicklung verlieren sympathische Neuronen ihre Abhängigkeit von NGF für das Überleben, benötigen es aber weiterhin für das Somawachstum und die Entwicklung eines reifen Neurotransmitter-Phänotyps. Diesen Effekt übt NGF Gfra-unabhängig über eine RET-Phosphorylierung aus (Tsui-Pierchala *et al.*, 2002c).

Die Monoubiquitinierung aktivierter RTK gilt als Internalisierungssignal, das die Rezeptoren zum Abbau in die Lysosomen dirigiert (Bonifacino und Weissman, 1998; Hicke, 2001; Dikic und Giordano, 2003). Der proteasomale Abbauweg hingegen, bei dem große Multiproteinkomplexe das Protein durch schrittweise Abspaltung von Aminosäuren abbauen, wird durch die Polyubiquitinierung eingeleitet. Bei diesem Prozess werden Ketten von vier oder mehr Ubiquitineinheiten an das Zielmolekül angehängt (Aguilar und Wendland, 2003). In Axonen sympathischer Neuronen unterliegt RET einem rapiden, proteasomalen Abbau, der in Axonen sensorischer Neuronen dorsaler Wurzelganglien (DRG) nicht stattfindet. Stattdessen wird RET dort retrograd zum Zellkörper transportiert (Tsui und Pierchala, 2010).

NGF inhibiert den ansonsten GDNF-induzierten, proteasomalen RET-Abbau, indem es eine Mono- statt einer Polyubiquitinierung von RET in behandelten Neuronen fördert. Durch NGF wird die Ansammlung autophosphorylierten RETs in der Plasmamembran

gefördert. Im Gegensatz dazu wird durch GDNF eine Internalisierung aktivierten RETs eingeleitet. NGF stimuliert die RET-Aktivität in reifen sympathischen Neuronen demzufolge über die Inhibierung des permanent in Axonen sympathischer Neuronen stattfindenden Ubiquitin-vermittelten RET-Abbaus vor dessen Internalisierung und Polyubiquitinierung (Tsui-Pierchala *et al.*, 2002c; Tsui und Pierchala, 2010).

GDNF ist demnach in der Lage, in sympathischen Neuronen einen axonalen proteasomalen Abbau von RET einzuleiten, kann jedoch durch die GDNF-induzierte Translokation von RET in *lipid raft*-Domänen im Zellkörper trotzdem einen NGF-ähnlichen protektiven Effekt erzielen. Dieser grenzt den Rezeptor von *non-raft*-Regionen der Plasmamembran ab und schützt ihn somit vom proteasomalen Abbau durch Ubiquitin-übertragende E3-Ligasen der Cbl-Familie (Pierchala *et al.*, 2007).

In Neuronen mit Ausnahme der Motoneuronen wird die Anwesenheit des Wachstumsfaktors TGF- β für den neurotrophen Effekt von GDNF benötigt, da dieser den Transport von Gfr α 1 in die *lipid raft*-Bereiche der Zellmembran aktiviert (Peterziel *et al.*, 2002; Sariola und Saarma, 2003; Schober *et al.*, 2007; Rahhal *et al.*, 2009). Auf die NRTN-abhängige Signaltransduktion übt TGF- β hingegen keinen Effekt aus, da es auf die Rekrutierung von Gfr α 2 zur Plasmamembran keinen Einfluss nimmt (Peterziel *et al.*, 2007).

Die Bildung eines vollständigen RET-Rezeptorkomplexes nach GFL-Aktivierung führt zur Aktivierung der MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinasen Erk1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*; (Santoro *et al.*, 1994; van Weering *et al.*, 1995)), der Phospholipase C γ (PLC γ ; (Borrello *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2006)), der PI3-Kinase und anschließend der Proteinkinase B (PKB)/Akt (van Weering und Bos, 1997; van Weering *et al.*, 1998a). Die Cdc42 (*cell division cycle 42*)-vermittelte Aktivierung c-Jun N-terminaler Kinasen (JNK) sei hier nur erwähnt und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht (Chiariello *et al.*, 1998). Eine Aktivierung von Erk5 (*extracellular signal-regulated kinase 5*) und p38MAPK (p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen) wurde bisher lediglich für die onkogenen RET-Mutanten RET-MEN2A und RET-MEN2B (1.3.1.3) beschrieben (Kurokawa *et al.*, 2003). Wann Neuronen auf welchen Wachstumsfaktor angewiesen sind, unterscheidet sich je nach Art und Entwicklungsstufe. Zumeist wird dieses komplexe System durch eine sequentielle Hochregulation der Expression beteiligter Gfr α -Korezeptoren im Laufe der Entwicklung des Organismus reguliert (Forgie *et al.*, 1999; Kokaia *et al.*, 1999).

Für das Überleben sympathischer Neuronen wird weiterhin ein Signalweg beschrieben, der sowohl MAP-Kinasen-, als auch Akt-unabhängig verläuft. Für das GDNF-vermittelte Überleben, die Proliferation und das Neuritenwachstum sympathischer Neuronen ist der Tyrosinrest Y1062 des RET-Rezeptors essenziell (Gustin *et al.*, 2007; Encinas *et al.*, 2008). Üblicherweise erfolgt zuerst eine Bindung des Adapterproteins Shc an diesen Tyrosinrest (Borrello *et al.*, 1994; Arighi *et al.*, 1997; Mercalli *et al.*, 2001) mit anschließender Bindung von Grb2 über seine SH2 (*Src homology 2*)-Domäne an phosphorylierte Tyrosinreste des aktivierten Shc-Proteins ((Clark *et al.*, 1992; Lowenstein *et al.*, 1992); Abb. 1.1). Der oben genannte Signalweg ist allerdings nicht von Shc/Grb2, sondern von den Dok (*downstream of tyrosin kinase*)-Proteinen (Crowder *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2006) Dok-4, Dok-5 und Dok-6 oder dem I κ B-Kinasekomplex (IKK) abhängig (Encinas *et al.*, 2008).

GDNF kann ein RET-unabhängiges Signal über seinen Korezeptor Gfr α 1 auslösen, das über Erk1/2 und PLC γ letztendlich in einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB mündet. Neurturin ist nicht dazu in der Lage, ein RET-unabhängiges Signal über Gfr α 2 zu induzieren (Poteryaev *et al.*, 1999; Trupp *et al.*, 1999; Pezeshki *et al.*, 2001). Wahrscheinlich ist hierbei von einer Interaktion von GDNF/Gfr α 1 mit Heparansulfat-Glykosaminoglykanen auszugehen, die die RTK Met (*hepatocyte growth factor receptor*) über zytoplasmatische Src-Kinasen aktivieren können (Sariola und Saarma, 2003). Erst kürzlich wurde ein solcher Transmembranrezeptor für GDNF, NRTN und Artemin identifiziert, das Heparansulfat-Proteoglykan Syndecan-3. Die Signalgebung erfolgt hierbei ebenfalls über Src-Kinasen, allerdings scheinbar Gfr α -unabhängig (Bespalov *et al.*, 2011). Dies lässt auf eine weitere Möglichkeit RET-unabhängiger Signalisierung schließen. GDNF kann neben RET und Syndecan-3 auch an einen Rezeptorkomplex aus Gfr α und dem Zelladhäsionsmolekül NCAM (*neural cell adhesion molecule*) binden und eine Signalkaskade über die Src-Kinase Fyn und die MAP-Kinasen Erk1/2 auslösen (Paratcha *et al.*, 2003; Yang und Han, 2010).

Die Mitwirkung des Gfr α -Korezeptors im kanonischen RET-Signalweg kann alternativ über eine *trans*-Stimulation erfolgen (Trupp *et al.*, 1997). Beim *in trans*-Signaling kann der Korezeptor beispielsweise von Schwannschen Zellen, membranständig mit RET-exprimierenden neuronalen Nachbarzellen interagieren und dadurch eine gerichtete Ausbildung von Axonen herbeiführen. Andererseits könnte er durch Proteasen und membranständige Phospholipasen von der Membran *gesheddet*, also

abgespalten, werden. Die lösliche Form sGfra1 hätte daraufhin die Möglichkeiten, freies GDNF zu binden und RET auf angrenzenden Zellen zu präsentieren oder immobilisiert an der extrazellulären Matrix GDNF zu binden und das Axonwachstum entlang dieser zu fördern. Aktiviertes RET bindet unterschiedliche Adapterproteine inner- oder außerhalb von *lipid raft*-Strukturen, wird jedoch interessanterweise selbst von sGfra1 stark in die *lipid rafts* rekrutiert, obwohl dieses nicht über einen GPI-Anker in den *rafts* lokalisiert ist (Paratcha *et al.*, 2001).

1.3.1.2.1 Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges

Die Kopplung aktivierter Rezeptor-Tyrosinkinasen an Kinasen des MAP-Kinase-Signalweges erfolgt über das Adapterprotein Shc, das nachfolgend Grb2 und das konstitutiv daran gebundene SOS zur Plasmamembran rekrutiert (Li *et al.*, 1999). SOS dient als GEF und somit als Aktivator kleiner GTPasen und kann dadurch das zytosolische Protein Ras aktivieren (Boriack-Sjodin *et al.*, 1998). Eine Aktivierung von Ras führt zu Zellwachstum, Überleben und Differenzierung der Zelle, weshalb eine intrazelluläre Aktivierung des Proteins selbst ohne extrazelluläres Signal onkogen sein kann (Coleman *et al.*, 2004). Die Ausübung dieser Ras-vermittelten Effekte verläuft entweder über eine Aktivierung der PI3-Kinase (1.3.1.2.2) oder der nachfolgenden MAP-Kinase-Kaskade über Raf (*rapidly growing fibrosarcoma*), Mek (*mitogen-activated protein kinase kinase*) und Erk1/2 ((Huang und Reichardt, 2001); Abb. 1.2). In sympathischen Neuronen bestimmt die Geschwindigkeit des proteasomalen RET-Abbaus die Länge des Signals (Tsui und Pierchala, 2008). Eine transiente Aktivierung von Erk1/2 über kurzzeitige GFL-Stimulation führt hierbei zur Proliferation und eine andauernde Aktivierung durch längerfristige GFL-Signalinduktion zur Differenzierung der Neuronen (Grewal *et al.*, 1999; Uchida *et al.*, 2006).

1.3.1.2.2 Aktivierung des Akt/PKB-Signalweges

Akt, auch als Proteinkinase B, bezeichnet, ist eine zentrale Kinase in dem PI3-Kinase-Signalweg (Bellacosa *et al.*, 1991). Genauer handelt es sich um die drei stark homologen Serin/Threonin-Kinase-Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3, die N-terminal eine PH (*pleckstrin homology*)-Domäne, eine zentrale Kinasedomäne und eine C-terminale hydrophobe Domäne regulatorischer Funktion besitzen (Frech *et al.*, 1997; Vivanco und Sawyers, 2002). Im Folgenden wird vereinfacht von Akt gesprochen. Bei einer durch Wachstumsfaktoren ausgelösten Aktivierung des PI3-

Kinase/Akt-Signalweges katalysiert die aktive PI3-Kinase die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in den Plasmamembran-gebundenen *second messenger* Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), woraufhin Akt über seine PIP₃-bindende PH-Domäne zur Plasmamembran rekrutiert wird (Burgering und Coffey, 1995; Franke *et al.*, 1995; Alessi *et al.*, 1996; Didichenko *et al.*, 1996; Andjelkovic *et al.*, 1997; Meier *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1998). Dort wird Akt/PKB durch die Proteinkinasen PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase1*) und PDK2 an den Aminosäureresten Thr308 und Ser473 phosphoryliert (Alessi *et al.*, 1997; Sarbassov *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung der Aminosäure Ser473 kann zur Abschätzung der Aktivierung von Akt durch die PI3-Kinase verwendet werden (Cantley, 2002). Für Akt konnte eine höhere Aktivität und eine schnellere Aktivierungskinetik innerhalb der *lipid rafts* im Vergleich zu *non-raft*-Regionen der Plasmamembran nachgewiesen werden. Teilweise zeigte sich auch eine Abhängigkeit der Akt-Aktivität in *non-raft*-Regionen von derjenigen in *lipid rafts*, was allerdings Wachstumsfaktor-spezifisch auftrat (Gao und Zhang, 2008). Über intrazelluläre Transportprozesse (*protein trafficking*) kann aktiviertes Akt in verschiedene Zellkompartimente wie den Zellkern gelangen, um dort weitere Substrate zu phosphorylieren oder Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Meist werden durch eine Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges Proliferation, Zellwachstum oder das Überleben der Zelle durch die Initiierung antiapoptotischer Prozesse, wie z. B. der Phosphorylierung von BAD (*Bcl-2-associated death promoter*), ausgelöst (Ahmed *et al.*, 1997; Dudek *et al.*, 1997; Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 1997; Kulik *et al.*, 1997). Reguliert wird Akt hauptsächlich durch die Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), die PIP₃ durch die Abspaltung einer Phosphatgruppe inaktivieren kann. Dadurch wird die Translokation von Akt zur Plasmamembran verhindert (Meili *et al.*, 1999; Li und Ross, 2007).

1.3.1.2.3 Alternative Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges über Rap1

Zur vollständigen Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges ist die zytosolische kleine GTPase Ras nicht zwingend erforderlich (Grewal *et al.*, 1999). Für die Zellstimulation durch die Neurotrophine NGF und BDNF sind anhaltende Aktivierungen der kleinen GTPase Rap1 (*Ras-related protein 1*) und der MAP-Kinasen Erk1/2 beschrieben, die ein Neuritenwachstum und eine Polarisierung der Neuronen durch eine Regulation der MAP-Kinase-Kaskade und des Zytoskeletts auslösen (York *et al.*, 1998; Kao *et al.*,

2001; Wu *et al.*, 2001). Für das Rap1-abhängige Neuritenwachstum ist allerdings die Inaktivierung der Zytoskelett-regulierenden kleinen GTPase Rho (*Ras homolog gene family*) notwendig (Yamada *et al.*, 2005). Kleine GTPasen wie Rho und Rap1 agieren als zentrale Schalter in Signalwegen, da sie von einer inaktiven, GDP-gebundenen Form im Zytosol in eine aktive, GTP- und membrangebundene Form übergehen können. Hierzu benötigen sie einen GEF, der den Austausch von GDP zu dem im Zytoplasma ca. 10-fach höher konzentrierten GTP stimuliert. Zum Abschalten des Signals können GTPase-aktivierende Proteine (GAP) die intrinsische GTPase-Aktivität der kleinen GTPase beschleunigen. Als entsprechender GAP für Rho wurde das Protein RA-RhoGAP (*Rap-activated Rho GAP*) identifiziert, das nach Aktivierung durch Rap1 Rho inaktiviert und das Rap1-vermittelte Neuritenwachstum fördert (Yamada *et al.*, 2005).

Als GEF und somit Aktivatoren für Rap1 sind im NGF-induzierten Signalweg im Wesentlichen RapGEF1, auch C3G genannt (Radha *et al.*, 2008), und RapGEF2 (Hisata *et al.*, 2007) bekannt. Sie stellen die primären Kandidaten als GEF für Rap1 im RET/Rap1/Erk1/2-Signalweg dar (Tanaka *et al.*, 1994; Gotoh *et al.*, 1995; Ichiba *et al.*, 1997; Liao *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 2001; Ling *et al.*, 2003). Der NGF-aktivierte TrkA-Rezeptor rekrutiert FRS2, das TrkA mit CrkL (*Crk-like protein*) verknüpft. Das wiederum fungiert als Adapter für die RapGEF1-Bindung (Kao *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). Dieser Signalprotein-Komplex wird zusammen mit dem Rezeptor in Clathrin-umhüllte Vesikel sortiert und zuerst in frühe Endosomen internalisiert (Wu *et al.*, 2001). Anschließend kann der aktivierte TrkA-Rezeptor in späten Endosomen RapGEF2 rekrutieren. Rap1 wird sowohl auf der Stufe der frühen Endosomen von RapGEF1 als auch in späten Endosomen von RapGEF2 aktiviert. Sehr wahrscheinlich ist von einem Zusammenspiel beider GEF mit stärkerer Beteiligung von RapGEF2 zur anhaltenden Aktivierung von Rap1 und der anschließenden MAP-Kinasen Erk1/2 auszugehen (Hisata *et al.*, 2007).

An dem GDNF-vermittelten Neuritenwachstum während der neuronalen Entwicklung ist eine anhaltende Aktivierung des Rap1/Erk1/2 Signalwegs über das Adapterprotein Dok-4 beteiligt, das nach RET-Aktivierung mit homodimerisiertem, Tyrosin-phosphoryliertem RET am Tyr1062-Rest interagiert (Grimm *et al.*, 2001; De Falco *et al.*, 2007) und dort phosphoryliert wird (Uchida *et al.*, 2006). Die Rolle der beteiligten Dok-Proteine ist noch nicht vollständig geklärt. Über einen *yeast-two-hybrid screen* wurden Dok-4 und Dok-5 als direkte Bindungspartner von RET

identifiziert (Grimm *et al.*, 2001). In murinen Modellsystemen übernimmt Dok-6 die wesentliche Rolle (Crowder *et al.*, 2004), während im humanen System Dok-1 und Dok-4 die hauptsächliche Vermittlungsfunktion haben (Kurotsuchi *et al.*, 2010). Über einen *yeast two-hybrid screen* mit der intrazellulären RET-Domäne als Köder wurde kürzlich Rap1GAP (*GTPase-activating protein for Rap1*) als neuer Interaktionspartner von RET und als GAP für Rap1 in diesem Signalweg identifiziert. Rap1GAP fand sich in neuronalen Geweben und wird zusammen mit RET in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns koexprimiert. RET und Rap1GAP wiesen verstärkte Interaktion nach GDNF-Stimulation auf, die über eine Bindung von Rap1GAP an den Tyr981-Rest der intrazellulären RET-Domäne vermittelt wird. Zusätzlich zeigte eine Überexpression von Rap1GAP vermindertes GDNF-vermitteltes Neuritenwachstum, während das Ausschalten endogener Rap1GAP-Expression mittels siRNA (*small interfering RNA*) verstärktes Neuritenwachstum aufwies. Eine negative Regulation der GDNF-vermittelten Erk1/2-Aktivierung und des Neuritenwachstums durch Rap1GAP wurde nachgewiesen ((Jiao *et al.*, 2010; Paratcha und Ledda, 2010); Abb. 1.4).

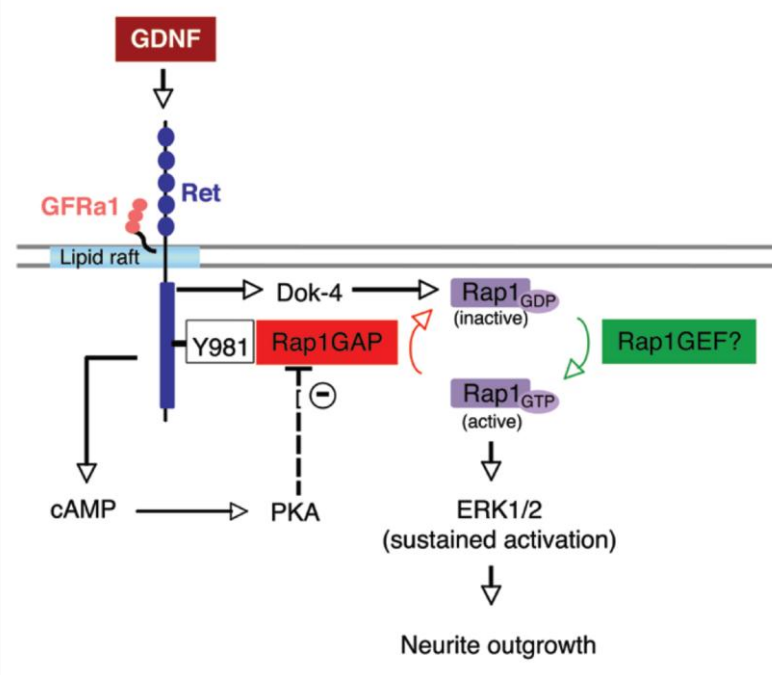


Abb. 1.4: Interaktionsmodell von Rap1GAP in der GDNF-vermittelten RET-Signaltransduktion

Nach der RET-Aktivierung durch den heterologen Komplex GDNF/Gfra1 wird RET an verschiedenen Tyrosinresten phosphoryliert. Über Tyr1062 wird die Aktivierung von Dok-4 vermittelt, durch das anschließend eine anhaltende Aktivierung des Rap1/Erk1/2-Signalwegs und ein Neuritenwachstum induziert werden. Gleichzeitig resultiert aus der RET-Aktivierung eine Phosphorylierung von Tyr981 (Y981), der an der Rekrutierung des negativen Signalregulators Rap1GAP beteiligten Bindungsstelle. Rap1GAP reguliert den Dok-4/Rap1/Erk1/2 Signalweg und kontrolliert das Neuritenwachstum. Eine mögliche Funktion der Proteinkinase A (PKA) in der Inhibition der Rap1GAP-Aktivität ist abgebildet (gestrichelte Linie). Modifiziert nach (Paratcha und Ledda, 2010).

1.3.1.3 Pathogenese RET-assoziiierter Krankheiten

Das für den RET-Rezeptor codierende Gen ist als Protoonkogen bekannt, da es durch aktivierende Mutationen zu einem Onkogen wird und zur neoplastischen Transformation der Zelle beiträgt. Durch Rekombination oder Punktmutation im *RET*-Gen kann es zu einer höheren Rezeptoraktivität des Genprodukts und dem Kontrollverlust der sensiblen intrazellulären Signalregulierung kommen (Takahashi *et al.*, 1985; Mulligan *et al.*, 1993). Viele onkogene Mutationen führen zur konstitutiven Dimerisierung und so zur permanenten Autophosphorylierung und Aktivierung von Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität (Rodrigues und Park, 1994). Einige solcher Keimbahnmutationen bei *RET* sind mit der Entwicklung dreier autosomal dominant vererbbarer Krebserkrankungen assoziiert, den Subtypen der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN2) A und B sowie den familiären medullären Schilddrüsenkarzinomen (FMTC; (Mulligan *et al.*, 1993; Eng *et al.*, 1996; Santoro *et al.*, 2004)). Beim Subtyp MEN2A führen Mutationen im extrazellulären Teil von RET zu konstitutiv aktiven Homodimeren (Bongarzone *et al.*, 1993; Durick *et al.*, 1995), bei MEN2B hingegen wird durch Mutationen im intrazellulären Abschnitt eine aktive Kinase mit veränderter Substratspezifität gebildet (Songyang *et al.*, 1995). Somatische Umlagerungen, bei denen die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors mit einem nicht verwandten Genabschnitt rekombiniert ist, treten in papillären Schilddrüsenkarzinomen (PTC) auf (Grieco *et al.*, 1990). Die resultierenden Fusionsproteine, beispielsweise RET/PTC und RET/PTC2 (Abb. 1.1), sind im Zytoplasma lokalisiert und die RET-Tyrosinkinase ist ähnlich wie bei MEN2A konstitutiv aktiviert (Bongarzone *et al.*, 1993; Borrello *et al.*, 1994; Durick *et al.*, 1995). Chimäre oder onkogene Formen wie diese dienten anfänglich fast ausschließlich zur Untersuchung der RET-Signalweiterleitung.

Untersuchungen an RET/PTC2 zeigten eine Abhängigkeit der mitogenen Aktivität des onkogenen Fusionsproteins von den an der MAP-Kinase-Kaskade beteiligten Proteinen Ras und Raf (Durick *et al.*, 1998). Eine Onkogenese ist oft eng mit der anhaltenden Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges verknüpft (Hunter, 1997).

Auch inaktivierende Mutationen des RET-Rezeptors sind bekannt, die z. B. zu *Morbus Hirschsprung* führen (Attie *et al.*, 1994; Pasini *et al.*, 1995; Mak und Ponder, 1996). Diese Krankheit ist durch eine neonatale Gastrointestinal-Obstruktion und das Auftreten eines Megakolon durch eine Aganglionose im Dickdarm charakterisiert (Edery *et al.*, 1994).

1.4 ENDOZYTULOSE

Die Aufnahme von Stoffen aus dem extrazellulären Raum oder von der Plasmamembran in das Zellinnere wird als Endozytose, der entgegengesetzte Prozess als Exozytose bezeichnet. Die Aufnahme fester Stoffe wird als Phagozytose und die Aufnahme von Flüssigkeiten als Pinozytose bezeichnet. Die Internalisierung erfolgt bei der Endozytose über membranumhüllte Vesikel, die sich von der Plasmamembran mit Hilfe einiger Proteinkomplexe abschnüren. Diese Vesikel fusionieren mit Endosomen und werden anhand ihrer Morphologie, spezifischer Markerproteine wie den Rab (*Ras-related in brain*)-GTPasen (Zerial und Stenmark, 1993; Stenmark, 2009) und der Zeit, die endozytiertes Material benötigt, um dorthin zu gelangen, in frühe Endosomen (EE), späte Endosomen (LE), Recycling-Endosomen (RE) oder die besonders aziden Lysosomen unterteilt (Abb. 1.6).

Aktivierte Plasmamembran-Rezeptoren können über verschiedene Wege internalisiert werden: Clathrin-abhängig, Caveolin-abhängig, Clathrin- und Caveolin-unabhängig oder über Makropinozytose (Abb. 1.5).

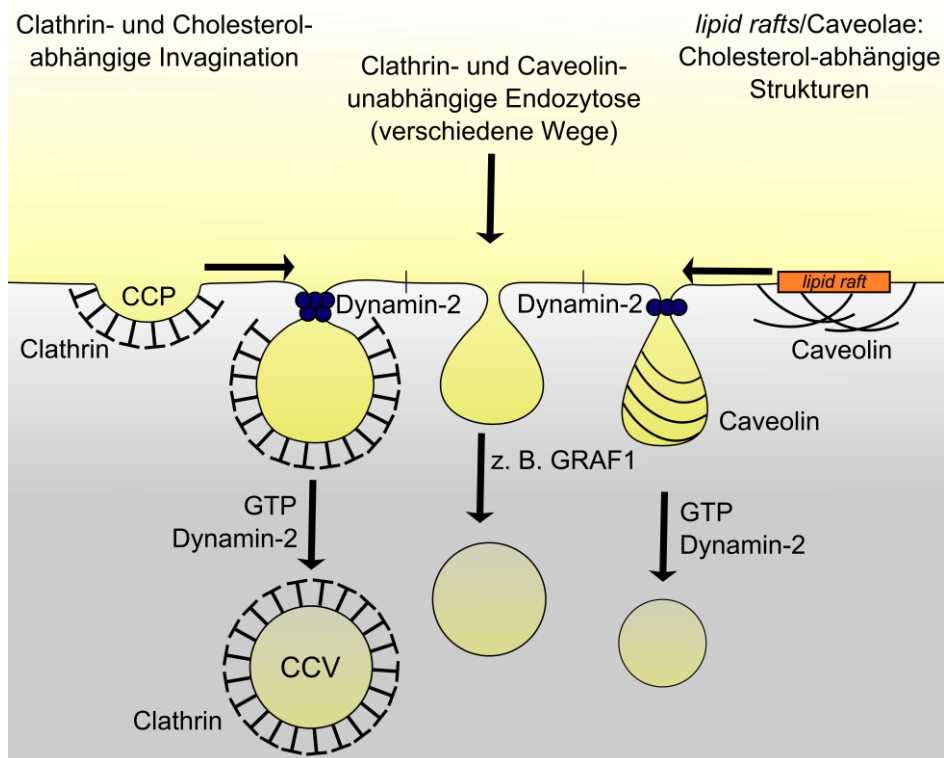


Abb. 1.5: Verschiedene Endozytosewege der Säugerzelle

Dargestellt ist die schrittweise Einstülpung der Plasmamembran einer Säugerzelle beim Vorgang der Clathrin-abhängigen Endozytose (links), der Caveolin-abhängigen Endozytose innerhalb Caveolae oder *lipid raft*-Strukturen (rechts) und der Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Endozytose (Mitte). Die Clathrin- und Caveolinummantelung gereifter CCV und Caveolae wird nach erfolgter Abschnürung von der Plasmamembran, die durch die große GTPase Dynamin-2 erfolgt, entfernt. Die Makropinozytose ist nicht dargestellt. GTP: Guanosintri-phosphat; GRAF1 (*GTPase regulator associated with focal adhesion kinase-1*); CCP: *clathrin-coated pit*; CCV: *clathrin-coated vesicle*.

Alle diese Wege haben die Bildung peripherer früher Endosomen, den sogenannten sortierenden Endosomen, als zentralen Schritt gemeinsam (Bronfman *et al.*, 2007). Die Aufnahme vieler Signalrezeptoren wird durch ihre Liganden-induzierte Aktivierung stimuliert. Beispiele hierfür sind die Rezeptoren für LDL (*low density lipoprotein*), Transferrin, Antikörper oder Wachstumsfaktoren. Diese rezeptorvermittelte Internalisierung verläuft für nahezu alle Rezeptorfamilien in erster Linie Clathrin-abhängig. Die meisten aktivierten RTK, Signal- und Adapterproteine befinden sich in *lipid raft*-Mikrodomänen, müssen diese Signalplattform jedoch zur Clathrin-abhängigen Internalisierung wieder verlassen. Hierzu werden zunächst die zur Endozytose bestimmten Rezeptoren zu gesonderten, ca. 150 nm umfassenden Bereichen auf der Plasmamembran, den CCP (*clathrin coated pits*), rekrutiert (Mukherjee *et al.*, 1997). Durch Invagination dieser Membranbereiche, die an der cytoplasmatischen Seite mit dem Strukturprotein Clathrin ausgekleidet sind, bilden sich Clathrin-umhüllte Vesikel (*clathrin coated vesicles*; CCV). Für die Clathrin-Bindung an die Membran ist der multimere Proteinadapterkomplex AP-2 verantwortlich und daher essenziell für die Ausbildung der CCV. Zusätzlich interagiert der Komplex bei der rezeptorvermittelten Endozytose mit Tyrosinresten der Membranrezeptoren. Die Bindung des AP-2-Komplexes an die Membran selbst wird über die EH (*Eps15-Homology*)-Domänen des konstitutiv damit verbundenen Eps15 (*epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway substrate clone 15*) vermittelt (Benmerah *et al.*, 1999). Anschließend lagert sich die GTPase Dynamin-2 (DNM2) über seine PH-Domäne, die das Phosphatidylinositol der Membranlipide erkennt, an den jeweiligen Hals der invaginierten *coated pits* an. Das Protein Ampiphysin bindet über seine SH3 (*Src homology 3*)-Domäne die prolinreiche Domäne (PRD) von Dynamin und vermittelt die Rekrutierung weiterer Dynamin-Moleküle, die sich im GTP-gebundenen Zustand in einer rechtsgewundenen Helix um den Vesikelhals schnüren. Durch GTP-Hydrolyse verändert sich vermutlich die Helixstruktur des Dynaminpolymers, was zur Freisetzung der Vesikel von der Plasmamembran in das Zellinnere führt (Chen *et al.*, 1991; Herskovits *et al.*, 1993a; Herskovits *et al.*, 1993b; van der Bliek *et al.*, 1993; Ochoa *et al.*, 2000). Umstritten ist, ob DNM2 diesen Effekt nur indirekt durch Rekrutierung oder Regulation von *downstream*-Effektoren ausübt, da einige Daten auf eine Unabhängigkeit des Endozytosemechanismus von der GTPase-Aktivität des Dynamins hinweisen (Sever *et al.*, 1999). Nach Dissoziation der Vesikel-umhüllenden Clathrin-Triskelions

verschmelzen die Vesikel mit frühen Endosomen, die aufgrund der V-ATPase-Aktivität einen geringeren pH-Wert aufweisen (Lafourcade *et al.*, 2008). Dort werden die vesikulären Cargo-Proteine sortiert. Die zytosolischen Proteine der ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-Maschinerie beispielsweise erkennen Ubiquitin-markierte Cargo-Proteine und sortieren sie als zentralen Schritt des lysosomalen Systems zum lysosomalen oder proteasomalen Abbau in die internen Vesikel der MVB (*multivesicular bodies*; (Piper und Luzio, 2007; Hurley und Ren, 2009; Wollert und Hurley, 2010)). Diese Sortierung spielt eine entscheidende Rolle in der Herabregulierung von Wachstumsfaktorrezeptoren (Hierro *et al.*, 2004). Hierbei reifen frühe Endosomen zuerst durch homotypische Fusion zu den größeren späten Endosomen (Rink *et al.*, 2005), bevor sie mit den Lysosomen fusionieren ((Futter *et al.*, 1996; Luzio *et al.*, 2000; Luzio *et al.*, 2001); Abb.1.6).

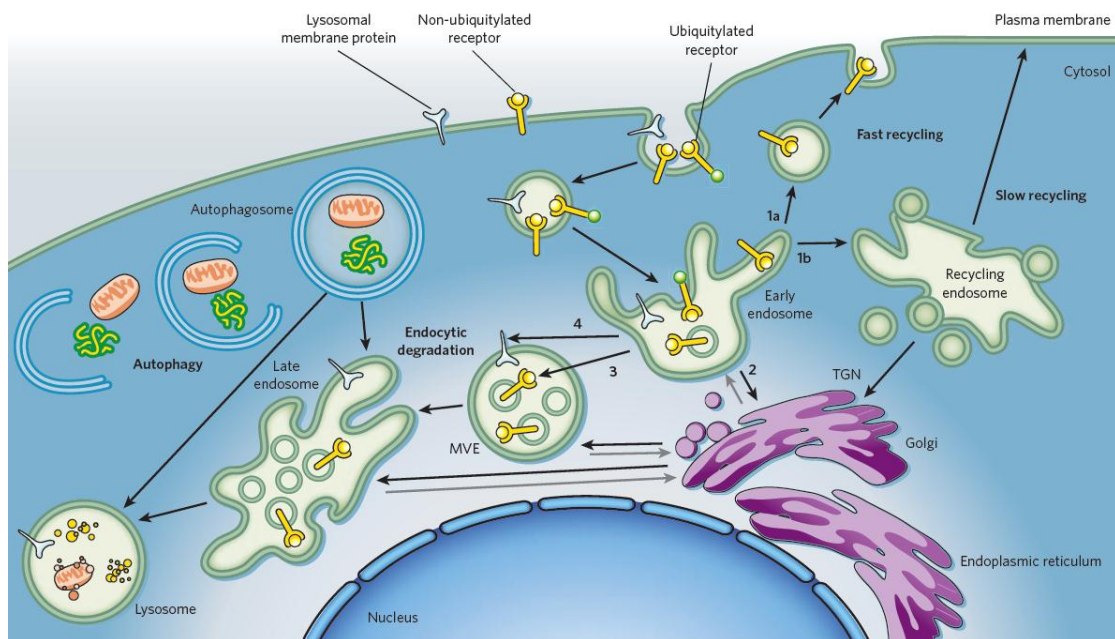


Abb. 1.6: Das endosomale System und die Sortierung von Cargo-Proteinen in Säugerzellen

Endozytiertes Material wird von der Zelloberfläche internalisiert und gelangt so in frühe Endosomen (EE), die darüber hinaus Fracht vom TGN (Trans-Golgi-Netzwerk) erhalten. In EE werden die Cargo-Proteine sortiert. Einige, z. B. der *low density lipoprotein* (LDL)-Rezeptor, werden entweder direkt (**1a**) oder indirekt über Recycling-Endosomen (**1b**) zurück zur Plasmamembran befördert. Andere werden zum TGN sortiert (**2**). Die Reifung früher zu später Endosomen (LE) geschieht durch ein Absinken des pH-Wertes, das Entfernen nicht-lysosomaler Fracht (z. B. Transferrin-Rezeptoren und Mannosephosphat-Rezeptoren (MPR)) und die Bildung multivesikulärer Endosomen bzw. Körper (MVE bzw. MVB). Ubiquitinierte Membranproteine, z. B. aktivierte Wachstumsfaktor-Rezeptoren, werden in intraluminale Vesikel sortiert und enden über die MVE im Lumen der Lysosomen (**3**). Im Gegensatz dazu erreichen lysosomale Membranproteine ihr Ziel, indem sie bevorzugt zur äußeren Membran der MVE sortiert werden (**4**). Reife LE verschmelzen mit Lysosomen, in denen die Frachtproteine und auch der Inhalt der Autophagosomen abgebaut werden (Raiborg und Stenmark, 2009).

Die wichtigste Komponente der Clathrin-unabhängigen Endozytosemaschinerie stellen die Caveolae dar, die eine Internalisierung innerhalb von *lipid raft*-Domänen induzieren. Caveolae sind kleine, höhlenförmige Plasmamembran-Einstülpungen von ca. 50-100 nm Durchmesser, die bei vielen, jedoch nicht allen, Zelltypen vorkommen. Sie entstehen aus einer Untergruppe der *lipid rafts*, die mit dem Cholesterol-bindenden Protein Caveolin assoziiert sind. Untersuchungen an der Caveolin-abhängigen Aufnahme von Glykosphingolipiden deuten darauf hin, dass über die Clathrin-vermittelte und die Caveolin-abhängige Endozytose zwar primär unterschiedliche Vesikel gebildet werden, diese jedoch bereits nach 5 Minuten in frühen Endosomen fusionieren. Dort erfolgt eine Partitionierung in zwei Reservoirs, von denen die Fracht entweder über LE zum Golgi-Apparat oder über das Recycling-Netzwerk zurück zur Plasmamembran transportiert werden kann (Sharma *et al.*, 2003). Nur wenige Cargo-Proteine, darunter einige GPI-verankerte Proteine, werden weder über Clathrin- noch über Caveolin-abhängige Endozytosewege internalisiert. Zu den bekanntesten dieser Wege zählen CLIC (*clathrin-independent carriers*) und GEEC (*GPI-enriched endocytic compartments*), an denen die Proteine GRAF1 (*GTPase regulator associated with focal adhesion kinase-1*) und Cdc42 (*cell division control protein 42 homolog*) mitwirken (Cheng *et al.*, 2006; Lundmark *et al.*, 2008; Doherty und Lundmark, 2009).

1.4.1 ENDOSOMALE SIGNALWEITERLEITUNG

Bei der Endozytose und der zellulären Signaltransduktion handelt es sich um ein komplexes, bidirektionales System, bei dem sich beide Partner gegenseitig beeinflussen können. Im einfachsten Fall geschieht dies über die Regulation der Anzahl membranständiger Rezeptoren durch Endozytose. Andersherum stimuliert die Aktivierung von Membranrezeptoren oder intrazellulärer Effektorproteine eine Internalisierung des Rezeptorkomplexes. Innerhalb der Zelle ist die Anzahl signalweiterleitender Proteine und der Signalwege verhältnismäßig gering im Vergleich zu den signalauslösenden Liganden und ihren entsprechenden Rezeptoren. Um eine einzigartige Zellantwort für jede extrazelluläre Information zu ermöglichen, ist daher eine genaue räumliche und zeitliche Regulation der Signalweiterleitung essenziell. Dies wird zellulär durch eine Kompartimentalisierung der Rezeptoren und Korezeptoren an der Plasmamembranoberfläche in verschiedene Mikrodomänen

(Tab. 1.1; (Simons und Toomre, 2000) und damit verbunden durch unterschiedliche Endozytosewege (1.4) realisiert.

Tab. 1.1: Nomenklatur von *raft*-Domänen (Simons und Toomre, 2000)

	I. Rafts	II. Clustered rafts	III. DRMs	IV. Caveolae
Components	<ul style="list-style-type: none"> • Glycosphingolipids • Cholesterol • Lipid-modified proteins containing saturated acyl chains: <ul style="list-style-type: none"> – GPI-anchored proteins – Doubly acylated Src-type kinases • Transmembrane proteins 	<ul style="list-style-type: none"> • Rafts clustered by: <ul style="list-style-type: none"> – Antibody – Lectin – Adjacent cell proteins – Physiological crosslinking proteins 	<ul style="list-style-type: none"> • Rafts remaining insoluble after treatment on ice with detergent‡§: Triton X-100 (most popular), Brij-58, CHAPS, NP-40 	<ul style="list-style-type: none"> • Raft proteins and lipids • Caveolins
Properties	<ul style="list-style-type: none"> • 50 nanometres in diameter • Mobile ($\sim 10^{-9}$ cm² sec⁻¹) • Liquid-ordered phase 	<ul style="list-style-type: none"> • Large, often hundreds of nanometres to micrometres in size • Often bound to cytoskeleton 	<ul style="list-style-type: none"> • Float to low density in sucrose or Optiprep™ density gradients 	<ul style="list-style-type: none"> • Morphological 'cave-like' invaginations on the cell surface
Comments	<ul style="list-style-type: none"> • Native rafts are only detected in living cells 	<ul style="list-style-type: none"> • Clustering is used both artificially and physiologically to trigger signalling cascades 	<ul style="list-style-type: none"> • Non-native (aggregated) raft • Variable effects depending on: <ul style="list-style-type: none"> – Detergent type – Detergent:lipid ratio – Cell type 	<ul style="list-style-type: none"> • Raft subcategory • Highly specialized

* DRM, detergent-resistant membrane; DIG, detergent-insoluble glycolipid-rich domain; DIC, detergent-insoluble complex; LDM, low-density membrane; DIM, detergent-insoluble material; GEM, glycolipid-enriched membrane; TIFF, Triton X-100 insoluble floating fraction.
 ‡Care should be taken when choosing solubilization conditions for co-immunoprecipitation experiments, as these popular detergents do not solubilize rafts on ice.
 §Co-localization of proteins in rafts or DRMs could be mistaken for direct protein-protein interactions if rafts are not completely solubilized.
 §Rafts can be solubilized in octyl glucoside or in the detergents listed above at raised temperatures.

Die Existenz von *lipid raft*-Domänen war lange Zeit umstritten, gilt jedoch mittlerweile durch den Einsatz hochauflösender Mikroskopie-Methoden wie der Elektronenmikroskopie, *fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM), *Förster resonance energy transfer* (FRET) und *photonic force microscopy* (PFM) als verifiziert (Varma und Mayor, 1998; Pralle *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2000; de Almeida *et al.*, 2009; Stockl und Herrmann, 2010). *Lipid rafts* sind ca. 50 nm große Cholesterol- und Sphingolipid-reiche Regionen der Plasmamembran (Simons und Ikonen, 1997). Innerhalb der Signaltransduktion sind sie die wichtigsten Mikrodomänen, da sie als Antwort auf eine durch Ligand-Rezeptor-Bindung hervorgerufene Signalgebung zu größeren, stabileren Strukturen fusionieren können, die als Signalplattformen dienen (Simons und Toomre, 2000; Hofman *et al.*, 2008). Einige Daten deuten außerdem darauf hin, dass *rafts* an der neuronalen Zelladhäsion, der zielgerichteten Ausbildung von Axonen und synaptischer Signalweiterleitung beteiligt sind (Tsui-Pierchala *et al.*, 2002b). *Lipid raft*-lokalisierte Proteine können über einen GPI-Anker, über einen Acylrest oder eine membrandurchspannende Domäne an der Membran befestigt sein. Neben den Mikrodomänen auf der Plasmamembran können aber auch die verschieden aufgebauten endosomalen Kompartimente, wie z. B. das frühe und das späte Endosom, als weichenstellende Signalplattformen fungieren. Erste Hinweise auf die endosomale Signalweiterleitung einer RTK gab die Entdeckung, dass sich der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors nach Stimulation zusammen mit nachfolgenden Signalproteinen der intrazellulären Signalkaskade nicht nur an der

Plasmamembran, sondern ebenfalls an der Membran früher Endosomen befindet ((Di Guglielmo *et al.*, 1994; Bergeron *et al.*, 1995); Abb. 1.7a). Durch die Inhibition der Clathrin-abhängigen Endozytose (1.4.2) des aktivierten EGFR werden die vollständige Aktivierung der PI3-Kinase und der MAP-Kinasen Erk1/2 verhindert (Vieira *et al.*, 1996). Signale können daher nicht nur im endosomalen System weitergeleitet, sondern auch dort generiert werden. Damit dieser endosomal lokalisierte, aktivierte Rezeptorkomplex Signalkaskaden aus den sogenannten Signalendosomen heraus initiieren kann, ist eine vollständige Internalisierung des Rezeptors über Endozytose essenziell (Sorkin, 2001).

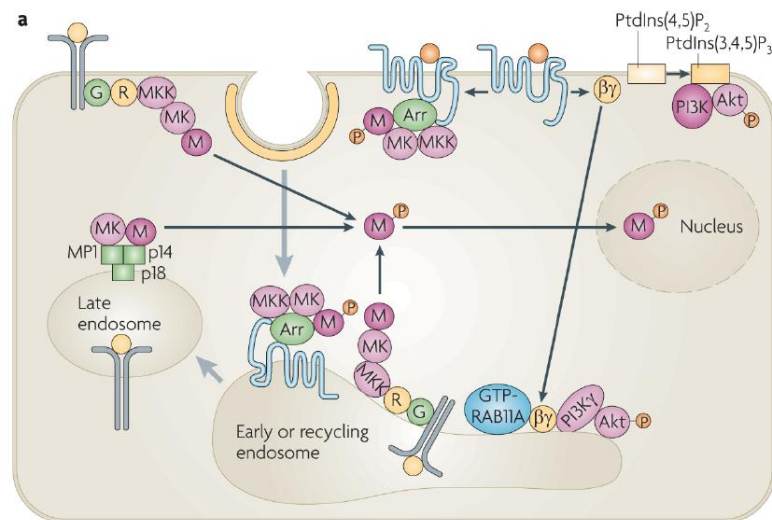


Abb. 1.7a: Signalvorgänge an der Plasmamembran und in Endosomen

Die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt Signalkaskaden durch Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) findet an der Plasmamembran, in frühen, späten und Recycling-Endosomen statt. Dort dissoziiert aktivierte, phosphorylierte MAPK (M) von der MAPK-Kinase (MK) und phosphoryliert Substrate im Zytoplasma und im Zellkern, sofern sie nicht fest an Gerüstproteine wie das β -Arrestin gekoppelt ist. Stimulierte GPCR aktivieren den G-Protein Subkomplex $G\beta\text{-}G\gamma$, der entweder an der Plasmamembran PI3K und Akt aktivieren kann oder zu frühen und Recycling-Endosomen transloziert, um dort die endosomale PI3K γ -Isoform zu phosphorylieren, was letztlich zur Aktivierung von endosomalem Akt führt.

Auch in Neuronen werden Signale, die an der Plasmamembran initiiert werden, endosomal fortgesetzt. Die Signalweiterleitung neurotropher Faktoren unterscheidet sich von anderen Wachstumsfaktoren dadurch, dass das sezernierte Signalprotein zu innervierender Zielzellen an die Rezeptoren der präsynaptischen Endigungen bindet und das Signal über lange Distanz retrograd über das Axon zum Zellkörper transportiert werden muss, um dort Änderungen der Genexpression auszulösen (Howe und Mobley, 2005). Neuronale, endosomale Signalweiterleitung in retrograd transportierten Signalendosomen wurde bereits im Zusammenhang mit NGF nachgewiesen (Grimes *et al.*, 1996; Grimes *et al.*, 1997). Während der aktivierte NGF-

TrkA-Signalkomplex von der Plasmamembran eine transiente Aktivierung der kleinen GTPase Ras auslöst, unterscheidet sich die endosomale Signalgebung stattdessen durch eine anhaltende Aktivierung der kleinen Rap1-GTPase und des anschließenden MAPK-Signalwegs (Wu *et al.*, 2001; Delcroix *et al.*, 2003). In DRG-Neuronen induziert NGF über TrkA zusätzlich ein unterschiedliches Signalmuster für retrograde Signalgebung im Vergleich zur direkten Stimulation im Zellkörper. Im Soma werden durch NGF nur die MAP-Kinasen Erk1/2 aktiviert, was nicht zum Auslösen eines Überlebenssignals ausreicht. Nach axonaler Stimulation werden Erk1/2 nur als lokales Signal an den Enden der Axone generiert. Des Weiteren wird hierbei über eine Phosphorylierung der Erk5-MAPK ein retrogrades Signal vermittelt, das zur Translokation von pErk5 in den Zellkern, der Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB und zu einem Überlebenssignal führt ((Watson *et al.*, 2001); Abb. 1.7b). Bisher scheinen die NGF-vermittelte Aktivierung von Erk5 sowie z. B. die Adapterproteine MP1 (*Mek1 partner 1*) und p14 im EGF-vermittelten (Teis *et al.*, 2002; Teis *et al.*, 2006) oder SARA (*SMAD anchor for receptor activation*) im TGF- β -vermittelten Signalweg (Di Guglielmo *et al.*, 2003) als spezifisch für retrograde endosomale Signalwege zu gelten.

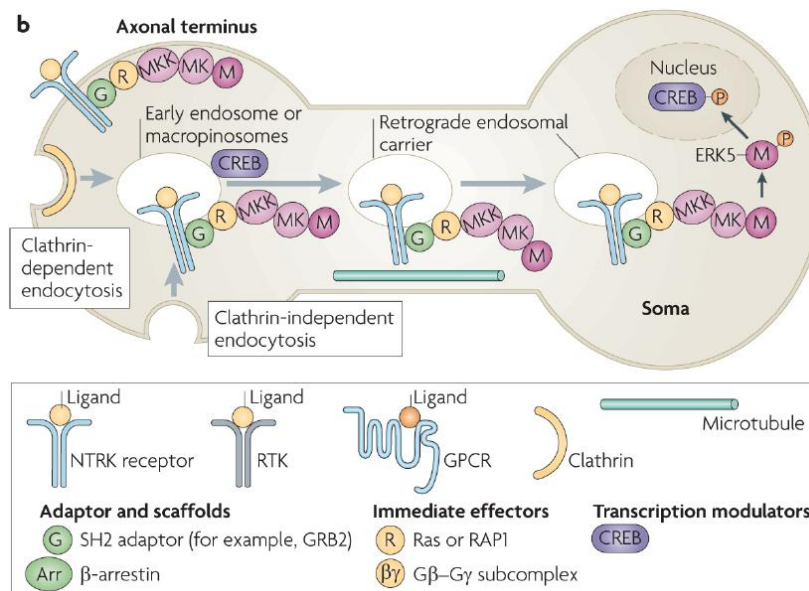


Abb. 1.7b: Modell eines retrograden, endosomalen Signalwegs in Neuronen

Nervenwachstumsfaktor-aktivierte Rezeptoren (NTRK) werden Clathrin-abhängig und -unabhängig endozytiert und mit assoziierten Komponenten der MAPK-Signalkaskade in frühe Endosomen oder Makropinosomen sortiert. NTRK Signalkomplexe werden Dynein-abhängig retrograd zum Zellkörper transportiert. Dort wird die MAPK *extracellular signal-regulated kinase 5* (Erk5) phosphoryliert und aktiviert. Erk5 phosphoryliert das *cAMP responsive element-binding protein* (CREB), das die Transkription anti-apoptotischer Gene reguliert. Graue Pfeile stellen *protein trafficking* dar, schwarze Pfeile Proteintranslokation oder Komplexbildung. Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*; MP1: *Mek1 partner 1*; PtdIns(3,4,5)P₃: Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat; PtdIns(4,5)P₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; SH2: *Src homology 2* (Sorkin und von Zastrow, 2009).

Auf GDNF-vermittelte Signalendosomen wurden bereits Hinweise durch den Nachweis retrograden GDNF-Transports nach axonaler Stimulation in adulten Motoneuronen (Leitner *et al.*, 1999), DRG- und parasympathischen Neuronen (Leitner *et al.*, 1999; Laurikainen *et al.*, 2000) und dopaminergen Neuronen (Tomac *et al.*, 1995) erbracht. Welche Signale intrazellulär generiert oder von der Plasmamembran weitergeleitet werden, scheint jedoch durch die bisher widersprüchlichen Erkenntnisse Zelltyp-spezifisch zu sein. In embryonalen sympathischen Neuronen wurde eine retrograde Weiterleitung von aktiviertem RET, Gfr α 1 und Akt, jedoch nicht von Erk1/2, festgestellt, die zu neuronalem Überleben und Neuritenwachstum führte (Coulpier und Ibanez, 2004). Andererseits wurde in der Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y die Clathrin-vermittelte RET-Internalisierung zur vollständigen Aktivierung von Erk1/2, aber nicht für den PI3-Kinase/Akt-Signalweg benötigt (Richardson *et al.*, 2006).

1.4.2 MODIFIKATION DER ENDOZYTULOSE

Der Einsatz des neurotrophen Wachstumsfaktors GDNF zeigte bereits Teilerfolge in der Behandlung von *Morbus Parkinson* (Gill *et al.*, 2003; Slevin *et al.*, 2005) und der Amyotrophen Lateralsklerose (Henderson *et al.*, 1994).

Als positiv geladene Polypeptide sind GFL wie GDNF allerdings nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen (Windisch *et al.*, 1998). Zusätzlich zu ihrer Anfälligkeit gegenüber hydrolytischen Enzymen (Yamazaki *et al.*, 2009) gilt ihre medizinische Relevanz als therapeutisches Medikament in Hinblick auf neuronale Erkrankungen somit *per se* als limitiert (Kirik *et al.*, 2004). Um den Einsatz niedermolekularer Verbindungen als Kandidaten für eine effektive Behandlung neuronaler Defekte zu ermöglichen, müssen zunächst die intrazellulären Signalwege und Interaktionspartner neurotropher Faktoren detailliert verstanden werden.

Die Dynamik des Endozytose-Netzwerks und der Übergang von Rezeptorkomplexen in verschiedene Kompartimente des endosomalen Systems werden von Rab-GTPasen reguliert. Als eine große Familie aus der Superfamilie der Ras-GTPasen sind diese an der Regulation des Vesikeltransports beteiligt (Jordens *et al.*, 2005). So nehmen beispielsweise Rab4 und Rab5 maßgeblich am frühen endosomalen *trafficking* teil (Bucci *et al.*, 1992; Sonnichsen *et al.*, 2000), Rab7 reguliert u. a. den Cargo-Protein-Transport auf Höhe der LE/MVB zu den Lysosomen (Vanlandingham und Ceresa, 2009), Rab9 agiert beim Transport von späten Endosomen zum TGN (Barbero *et al.*,

2002; Ganley *et al.*, 2004) und Rab11 entlang der Wege des Rezeptor-Recyclings (Ullrich *et al.*, 1996; Somsel Rodman und Wandinger-Ness, 2000; Cavalli *et al.*, 2001). Die Spezifität verschiedener Rab-GTPasen für unterschiedliche endosomale Kompartimente macht die mikroskopische Kollokalisationsanalyse Fluoreszenzmarkierter Rab- und Zielproteine zu einem wichtigen Werkzeug der Untersuchung intrazellulärer Transport- und Signalwege.

Die enorme Anzahl intrazellulär beteiligter Signal- und Gerüstproteine bietet eine Vielzahl neuer Ansatzpunkte für eine Modifikation der Signaltransduktion.

So kann beispielsweise durch eine gezielte Überexpression dominant negativer Mutanten von Proteinen, die an spezifischen Endozytosewegen beteiligt sind, die natürliche Funktion dieser Proteine weitestgehend unterbunden werden.

Durch die induzierte Überexpression der Dynamin-2-Mutante K44A, die unfähig zur GTP-Bindung und -Hydrolyse ist, können die Clathrin-abhängige und die Caveolin-abhängige Endozytose bei intermediären Schritten unter Akkumulation Clathrin- oder Caveolin-ummantelter Plasmamembran-Einstülpungen mit noch nicht abgeschnürtem Hals *in vivo* inhibiert werden. Eine dominant negative Mutante von Eps15, Eps15 DIII, die eine Deletion der C-terminalen, AP-2 Bindungsstellen-enthaltenden Domäne aufweist, inhibiert hingegen spezifisch die Clathrin-abhängige Endozytose (*clathrin-dependent endocytosis*; CDE). Dies geschieht bereits auf Höhe der CCP-Bildung und früher Invagination durch die Präzipitation der Clathrin-bindenden AP-2-Proteinkomplexe (Benmerah *et al.*, 1996; Benmerah *et al.*, 1998; Benmerah *et al.*, 1999). Einige Rezeptoren, wie der aktivierte EGF-Rezeptor, sind in der Lage, CCP *de novo* Grb2-abhängig in Zellen auszubilden, bei denen zuvor AP-2 entfernt wurde. Hierdurch entsteht eine Unterteilung der CDE, da z. B. Transferrin-Rezeptoren nicht in solchen CCP akkumulieren können (Johannessen *et al.*, 2006).

Eine weitere Möglichkeit zur spezifischen Inhibition von Endozytosewegen bietet sich durch den Einsatz diverser Chemikalien, die die natürliche Endozytosemaschinerie der Zelle verändern können.

Eine Behandlung von Zielzellen mit der Chemikalie Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) führt zur Depletion von Cholesterol aus der Plasmamembran, wodurch die *lipid raft*-Domänen zerstört werden und somit hauptsächlich die *raft*-abhängige Endozytose über Caveolae inhibiert wird (Hailstones *et al.*, 1998; Ostermeyer *et al.*, 1999). Nach M β CD-Behandlung findet sich in untersuchten Zellen weiterhin eine Ansammlung flacher, Clathrin-besetzter Plasmamembran-Einstülpungen (*type 1 coated pits*), deren

Invagination durch die Cholesterol-Depletion stark inhibiert wird (Rodal *et al.*, 1999). Durch eine M β CD-Präinkubation können somit *in vivo* spezifisch die Clathrin- und die Caveolin-abhängige Endozytose ohne Beeinflussung der übrigen Internalisierungsmechanismen der Zelle nahezu vollständig ausgeschaltet werden. Über mögliche Unterschiede im Phosphorylierungszustand beteiligter Signalkaskaden-Kinasen kann eine Beteiligung entsprechender Endozytosewege am jeweiligen Signalweg experimentell aufgezeigt werden. Alternativ könnte hierfür auch eine Inhibition der Cholesterol-Biosynthese induziert werden.

Ein weiterer schnell wirkender Endozytose-Inhibitor ist das kleine, zellpermeable Molekül Dynasore. Als nichtkompetitiver Inhibitor der GTPase-Aktivität von Dynamin blockiert es alle Dynamin-abhängigen Endozytosewege, selbst in Neuronen. Nach Dynasore-Behandlung akkumulieren demnach zwei Intermediatsformen Clathrin-ummantelter Plasmamembran-Einstülpungen, bei denen die GTPase-Aktivität von Dynamin eine Rolle spielt. Einerseits finden sich vollständig mit Clathrin ausgekleidete, O-förmige CCP-Intermediate, die nicht von der Plasmamembran abgestoßen werden (*type 3 coated pits*). Andererseits finden sich bereits Intermediate in einer früheren Phase, die die GTP-Hydrolyse des Dynamins zur Reifung zu benötigen scheinen (Narayanan *et al.*, 2005), kurz vor der Reifung U-förmiger Einstülpungen (*type 1 coated pits*) zu O-förmigen, vollständig ausgekleideten CCP (*type 2 coated pits*; (Macia *et al.*, 2006; Nankoe und Sever, 2006; Chen *et al.*, 2009)). Ebenso wie bei der Dynamin-2-Mutante K44A führt auch eine Dynasore-Behandlung zur Akkumulation noch Plasmamembran-gebundener Caveolae.

Eine eher zwiespältige Rolle als Endozytose-Inhibitor nimmt das zellpermeable Molekül Chloroquin ein, das mit Ammoniumionen und anderen Aminen zur Gruppe der *cationic amphiphilic class of drugs* (CAD) gehört. Diese wurden ursprünglich eingesetzt, um durch ihre schwach basischen Eigenschaften den pH-Wert der Lysosomen zu erhöhen und somit eine Reifung später Endosomen zu Lysosomen zu blockieren (Ohkuma und Poole, 1978; Wang *et al.*, 1993a). Obwohl postuliert wurde, dass Chloroquin auch die Aufnahme von Liganden-Rezeptorkomplexen über ein Verhindern des Rezeptor-Recyclings blockiert (Tietze *et al.*, 1980) und obwohl Chloroquin in hohen Konzentrationen die Clathrin-Freisetzung von CCV verhindern kann (Phonphok und Rosenthal, 1991), konnte in verschiedenen Zelllinien kein direkter Effekt auf die Bindung oder die Aufnahme von Liganden, z. B. Transferrin, festgestellt werden (Schneider und Trouet, 1981; Stein *et al.*, 1984). Zumeist wurde

lediglich der Einfluss auf die endosomale Reifung, in geringer Konzentration auch schon auf Höhe von Zelloberfläche und früher Endosomen, beschrieben (Ippoliti *et al.*, 1998; Yuyama *et al.*, 2006).

Eine Übersicht der wichtigsten Inhibitionsmethoden der Clathrin- und der Caveolin-abhängigen Endozytose und ihrer Wirkungsorte ist nachfolgend zusammengefasst (Abb. 1.8).

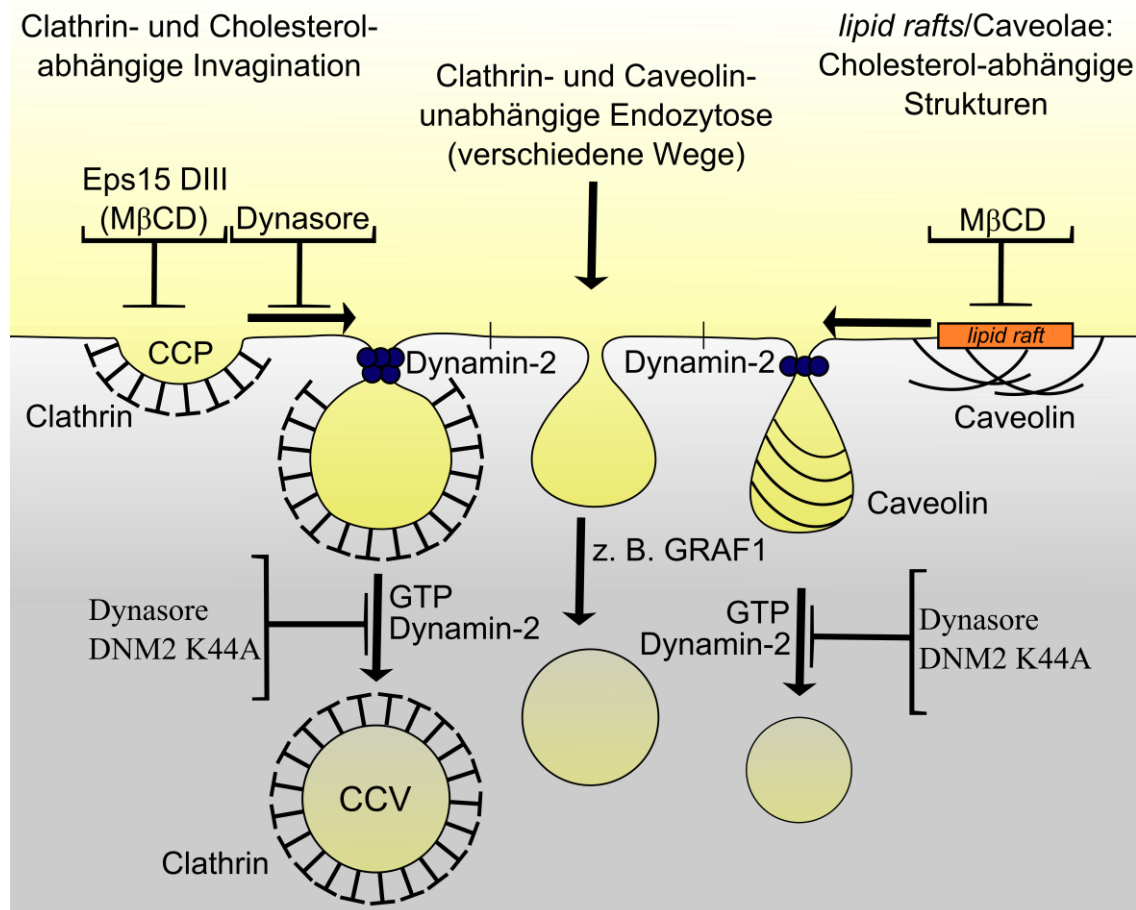


Abb. 1.8: Verschiedene Endozytosewege der Zelle und Möglichkeiten zu ihrer Inhibition

Dargestellt ist die schrittweise Einstülpung der Plasmamembran einer Säugerzelle beim Vorgang der Clathrin-abhängigen Endozytose (links), der Caveolin-abhängigen Endozytose innerhalb Caveolae oder *lipid raft*-Strukturen (rechts) und der Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Endozytose (Mitte). Durch Inhibitionspeile sind mögliche Schritte dargestellt, an denen die Endozytose mittels dominant negativer Mutanten oder geeigneter Reagenzien unterbrochen werden kann. Eps15 DIII: dominant negative Mutante von Eps15 (*epidermal-growth factor receptor (EGFR) pathway substrate clone 15*); DNM2 K44A: dominant negative Mutante von Dynamin-2; MβCD: Methyl-β-Cyclodextrin; GTP: Guanosintriphosphat; GRAF1 (*GTPase regulator associated with focal adhesion kinase-1*); CCP: *clathrin-coated pit*; CCV: *clathrin-coated vesicle*.

1.5 REPORTERPROTEINE

Zur mikroskopischen Detektion und Lokalisation spezifischer intrazellulärer Proteine oder auch von Membranproteinen ist neben der Immunfluoreszenzanalyse die Kopplung der gewünschten cDNA an sogenannte Reportergene eine etablierte Methode. Reportergene codieren für Reporterproteine, die eine Kontrolle der Genexpression und eine Lokalisationsanalyse des gekoppelten Zielproteins in verschiedenen Zellsystemen ermöglichen (Chalfie *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1998). Ein Beispiel eines solchen Reporterproteins ist das GFP (*green fluorescent protein*), das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert und sich somit zur Herstellung entsprechend fluoreszierender Fusionsproteine eignet. Es wurde aus der biolumineszenten Qualle *Aequorea victoria* gewonnen und erstmals 1961 beschrieben (Shimomura *et al.*, 1962; Shimomura, 2005). Die entsprechende cDNA wurde 1992 isoliert, kloniert und sequenziert (Prasher *et al.*, 1992). GFP besteht aus 238 Aminosäuren und weist eine Molekülmasse von 26.9 kDa auf (Aggeli *et al.*, 2001). Das unmodifizierte, natürlich vorkommende GFP besitzt zwei Anregungsmaxima bei Wellenlängen von 395 bzw. 475 nm und ein Emissionsmaximum bei 509 nm. Der eigentliche Fluorophor des GFP bildet sich während etwa 4 Stunden autokatalytisch aus der Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67 innerhalb der Polypeptidkette (Cody *et al.*, 1993; Heim *et al.*, 1994). Durch gezielte AS-Punktmutationen, meist innerhalb der Fluorophorsequenz, sind mittlerweile einige GFP-Varianten etabliert, die andere Fluoreszenzspektra und somit eine andersfarbige Fluoreszenz aufweisen, nach der in der Regel auch die Benennung erfolgt, z. B. CFP (*cyan fluorescent protein*) oder YFP (*yellow fluorescent protein*). Modifizierte Varianten von GFP, CFP und YFP, deren Expression erhöht ist und deren Fluoreszenzeigenschaften verstärkt sind, werden als *enhanced GFP*, CFP bzw. YFP (EGFP, ECFP bzw. EYFP) bezeichnet (Cody *et al.*, 1993; Chalfie *et al.*, 1994; Cormack *et al.*, 1996). Zur Herstellung fluoreszierender Fusionsproteine werden Säugerexpressionsvektoren kloniert, bei denen die für das gewünschte Protein codierende DNA-Sequenz meist C- oder N-terminal von einer für GFP oder für ein GFP-Derivat codierenden DNA-Sequenz flankiert werden.

1.6 FÖRSTER RESONANCE ENERGY TRANSFER

Neben der allgemeinen Fluoreszenzmikroskopie ist der *Förster resonance energy transfer* (FRET) eine weiterführende und hochauflösendere mikroskopische Methode zur Protein-Interaktionsanalyse, die auf der Verwendung geeigneter GFP-Derivate basiert.

FRET ist ein bereits 1948 entdeckter Prozess, bei dem ein angeregter Donorfarbstoff abhängig von der Entfernung eines Akzeptormoleküls Energie strahlungsfrei in Form von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf dieses übertragen kann (Förster, 1948). Handelt es sich bei beiden Molekülen um Fluorochrome, wird auch von *fluorescence resonance energy transfer* gesprochen. Der Abstand beider Moleküle sollte zwischen 1.5 und 10 nm betragen, um einen FRET beobachten zu können. Je geringer der Abstand der interagierenden Proteine ist, desto stärker ist der FRET, da die Intensität des Signals mit der sechsten Potenz des Abstands beider Fluorophore abnimmt. Es ist somit möglich, Interaktionen zweier unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Proteine intrazellulär nachzuweisen, da ihr Abstand durch die Intensität des Energietransfers bestimmt werden kann (Tsien *et al.*, 1993). Indem Proteine mit verschiedenen Varianten von GFP in lebende Zellen transfiziert werden, kann eine mögliche Kolo-kalisation aufgezeigt werden. Ein geeignetes und häufig verwendetes Fluorochromenpaar bilden die Reporterproteine CFP und YFP, da das Emissionsspektrum des Donors (CFP) mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors (YFP) überlappt. Ein FRET kann über eine Abnahme der Donor-Fluoreszenz oder eine Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 1.9).

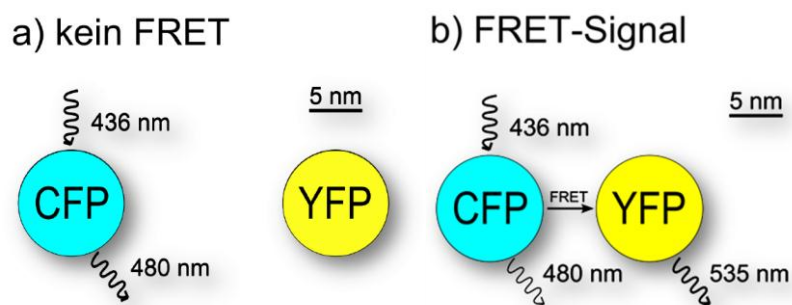


Abb. 1.9: Prinzip von FRET anhand des Fluorophorenpaars CFP und YFP

a) Kein FRET: Ist der Abstand zwischen CFP und YFP zu groß, ist kein strahlungsfreier Energietransfer zwischen beiden Fluorophoren möglich. **B)** FRET-Signal: Nach Verringerung des Abstands zwischen CFP und YFP kann ein FRET erfolgen. Die Fluoreszenzintensität des Donors (CFP) nimmt ab, die des Akzeptors (YFP) zu.

2 MATERIAL

2.1 VERBRAUCHSMATERIAL

Material	Hersteller
Deckgläser	Menzel-Glaser, Braunschweig
Elektroporationsküvetten	Eppendorf, Hamburg
Entsorgungsbeutel	Roth, Karlsruhe
Gefäße	Schott, Mainz
Bechergläser 100 mL	Sarstedt, Nürnberg
Eppendorfgefäße 1.5 mL/2 mL	Schott, Mainz
Glasflaschen 50/200/500/1000 mL	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Kryoröhrchen 1.5 mL	Biozym Scientific, Oldendorf
PCR Softtubes 200 µL	Greiner bio-one, Frickenhausen
Plastikröhrchen 10/15/50 mL	Schott, Mainz
Schüttelkolben 50/500 mL	Roth, Karlsruhe
Handschuhe	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikrotiterplatten	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Objektträger 76 x 26 x 1 mm	B. Braun, Melsungen
Omnifix Injektionsspritzen	Pechiney, Chicago, USA
Parafilm „M“ Laboratory Film	Hirschmann EM, Eberstadt
Pipetten	Brand, Wertheim
Glaspipetten 5/10/20 mL	Eppendorf, Hamburg
Pasteurpipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipetus Pipettierhilfe	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetman 2/10/20/50/200/1000 µL	Schleicher und Schüll, Dassel
Pipettenspitzen 10/200/1000 µL	Roth, Karlsruhe
Protran Nitrozellulosemembran	Sarstedt, Nümbrecht
Sterican Injektionskanülen	Schleicher und Schüll, Dassel
Sterilfilter	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Whatman Papier GB002	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen nunc™ 25/75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten (4-Well, 6-Well, 12-Well)	
Zellschaber	

2.2 REAGENZIENSÄTZE

Reagensatz	Hersteller
<i>Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L</i>	Lonza, Köln
Lipofectamin LTX und PLUS Reagenz	Invitrogen, Darmstadt
Omniscript RT Kit	QIAGEN, Hilden
PEQLAB peqGOLD DNA-Polymerase Kit	PeqLab, Erlangen
<i>QIAEX II Gel Extraction Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>SuperSignal West Pico Enhanced Chemiluminescence Kit</i>	ThermoFisher, Waltham, USA
<i>SV Total RNA Isolation Kit</i>	Promega, Mannheim
<i>Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	Promega, Mannheim

2.3 GERÄTE

Gerät	Hersteller
Amaya Nucleofector II Device	Lonza, Köln
Autoklaven	Webeco CS-Lab/IDK Webeco Automat V
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Eismaschine Ziegler B-100	Ziegler Eismaschinen, Isernhagen
Elektrophorese-Kammern	Mechanische Werkstatt, Bielefeld
Elektroporator 2510	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzlampe Exfo X-Cite 120PC	EXFO Life Sciences, Kanada
Fluoreszenzmikroskop Leica DM5000 B	Leica Microsystems, Solms
Geldokumentationssystem	PeqLab, Erlangen
HeraCell Inkubator	Heraeus Instruments, Osterode
Kamera Leica DFC 350 Fx	Leica Microsystems, Solms
Kühlschränke/ Gefriertruhen	Liebherr Premium -20 °C Privileg Öko 4 °C Herafreeze HFC 7150 TOP Herafreeze HFC 586 TOP
Konfokales Mikroskop Zeiss LSM 710	Carl Zeiss, Jena
LAS 3000 ECL-Kamera	Fuji, Tokyo, Japan
Laser	Laser Argon-Multiline 25 mW Laser HeNe 543 nm für LSM 710
Lichtmikroskop Leica DM IRB	Leica Microsystems, Solms
Magnetrührer MR80	Heidolph, Nürnberg
Mikrowelle LG Wavedom	LG, Korea
Millipore Synergie (Milliporeanlage)	Billerica, USA
NanoDrop UV-Spektralphotometer ND-1000	PeqLab, Erlangen
Netzgeräte	250V/0-0.1 A Biometra P25 Power Supply EPS 200
pH-Meter SevenMulti	Mettler Toledo, Gießen
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, USA
Sterilwerkbänke	Labor: Holten LaminAir HVR2448 Zellkultur: Heraeus Herasafe HS12
<i>Tecan Reader</i>	Tecan, Martinsried
Thermomixer 5436 Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Turrax TP 18/10	IKA Werke, Staufen
Vakuumpumpe (Zellkultur) Laboport	KNF Neuberger, Freiburg
Vortex Genie II, G-560	Scientific Industries, Kanada
Waagen	Mettler Toledo, Schweiz LabStyle 3002 Balance Sartorius, Göttingen Präzisionswaage Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	MS Laborgeräte, Wiesloch W6 Eppendorf, Hamburg Thermostat 2761 Memmert WB Memmert, Schwabach
Western Blot-Kammern	Mechanische Werkstatt, Bielefeld
Zentrifugen	Heraeus Instruments, Osterode Eppendorf, Hamburg Biofuge 13 Tischzentrifuge Eppendorf, Hamburg Zentrifuge 5415C Eppendorf, Hamburg Zentrifuge 5417R, Rotor FA-45-30-11 Eppendorf, Hamburg Zentrifuge 5804R, Rotor A-4-44 Eppendorf, Hamburg Zentrifuge VWR Galaxy 16DH VWR, Darmstadt Sorvall RC-5B, Rotor: SS-34 und GS-3 Sorvall, Bad Homburg

2.4 CHEMIKALIEN

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München) im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen oder waren im Labor vorhanden.

Chemikalie	Hersteller
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamidmischung, Rotiphorese	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich, München
<i>all-trans</i> -Retinsäure (ATRA)	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumsulfat, ≥ 99.5 %	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	Biorad, Mississauga, Kanada
Bromphenolblau-Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Calcein-AM	Sigma-Aldrich, München
Chloroquindisphosphatsalz ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fisher Scientific, Schwerte
dNTPs (dATP, dTTP, dCTP und dGTP)	Roche, Mannheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Lonza, Köln
Dynasorehydrat ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, München
Ethidiumbromidlösung (1 %)	Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Serva, Heidelberg
Guanidiniumthiocyanat	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HOECHST 33342	Invitrogen, Darmstadt
Immersionsöl für Mikroskopie	Leica, Solms
Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) ≥ 99 %	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Biomol, Hamburg
L-Glutamin, 200 mM, 100x Lösung	Lonza, Köln
LysoTracker RED DND-99	Cambrex, Taufkirchen
Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD)	Sigma-Aldrich, München
Milchpulver	Lasana
Mowiol 4-88 (PEG 4-88)	Sigma-Aldrich, München
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
N-Lauroylsarkosin-Natriumsalz (Sarkosyl NL)	Sigma-Aldrich, München
Pepstatin A	Biomol, Hamburg
Pepton	Roth, Karlsruhe
Phalloidin (FITC) ≥ 90 %	Enzo Life Sciences, Lörrach
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Pferdeserum (HS)	Serva, Heidelberg
Poly-L-Lysin-Hydrobromid	Sigma-Aldrich, München
Ponceau S	Serva, Heidelberg
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, München
Resazurin	Sigma-Aldrich, München
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA, Cölbe
Transferrin Alexa Fluor 555 Konjugat	Invitrogen, Darmstadt
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Lonza, Köln
Trypton (aus Fleisch)	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid)	Fermentas, St. Leon-Rot
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich, München

2.5 MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON *ESCHERICHIA COLI*

Medium	Zusammensetzung
Luria-Bertani (LB) Medium, Lagerung bei 4 °C	1 % (w/v) Pepton 0.5 % (w/v) Hefeextrakt 0.5 % (w/v) NaCl, pH-Wert auf 7.0 eingestellt
LB Agar, Lagerung bei 4 °C	LB Medium 1.2 % (w/v) Agar-Agar, pH-Wert auf 7.0 eingestellt Nach Erhitzen wurde der auf ca. 60 °C abgekühlte Agar steril auf 10 cm-Petrischalen gegossen und bei RT bis zur Erstarrung gelagert.
SOC Medium, Lagerung bei -20 °C	0.5 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Trypton 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgSO ₄ 2 mM Glukose, pH-Wert auf 7.0 eingestellt

Alle Medien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die jeweiligen Antibiotika wurden bei Temperaturen unter 50 °C hinzugefügt.

2.6 ZELLKULTURMEDIEN

Medium	Zusammensetzung
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) steril filtriert, Lagerung bei 4 °C	13.38 g/L DMEM-Pulver 3.4 g/L NaHCO ₃ 8 mL/L 1 M HCl 0.1 g/L Phenolrot, pH-Wert auf 7.4 eingestellt
DMEM-Basalmedium, Lagerung bei 4 °C	DMEM + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 100x Lösung + 1 % (v/v) L-Glutaminlösung (200 mM)
DMEM-Vollmedium, Lagerung bei 4 °C	DMEM-Basalmedium + 10 % FKS
PBS (1x) für die Zellkultur, Lagerung bei 4 °C	136 mM NaCl 2.5 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1.4 mM KH ₂ PO ₄ 0.1 g/L Phenolrot, pH-Wert auf 7.4 eingestellt
HAT-Medium, Lagerung bei 4 °C	DMEM Vollmedium + 0.1 mM Hypoxanthin + 400 nM Aminopterin + 0.016 mM Thymidin
PLL-Lösung, Lagerung bei 4 °C	50 µL Poly-L-Lysin (PLL; 50 mg/mL in PBS) in 25 mL PBS aufnehmen

2.7 PUFFER UND ANDERE LÖSUNGEN

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
APS-Lösung, Lagerung bei 4 °C	1 g Ammoniumperoxodisulfat in 10 mL ddH ₂ O lösen
Blotto, Lagerung bei 4 °C	2 % Milchpulver in PBS-T bzw. 2 % Milchpulver in TTBS für phosphatfreie Bedingungen
DNA-Ladepuffer (6x)	37 % (w/v) Glycerin 6 mM EDTA 0.1 % (w/v) Bromphenolblau 0.1 % (w/v) Xylencyanol ZZ in 1x TAE-Puffer
HOECHST (1000x), Lagerung bei 4°C	100 mg/mL HOECHST 33342 in ddH ₂ O
Laemmlipuffer (3x)	30 % (w/v) Saccharose 6 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 62.5 % (v/v) 1 M Tris-HCl (pH-Wert 6.8) 0.1 % (w/v) Bromphenolblau
Laemmlipuffer (3x) + β-Mercaptoethanol	Laemmlipuffer (3x) + 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol (unmittelbar vor Verwendung zugeben)
Lysispuffer (unmittelbar vor Gebrauch herzustellen und bei 4 °C zu verwenden)	2.4 mL PBS 100 µL 25 % Triton X-100 (Endkonz. 1 %) 50 µL NaF (500 mM) 50 µL NaVO ₃ (50 mM) 12.5 µL PMSF (100 mM) 9.75 µL Methanol 2.5 µL Pepstatin A (1 mg/mL) 0.25 µL Leupeptin (10 mg/mL)
MOPS-Puffer (10x), autoklaviert dunkel lagern	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA, pH-Wert auf 7.0 eingestellt
Mowiol 4-88-Lösung, Lagerung bei 4 °C	10 g Mowiol 4-88 in 40 mL PBS lösen 24 h rühren, + 20 mL Glycerin (wasserfrei) 24 h bei 4 °C rühren 1 h bei 27,000 x g zentrifugiert, dann aliquotiert
Natriumacetat-Waschpuffer, Lagerung bei 4 °C	150 mM NaCl 1 mM CaCl ₂ 20 mM Natriumacetat, pH-Wert auf 4.6 eingestellt
PBS (10x)	1.4 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄ , pH-Wert auf 7.3 eingestellt
PBS-T	0.1 % (v/v) Tween 20 in PBS (1x)
PFA-Fixierlösung, Lagerung bei -20 °C	4 % (w/v) Paraformaldehyd 3 % (w/v) Saccharose in PBS (1x), PFA in Mikrowelle gelöst
RIPA-Puffer (1x), Lagerung bei 4 °C	50 mM Tris-HCl (pH-Wert 7.2) 150 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat 0.1 % SDS (w/v)
RNA-Extraktionslösung	3 M Guanidiniumthiocyanat 25 mM Natriumcitrat, pH-Wert auf 7.0 eingestellt 0.5 % (v/v) Sarkosyl NL 0.1 M β-Mercaptoethanol (unmittelbar vor Verwendung zugeben)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
RNA-Probenpuffer (1x)	0.25 % (w/v) Bromphenolblau 4 mM EDTA 7.2 % (v/v) Formaldehyd (37 %ig) 20 % (v/v) Glycerin 30 % (v/v) Formamid 40 % (v/v) MOPS-Puffer (10x)
SDS-Laufpuffer (10x)	1.92 M Glycin 0.5 M Tris-HCl 1 % (w/v) SDS
SDS-Sammelgelepuffer	0.5 M Tris-HCl, pH-Wert 6.8
SDS-Trenngelepuffer	1.5 M Tris-HCl, pH-Wert 8.8
<i>Semi-Dry</i> -Puffer (10x)	5.8 g/L Tris-HCl 2.92 g/L Glycin 3.7 mL/L 10 % (w/v) SDS, pH-Wert mit NaOH auf 9.2 eingestellt
<i>Semi-Dry</i> -Puffer (1x)	50 mL Methanol 20 mL <i>Semi-Dry</i> -Puffer (10x) 130 mL ddH ₂ O
Strip-Puffer, Lagerung bei 4 °C	200 mM Glycin in ddH ₂ O, pH-Wert mit HCl auf 2.1 eingestellt
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-HCl 2 M Essigsäure 50 mM EDTA, pH-Wert auf 8.0 eingestellt
TBS (1x)	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl, pH-Wert auf 7.0 eingestellt
TTBS	25 mM Tris-HCl 150 mM NaCl, pH-Wert mit HCl auf 7.4 eingestellt 0.05 % (v/v) Tween 20

2.8 ENZYME, STANDARDS

Enzym/Standard	Hersteller
Alkaline Phosphatase (1 U/μL)	Roche, Mannheim
Bioline BioTAQ DNA-Polymerase (5 U/μL)	Bioline, Luckenwalde
DNA-Marker 1 kb DNA Ladder	Invitrogen, Darmstadt
<i>PfuUltra</i> High Fidelity DNA-Polymerase (2.5 U/μL)	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Prestained Protein-Ladder</i>	Biorad, Mississauga, Kanada
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (NEB), Frankfurt a. M.
RNasin Plus RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
T4-DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA Ligase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt a. M.

Alle Enzyme und Standards wurden bei -20 °C gelagert.

2.9 ANTIBIOTIKA

Antibiotikum	Ausgangskonzentration	Verwendete Konzentration	Hersteller
Ampicillin-Natriumsalz ≥ 99 %	100 mg/mL in ddH ₂ O	100 μg/mL	Roth, Karlsruhe
Geneticinsulfat-Lösung (G418)	50 mg/mL in ddH ₂ O	500 μg/mL	PAA, Cölbe

Antibiotikum	Ausgangskonzentration	Verwendete Konzentration	Hersteller
Kanamycinsulfat	10 mg/mL in ddH ₂ O	50 µg/mL	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin 100x Lösung	10,000 U/mL (P), 10,000 U/mL (S)	1 % (v/v)	Lonza, Köln

2.10 WACHSTUMSFAKTOREN

Wachstumsfaktor	Spezies	Hersteller
GDNF (<i>Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor</i>) (#G1401)	Ratte	SIGMA, Missouri, USA
GDNF (<i>Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor</i>) (#G1777)	human	SIGMA, Missouri, USA
Neurturin (rekombinant)	human	Peptotech, Hamburg

Alle Wachstumsfaktoren wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.11 ANTIKÖRPER

Antikörper	Spezies	Spezifität	Hersteller	MW	WB	IF
anti-Akt (#9272)	Kaninchen	Akt	Cell-Signaling, Beverly, USA	60 kDa	1:1,000	-
anti-Aktin	Maus	Aktin	(Gonsior <i>et al.</i> , 1999)	42 kDa	1:10,000	-
anti-Erk1/2 (#9102)	Kaninchen	Erk1/2	Cell-Signaling, Beverly, USA	42, 44 kDa	1:1,000	-
anti-Erk5 (#3372)	Kaninchen	Erk5	Cell-Signaling, Beverly, USA	115 kDa	1:1000	-
anti-GFRα1 (H-70)	Kaninchen	GFRα1 (AA 368-437)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	47/53 kDa	1:250	1:300
anti-GFRα2 (#AB5402)	Kaninchen	GFRα2 (AA 376-390)	Millipore, Billerica, USA	47/52 kDa	1:750	1:500
anti-Kaninchen Cy3	Ziege	Kaninchen IgG (H+L)	Dianova, Hamburg	-	-	1:200
anti-Kaninchen HRP	Ziege	Kaninchen IgG (H+L)	Sigma, St. Louis, USA	-	1:10,000	-
anti-LAMP1 (1D4B)	Ratte	Maus Lysosomen	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	120 kDa	1:500	1:100
anti-Maus HRP	Ziege	Maus IgG (H+L)	Sigma, St. Louis, USA	-	1:10,000	-
anti-pAkt (#9271)	Kaninchen	pAkt (Ser473)	Cell-Signaling, Beverly, USA	60 kDa	1:1,000	-
anti-pErk1/2 (#9101)	Kaninchen	pErk1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell-Signaling, Beverly, USA	42, 44 kDa	1:1,000	-
anti-pErk5 (#3371)	Kaninchen	pErk5 (Thr218/Tyr220)	Cell-Signaling, Beverly, USA	115 kDa	1:1000	-

2.12 BAKTERIENSTÄMME

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i>	(Invitrogen, 2003)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i> proAB lacI</i> ^q ΔM15 Tn10(Tetr ^r)]	(Stratagene, 2002)

2.13 ZELLINIEN

2.13.1 N18TG2

N18TG2 ist eine 6-Thioguanin-resistente Mutante der N18 Zelllinie, die aus der murinen C1300 Neuroblastomazelllinie etabliert wurde (Minna *et al.*, 1972; Hamprecht, 1977; Hamprecht *et al.*, 1985).

Die Zellen wachsen schwach adhärent in Zellkultur mit DMEM-Vollmedium + 100 µM 6-Thioguanin bei 37 °C und 5 % CO₂. N18TG2 Zellen werden alle 3-5 Tage 1:5 bis 1:10 geteilt und in 70 % DMEM-Basalmedium, 20 % FKS und 10 % DMSO mit ca. 1-2 x 10⁶ Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren (DSMZ ACC 103).

Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. B. Hamprecht zur Verfügung gestellt.

2.13.2 N4TG3

N4TG3 ist ein 6-Thioguanin-resistenter Klon der murinen Neuroblastomazelllinie N4, die aus C1300 Neuroblastomazellen entstand (Amano *et al.*, 1974; Traber *et al.*, 1974). Die Zellen wachsen schwach adhärent in Zellkultur mit DMEM-Vollmedium + 100 µM 6-Thioguanin bei 37 °C und 5 % CO₂. N4TG3 Zellen werden alle 2-4 Tage 1:2 bis 1:4 geteilt und in 70 % DMEM-Basalmedium, 20 % FKS und 10 % DMSO mit ca. 2 x 10⁶ Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren (DSMZ ACC 101).

Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. B. Hamprecht zur Verfügung gestellt.

2.13.3 NS20Y

Die cholinerge und adrenerge Zelllinie NS20Y entstand aus der murinen Neuroblastomazelllinie C1300 (Amano *et al.*, 1972).

Die adhärennten NS20Y Zellen werden in DMEM-Vollmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, alle 2-4 Tage 1:5 bis 1:10 geteilt und in 70 % DMEM-Basalmedium, 20 % FKS und 10 % DMSO mit ca. 2 x 10⁶ Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren (DSMZ ACC 94).

Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. B. Hamprecht zur Verfügung gestellt.

2.13.4 NH15-CA2

NH15-CA2 ist eine doppelte Hybridomazelllinie, die aus Maus (Neuroblastoma x Glioma) x Ratte Glioma Hybridomazelllinien entstand. Sie wächst abhängig von HAT-Medium, das die chemischen Substanzen Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält. Hypoxanthin wird als Vorstufe für Purine für den

Aufbau von DNA benötigt. Zu der Umwandlung von Hypoxanthin ist jedoch das Enzym HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) notwendig. Somit können nur Hybridomazellen kultiviert werden, die die *hprt*-Gene (HGPRT) besitzen. Aminopterin hingegen hemmt die Dihydrofolatreduktase und verhindert auf diese Weise die Thymin-Biosynthese, weshalb Thymidin dem Medium zugesetzt werden muss. NH15-CA2 Zellen sind nur ca. 10 Passagen verwendbar. Sie werden in HAT-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, alle 2-3 Tage 1:6 bis 1:10 geteilt und in 70 % DMEM-Basalmedium, 20 % FKS und 10 % DMSO mit ca. 1 x 10⁶ Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren (Heumann *et al.*, 1979).

Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. B. Hamprecht zur Verfügung gestellt.

2.13.5 NG108-15

Die NG108-15 Zelllinie, ursprünglich 108CC15 genannt, ist eine cholinerge Hybridomazelllinie aus Maus N18TG2 Neuroblastoma x Ratte C6-BU-1 Glioma Zelllinien (Hamprecht, 1977; Hamprecht *et al.*, 1985). Die Zellen werden in HAT-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, alle 2-3 Tage 1:6 bis 1:10 geteilt und in 70 % DMEM-Basalmedium, 20 % FKS und 10 % DMSO mit ca. 1 x 10⁶ Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren (ATCC HB-12317).

2.13.6 NEURO-2A

Die murine Neuroblastomazelllinie Neuro-2a (N2a) wurde aus der Tumorzelllinie C1300 etabliert (Olmsted *et al.*, 1970). Die Zellen wachsen in Zellkultur mit DMEM-Vollmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Neuro-2a Zellen werden alle 3-5 Tage 1:3 bis 1:6 geteilt und in 70 % DMEM-Basalmedium, 20 % FKS und 10 % DMSO mit ca. 2 x 10⁶ Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren (ATCC CCL-131; DSMZ ACC 148).

Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig bezogen.

2.13.7 B104

B104 ist eine vom zentralen Nervensystem der Ratte abgeleitete Neuroblastomazelllinie (Schubert *et al.*, 1974; Bottenstein und Sato, 1979; Honma *et al.*, 1996), die im Hinblick auf die GDNF-Familien-spezifische Signalgebung zwar die Korezeptoren Gfra1 und Gfra2, jedoch nicht den RET-Rezeptor exprimiert (Pezeshki *et al.*, 2001). Die Regulation der neuronalen Entwicklung kann *in vitro* gut anhand von B104 Zellen untersucht werden, da diese den Vorteil bieten, unter Serumentzug die

Proliferation zu beenden und eine morphologische Veränderung von Fibroblasten-ähnlicher zu einer bipolaren Zellform mit Neuriten auszubilden (Toda *et al.*, 1999). Sie wachsen schwach adhärent in Zellkultur mit DMEM-Vollmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. B104 Zellen werden alle 2-4 Tage 1:10 bis 1:20 geteilt und in 40 % DMEM-Basalmedium, 50 % FKS und 10 % DMSO mit ca. 1 x 10⁶ Zellen pro Kryoröhrchen eingefroren (ICLC ATL99008).

Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. K. Sandhoff zur Verfügung gestellt.

2.14 VEKTOREN UND CDNAS

Name	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
pcDNA3.1+	Ampicillinresistenzgen, Neomycinresistenzgen, CMV-Promotor	Säugerexpressionsvektor	Invitrogen
pEG/C/YFP-C1	Kanamycinresistenzgen, Neomycinresistenzgen, SV40-Promotor	Säugerexpressionsvektor für N-terminal getaggte GFP/CFP/YFP-Fusionsproteine	Clontech
pEG/CFP-N1	Kanamycinresistenzgen, Neomycinresistenzgen, SV40-Promotor	Säugerexpressionsvektor für C-terminal getaggte GFP/CFP-Fusionsproteine	Clontech
pEGFP-N3	Kanamycinresistenzgen, Neomycinresistenzgen, SV40-Promotor	GFP-Kontrolle für Immunfluoreszenzen	Clontech
pGEM-T <i>Easy</i>	Ampicillinresistenzgen, <i>lac</i> -Operator, T7-Promotor	A/T-Klonierungs- und Sequenzierungsvektor	Promega
pVenus-N1	Kanamycinresistenzgen, Neomycinresistenzgen, SV40-Promotor	Säugerexpressionsvektor für C-terminal getaggte YFP-Fusionsproteine	Dr. S. Verrier

cDNA Klon	Plasmid	Beschreibung	Referenz
IMAGp998H1 714021Q	pCMV-SPORT6 (Ampicillinresistenzgen)	RET51 C-Terminus murine cDNA	RZPD
IRAVp968E0 7103D	pCMV-SPORT6.1 (Ampicillinresistenzgen)	Gfra1 murine cDNA	RZPD
IRAVp968F0 9120D	pYX-Asc (Ampicillinresistenzgen)	RET9 murine cDNA	RZPD
IRCLp5011E 1132D	pCR-BluntII-TOPO (Kanamycinresistenzgen)	C3G/RapGEF1 Isoform 2 murine cDNA	imaGenes
IRCMp5012H 0914D	pCR4-TOPO (Kanamycinresistenzgen)	Rap1-PDZ-GEF1/RapGEF2 humane cDNA	imaGenes

Eine vollständige Plasmidliste ist dem Anhang (I) beigelegt.

2.15 OLIGONUKLEOTIDE

Name	Sequenz	Verwendungszweck
Aktin 3'	5'-GCC ATC TCC TGC TCG AAG TC-3'	3'-Primer zum Nachweis von Aktin als Kontrolle in RT-PCR
Aktin 5'	5'-ACC AAC TGG GAC GAC ATG GA-3'	5'-Primer zum Nachweis von Aktin als Kontrolle in RT-PCR
C3G f	5'-CCT CGA GGT ATG AGC AGC GGC CTC GGC CTC-3'	5'-Klonierungsprimer für C3G mit <i>XhoI</i> Sequenz
C3G r	5'-CAA GCT TCT AGG TCT TCT CTT CGC GGT CTG-3'	3'-Klonierungsprimer für C3G mit <i>HindIII</i> Sequenz
C3Gseq2	5'-CCC TCT GAC AGA CCG AGA AA-3'	5'-Sequenzierung von C3G Konstrukten Bindet ab 636 bp der murinen CDS (<i>coding sequence</i>)
C3Gseq3	5'-GCA GAC AGA CAC TCC ACC TG-3'	5'-Sequenzierung von C3G Konstrukten Bindet ab 1260 bp der murinen CDS
C3Gseq4	5'-GCT CAG GGC CTC AGT GTA TC-3'	5'-Sequenzierung von C3G Konstrukten Bindet ab 1855 bp der murinen CDS
C3Gseq5	5'-AAG CAA GAG GGT GAT GAT GG-3'	5'-Sequenzierung von C3G Konstrukten Bindet ab 2371 bp der murinen CDS
EGFP-N/YFP-N1r	5'-CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G-3'	3'-Sequenzierung von pVenus-N1-Konstrukten
Gfra1 3'	5'-CGG AAT TCA CGA TGT TTC TGC CAA TGA TAC-3'	3'-Klonierungsprimer für Gfra1 mit <i>EcoRI</i> Sequenz
Gfra1 350r	5'-TTT CCC TGC AGG CTC TGG TAC-3'	3'-Primer für den Nachweis von Gfra1-cDNA
Gfra1 5'	5'-CGG GAT CCG GCG GCA CCA TGT TCC TAG-3'	5'-Klonierungsprimer für Gfra1 mit <i>BamHI</i> Sequenz
Gfra2 3'	5'-CGG AAT TCT ACT GGG CCA AGG TCA CCA TC-3'	3'-Klonierungsprimer für Gfra2 mit <i>EcoRI</i> Sequenz
Gfra2 360r	5'-CTT CGT AGA ACT CCT CAC CCT C-3'	3'-Primer für den Nachweis von Gfra2-cDNA
Gfra2 5'	5'-CGG GAT CCG TTA ACA TGA TCT TGG CAA ACG CC-3'	5'-Klonierungsprimer für Gfra2 mit <i>BamHI</i> Sequenz
Gfra2 ATG	5'-ATG ATC TTG GCA AAC GCC TTC TG-3'	5'-Primer für den Nachweis von Gfra2-cDNA
mret9 cDNA 1 F	5'-GGG GAT AGT CTG CCC TTC C-3'	5'-Sequenzierung von RET Konstrukten; bindet ab 625 bp der murinen RET CDS
mret9 cDNA 2 F	5'-GAA AGT CTG TGT GGA AAA CTG CC-3'	5'-Sequenzierung von RET Konstrukten; bindet ab 1275 bp der murinen RET CDS
mret9 cDNA 3 F	5'-CTG CCC TCT TCT CCC TTA TCA TCT-3'	5'-Sequenzierung von RET Konstrukten; bindet ab 1925 bp der murinen RET CDS
mret9 cDNA 4 F	5'-AGG ATG GGC CAC TTC TTC TC-3'	5'-Sequenzierung von RET Konstrukten; bindet ab 2390 bp der murinen RET CDS
PDZ GEF f	5'-GCT CGA GCC ATG AAA CCA CTA GCA ATC CCA GCT AAC CAT GG-3'	5'-Klonierungsprimer für Rap1-PDZ-GEF1 mit <i>XhoI</i> Sequenz und zum Einfügen der fehlenden AS-Sequenz Methionin, Lysin, Prolin und Leucin
PDZ GEF r	5'-ACC GCG GTC AAA CAG CAG AAA CTT GTT CAT C-3'	3'-Klonierungsprimer für Rap1-PDZ-GEF1 mit <i>SacII</i> Sequenz
PDZ1	5'-TGG AAA GAG CAG GGA CCA TA-3'	5'-Sequenzierung von Rap1-PDZ-GEF1 Konstrukten; bindet ab 455 bp der humanen CDS
PDZ2	5'-GTT TAA TGA CCC GAG CCT CA-3'	5'-Sequenzierung von Rap1-PDZ-GEF1 Konstrukten; bindet ab 945 bp der humanen CDS
PDZ3	5'-CCC CCA CCT TCC TAA AAT TG-3'	5'-Sequenzierung von Rap1-PDZ-GEF1 Konstrukten; bindet ab 1443 bp der humanen CDS
PDZ4	5'-TGA GGT CTC TGT CAC ACC TGA-3'	5'-Sequenzierung von Rap1-PDZ-GEF1 Konstrukten; bindet ab 1947 bp der humanen CDS
PDZ5	5'-CCT GGG AGA AAC TTC CCA AT-3'	5'-Sequenzierung von Rap1-PDZ-GEF1 Konstrukten; bindet ab 2462 bp der humanen CDS

Name	Sequenz	Verwendungszweck
PDZ6	5'-CCT GGT GAC AAA AAG CCT GT-3'	5'-Sequenzierung von Rap1-PDZ-GEF1 Konstrukten; bindet ab 3019 bp der humanen CDS
PDZ7	5'-TCT CAC TGC ACG ATG AGA GG-3'	5'-Sequenzierung von Rap1-PDZ-GEF1 Konstrukten; bindet ab 3482 bp der humanen CDS
Rap1a f	5'-CCT CGA GGT ATG CGT GAG TAC AAG CTA GTA G-3'	5'-Klonierungsprimer für Rap1a
Rap1a r	5'-GGA ATT CTA GAG CAG CAA ACA TGA TTT C-3'	3'-Klonierungsprimer für Rap1a
Ret +Kozak	5'-AGT CGA CGC GAT GGC GAA AGC GAC GTC-3'	5'-Klonierungsprimer für RET9 und RET51 + Kozak-Sequenz und <i>Sall</i> Sequenz
Ret f2922	5'-AGA CAA CTG CAG CGA GGA AAT G-3'	5'-Primer zur RET9/RET51 Überprüfung
Ret neu f	5'-CAA ACT CTA TGG CAT GTC AGA CCC GAA CTG G-3'	5'-Primer für die <i>site directed mutagenesis</i> von RET51
Ret neu r	5'-GTC TGA CAT GCC ATA GAG TTT GTT TTC AAT CC-3'	3'-Primer für die <i>site directed mutagenesis</i> von RET51
Ret5 5'	5'-AGT CGA CAT GGC GAA AGC GAC GTC CGG-3'	5'-Klonierungsprimer für RET9 und RET51 mit <i>Sall</i> Sequenz
Ret5 r370	5'-CTG GAG GAA GAT GGT GAG CAG-3'	3'-Primer für den Nachweis von RET-cDNA
Ret51 r	5'-CGG TAC CTT AGC TAT CAA ATG TGT CCA TTA AT-3'	3'-Klonierungsprimer für RET51 mit <i>KpnI</i> Sequenz
Ret51r-stop	5'-CGG TAC CGC GCT ATC AAA TGT GTC CAT TAA TTT TG-3'	3'-Klonierungsprimer für RET51 ohne Stopp-Codon mit <i>KpnI</i> Sequenz
Ret9 r	5'-CGG TAC CTA GAA TCT AGT AAA TGC ATG TGA-3'	3'-Klonierungsprimer für RET9 mit <i>KpnI</i> Sequenz
Ret9r-stop	5'-CGG TAC CGC GAA TCT AGT AAA TGC ATG TGA AAT-3'	3'-Klonierungsprimer für RET9 ohne Stopp-Codon mit <i>KpnI</i> Sequenz
revs	5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'	3'-Sequenzierung von Rap1-PDZ-GEF1
sp6	5'-CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'	3'-Sequenzierung von pGEM-T <i>Easy</i> Konstrukten
sp6m	5'-CGC CAA GCT ATT TAG GTG ACA C-3'	Modifizierter sp6 3'-Primer
T7	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	5'-Sequenzierung von pGEM-T <i>Easy</i> Konstrukten
Wdfy f	5'-GCT CGA GCG ATG GCG GCG GAG ATC CAG C-3'	5'-Klonierungsprimer für Wdfy2/ProF mit <i>XhoI</i> Sequenz
Wdfy nf_72AC	5'-CCT CCG ATG GCG GCG GAG ATC-3'	5'-Klonierungsprimer für <i>nested</i> PCR von Wdfy2/ProF
Wdfy nr_70AC	5'-CTT CAG GGA CAC TGT CTC CTA GTC-3'	3'-Klonierungsprimer für <i>nested</i> PCR von Wdfy2/ProF
Wdfy r	5'-CGG ATC CTC ATG ACA CCA CTG GGG TCA TG-3'	3'-Klonierungsprimer für Wdfy2/ProF mit <i>BamHI</i> Sequenz
YFP-C	5'-CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G-3'	5'-Sequenzierung von pEYFP-C1 Konstrukten
YFP-N	5'-GGG AGG TGT GGG AGG TTT T-3'	3'-Sequenzierung von pEYFP-C1 Konstrukten
YFP-N1f	5'-CGT GTA CGG TGG GAG GTC TA-3'	5'-Sequenzierung von pVenus-N1 Konstrukten

Alle Primer wurden von Invitrogen bezogen, in lyophilisiertem Zustand geliefert, auf eine Konzentration von 100 pMol/ μ L in ddH₂O gelöst und in 5 pMol/ μ L für PCR bzw. 10 pMol/ μ L für Sequenzierungen eingesetzt.

2.16 SOFTWARE UND INTERNETSEITEN

Software	Verwendungszweck
Adobe Acrobat 9 Pro (Adobe)	Formatierungssoftware
Adobe Photoshop CS3 (Adobe)	Bildbearbeitung
Aida 4.06.117 (Fuji)	LAS-Software
Blast 2.2.24 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)	Sequenzvergleich
Ecapt (Vilber Lourmat)	Agarosegel-Dokumentation
EndNote (Thomson Reuter)	Literaturverzeichnis
GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.)	Datenbearbeitung
http://scholar.google.de	Literaturrecherche
http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php	Restriktionsanalyse
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	Datenbankrecherche
i-Control 1.4 (Tecan)	Mikrotiterplatten-Fluoreszenzmessung
ImageJ 1.4.3 (http://rsbweb.nih.gov/ij)	Bildauswertung
Inkscape 0.48 (http://inkscape.org)	Vektorgrafik-Editor
Leica Application Suite 1.8.0 (Leica)	Fluoreszenzmikroskopie
MS Office 2010 (Microsoft)	Tabellen- und Dokumentbearbeitung
MS Windows 7 (Microsoft)	Betriebssystem
NanoDrop 3.1.0 (NanoDrop Technologies)	NanoDrop-Software
pDRAW32 1.1.93 (Acaclone Software)	DNA-Analysesoftware
Primer3 0.4.0 (http://45meri.wi.mit.edu/primer3/input.htm)	Ermittlung von Primersequenzen
Zen 2008 SP1.1 (Zeiss)	Konfokale Mikroskopie

3 METHODEN

3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.1.1 KULTIVIERUNG VON *E. COLI*-STÄMMEN

E. coli Stämme wurden in LB Medium als Flüssigkulturen oder auf LB Agar-Platten kultiviert. Bei Bedarf wurden das LB Medium bzw. die LB Agar-Platten zuvor mit Ampicillin (100 µg/mL) oder Kanamycin (50 µg/mL) versetzt. Die Kultivierung erfolgte jeweils bei 37 °C im Inkubator (LB Agar-Platten) bis zur Sichtbarkeit von Kolonien oder im Schüttelinkubator (LB Flüssigkulturen) bis zur gewünschten OD₆₀₀.

3.1.2 KRYOKONSERVIERUNG VON *E. COLI*-STÄMMEN

Zur Kryokonservierung von *E. coli*-Stämmen wurden die entsprechenden Kolonien auf einer LB Agar-Platte mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C inkubiert. In einem Kryoröhrchen wurde 1 mL einer 7 %igen DMSO-Lösung vorgelegt. Von der frisch bewachsenen LB Agar-Platte wurden Kolonien mit einem Zahnstocher bis zur Trübung der DMSO-Lösung transferiert. Die Kryokultur wurde umgehend bei -80 °C gelagert.

3.1.3 PLASMIDISOLIERUNG AUS *E. COLI*-FLÜSSIGKULTUREN

Die Aufreinigung plasmidischer DNA aus *E. coli*-Flüssigkulturen erfolgte unter Verwendung des QIAprep *Spin Miniprep Kits* gemäß Herstellerangaben (Handbuch Version 12/2006). Das hierbei verwendete Prinzip basiert auf alkalischer Lyse der Bakterien, Adsorption der DNA an eine Kieselgel-Matrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, mehreren Waschschritten und nachfolgender Elution der DNA. Von einer ü. N. kultivierten LB Flüssigkultur (3.1.1) wurden 4.5 mL schrittweise für 1 min bei 18,000 x g zentrifugiert und pelletiert. Die Lagerung der Plasmide erfolgte für bis zu 4 Wochen bei 4 °C, für längere Zeiträume bei -20 °C.

3.1.4 BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄURE-KONZENTRATION UND -REINHEITSGRAD

Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration und -Reinheit erfolgte am NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer. Hierzu wurden 2 µL der Nukleinsäurelösung eingesetzt und die Extinktionen bei 260 nm (Nukleinsäuren), 280 nm (Proteine) und 320 nm (Trübung) gemessen. Eine Extinktion von 1 bei

260 nm entspricht empirisch einer Konzentration von 50 µg/mL dsDNA, 40 µg/mL dsRNA oder 33 µg/mL ssRNA. Der Quotient $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der Nukleinsäure. Für DNA sollte er ≥ 1.8 und im Falle von RNA optimalerweise ≥ 2.0 betragen.

3.1.5 ENZYMATISCHE RESTRIKTION VON DNA

Die Hydrolyse von Plasmid-DNA erfolgte durch Restriktionsendonukleasen, die innerhalb ihrer meist palindromischen vier, sechs oder acht Basenpaare langen Erkennungssequenzen die DNA spezifisch schneiden können und dabei, je nach verwendetem Enzym, entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder kohäsive Enden (*sticky ends*) erzeugen (Nathans und Smith, 1975; Fuchs und Blakesley, 1983).

Analytische Restriktionen zur Überprüfung von Schnittstellen oder Plasmidgröße wurden mit folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

- 1 µL aufgereinigte Plasmid-DNA
- 1 µL 10x NEB-Puffer
- 1 µL 10x BSA (falls erforderlich)
- 0.1 µL Restriktionsenzym A
- 0.1 µL Restriktionsenzym B (falls erforderlich)
- ad 10 µL ddH₂O

Nach 1-stündiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad wurde der Reaktionsansatz mit 2 µL 6x DNA-Ladepuffer versetzt, über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Ergebnis dokumentiert.

Präparative Restriktionen wurden mit folgenden Reaktionsansätzen durchgeführt, wenn die DNA-Produkte in weiteren Klonierungsschritten verwendet werden sollten:

Zielvektor:

- 10 µL Plasmid-DNA des Zielvektors
- 6 µL 10x NEB-Puffer
- 6 µL 10x BSA (falls erforderlich)
- 1 µL Restriktionsenzym A
- 1 µL Restriktionsenzym B (falls erforderlich)
- ad 60 µL ddH₂O

Ausgangsvektor mit Insert:

- 10 µL Plasmid-DNA des Inserts
- 10 µL 10x NEB-Puffer
- 10 µL 10x BSA (falls erforderlich)
- 1 µL Restriktionsenzym A
- 1 µL Restriktionsenzym B (falls erforderlich)
- ad 100 µL ddH₂O

Nach einer Inkubation im Wasserbad für 2 h bei 37 °C wurde die plasmidische DNA je nach weiterem Verwendungszweck dephosphoryliert, ethanolpräzipitiert oder für

15 min bei 65 °C zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme inkubiert, mit 12 µL bzw. 20 µL 6x DNA-Ladepuffer versetzt und über präparative Agarose-Gelelektrophorese (3.1.6) aufgetrennt und isoliert.

3.1.6 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE VON DNA

Zur analytischen oder präparativen Auftrennung von DNA-Gemischen werden Agarose-Gele eingesetzt. Die Proben werden im Gel einem elektrischen Feld ausgesetzt, in dem die DNA aufgrund der Ladung des Phosphat-Rückgrats je nach Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit aufgetrennt wird. Je höher die Agarose-Konzentration des Gels ist, desto langsamer werden die Fragmente im elektrischen Feld separiert und desto kleiner können die aufgetrennten Fragmente sein.

Zur Agarose-Gelelektrophorese wurde die entsprechende Menge Agarose (0.8-1 % (w/v) für 1 kb bis 10 kb große Fragmente, 2 % (w/v) für Fragmente von 100 bp bis 1 kb) durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurde die Agaroselösung mit 0.01 % (v/v) Ethidiumbromidlösung versetzt, in eine Elektrophoresekammer gegossen und anschließend wurde ein Kamm eingesetzt. Die mit 6x DNA-Ladepuffer versetzten Proben wurden auf das Gel aufgetragen und eine Spannung von 80-100 V wurde angelegt. Nachdem die Bromphenolblau-Bande des Ladepuffers (bei 400 bp) etwa $\frac{3}{4}$ der Laufstrecke des Gels erreicht hatte, wurde das Gel auf den UV-Transilluminator gelegt. Da Ethidiumbromid in Nukleinsäuren interkaliert und dabei seine Fluoreszenz bei UV-Anregung stark zunimmt, konnten somit die DNA-Banden sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Eine Größenabschätzung der DNA-Fragmente erfolgte durch die gleichzeitige Elektrophorese von 5 µL einer DNA-Markierzusammensetzung definierter Basenpaarlängen (DNA-Marker 1 kb DNA *Ladder*, Invitrogen).

3.1.7 DNA-ISOLIERUNG AUS AGAROSE-GELFRAGMENTEN

Zur Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen wurden die entsprechenden Fragmente mittels Skalpell unter einem UV-Transilluminator ausgeschnitten und entweder über das *QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit* (Handbuch Version 02/1999) oder das *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* von Promega (Handbuch Version 01/2005) aufgereinigt.

3.1.8 DEPHOSPHORYLIERUNG PLASMIDISCHER DNA

Um eine Religation linearisierter plasmidischer DNA zu verhindern, wurde der Restriktionsansatz mit 1 U alkalischer Phosphatase für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15 min bei 65 °C inaktiviert.

3.1.9 PHENOLEXTRAKTION UND ETHANOLPRÄZIPITATION VON DNA

Bei dieser Methode wurde DNA, meist direkt anschließend an eine PCR, zuerst über eine Phenolextraktion aufgereinigt und anschließend zur Aufkonzentrierung durch Zugabe von Ethanol und Natriumacetat als Natriumsalz aus wässrigen Lösungen präzipitiert. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5.2 und mit 3/10 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gevortext und für 2 min bei 18,000 x g und RT zentrifugiert (Colter *et al.*, 1962). Die obere, wässrige Phase wurde mit dem 2.5-fachen Volumen an -20 °C kaltem absolutem Ethanol versetzt, gevortext und 10 min auf Trockeneis gelagert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C, 18,000 x g wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet mit dem 2.5-fachen des Ausgangsvolumens an -20 °C kaltem 70 %igem Ethanol überschichtet. Abschließend wurde erneut 1 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet bei 37 °C im Thermomixer getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

3.1.10 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN

T4-Ligasen katalysieren ATP-abhängig die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxygruppen zweier DNA-Doppelstränge (Ferretti und Sgaramella, 1981). Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden linearisierte, dephosphorylierte Plasmid-DNA und Insert-DNA in einem Agarosegel aufgetrennt. Die entsprechenden DNA-Banden wurden auf einem UV-Transilluminator aus dem Gel präpariert und aufgereinigt (3.1.7). Die Ligation erfolgte durch Zugabe von 2 U T4-DNA-Ligase für 2 h bei RT (kohäsive Enden) oder über Nacht bei 16 °C (*blunt ends*). Der folgende Ligationsansatz wurde verwendet:

0.5 µL	linearisierte, plasmidische DNA
12 µL	Insert-DNA
1.5 µL	10x T4-DNA-Ligase Puffer
1 µL	T4-DNA-Ligase

3.1.11 HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER *E. COLI*

Zur Herstellung elektrokompeter Zellen wurden 10 mL *E. coli* Flüssigkultur ü. N. kultiviert. Die Vorkultur wurde vollständig in 1 L LB Medium überführt und ca. 2 h bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3-0.35 kultiviert. Die Kultur wurde 20 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 5,000 rpm und 4 °C im SLA 1500-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 L kaltem, sterilem ddH₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 0.5 L kaltem, sterilem ddH₂O gewaschen, in 20 mL kaltem, sterilem 10 %igem Glycerin resuspendiert und in 40 µL Aliquots umgehend auf Trockeneis eingefroren. Die kompetenten *E. coli* wurden bei -80 °C kryokonserviert.

3.1.12 TRANSFORMATION DURCH ELEKTROPORATION

Zur Transformation von *E. coli* DH5α-Zellen wurde eine Elektroporation durch Perforation der bakteriellen Zellmembran mit kurzen elektrischen Impulsen bei einer Spannung von 1800 V durchgeführt, was die Zellen zur Aufnahme extrazellulärer plasmidischer DNA in das Zellinnere befähigt.

Zunächst wurde ein 40 µL-Aliquot elektrokompeter *E. coli* auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µL eines Ligationsansatzes wurde die Bakteriensuspension in eine vorgekühlte, UV-sterilisierte Elektroporationsküvette überführt. Anschließend erfolgte die Elektroporation bei 1800 V, bevor die Bakterien in 500 µL 37 °C warmen SOC-Mediums aufgenommen wurden. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad. Im Anschluss wurden 50 µL bzw. 450 µL der *E. coli* auf zwei vorgewärmten LB Agar-Platten mit zugesetztem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Im Falle von pGEM-T *Easy* waren die Platten zuvor mit IPTG/X-Gal für eine Blau-Weiß-Selektion versetzt (3.1.16). Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und ü. N. im 37 °C-Brutschrank inkubiert.

3.1.13 KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Vektor wurde die DNA mit für die Klonierungsstrategie geeigneten Restriktionsenzymen hydrolysiert (3.1.5). Die Fragmente wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (3.1.6) und aus dem Gel isoliert (3.1.7). Der Vektor wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert, dephosphoryliert (3.1.8) und analog aus Agarose-Gelfragmenten isoliert.

Das aufgereinigte DNA-Fragment wurde in den Vektor ligiert (3.1.10) und in *E. coli* transformiert (3.1.12).

3.1.14 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von Polynukleotiden. Sie kann zu analytischen oder auch präparativen Zwecken eingesetzt werden. Das Prinzip der PCR beruht auf Enzymen zur Replikation von DNA (DNA-Polymerasen), die unter definierten Bedingungen zu einem DNA-Einzelstrang einen komplementären Strang synthetisieren können. Der zu replizierende Bereich wird dabei durch die eingesetzten Primer spezifisch begrenzt. Die PCR durchläuft eine Anzahl immer gleicher Zyklen. In jedem Zyklus wird die Zahl der Template im Idealfall verdoppelt. Für eine PCR wurde standardmäßig folgender Ansatz pipettiert:

15.5 µL	ddH ₂ O
2 µL	10x PCR-Reaktionspuffer + Mg ²⁺
1 µL	Templat-DNA (~50 ng/µL)
0.5 µL	5'-Primer (5 pmol/µL)
0.5 µL	3'-Primer (5 pmol/µL)
0.4 µL	dNTPs (je 2.5 mM)
0.1 µL	DNA-Polymerase

Das Standard-Temperatur-Programm für eine PCR war:

30-40x {	1.	3 min	95 °C	
	2.	30 s	95 °C	Denaturierung
	3.	30 s	X °C	Anlagerung (Temperatur X ist Primer-spezifisch)
	4.	Y min	72 °C	Elongation (Y: ca. 1 min/kb)
	5.	5 min	72 °C	finale Elongation
	6.	∞	10 °C	Kühlung

Zum Nachweis des PCR-Produkts wurden 5 µL des PCR-Ansatzes mit 1 µL 6x DNA-Ladepuffer versetzt und über Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.1.14.1 ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE

Über mutagene Oligonukleotide, die als Primer in der PCR eingesetzt werden, können Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen in das zu amplifizierende Produkt eingefügt werden. Komplementäre Primer, die die gewünschte Mutation tragen, wurden in einer PCR mit plasmidischer Templat-DNA eingesetzt. Im Falle der Deletion größerer DNA-Bereiche wiesen die komplementären Primer Sequenzen von 20-25 Nukleotiden auf, die die zu deletierende Region flankieren. Zusätzlich wurde je ein Primer *up-* sowie *downstream* der zu amplifizierenden Fragmente als Rahmenprimer benötigt. Mit jeweils einem mutierten und einem Rahmenprimer wurden die zwei Fragmente des gewünschten PCR-Produkts getrennt amplifiziert.

Für die Amplifikation größerer PCR-Produkte wurde eine *Taq*-DNA-Polymerase verwendet und zur Gewährleistung hoher Genauigkeit eine *Pfu*-DNA-Polymerase im Verhältnis 1:15 beigemischt. Nach Aufreinigung und Aufkonzentrierung (3.1.9) wurden die Produkte als Primer und Templat zugleich in einer nachfolgenden PCR mit wenigen Zyklen und ohne weitere Templat-DNA eingesetzt. Da die Produkte im Bereich der mutierten Primer überlappen, können sie miteinander hybridisieren und verlängert werden. Im Idealfall konnten direkt in dieser PCR geringe Mengen der Rahmenprimer beigefügt werden, andernfalls wurde eine abschließende PCR zum Zusammenführen der Produkte durchgeführt. Der Standard-PCR-Ansatz für die ortsspezifische Mutagenese war wie folgt:

81.5 µL	ddH ₂ O
10 µL	PCR-Reaktionspuffer + Mg ²⁺
2 µL	5'-Primer (5 pmol/µL)
2 µL	3'-Primer (5 pmol/µL)
2.5 µL	dNTPs (je 2.5 mM)
1 µL	Templat-DNA (~50 ng/µL)
1 µL	DNA-Polymerase-Mix (<i>Taq:Pfu</i> (15:1))

Für die Zusammenführungs-PCR wurden je 0.5 µL PCR-Produkt aus den vorherigen beiden PCR-Ansätzen als Templat eingesetzt.

Anschließend erfolgte ü. N. eine Restriktion des PCR-Produkts mit dem Enzym *DpnI*, das spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet. Dadurch verblieb nur das neu amplifizierte, unmethylierte Produkt, das bei Bedarf direkt in den A/T-Vektor pGEM-T *Easy* (3.1.15) kloniert werden konnte (Weiner und Costa, 1994; Weiner *et al.*, 1994).

3.1.14.2 KOLONIE-POLYMERASE-KETTENREAKTION

Um *E. coli*-Kolonien auf die Vollständigkeit eines transformierten Konstruktes zu testen, ist die Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (Kolonie-PCR) eine etablierte Methode zum primären Ausschluss negativer Klone. Dabei wird durch die Auswahl zweier geeigneter Primer, wobei einer z. B. mit einem Bereich in der *multiple cloning site* (MCS) des Plasmids und der andere mit einem Bereich der Insert-DNA hybridisiert, ein kurzer Abschnitt des aufgenommenen Plasmids aus den Klonen über PCR qualitativ amplifiziert. Nur Klone, die das vollständige Plasmid oder zumindest ein Plasmid inkl. dem primerbindenden DNA-Insertfragment aufgenommen haben, führen zu Amplifikaten, die in der nachgeschalteten analytischen Agarose-Gelelektrophorese detektierbar sind.

Für die PCR-Reaktionsansätze wurde folgender PCR-Mastermix hergestellt:

9.2 $\mu\text{L} \times n$	ddH ₂ O
10 $\mu\text{L} \times n$	peqGOLD Master Mix Y
0.4 $\mu\text{L} \times n$	5'-Primer (5 pmol/ μL)
0.4 $\mu\text{L} \times n$	3'-Primer (5 pmol/ μL)

Dabei bezeichnet n die Anzahl der zu testenden Proben + 1. Für jede Probe betrug das Volumen des PCR-Mix 20 μL . Mit einem Zahnstocher wurde die entsprechende Kolonie aufgenommen und ein Sicherheitsausstrich auf einer LB Agar-Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum gemacht. Das restliche Zellmaterial wurde in dem zugehörigen PCR-Mix suspendiert.

Für die Kolonie-PCR wurde folgendes Temperatur-Programm verwendet:

31x	{	3 min	95 °C	Aufschluss der Bakterien
		30 s	95 °C	Denaturierung
		30 s	X °C	Anlagerung (Temperatur X ist Primer-spezifisch)
		Y min	72 °C	Elongation (Y: ca. 1 min/kb)
		5 min	72 °C	finale Elongation
		∞	10 °C	Kühlung

3.1.15 A/T-KLONIERUNG

Mit Hilfe der A/T-Klonierung können PCR-Produkte effizient in einen geeigneten Klonierungsvektor überführt werden. Der A/T-Klonierungsvektor pGEM-T *Easy* nutzt das Templat-unabhängige Hinzufügen eines Desoxyadenosins am 3'-Ende von PCR-Produkten einiger thermostabiler DNA-Polymerasen wie z. B. der *Taq*-DNA-Polymerase aus. Der linearisierte, an einer *EcoRV*-Restriktionserkennungssequenz gespaltene pGEM-T *Easy* verfügt über einen 3'-Thymidin-Überhang zu beiden Seiten, so dass die PCR-Produkte über Ligation der kohäsiven Enden ohne weitere enzymatische Behandlung effizient in den Vektor kloniert werden können.

Zunächst wurde mit dem PCR-Produkt eine Ethanolpräzipitation (3.1.9) durchgeführt. Die gefällte DNA wurde anschließend in 10 μL TE-Puffer gelöst. Wurde eine PCR mit Anteilen einer *Pfu*-Polymerase oder einer anderen DNA-Polymerase mit Korrekturaktivität durchgeführt, musste zum nachträglichen Hinzufügen des Desoxyadenosins am 3'-Ende folgender Ansatz für 20 min bei 72 °C im PCR-Thermocycler nachinkubiert werden:

10 μL	PCR-Produkt nach Ethanolpräzipitation
1.1 μL	10x PCR-Puffer + Mg ²⁺
0.25 μL	dNTPs (je 2.5 mM)
0.11 μL	<i>Taq</i> -Polymerase

Andernfalls konnte das PCR-Produkt direkt in pGEM-T *Easy* ligiert werden:

5 μ L	2x Ligationspuffer für pGEM-T <i>Easy</i>
3.7 μ L	PCR-Produkt nach Ethanolpräzipitation
0.3 μ L	pGEM-T <i>Easy</i>
1 μ L	T4 DNA Ligase

Die Ligation erfolgte ü. N. bei 16 °C. Anschließend folgte eine Transformation in *E. coli* (3.1.12), eine Plasmidisolierung aus *E. coli*-Flüssigkulturen (3.1.3), eine Kontrollrestriktion (3.1.5) und eine Sequenzierung zur Verifikation der DNA-Sequenz und der gewünschten Orientierung (3.1.17).

3.1.16 BLAU-WEIß-SELEKTION

Im Falle einer Klonierung über den pGEM-T *Easy*-Vektor konnte eine Blau-Weiß-Selektion auf Klone mit religiertem Plasmid durchgeführt werden. Bei diesem Vektor wird die MCS von den T7 und SP6 RNA-Polymerase Promotoren flankiert. Die MCS liegt in dem Bereich des *lacZ*-Gens, das für das α -Peptid der β -Galaktosidase kodiert. Durch die Insertion eines DNA-Fragments wird das α -Peptid und somit die β -Galaktosidase der Bakterienklone inaktiviert, wodurch rekombinante Klone direkt über eine Farbreaktion auf Indikatorplatten identifiziert werden können. Die LB Platten wurden dazu vor der Kultivierung transformierter *E. coli* mit 80 μ L X-Gal und 100 μ L IPTG behandelt. Klone mit religiertem Plasmid erschienen dabei nach Inkubation blau, Klone, die ein Plasmid mit DNA-Insert aufgenommen haben, weiß, da die korrekte Translation des *lacZ*-Gens durch das in die MCS insertierte DNA-Fragment verhindert wurde.

3.1.17 SEQUENZIERUNG VON DNA-KONSTRUKTEN

Alle Sequenzierungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an der *Sequencing Core Facility* am CeBiTec in Bielefeld durchgeführt (CeBiTec, Bielefeld). Dafür wurden je Sequenzierung mindestens 2 μ g plasmidischer DNA in einer Konzentration von 250 ng/ μ L verwendet und die Primer in 10 pMol/ μ L eingesetzt.

3.1.18 REVERSE TRANSKRIPTION VON RNA FÜR PCR

Mit Hilfe der reversen Transkription und anschließender Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) kann die Transkription eines Gens nachgewiesen werden. Für die Weiterverwendung kann eine aus Zelllysaten gewonnene mRNA-Probe mittels reverser Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben werden. Dieser Schritt erfolgt unabhängig von der eigentlichen

Polymerase-Kettenreaktion, es handelt sich also um eine sogenannte zweischrittige RT-PCR.

2 µg RNA wurden mit Hilfe des Omniscript RT Reagenziensatzes von QIAGEN (Handbuch Version 05/2004) in cDNA umgeschrieben. Der Reaktionsansatz wurde folgendermaßen pipettiert:

2 µg	RNA in DEPC-H ₂ O
1 µL	Rnasin
2 µL	RT-Reaktionspuffer
2 µL	<i>Random Primer</i>
2 µL	dNTPs (je 5 mM)
1 µL	reverse Transkriptase
ad 20 µL	DEPC-H ₂ O

Der reverse Transkriptase-Ansatz wurde im *Thermocycler* für 10 min bei 22 °C zur Anlagerung der Hexanukleotid-Zufallsprimer, für eine Stunde bei 42 °C, dem Temperaturoptimum der reversen Transkriptase, und für 5 min bei 99 °C zur Inaktivierung der Enzyme inkubiert.

Die cDNA-Lagerung erfolgte bei -20 °C. Im zweiten Schritt wurde eine Standard-PCR (3.1.14) mit 1 µL der cDNA als Templat durchgeführt. Als Kontrollen dienten Aktinprimer und eine Reinstwasserkontrolle (Mullis *et al.*, 1986).

3.1.19 REINIGUNG VON RNA AUS ADULTEM MÄUSEHERZGEWEBE

Zur Extraktion der RNA wurde die Guanidiniumthiocyanat-Methode verwendet (Chomczynski und Sacchi, 1987). Alle Geräte wurden zur Vermeidung von Rnase-Kontaminationen, soweit möglich, autoklaviert oder für 30 min mit 3 % H₂O₂ behandelt und anschließend mit DEPC-H₂O gespült. Weiterhin wurden Rnase-freie Plastik-Einmalartikel verwendet und Puffer aus geprüften, Rnase-freien Reagenzien angesetzt. Durch Zusatz des Rnase-Inhibitors Rnasin zu enzymatischen Reaktionsansätzen konnte Rnase-Aktivität ausgeschaltet werden.

100 mg gefrorenes Mäuseherzgewebe wurden in 1 mL RNA-Extraktionspuffer in einem 15 mL-Röhrchen am Ultraturrax für 30 s homogenisiert. Das Homogenat wurde nacheinander mit 100 µL 2 M Natriumacetat (pH 4.0), 1 mL H₂O-gesättigtem Phenol und 200 µL Chloroform-Isoamylalkohol (49:1) versetzt. Anschließend wurde die Suspension für 30 s stark durchmischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Im SS-34-Rotor (Sorvall) wurde bei 4 °C für 20 min und 10,000 x g die wässrige von der Phenolphase getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren durch Zugabe eines Volumens kalten Isopropanols für mindestens 1 h bei -20 °C gefällt. Die RNA wurde bei 4 °C, 18,000 x g für 15 min in

einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert und zweimal mit 500 µL eiskaltem, absolutem Ethanol gewaschen. Nach dem Lufttrocknen wurde das Präzipitat in 20-100 µL DEPC-H₂O aufgenommen. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde am NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (3.1.4) ermittelt, die Intaktheit der RNA-Probe nach Anfärbung mit Ethidiumbromid durch Auftrennung in einem MOPS-Agarose-Gel (3.1.21). Die gereinigte RNA wurde für den kurzfristigen Gebrauch bei -20 °C gelagert, die längerfristige Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

3.1.20 REINIGUNG VON RNA AUS EUKARYOTISCHEN ZELLEN

Für die Reinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen wurde eine Zellyse mit anschließender Abtrennung von DNA und Proteinen, die auf Kieselgel-Membran-Zentrifugensäulen basiert, durchgeführt. Das Protokoll erfolgte nach dem Promega *SV Total RNA Isolation System* (Handbuch Version 08/2005).

3.1.21 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE VON RNA

Zur Integritätsbestimmung aufgereinigter RNA kann eine elektrophoretische Auftrennung der mit Ethidiumbromid versetzten Probe in einem MOPS-Agarosegel erfolgen. Bei intakter RNA werden anschließend an die Elektrophorese unter UV-Licht Banden für die 28S und 18S rRNA sichtbar. Diese liegen für Eukaryoten typischerweise in einem Verhältnis von 2:1 vor.

Vorbereitend wurden die Elektrophoresekammer und der Kamm für die Taschen für mindestens 30 min mit einer 3 % H₂O₂-Lösung inkubiert, um RNasen zu inaktivieren. Für ein 1 %iges Agarosegel wurden 300 mg Agarose in 30 mL MOPS-Puffer (1x) in der Mikrowelle aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C in die Kammer gegossen. Nach einer Aushärtungszeit von ca. 30 min konnte MOPS-Puffer in die Kammer gegeben und das Gel beladen werden.

1 µg RNA wurde lyophilisiert und in 10 µL RNA-Probenpuffer mit Ethidiumbromid gelöst. Die Proben wurden für 10 min bei 72 °C erhitzt und danach 5 min auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung in einem 1 %igen Gel erfolgte für ca. 45 min bei 70 V (Hewlett *et al.*, 1977).

3.2 ZELLBIOCHEMISCHE METHODEN

3.2.1 KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN IN ZELLKULTUR

Eukaryotische, adhärente Zellen wurden alle 2-4 Tage passagiert (3.2.2) und wie zuvor beschrieben (2.13) geteilt. Die Kultivierung erfolgte standardmäßig in sterilen Zellkulturflaschen, -schalen oder -platten bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 99 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator.

3.2.2 PASSAGIEREN EUKARYOTISCHER ZELLEN

Zur Ablösung der Zellen einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit Trypsin/EDTA bedeckt und unter leichtem Schütteln in Suspension gebracht. Zum Abstoppen des Trypsins wurde DMEM-Vollmedium im Überschuss zugegeben. Die Zellen wurden bei 300 x g für 5 min pelletiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer entsprechenden Menge Medium resuspendiert. Zur weiteren Verwendung der Zellen wurde gegebenenfalls der Zelltiter in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (3.2.3) und die Zellen wurden in gewünschter Dichte in DMEM-Vollmedium ausgesät.

3.2.3 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Ein angefeuchtetes Deckglas wurde bis zur Ausbildung Newtonscher Ringe auf die Zählkammer gedrückt. Dann wurden 10 µL der Zellsuspension unter das Deckglas pipettiert und die vier großen Eckquadrate der Zählkammer ausgezählt. Die Zellkonzentration ergibt sich aus der Formel: Mittelwert x 10⁴ = Zellzahl / mL.

3.2.4 KRYOKONSERVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN

Um adhärente Zellen zu konservieren, wurden die Zellen einer konfluenten Zellkulturflasche trypsiniert und in kaltem PBS aufgenommen. Gegebenenfalls wurde der Zelltiter in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden 5 min bei 300 x g pelletiert. Das PBS wurde abgesaugt, das Pellet in vorgekühltem Einfriermedium (je nach Zelltyp, siehe 2.13) vorsichtig resuspendiert und auf die gewünschte Zellkonzentration (je nach Zelltyp, siehe 2.13) eingestellt. Alternativ wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 75 cm² Zellkulturflasche ohne Bestimmung des Zelltiters in 4 mL Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1 mL-Aliquots in vorgekühlte Kryoröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden ü. N. bei -80 °C und schließlich bei -150 °C konserviert.

3.2.5 REVITALISIERUNG KRYOKONSERVIERTER, EUKARYOTISCHER ZELLEN

Die kryokonservierten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen mit 0.5 mL warmem DMEM-Vollmedium vorsichtig mit einer 5 mL-Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen mit 12 mL vorgelegtem, warmem DMEM-Vollmedium überführt. Sie wurden bei 300 x g für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 5 mL warmem DMEM-Vollmedium resuspendiert und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Nach Kultivierung ü. N. wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um Reste von DMSO und abgestorbene Zellen zu entfernen.

3.2.6 PLL-BESCHICHTUNG VON DECKGLÄSERN UND ZELLKULTURPLATTEN

Zur Erhöhung der Adhärenz wurden Zellkulturflaschen und Deckgläser mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Sowohl Beschichtung als auch Lagerung des beschichteten Verbrauchsmaterials erfolgten bei 4 °C.

500-1000 Deckgläser wurden für eine Dauer von 24 h in konzentrierter HNO₃ geschüttelt und mehrfach mit ddH₂O gewaschen. Danach wurden die Deckgläser ü. N. in PLL-Lösung (0.1 mg/mL in PBS) unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurden die Deckgläser erneut mehrfach mit ddH₂O gewaschen, unter UV-Licht getrocknet und unter sterilen Bedingungen bei 4 °C gelagert.

Zur Beschichtung einer 12-Well-Zellkulturplatte wurde jedes Well mit 500 µL PLL-Lösung ü. N. geschüttelt. Nach Entfernung der PLL-Lösung und darauf folgender Trocknung der Zellkulturplatten unter UV-Licht erfolgte die Lagerung unter sterilen Bedingungen bei 4 °C. PLL-beschichtete Deckgläser und Zellkulturplatten wurden in der Regel innerhalb eines Monats verwendet.

3.2.7 LAMININ-BESCHICHTUNG VON DECKGLÄSERN UND ZELLKULTURPLATTEN

PLL-beschichtete Deckgläser und Zellkulturplatten wurden zusätzlich mit Laminin beschichtet, um eine noch höhere Zelladhärenz zu erreichen. Bereits PLL-beschichtete Deckgläser und Zellkulturplatten (3.2.6) wurden hierzu mit 20 µg/mL Laminin in DMEM-Basalmedium ü. N. bei 37 °C inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und nach Trocknung unter UV-Licht steril bei 4 °C gelagert. PLL/Laminin-beschichtete Deckgläser und Zellkulturplatten wurden in der Regel innerhalb eines Monats verwendet.

3.2.8 PFA-FIXIERUNG ADHÄRENTER, FLUOROPHOR-TRANSFIZIERTER ZELLEN

Zur mikroskopischen Analyse bestimmte Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert, einmal mit PBS gespült und mit 4 % PFA in PBS für 30 min bei RT im Dunkeln fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal 5 min mit PBS gewaschen und einmal 5 min zur Anfärbung der Zellkerne in 1:1000 (v/v) HOECHST in PBS inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS und einmal mit ddH₂O im Dunkeln gewaschen. Danach wurde das Deckglas mit Mowiol 4-88 mit der Zellseite nach unten auf einem Objektträger fixiert. Zur Aushärtung des Eindeckmediums wurden die Objektträger ü. N. bei RT im Dunkeln gelagert. Am nächsten Tag konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

3.2.9 PFA-FIXIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN ZUR IMMUNFLUORESCENZ

Für die PFA-Fixierung eukaryotischer Zellen, bei denen zusätzlich eine Immunfluoreszenz betrachtet werden sollte, wurden die Zellen wie gewohnt PFA-fixiert (3.2.8). Allerdings wurden sie zusätzlich nach der Fixierung und dem Waschen mittels 0.02 % Triton X-100 in PBS für 5-10 min bei RT permeabilisiert. Nach 3 weiteren Waschschrritten mit PBS wurden die Deckgläser mit 20 µL primärer Antikörperlösung (1:300 anti-Gfr α 1 bzw. 1:500 anti-Gfr α 2 in 1 % BSA in PBS) je Deckglas für 2 h inkubiert und wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper diente der rot fluoreszierende Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 Antikörper, der 1:200 in 1 % BSA in PBS eingesetzt wurde. Zusätzlich wurde zum Anfärben der Aktinfilamente FITC-Phalloidin im Verhältnis 1:100 zugesetzt. Die Zellen wurden für 1 h im Dunkeln mit dem Sekundärantikörper zuzüglich FITC-Phalloidin inkubiert, einmal gewaschen, HOECHST-gefärbt und eingedeckt (3.2.8). Am nächsten Tag konnten die Zellen am Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

3.2.10 TRANSFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN

3.2.10.1 Transfektion durch Lipofektion

Lipofektion ist eine Art der Transfektion von Säugerzellen, bei der die Transfektionsreagenzien positiv geladene Liposomen bilden, an die negativ geladene Plasmid-DNA binden kann. Diese Komplexe können von den Zellen internalisiert werden.

Für die Lipofektion mit Lipofectamin LTX wurden Neuro-2a bzw. B104 Zellen derart in 4-Well-Zellkulturplatten auf unbeschichteten Deckgläsern in DMEM-Vollmedium

ausgesät, dass ihre Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion 50-70 % betrug. Empirisch erwies sich eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen als geeignet. 2 µg aufgereinigte Plasmid-DNA wurden in 50 µL DMEM-Basalmedium vorgelegt, gevortext, mit 2.5 µL PLUS Reagenz versetzt und vorsichtig gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 2 µL Lipofectamin hinzugegeben, es wurde erneut gevortext und 30 min bei RT inkubiert. Bei den zu transfizierenden Zellen wurde das Medium gegen frisches DMEM-Vollmedium ersetzt und der Lipofectamin-DNA-Mix hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 4-6 h erfolgte zur Entfernung der zytotoxischen DNA-Liposomenkomplexe ein weiterer Mediumwechsel auf frisches DMEM-Vollmedium.

3.2.10.2 Transfektion mit FuGENE HD

FuGENE HD ist ein Multikomponenten-Transfektionsreagenz, das Komplexe mit DNA bildet und diese in eukaryotische Zellen transportiert.

Die Transfektion mit FuGENE HD erfolgte nach dem FuGENE HD Transfektionsreagenz Protokoll von Roche (Handbuch Version 11/2007). In Kürze: Einen Tag vor der Transfektion wurden 1.5×10^5 Neuro-2a Zellen pro Well einer 4-Well-Zellkulturplatte auf unbeschichteten Deckgläsern in DMEM-Vollmedium ausgesät (3.2.2). Für jedes Well wurden 500 ng plasmidischer DNA in 25 µL DMEM-Basalmedium verdünnt, mit 1 µL FuGENE HD, um ein Verhältnis von 2:1 von Transfektionsreagenz (µL) zu DNA (µg) zu erhalten, versetzt, gevortext, 15 min bei RT inkubiert und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Transfektionseffizienz wurde nach 48 h mikroskopisch ermittelt (3.2.8).

3.2.10.3 Transfektion mit NeuroFECT

NeuroFECT ist ein speziell für die Transfektion neuronaler Zellen geeignetes kationisches Polymer. Es bildet Komplexe mit DNA aus, die endozytotisch von den Zellen aufgenommen werden. Intrazellulär wird es zu kleineren, nicht zytotoxischen Molekülen abgebaut.

Die Transfektion mit NeuroFECT erfolgte nach dem NeuroFECT Transfektionsreagenz Protokoll von Genlantis (Handbuch Version 01/2006). In Kürze:

Einen Tag vor der Transfektion wurden 1.5×10^5 Neuro-2a Zellen pro Well einer 4-Well-Zellkulturplatte auf PLL-beschichteten Deckgläsern in DMEM-Vollmedium ausgesät (3.2.2). Für 2 Ansätze wurden 2 µg plasmidischer DNA in 100 µL DMEM-Basalmedium und 2.4 µL NeuroFECT in 100 µL DMEM-Basalmedium verdünnt, um ein 6:1 Verhältnis von Transfektionsreagenz (µg) zu DNA (µg) zu erhalten. Das

verdünnte NeuroFECT wurde tropfenweise in die DNA-Lösung pipettiert und vorsichtig gemischt. Zur Komplexbildung wurde der Ansatz 15-20 min bei RT inkubiert. Das Medium der zu transfizierenden Zellen wurde entfernt und gegen frisches DMEM-Basalmedium zuzüglich 100 μL des Transfektionsansatzes ausgetauscht. Die Transfektionseffizienz wurde nach 48 h mikroskopisch ermittelt (3.2.8).

3.2.10.4 Nukleofektion von B104 Säugierzellen

Für eine hocheffektive Transfektion der verwendeten Neuroblastomazelllinie B104 wurde die Nukleofektion nach Lonza durchgeführt. Bei dieser Transfektionsmethode erfolgt eine Elektroporation der Zellen, die eine direkte Transfektion von Plasmid-DNA in den Zellkern möglich macht und somit von der Zellteilung unabhängig ist.

Pro Transfektionsansatz zuzüglich einer Negativkontrolle wurden je 800 μL DMEM-Vollmedium in zwei Wells einer 4-Well-Zellkulturplatte mit Deckglas im Inkubator vortemperiert. Zusätzlich wurden 10 mL DMEM-Vollmedium pro Transfektionsansatz in 15 mL-Zentrifugenröhrchen auf 37 °C vorgewärmt. Anschließend wurden 2 μg der zu verwendenden aufgereinigten Plasmid-DNA in einem Eppendorfgemäß vorgelegt und pro Ansatz 82 μL Transfektionslösung L mit 18 μL Supplement 1 vermischt.

Ansätze inklusive einer Negativkontrolle:

Anzahl der Nukleofektionen+1	1	2	3	4	5	6	7	8
Volumen Transfektionslösung L [μL]	164	246	328	410	492	574	656	738
	+	+	+	+	+	+	+	+
Volumen Supplement 1 [μL]	36	54	72	90	108	126	144	162

Die Zellen einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche wurden 1x mit PBS gewaschen, mit 1.5 mL Trypsin/EDTA abgelöst, in 8.5 mL DMEM-Vollmedium resuspendiert und gezählt. Das Volumen an Zellsuspension für 1×10^6 Zellen pro Transfektion, zuzüglich 1×10^6 Zellen für die Negativkontrolle, wurde in einem 50 mL-Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 100 x g zentrifugiert und der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde im entsprechenden Volumen der angesetzten Transfektionslösung gelöst. Jeweils 100 μL wurden daraufhin mit der Plasmid-DNA vermischt und luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Zellen wurden mit der Programmeinstellung A-030 transfiziert, in die vorgewärmten 10 mL Medium überführt und abzentrifugiert (10 min, 100 x g). Das Pellet wurde in 200 μL DMEM-

Vollmedium resuspendiert und zu gleichen Teilen auf zwei Wells einer 4-Well-Zellkulturplatte aufgeteilt. Für die Negativkontrolle wurde der Elektroporations-schritt ohne Plasmid durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wurde nach 24 h mikroskopisch ermittelt (3.2.8).

3.2.12 STABILE TRANSFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN

Zur Generierung stabil transfizierter Klone wurden 5×10^5 Neuro-2a Zellen mittels Lipofektion (3.2.10.1) und 1×10^6 B104 Neuroblastomazellen mittels Nukleofektion (3.2.10.4) zunächst mit der gewünschten plasmidischen DNA in 6-Well-Zellkulturplatten transfiziert. Zur Selektion G418-resistenter, stabil exprimierender Klone wurden die Zellen 24 h *post transfection* (p. t.) in 1 mL Trypsin/EDTA pro Well abgelöst, mit 3 mL DMEM-Vollmedium verdünnt und anschließend in Verdünnungen von 50 μ L, 100 μ L, 250 μ L, 500 μ L und 1 mL auf 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel auf DMEM-Vollmedium mit Selektionsantibiotikum G418 (500 μ g/mL) durchgeführt (Shaw *et al.*, 1993; Toda *et al.*, 1999). Das Selektionsmedium wurde alle 2-3 d erneuert. Etwa 12-14 d p. t. waren einzelne G418-resistente Zellkolonien erkennbar. Die Schalen wurden daraufhin einmal mit PBS gewaschen und die Zellen einer vereinzelt Kolonie trypsiniert, indem ein Glaszylinder um den Klon platziert, mit Silikon abgedichtet und mit Trypsin/EDTA gefüllt wurde. Die einzelnen Kolonien wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette resuspendiert, auf 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät und in Selektionsmedium expandiert und kryokonserviert (3.2.4). In der Regel wurden 20-40 Klone aus jeder Transfektion erhalten und anschließend mikroskopisch (3.2.8) oder über ihr Proteinexpressionsniveau (3.3.3, 3.3.4) auf erfolgreiche Transfektion und Expression überprüft.

3.2.13 STIMULATION VON NEURO-2A SÄUGERZELLEN

Für Stimulationsexperimente wurden 1×10^6 Neuro-2a Zellen pro Well einer 6-Well-Zellkulturplatte in 2.5 mL DMEM-Vollmedium ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für 16 h in 1 mL DMEM-Basalmedium + 0.5 % FKS ausgehungert. Anschließend wurde die Stimulation (50 ng/mL GDNF bzw. 100 ng/mL NRTN in DMEM-Basalmedium) durchgeführt. Pro Versuchsreihe wurden 4 Wells für die Stimulationszeitpunkte 0, 15, 30 und 60 min und 1 Well für die Stimulationskontrolle (1 M Sorbitol, 15 min) benötigt. Die Zellen wurden für die entsprechende Zeit bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. 1 M Sorbitol löst durch osmotischen Stress die

Aktivierung des MAPK- und eine Herabregulierung des PKB/Akt-Signalweges aus und dient somit als Positivkontrolle für eine intakte Signalgebung der Zellen (Meier *et al.*, 1998; Aggeli *et al.*, 2001; Yoong *et al.*, 2005).

3.2.14 STIMULATION VON B104 SÄUGERZELLEN

Für Stimulationsexperimente wurden $3-4 \times 10^5$ B104 Zellen pro Well einer 12-Well-Zellkulturplatte in 1 mL Vollmedium ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel auf 500 μ L DMEM-Basalmedium und weitere 16 h später wurde die Stimulation (50 ng/mL GDNF bzw. 100 ng/mL NRTN in DMEM-Basalmedium) durchgeführt. Pro Versuchsreihe wurden 3 Wells für die Stimulationszeitpunkte 0, 10 und 60 min und 1 Well für die Stimulationskontrolle (1 M Sorbitol, 15 min) benötigt. Die Zellen wurden für die entsprechende Zeit bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Falle einer vorherigen Endozytosemodulatorbehandlung wurden die Zellen auf PLL/Laminin-beschichteten 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für 30 min vor und auch während der Stimulation bei 37 °C und 5 % CO₂ mit DMEM-Basalmedium zuzüglich 400 μ M Chloroquin, 40 μ M Dynasore, 80 μ M Dynasore oder 10 mM Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) Endkonzentration inkubiert. Im Falle einer vorherigen Behandlung der Zellen mit Sulf1 wurden die Zellen auf PLL/Laminin-beschichteten 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für 30 min vor der Stimulation bei 37 °C und 5 % CO₂ mit Sulf1-Enzymlösung inkubiert, die zuvor aus Zellkulturüberständen aufkonzentriert und in DMEM-Basalmedium umgepuffert wurde.

3.2.15 FÄRBUNG DER LYSOSOMEN MIT LYSOTRACKER

Zur Anfärbung azider Zellkompartimente wurden die Zellen in 4-Well-Zellkulturplatten auf unbeschichteten Deckgläsern bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert, das Medium wurde abgenommen und durch DMEM-Vollmedium mit 50 nM LysoTracker ersetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation unter Standardbedingungen im Inkubator. Die Zellen wurden PFA-fixiert und auf Objektträger aufgebracht (3.2.8).

3.2.16 BESTIMMUNG DER ZELLVITALITÄT

3.2.16.1 Bestimmung der Zellvitalität über Calcein-AM und Propidiumiodid

Der Anteil lebender Zellen nach der Stimulation mit Wachstumsfaktoren (3.2.13) wurde teilweise über die Behandlung mit den Chemikalien Calcein-AM und

Propidiumiodid bestimmt. Calcein-AM ist der Acetoxymethylester des Calcium-chelatierenden Fluorescein-Derivats Calcein. Der Ester wird über die Plasmamembran in die Zellen transportiert. Im Zellinneren wird die Acetoxymethylgruppe, die die Calcium-bindende Region des Moleküls maskiert, unspezifisch enzymatisch durch Esterasen gespalten, was bedingt durch die nun mögliche Calcium-Bindung an Calcein zu einer starken grünen Fluoreszenz führt. Calcein hat bei einem pH-Wert von 9 ein Anregungsmaximum bei 495 nm und ein Emissionsmaximum von 515 nm (Wang *et al.*, 1993b). Nur lebende Zellen besitzen die notwendigen aktiven Esterasen und zeigen somit eine Fluoreszenz.

Zur Bestimmung abgestorbener Zellen wurde der Farbstoff Propidiumiodid verwendet, der nur die perforierte Membran toter Zellen durchdringen kann und dort als Nukleinsäureinterkalator fungiert. Propidiumiodid weist ein Anregungsmaximum bei 488 nm und ein Emissionsmaximum bei 590 nm auf. Diese Maxima verschieben sich auf 535 nm bzw. 617 nm, wenn Propidiumiodid in DNA interkaliert (Jones und Senft, 1985).

N4TG3 Zellen wurden auf 4-Well-Zellkulturplatten zu 2.5×10^4 Zellen pro Well in DMEM-Vollmedium ausgesät (3.2.2), 24 h später für eine Dauer von 16 h in DMEM-Basalmedium + 0.5 % FKS ausgehungert und für 1-3 Tage mit 50 ng/mL GDNF stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 $\mu\text{g/mL}$ Calcein-AM und 2 $\mu\text{g/mL}$ Propidiumiodid versetzt und 1 h lang bei 37 °C unter Standardbedingungen inkubiert. Die Betrachtung und Auszählung der Zellen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Die vitalen und toten Zellen fünf zufällig ausgewählter Mikroskopfelder wurden gezählt und zwei Wells je Experiment wurden ausgewertet.

3.2.16.2 Bestimmung der Zellvitalität über Trypanblau

Abgestorbene Zellen können alternativ zu Propidiumiodid mit Trypanblau angefärbt werden.

Vitale Zellen nehmen den Diazofarbstoff nicht auf, in abgestorbene Zellen kann der Farbstoff eindringen. Innerhalb der Zelle bindet Trypanblau an Proteine, wodurch die Zelle eine dunkelblaue Färbung erhält.

Eine zuvor trypsinierte Zellsuspension (3.2.2) wurde für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert und das serumhaltige Medium vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde in 1 mL PBS resuspendiert. Daraufhin wurden 20 μL der Zellsuspension mit 80 μL einer 0.5 %igen (w/v) Trypanblaulösung in PBS versetzt, gemischt und für 2-3 min bei RT

inkubiert. Hiervon wurden 10 μL in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen sofort ausgezählt (3.2.3), da Trypanblau zytotoxisch ist. Der Anteil vitaler Zellen wurde über das Verhältnis nicht gefärbter zu der Gesamtzahl ungefärbter und blau gefärbter Zellen ermittelt.

3.2.16.3 Bestimmung der Zellvitalität über Resazurin

Der Farbstoff Resazurin (blau, nicht fluoreszierend) wird von lebenden Zellen zu Resorufin (pink, stark fluoreszierend) und anschließend weiter zu Hydroresorufin (farblos, nicht fluoreszierend) reduziert (Abb. 3.1).

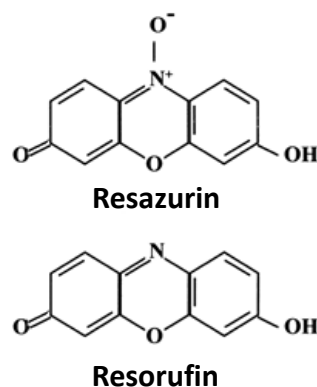


Abb. 3.1: Struktur von Resazurin und Resorufin

NG108-15, NH15-CA2, N18TG2, N4TG3 oder NS20Y Zellen wurden zu 1×10^4 , 5×10^3 oder 2.5×10^3 Zellen pro Well und Stimulationstest für eine 5-fach-Bestimmung in DMEM-Basalmedium in einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe von 2,000, 4,000, 6,000, 8,000 und 10,000 Zellen je Zelllinie in einer 96-Well-Zellkulturplatte angesetzt. Zudem wurden Negativkontrollen mit Zellen ohne Wachstumsfaktor und mit Medium ohne Zellen angelegt. Nach 16 h wurden die Zellen mit 50 ng/mL GDNF stimuliert. Nach 2-4 d Inkubation wurden pro Well 20 μL Resazurininlösung (175 μM) zu den Zellen pipettiert und die Zellen für 6 h inkubiert. Die Fluoreszenz bei 588 nm (Anregung: 530 nm) wurde am *Tecan Reader* vermessen (O'Brien *et al.*, 2000).

3.2.17 NEURITENWACHSTUMSTEST

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung und das Neuritenwachstum von Zellen mit neuronalen Eigenschaften wurden 1×10^5 Zellen pro Well einer 4-Well-Zellkulturplatte auf PLL-beschichteten

Deckgläsern in DMEM-Vollmedium ausgesät, 24 h später für 16 h in DMEM-Basalmedium, DMEM-Basalmedium + 0.5 % FKS oder DMEM-Basalmedium + 0.5 % HS ausgehungert und mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor für 1-3 d inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet sowohl die differenzierten als auch die undifferenzierten Zellen in fünf zufällig ausgewählten Mikroskopfeldern auf je zwei Wells pro Experiment gezählt. Ab einer Neuritenlänge des doppelten Zelldurchmessers wurde eine Zelle als differenziert gewertet.

3.2.18 ENDOZYTULOSE VON FLUORESZENZ-MARKIERTEM TRANSFERRIN

Die Aufnahme von Transferrin über Transferrin-Rezeptoren ist ein gut verstandener Prozess, mit dessen Hilfe die Endozytosemaschinerie einer Säugerzelllinie unter diversen Bedingungen überprüft werden kann. Die Transferrin-Moleküle sind hierzu an den Alexa Fluor 555-Farbstoff gekoppelt, der fluoreszenzmikroskopisch detektierbar ist.

Zur Untersuchung der Transferrin-Aufnahme wurden 1×10^5 B104 Zellen pro Well in 4-Well-Zellkulturplatten mit PLL- oder PLL/Laminin-beschichteten Deckgläsern ausgesät und nach 20 h für 5 h in DMEM-Basalmedium unter Standardbedingungen ausgehungert. Es folgte eine 10-minütige Inkubation in DMEM-Basalmedium einmal mit und einmal ohne entsprechenden Endozytosemodulator (60 μM Dynasore bzw. 300 μM Chloroquin). Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden zur Anlagerung des Transferrin-Konjugates für 15 min mit 5 μg Alexa Fluor 555-Transferrin in 500 μL DMEM-Basalmedium auf Eis im Dunkeln inkubiert. Zur Aufnahme des Transferrin-Konjugates wurden die Zellen einmal mit DMEM-Basalmedium mit den entsprechenden Endozytosemodulatoren gewaschen und bei 37 °C in gleichem Medium für die gewünschte Zeit der zu untersuchenden Transferrin-Aufnahme (0 bzw. 7 min) auf vortemperierten Metallblöcken unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend zum Stoppen der Endozytose zügig auf 4 °C abgekühlt. Um nicht endozytiertes Transferrin, das noch rezeptorgebunden auf der Plasmamembran vorliegt, zu entfernen, wurden alle Ansätze einmal mit kaltem PBS gespült und für 15 min mit kaltem Natriumacetat-Waschpuffer (pH 4.6) auf Eis gewaschen. Nach zwei weiteren Spülschritten mit kaltem PBS wurden die Zellen weitestgehend unter Lichtausschluss PFA-fixiert (3.2.8; (Macia *et al.*, 2006; Kirchhausen *et al.*, 2008)).

3.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.3.1 HERSTELLUNG VON PROTEINEXTRAKTEN

Zur Herstellung von Proteinextrakten frischen murinen Gewebes wurden vier frisch isolierte, adulte Mäuseherzen in ein gekühltes Röhrchen mit Rundboden vorgelegt und mit der 8-fachen Menge RIPA-Puffer + 0.2 % (v/v) PMSF (gesättigte Lösung) versetzt. Das Gewebe wurde am Ultraturrax zerkleinert, auf Eppendorfgefäße verteilt und für 5 min bei 4 °C und 10,000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Zur Untersuchung des Expressionsmusters von Säugerzellen in Zellkultur, z. B. nach Stimulation oder Transfektion der Zellen, wurden Proteinextrakte für eine anschließende SDS-Gelelektrophorese (3.3.3) hergestellt. Hierzu wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und mit 120 µL bzw. 300 µL Lysispuffer (2.7) pro Well einer 12-Well- bzw. 6-Well-Zellkulturplatte versetzt. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Im Falle der Stimulationsexperimente mit vorheriger MβCD- oder Chloroquin-Inkubation der Zellen wurden zusätzlich die Medium-Überstände vor dem Waschschrift abgenommen und bei 1,000 x g für 5 min abzentrifugiert. Währenddessen wurden die Zellen in den Wells gewaschen, in Lysispuffer abgeschabt und durch Scherkräfte homogenisiert. Anschließend wurden die Pellets einmal mit PBS gewaschen und in dem Lysispuffer, der die bereits abgeschabten Zellen enthielt, resuspendiert. Dieser Schritt erwies sich als notwendig, da MβCD und Chloroquin die Salzkonzentration des Mediums veränderten und zu einer stark erniedrigten Adhärenz der Zellen führten.

3.3.2 BRADFORD-PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Zur Messung des Proteingehalts von Zellextrakten wurden 3 bzw. 9 µL des jeweiligen Extrakts in je 1 mL PBS verdünnt und Proteinstandards mit 0, 1, 2.5, 5, 10, 15 und 25 µg/mL BSA in PBS angesetzt. Alle Proben und Standards wurden gevortext, mit 200 µL Bradford-Reagenz versetzt und mehrfach invertiert. Nach Transfer von 300 µL je Probe und Standard auf eine transparente 96-Well-Mikrotiterplatte und 5-minütiger Inkubation bei RT wurde die OD₅₉₅ am *Tecan Reader* gemessen. Aus den OD₅₉₅-Werten der Standardlösungen wurde eine Kalibriergerade erstellt, über deren Steigung die Proteinkonzentration der Proben errechnet wurde.

3.3.3 SDS-GELELEKTROPHORESE

Die Auftrennung von Proteingemischen nach molekularer Masse wurde durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erreicht (Laemmli, 1970). Dabei maskiert SDS die Proteine mit einer negativen Nettoladung, so dass die Laufgeschwindigkeit der Proteine in der Elektrophorese nur noch von deren molekularer Masse abhängt. Um eine höhere Bandenschärfe zu erlangen, wurde ein diskontinuierliches Gel verwendet, in dem zunächst die Proben in einem Sammelgel aufkonzentriert und anschließend im Trenngel aufgetrennt werden. Die Geldicke wurde durch 1 mm dicke *Spacer* bestimmt. Trenn- und Sammelgel wurden bei RT für ca. 30 min polymerisiert. Nach dem luftblasenfreien Einbau des Gels in die Laufkammer wurde es mit SDS-Laufpuffer überschichtet. Das Gel wurde mit den zuvor mit 3x Laemmlipuffer + β -Mercaptoethanol versetzten und für 5 min bei 95 °C erhitzten Proben beladen. Die Elektrophorese wurde mit 80-100 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront das Ende des Gels fast erreicht hatte. Die Gele wurden umgehend auf Nitrozellulosemembran transferiert (3.3.4).

Komponente	11 %iges Trenngel	12.5 %iges Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	1.8 mL	1.6 mL	1 mL
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 mL	1.25 mL	-
1 M Tris-HCl pH 6.8	-	-	190 μ L
Acryl-/Bisacrylamidmischung	1.85 mL	2.1 mL	280 μ L
10 %iges SDS	50 μ L	50 μ L	15 μ L
10 %iges APS	50 μ L	50 μ L	15 μ L
TEMED	2.5 μ L	2.5 μ L	2 μ L

3.3.4 WESTERN BLOT

Der Transfer von im SDS-Gel aufgetrennten Proteinen auf eine geeignete Trägermembran, z. B. aus Nitrozellulose, Nylon oder PVDF (Polyvinylidenfluorid), wird als Western Blot bezeichnet.

Für diese Methode wurden zunächst 6 Stücke Whatman-Papier und eine Nitrozellulosemembran auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Nitrozellulosemembran wurde für 5 min in *Semi-Dry*-Puffer befeuchtet. Auch das Whatman-Papier und das Polyacrylamidgel wurden kurz in *Semi-Dry*-Puffer getränkt. Dann wurden drei Lagen Whatman-Papier, die Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und nochmals drei Lagen Whatman-Papier in dieser Reihenfolge luftblasenfrei übereinander auf die untere Elektrode einer Blot-Apparatur geschichtet. Die obere Elektrode der Blot-Apparatur wurde aufgesetzt, mit einem zusätzlichen Gewicht beschwert, die

Spannungsquelle angeschlossen (positiver Pol unten, negativer Pol oben) und der Transfer für etwa 1 h mit 100 mA durchgeführt. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran anschließend kurz mit ddH₂O gespült, zur unspezifischen Proteinmarkierung in Ponceau-S Lösung (0.2 % Ponceau-S in 3 % TCA) geschwenkt und mit ddH₂O bis zur Hintergrund-Entfärbung gespült. Das Ergebnis wurde dokumentiert und die Membran entweder sofort weiter verwendet oder getrocknet und dunkel gelagert.

3.3.5 IMMUNFÄRBUNG EINES WESTERN BLOTS

Bei der Immunfärbung eines Western Blots (Immunblot) werden Protein-Antigene unter Verwendung von Antikörpern sichtbar gemacht. Dazu wird zunächst ein primärer Antikörper benötigt, der das nachzuweisende Antigen spezifisch bindet. Anschließend wurde mit einem an Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Enzym gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, der den Primärantikörper bindet. Unter Zugabe von H₂O₂ und Luminol katalysiert HRP eine Lichtreaktion, die als Chemilumineszenz mit Hilfe einer *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Kamera sichtbar gemacht werden kann.

Die restliche Bindungskapazität der Nitrozellulosemembran wurde durch 1-stündige Inkubation bei RT in Blockierungslösung mit Milchpulver abgesättigt. Für die Stimulationsanalyse der B104-Zellen (3.2.14) wurde phosphatfreies Blotto (2 % Milchpulver in TTBS), in allen anderen Fällen wurde Blotto aus 2 % Milchpulver in PBS-T verwendet. Die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockierungslösung erfolgte für 2 h bei RT oder zur Verringerung unspezifischer Reaktionen ü. N. bei 4 °C. Nach dreimaligem 5-minütigem Waschen mit PBS-T oder phosphatfrei mit TTBS wurde die Membran für 1 h bei RT mit Sekundärantikörper in PBS-T bzw. TTBS inkubiert und erneut entweder fünfmal mit PBS-T und einmal mit PBS oder phosphatfrei dreimal mit TTBS gewaschen. Die Membran wurde für eine Minute mit den *SuperSignal West Pico Enhanced Chemiluminescence*-Lösungen bedeckt, luftblasenfrei zwischen Polyethylenfolien gelegt und die Chemilumineszenz mit dem LAS 3000-System aufgezeichnet.

3.3.6 DENSITOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG VON ECL-SIGNALEN

Die densitometrische Quantifizierung der ECL-Signale der Western Blot-Immunfärbungen erfolgte durch die ImageJ-Software. Es wurde eine Pixelintensitätsmessung über eine definierte Fläche, die das ECL-Signal der jeweiligen

Proteinbande enthielt, durchgeführt und die im Folgenden beschriebenen Endwerte jeweils relativ zueinander verglichen. Für die Erstellung der Graphen und die Auswertung der Stimulationsexperimente wurde die jeweilige Intensität des unstimulierten Nullminutenwerts auf den Wert 1 normiert. Die dazugehörigen Stimulationswerte wurden hierzu in Relation gesetzt. Anschließend wurde das Verhältnis der phosphorylierten Kinasen zur Proteingesamtmenge der Kinasen am jeweiligen Stimulationszeitpunkt bestimmt. Sollten auch die Nullminutenwerte untereinander verglichen werden, so wurden alle Werte auf den Nullminutenwert der unstimulierten Kontrolle bezogen. Lediglich Versuche mit Anstieg des pErk1/2-Niveaus bzw. Verringerung des pAkt-Niveaus durch die Sorbitol-Stimulationskontrolle gingen in die Auswertung ein. Die Werte wurden mittels eines ungepaarten t-Tests auf statistische Signifikanz (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$) überprüft.

3.3.7 STRIPPEN VON NITROZELLULOSEMEMBRANEN

Eine bereits mit ECL-Reagenz entwickelte Nitrozellulosemembran kann zur Wiederverwendung für eine erneute Primärantikörperinkubation mit Strip-Puffer behandelt werden, um bereits gebundene Antikörperkomplexe zu entfernen. Hierzu wurde die Membran dreimal für 5 min mit ddH₂O und anschließend für 1 h bei RT mit Strip-Puffer (2.7) auf dem Schüttler inkubiert. Unspezifische Bindungen wurden für 30 min in Blockierungslösung abgesättigt, so dass die Membran für eine weitere Primärantikörperinkubation verwendet werden konnte.

4 ERGEBNISSE

4.1 MODELLSYSTEME ZUR UNTERSUCHUNG UND MODIFIKATION RET-VERMITTELTER SIGNALTRANSDUKTION

Zur Untersuchung der GDNF- und NRTN-vermittelten Signalwege und der entsprechenden Einflüsse des Rezeptors RET und der Korezeptoren *Gfra1* und *Gfra2* an der Signalgebung sollten geeignete neuronale Modellsysteme und Methoden etabliert werden.

4.1.1 EXPRESSION VON KOMPONENTEN DER GFL-INDUZIERTEN SIGNALTRANSDUKTION

Die zur Verfügung stehenden Neuroblastomazelllinien N4TG3, NS20Y, N18TG2 und Neuro-2a (N2a) sowie die Hybridomazelllinien NH15-CA2 und NG108-15 wurden zunächst auf die Expression beteiligter Signalkomponenten hin untersucht. Mit entsprechenden Oligonukleotiden wurde mit einer PCR auf vorhandene cDNA und rückschließend auf die zelllinienspezifische mRNA-Expression für die Rezeptor-Isoformen RET9 und RET51 und für den am GDNF-Signalkomplex beteiligten *Gfra1*-Korezeptor getestet (Abb. 4.1).

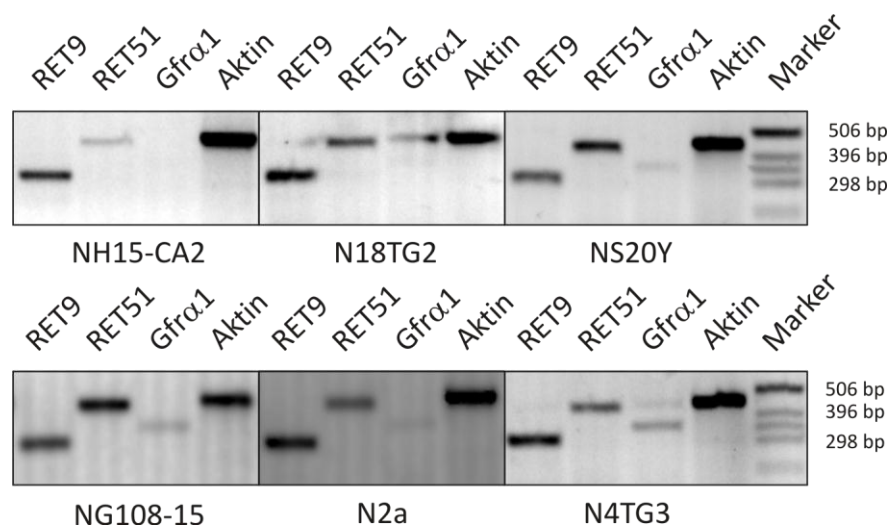


Abb. 4.1: Expressionsmuster ausgewählter neuronaler Zelllinien für RET9, RET51 und *Gfra1*

Alle dargestellten Zelllinien exprimieren mRNA der RET-Isoformen RET9 und RET51. Alle außer NH15-CA2 exprimieren mRNA für *Gfra1*. Von allen aufgeführten Neuroblastoma- und Hybridomazelllinien wurden Zellextrakte erstellt, aus denen mRNA isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde. Die cDNA wurde über PCR (30 Zyklen) mit den Primern *Gfra1* 5' und *Gfr350r* auf die Anwesenheit von *Gfra1*, mit Ret f2922 und Ret9 r auf *RET9*, mit Ret f2922 und Ret51 r auf *RET51* und mit Aktin 5' und Aktin 3' auf intakte cDNA über die Anwesenheit von Aktin-cDNA überprüft. Die jeweilige Bande bei 300 bp entspricht dem *RET9* Fragment, die bei 430 bp dem *RET51* Fragment, die bei 350 bp dem *Gfra1* Fragment und die bei 428 bp dem Aktin cDNA-Fragment. Marker: 1 kb DNA Ladder, (2 %iges Agarosegel).

Alle untersuchten Zelllinien neuronaler Herkunft weisen mRNA-Expression für die RET-Isoformen RET9 und RET51 auf. Anhand der Bandenintensität kann eine Abschätzung des Expressionsniveaus der Signalkomponenten vorgenommen werden. Außer für die Hybridomazelllinie NH15-CA2 traten bei allen Zelllinien Banden für Gfr α 1 im Gel auf, die im Allgemeinen eine schwache Intensität besaßen. Bei N4TG3 war die stärkste Ausprägung zu detektieren. Für die Neuroblastomazelllinien N18TG2 und N4TG3 trat eine zusätzliche Bande bei etwa 430 bp in der Gfr α 1-Spur auf, die einer Kontamination von Aktin-cDNA zuzuordnen ist.

Aufgrund der allgemein schwachen Bandenintensität für die Gfr α 1 mRNA-Expression wurde hierfür eine erneute PCR mit höherer Zyklenzahl für alle verwendeten Zelllinien durchgeführt (Abb. 4.2).

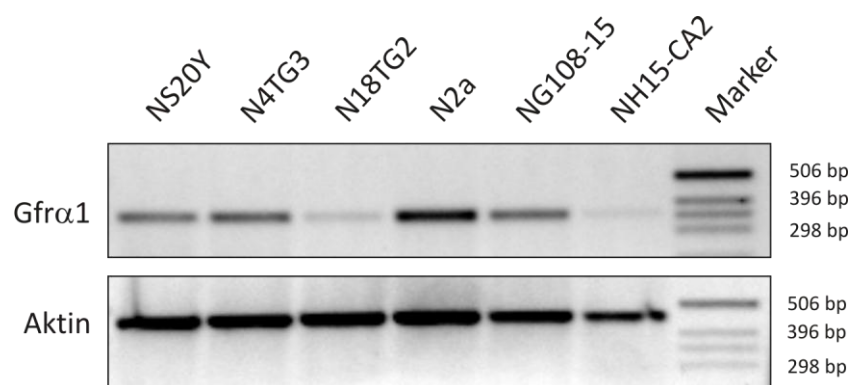


Abb. 4.2: Gfr α 1-Expression der Zelllinien NS20Y, N4TG3, N18TG2, N2a, NG108-15 u. NH15-CA2

Alle getesteten neuronalen Zelllinien exprimieren mRNA für Gfr α 1. Die cDNA der verwendeten Zelllinien wurde mit höherer Zyklenzahl (35x) erneut über PCR amplifiziert und mit den Primern Gfr α 1 5' und Gfr350r auf die Anwesenheit von *Gfr α 1* und mit den Primern Aktin 5' und Aktin 3' auf cDNA überprüft. Die jeweilige Bande bei 350 bp entspricht dem *Gfr α 1* Fragment und die bei 428 bp dem Aktin cDNA-Fragment. In der verwendeten Negativkontrolle mit der mRNA als PCR-Templat traten keine Banden auf (nicht dargestellt). Marker: 1 kb DNA Ladder, (2 %iges Agarosegel).

Alle getesteten Zelllinien exprimieren mRNA für Gfr α 1. Durch die höhere Zyklenzahl in der PCR konnte nun auch eine schwache Bande für NH15-CA2 detektiert werden. Neuro-2a Zellen zeigten im Vergleich zum vorherigen Experiment eine stark erhöhte Signalintensität für die Gfr α 1 mRNA (vgl. Abb. 4.1).

Auf Proteinebene konnte kein sicherer Nachweis der Gfr α 1-Expression der untersuchten Zelllinien erbracht werden, da sich die Spezifität des verwendeten Antikörpers gegen Gfr α 1 als sehr gering herausstellte. Aus Mangel an geeigneten Positiv- und Negativkontrollen für die Gfr α 1-Expression konnte daher an dieser Stelle nach mehreren Versuchen keine eindeutige Zuordnung der unterschiedlichen Signale

erfolgen (nicht dargestellt). Gegen die RET-Isoformen stand kein Antikörper zur Verfügung.

4.1.2 VITALITÄTSTESTS NACH GDNF-STIMULATION

Um zu überprüfen, ob GDNF als potenter Überlebensfaktor für die untersuchten neuronalen Zelllinien wirksam ist, wurden verschiedene Methoden unter variablen Bedingungen getestet. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Konzentrationsdichten ausgesät, in verschiedenen Minimalmedien ausgehungert, mit GDNF stimuliert und nach 2-4 Tagen untersucht.

Die Bestimmung der Viabilität durch Trypanblau stellte sich für die gewünschten Zwecke als wenig geeignet heraus, da die Zellen hierfür in Suspension gebracht werden mussten. Dieser Prozess sorgte für einen heterogenen Zellverlust und verhinderte gleichzeitig die gewünschte Betrachtung des Neuritenwachstums.

Anhand der Neuroblastomazelllinie N4TG3 wurde die Calcein- und Propidiumiodid-abhängige Methode zur Bestimmung des Verhältnisses vitaler zu abgestorbenen Zellen getestet. Die Zellen waren sowohl auf unbeschichteten als auch auf PLL-beschichteten Deckgläsern bereits nach zwei Tagen nicht mehr homogen verteilt. Stattdessen zeigten sich eine Migration vitaler Zellen an den Rand des Deckglases und die Akkumulation abgestorbener Zellen in zentralen Bereichen. Bei der Auswahl fünf zufällig ausgewählter Mikroskopfelder traten somit stärkere Schwankungen auf. Um den Anteil vitaler Zellen statistisch verlässlich zu bestimmen, wurden einmal alle Bereiche aufgenommen und ausgezählt (Abb. 4.3).

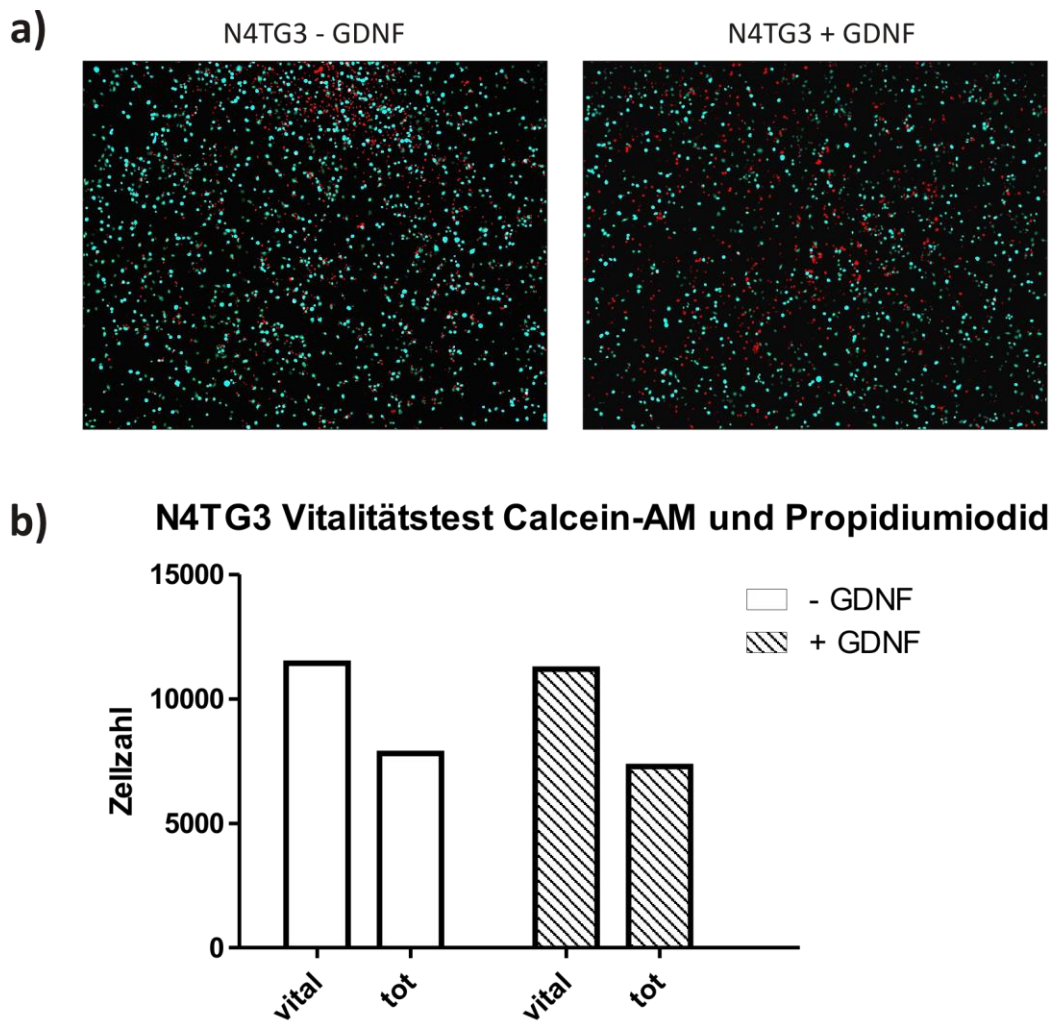


Abb. 4.3: Calcein-AM/PI-Vitalitätstest von N4TG3 Neuroblastomazellen nach GDNF-Stimulation

GDNF zeigte keinen Effekt auf das Überleben von N4TG3 Neuroblastoma-Zellen in Kultur. Dargestellt sind **a)** beispielhafte Fluoreszenzaufnahmen (vitale Zellen türkis und abgestorbene rot dargestellt) in 200-facher Vergrößerung und **b)** das Verhältnis von vitaler (Calcein-gefärbt) zu abgestorbenen (PI-gefärbt) Zellen 3 d ohne Stimulation und 3 d nach Stimulation mit 50 ng/mL GDNF. Die Zellen wurden zuvor für 16 h in DMEM 0.5 % FKS ausgehungert. Ausgezählt wurden ca. 19.000 Zellen pro Versuchsteil. Aufgrund der hohen Anzahl gezählter Zellen wurde das Ergebnis als repräsentativ angenommen. AM: Acetoxymethylester; PI: Propidiumiodid.

Das Verhältnis von vitalen zu abgestorbenen N4TG3 Zellen in Kultur blieb nach 3 d Stimulation mit 50 ng/mL GDNF konstant. GDNF ist somit kein potenter Überlebensfaktor für N4TG3 Neuroblastomazellen.

Zur Vermeidung des bei den mikroskopischen Methoden auftretenden Problems der heterogenen Zellverteilung wurde versucht, die Zellvitalität photometrisch zu bestimmen. Der nicht fluoreszente Farbstoff Resazurin wird von lebenden Zellen zu dem stark fluoreszierenden Resorufin umgewandelt. Über eine Standardkurve der Resazurin-Umsetzung verschiedener Zelldichten konnte der Anteil lebender Zellen nach GDNF-Stimulation an den Gfr α 1-exprimierenden Zelllinien NG108-15, NH15-CA2, NS20Y, N4TG3 und N18TG2 photometrisch abgeschätzt werden (Abb. 4.4).

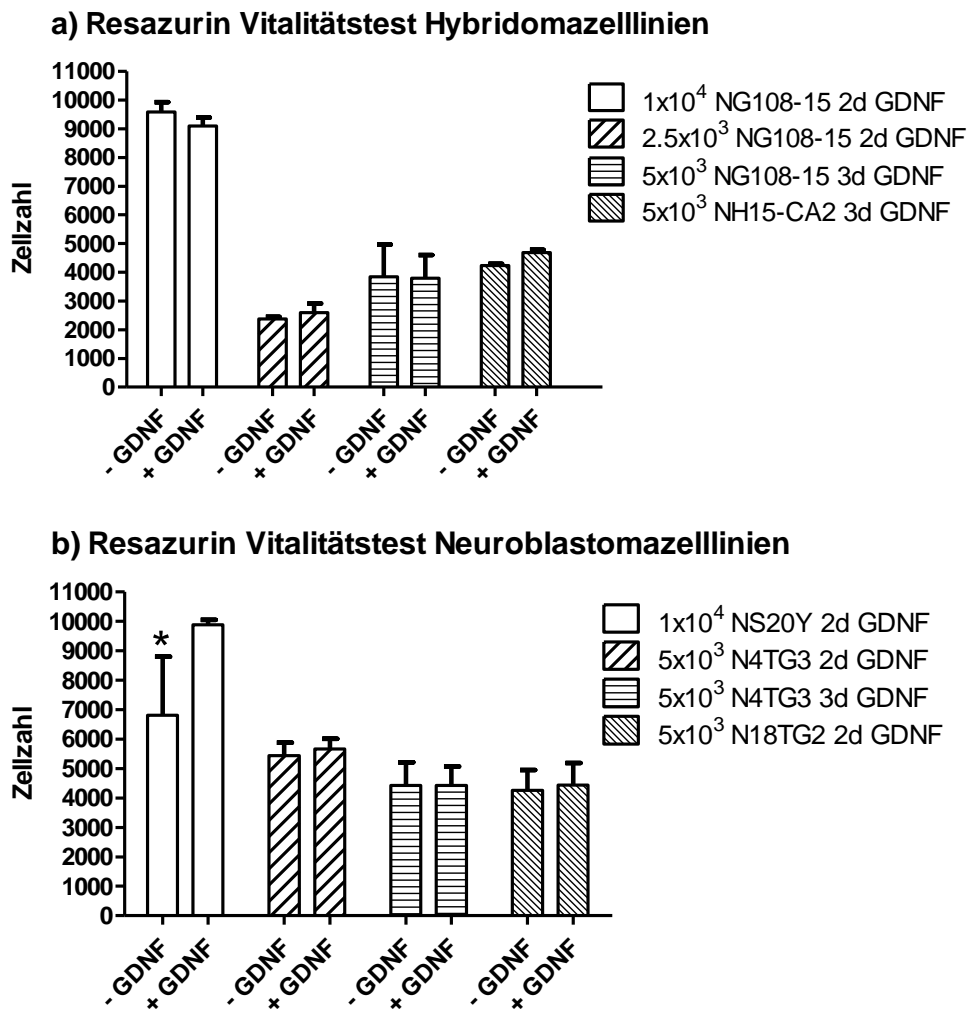


Abb. 4.4: Resazurin Vitalitätstest neuronaler Zellen nach GDNF-Stimulation

GDNF förderte nur das Überleben von NS20Y Neuroblastoma Zellen in Kultur signifikant. Hierbei waren die Ergebnisse unabhängig davon, ob 1×10^4 , 2.5×10^3 oder 5×10^3 Zellen ausgesät wurden und ob die Messung nach 2 oder 3 Tagen erfolgte, wie an Beispielen der NG108-15 Hybridomazellen und der N4TG3 Neuroblastomazellen verdeutlicht wurde. Zur Etablierung der Methode wurden die Experimente mehrfach durchgeführt, allerdings unter variierenden Bedingungen getestet. Die dargestellten Ergebnisse sind ausgewählte Stichproben. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Fünffachbestimmung wieder. * $p < 0.05$: ungepaarter Studentischer t-Test. **a)** Die GDNF-Stimulation bewirkte keinen Unterschied im Hinblick auf das Überleben der Hybridomazelllinien NG108-15 und NH15-CA2. **b)** Unter den getesteten Neuroblastomazelllinien wies nur NS20Y ein signifikant erhöhtes Überleben nach 2 d GDNF-Stimulation auf.

GDNF zeigte keine signifikante Reduktion der Sterblichkeit der Hybridomazelllinien NG108-15 und NH15-CA2 und der Neuroblastomazelllinien N4TG3 und N18TG2 unter verschiedenen getesteten experimentellen Bedingungen. Für NS20Y Zellen war bereits nach 2 d Stimulation mit 50 ng/mL GDNF eine signifikante Verminderung des Zellsterbens festzustellen.

4.1.3 NEURITENWACHSTUM NACH GDNF-STIMULATION

Ein möglicher Einfluss der Stimulation von Neuroblastomazellen mit dem neurotrophen Wachstumsfaktor GDNF auf das Neuritenwachstum wurde exemplarisch an den Zelllinien NS20Y und N4TG3 untersucht (vgl. 5.1), indem der Differenzierungsgrad vor und nach Stimulation bestimmt wurde (Abb. 4.5).

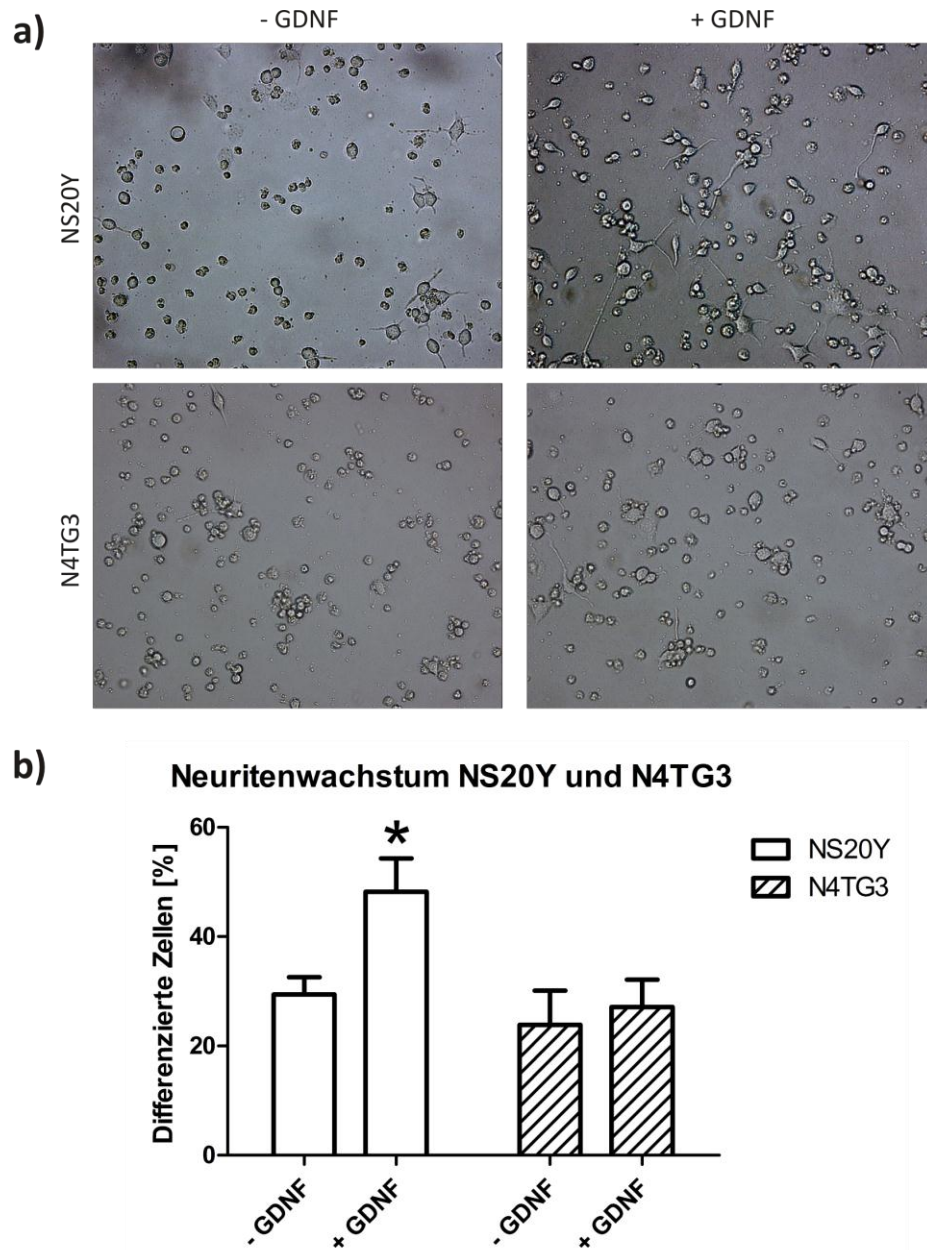


Abb. 4.5: Neuritenwachstum von NS20Y und N4TG3 Zellen nach GDNF-Stimulation

NS20Y Zellen zeigten eine zur unstimulierten Kontrolle signifikant erhöhte Differenzierungsrate nach 3 d GDNF-Stimulation. NS20Y und N4TG3 Neuroblastomazellen wurden für 16 h in DMEM-Basalmedium ausgehungert. Die Zellen wurden für 3 d ohne Stimulation bzw. für 3 d mit 50 ng/mL GDNF inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Mikroskopie-Aufnahmen nach 3 d in 400-facher Vergrößerung **(a)**. Differenzierte und undifferenzierte Zellen aus fünf zufällig ausgewählten Mikroskopfeldern wurden ausgezählt und der prozentuale Anteil differenzierter Zellen wurde grafisch dargestellt **(b)**. Zellen wurden ab einer Neuritenlänge des doppelten Zelldurchmessers als differenziert gewertet. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten an. *p<0.05: ungepaarter Studentscher t-Test.

Nach 3 d Stimulation mit 50 ng/mL GDNF war keine Veränderung des Neuritenwachstums bei N4TG3 Zellen festzustellen. Für NS20Y Zellen konnte ein signifikanter Anstieg in der Zahl differenzierter Zellen von 30 % ohne zu 50 % mit GDNF nachgewiesen werden.

4.1.4 AKTIVIERUNG SIGNALWEG-SPEZIFISCHER KINASEN NACH GDNF-STIMULATION

Um zu analysieren, welche Signalwege in den untersuchten Neuroblastomzelllinien Neuro-2a, NS20Y, N18TG2 und N4TG3 durch extrazelluläre GDNF-Stimulation aktiviert werden, wurden Immunblots aus Proteinextrakten unterschiedlich lange stimulierter Zellen hergestellt. Die an den wesentlichen GDNF-Signalwegen beteiligten Kinasen Erk1/2 und Akt und deren phosphorylierte Formen wurden mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (Abb. 4.6).

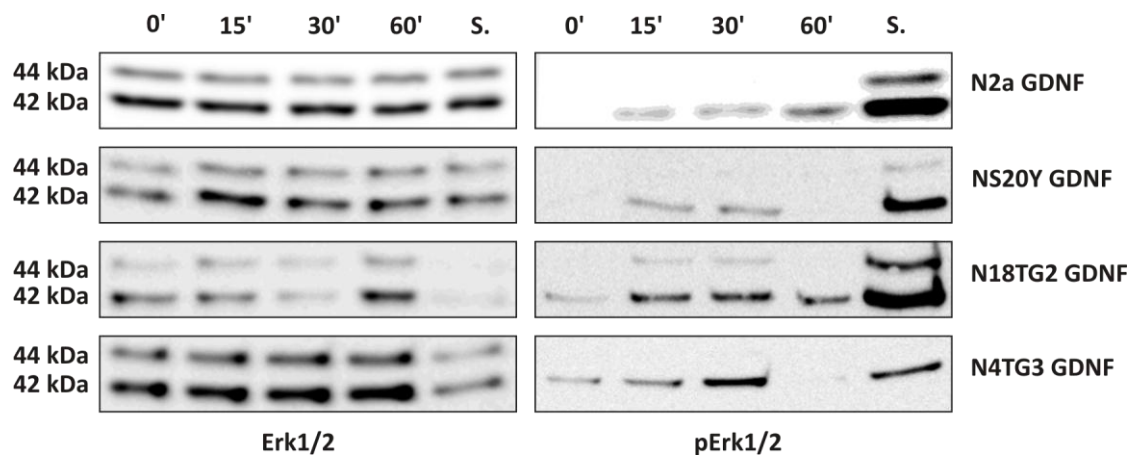


Abb. 4.6: GDNF-induzierte Erk1/2-Aktivierung der Zelllinien N2a, NS20Y, N18TG2 und N4TG3

Nach GDNF-Stimulation wiesen die untersuchten Zelllinien NS20Y, N18TG2 und N4TG3 eine transiente Phosphorylierung und Neuro-2a eine schwache anhaltende Phosphorylierung der MAP-Kinasen Erk1/2 auf. Dargestellt sind Immunblots gegen Erk1/2 (links) und phosphoryliertes Erk1/2 (rechts). Aufgetragen sind Proteinextrakte von Zellen ohne Stimulation (0 min) und nach 15 min, 30 min und 60 min Stimulation mit 50 ng/mL GDNF. Als Kontrolle diente eine Aktivierung der MAP-Kinasen über osmotischen Stress durch 15 min Inkubation mit 1 M Sorbitol (S.).

Neuro-2a Zellen reagierten auf eine Stimulation mit 50 ng/mL GDNF mit einer schwachen, anhaltenden Aktivierung von Erk1/2. Eine maximale Phosphorylierung war nach 60 min feststellbar. Bei NS20Y, N18TG2 und N4TG3 Zellen induzierte die GDNF-Stimulation eine transiente Aktivierung von Erk1/2. Die maximale Aktivierung der MAP-Kinasen war für diese Zelllinien unter Berücksichtigung der jeweiligen Gesamtproteinmenge 30 min nach GDNF-Stimulation erreicht. Für die Akt-Kinase wurden entsprechende Immunblots erstellt. Eine Phosphorylierung von Akt konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Für die Hybridomazelllinien NG108-15 und NH15-CA2 konnte aus methodischen Gründen kein phosphoryliertes Erk festgestellt werden (vgl. 5.1).

4.1.5 HERSTELLUNG STABIL TRANSFIZIERTER NEURO-2A GFRA1 UND GFRA2 ZELLEN

Der Nachweis von Gfra1 konnte in Neuro-2a Zellen nur auf der Ebene der mRNA-Expression und nicht der Proteinexpression erfolgen (vgl. 4.1.1, 5.1.1). In anderen Screens neuronaler Zelllinien konnten für Neuro-2a keine Gfra1 und Gfra2 mRNA nachgewiesen werden (Pezeshki *et al.*, 2001).

Zur Herstellung von Neuro-2a Klonen, die stabil entweder nur den Korezeptor Gfra1 oder nur Gfra2 exprimieren, wurden entsprechende Expressionsvektoren hergestellt. Die murine cDNA für Gfra1a wurde aus einem RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH)-Klon gewonnen. Für Gfra2a existierte kein erwerblicher Klon in den Datenbanken, so dass in diesem Falle zur Gewinnung entsprechender cDNA die Gesamt-RNA aus adultem Mäusehirngewebe isoliert wurde. Die Integrität der murinen RNA wurde in einem MOPS-Agarosegel überprüft (Abb. 4.7).

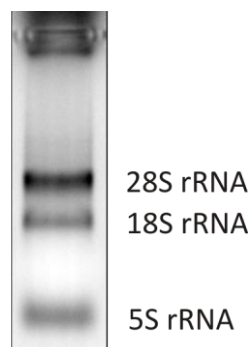


Abb. 4.7: Elektrophoretische Auftrennung von aus adultem Mäusehirn extrahierter RNA

Dargestellt ist ein 1%iges MOPS-Agarosegel, auf dem die Auftrennung von aus Mäusehirngewebe gewonnener RNA in die 28S, 18S, und 5S Untereinheiten ribosomaler RNA durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht wurde.

Das Verhältnis der 28S und 18S rRNA-Untereinheiten zueinander betrug etwa 2:1 und verifiziert die Intaktheit der aufgereinigten RNA (Mori *et al.*, 1978), so dass die nachfolgende reverse Transkription Gfra2 cDNA lieferte. Abschließend wurde das Gfra2-Konstrukt in den Expressionsvektor pcDNA3.1 mit Neomycinresistenz-Kassette kloniert (Strunk, 2008). Zur Bestimmung der optimalen G418 (Geneticin)-Konzentration zur Selektion stabil transfizierter Klone wurden Neuro-2a Zellen mit unterschiedlichen G418-Konzentrationen behandelt und ihr Sterbeverhalten untersucht (Abb. 4.8).

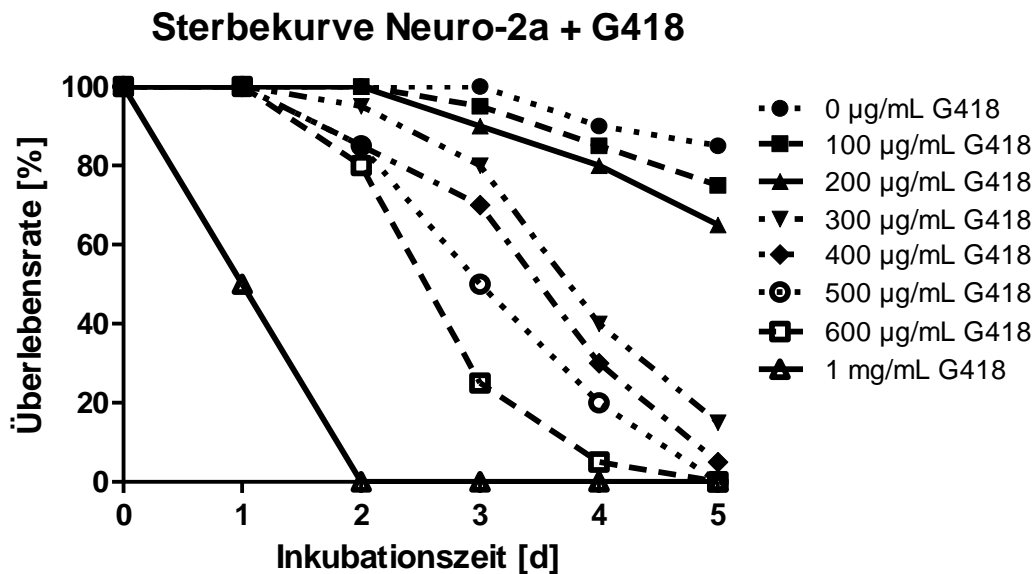


Abb. 4.8: Reaktion von Neuro-2a Zellen auf verschiedene G418-Konzentrationen

500 µg/mL G418 ist eine geeignete Konzentration zur Selektion transfizierter Neuro-2a Zellen mit Neomycinresistenz-Kassette. Neuro-2a wt Zellen wurden mit verschiedenen G418-Konzentrationen behandelt, um die optimale Konzentration für eine stabile Transfektion zu ermitteln. Der prozentuale Anteil vitaler Zellen wurde für jede Konzentration täglich mikroskopisch ermittelt und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit grafisch dargestellt. Alle 2-3 d wurden Medienwechsel durchgeführt.

Das Wachstum von Neuro-2a Zellen wird effizient durch die Zugabe von 500 µg/mL G418 unterdrückt. Diese Konzentration des zytotoxischen Antibiotikums führte zu einem Absterben der Hälfte aller Zellen nach 3 Tagen und zum Zelltod nach 6 Tagen. Neuro-2a Wachstum wird bereits durch G418-Konzentrationen von 300 µg/mL und 400 µg/mL inhibiert. Konzentrationen von 100 µg/mL und 200 µg/mL G418 zeigten einen minimalen Effekt auf das Zellwachstum. Die Konzentration von G418 wurde so gewählt, dass untransfizierte Zellen nach einem Zeitraum von 5 d absterben. Somit stellt 500 µg/mL G418 eine geeignete Konzentration zur Selektion stabil transfizierter Neuro-2a Klone dar.

Neuro-2a Zellen wurden mit Gfr α 1 und Gfr α 2 Expressionsvektoren mit Lipofectamin stabil transfiziert. G418-resistente Klone wurden vereinzelt in einer Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Gfr α 1 bzw. Gfr α 2 getestet. Zusätzlich zur Immunfluoreszenz wurden die Zellkerne mit HOECHST und die Aktinfilamente der Zellen mit FITC-Phalloidin angefärbt. Die Zellen wurden auf Gfr α -Expression und -Lokalisation überprüft. Aus jeweils 48 untersuchten Klonen wurden für jeden Korezeptor zwei stabil transfizierte Klone für weitere Experimente ausgewählt (Abb. 4.9).

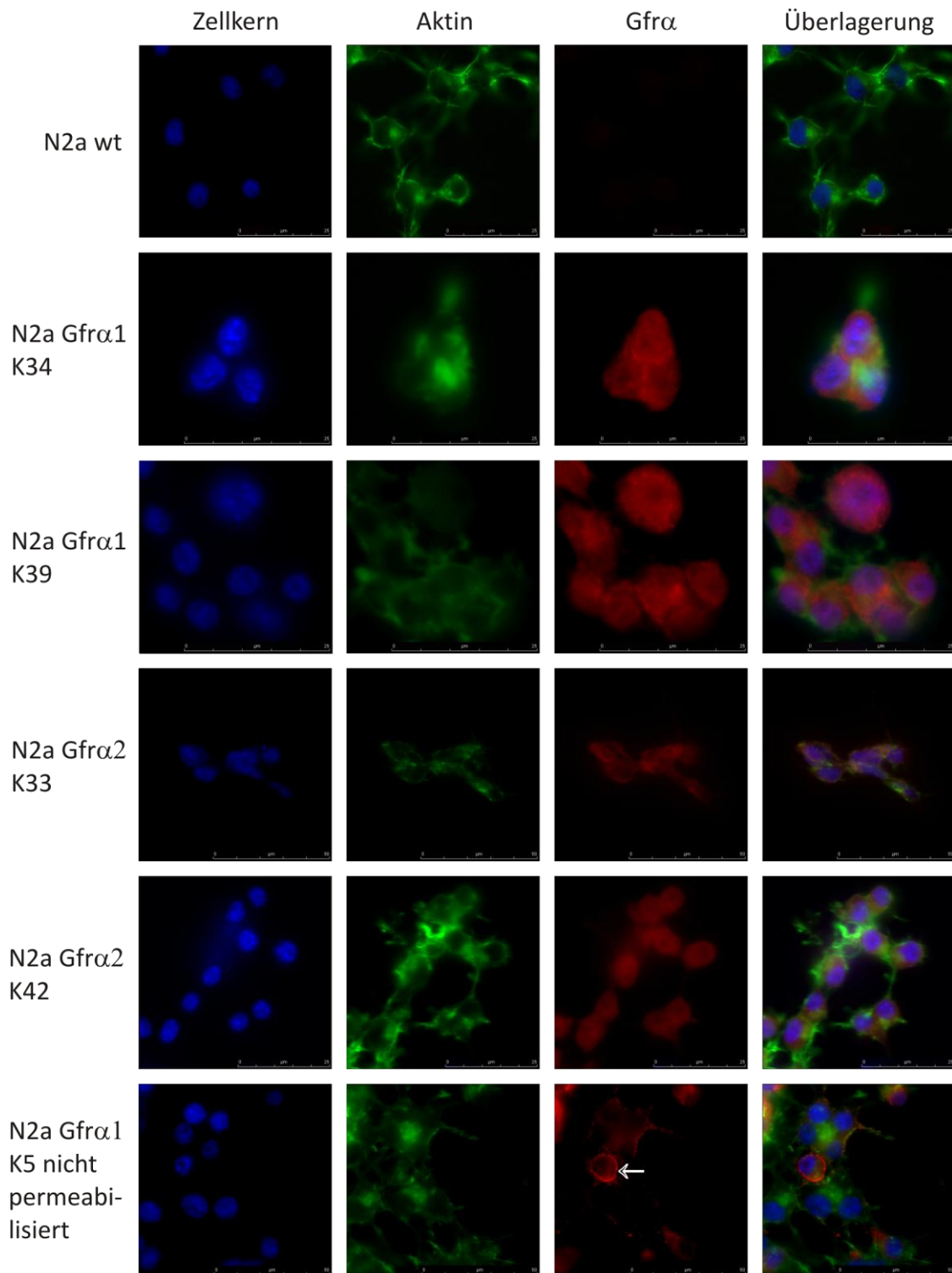


Abb. 4.9: Immunfluoreszenzen ausgewählter Neuro-2a Klone

In ausgewählten stabil transfizierten Neuro-2a Klonen konnte die Expression beider Gfr α -Korezeptoren fluorezenzmikroskopisch bestätigt werden. Am Beispiel von N2a Gfr α 1 K5 wurde der Permeabilisierungsschritt in der Immunfluoreszenz ausgelassen, wodurch der Antikörper nur an der Zelloberfläche binden konnte. Durch das persistierende Signal für Gfr α 1 wurde indirekt eine Lokalisation des Korezeptors an der Plasmamembran (mit Pfeil symbolisiert) nachgewiesen. Die Zellkerne sind HOECHST-gefärbt (blau), Aktinfilamente wurden mit FITC-Phalloidin gefärbt (grün) und Gfr α 1 und Gfr α 2 wurden mit einem cy3-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht (rot). Vergrößerung für N2a Wildtyp (wt), N2a Gfr α 1 K5, N2a Gfr α 2 K33 und N2a Gfr α 2 K42: 630x. Vergrößerung für N2a Gfr α 1 K34 und N2a Gfr α 1 K39: 1000x.

Im Falle von Gfr α 1 wiesen die Klone K34 und K39 die stärksten Signale in der Immunfluoreszenz auf, für Gfr α 2 entsprechend K33 und K42. Teilweise ließen sich intensivere Gfr α -Färbungen an der Plasmamembran feststellen, stellenweise waren diese punktuell konzentriert. Anhand einer Immunfluoreszenz, bei der der membranperforierende Schritt durch Detergenzien ausgelassen wurde, konnte beispielhaft gezeigt werden, dass der Korezeptortransport zur Plasmamembran zu funktionieren scheint (vgl. Abb. 4.9, N2a Gfr α 1 K5).

Für die ausgewählten Klone, die ein starkes Immunfluoreszenzsignal aufweisen, wurde die Proteinexpression der Korezeptoren über Immunblots abgeschätzt (Abb. 4.10).

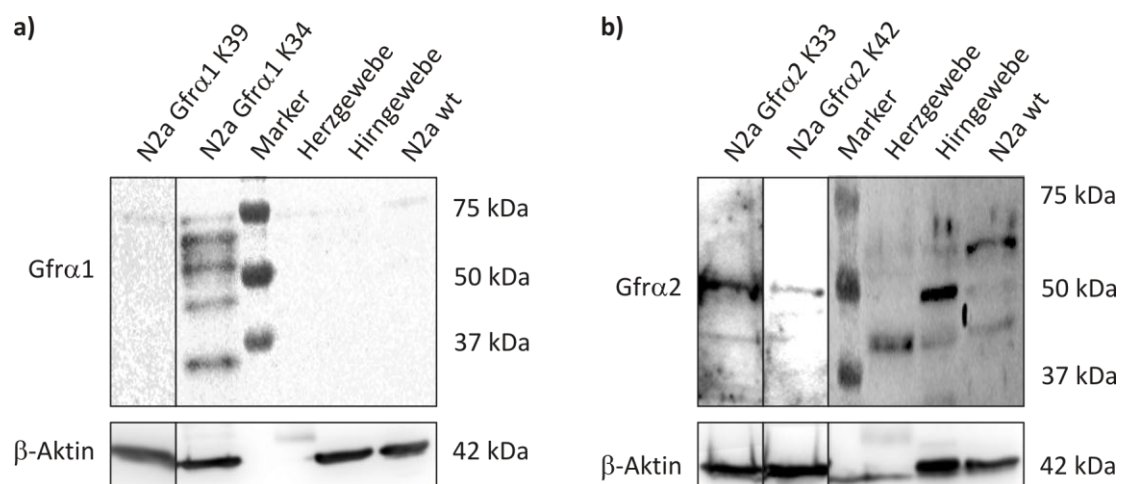


Abb. 4.10: Immunblots stabiler N2a Klone und ausgewählter Kontrollen gegen Gfr α 1 und Gfr α 2

N2a Gfr α 1 K34 zeigte starke, K39 keine Expression von Gfr α 1. N2a Gfr α 2 K33 zeigte schwache, aber gering stärkere Gfr α 2-Expression als K42. Die getesteten Kontrollen sind für Gfr α 2 geeignet, für Gfr α 1-Expression konnte keine Positivkontrolle etabliert werden. **a)** Immunblots gegen Gfr α 1 (47/53 kDa), aufgetragen wurden von links nach rechts N2a Gfr α 1 Klon 39, N2a Gfr α 1 Klon 34, Marker, adultes murines Herzgewebe, neonatales murines Hirngewebe und Neuro-2a Wildtyp (wt) Zellen. **b)** Immunblots gegen Gfr α 2 (47/52 kDa), aufgetragen wurden von links nach rechts N2a Gfr α 2 Klon 33, N2a Gfr α 2 Klon 42, Marker, adultes murines Herzgewebe, neonatales murines Hirngewebe und Neuro-2a Wildtyp (wt) Zellen. Als Proteinladekontrolle diente ein Antikörper gegen β -Aktin, der ein höher detektierbares Signal für die Herzgewebeproben zeigte. Marker: *Prestained Protein-Ladder*.

Im Falle der Gfr α 1-Expression war die Spezifität des Antikörpers wie zuvor sehr gering (vgl. 4.1.1). In den Spuren der getesteten Negativkontrollen des murinen Herzgewebes und des Neuro-2a Wildtyps traten keine Banden in dem für Gfr α 1 erwarteten Bereich bei 47/53 kDa auf (Abb. 4.10a), in der getesteten Positivkontrolle des neonatalen Mäusehirngewebes ebenfalls nicht. Der Versuch, eine geeignete Positivkontrolle für diesen Antikörper zu etablieren, blieb damit weiterhin erfolglos. Der Antikörper reagierte jedoch gezielt mit dem Gfr α 1-exprimierenden Klon 34 und

nicht mit Klon 39. Das Signal bei etwa 53 kDa wird daher als spezifisch für die Gfr α 1-Expression und das Expressionsniveau von Klon 39 als unterhalb der Nachweisschwelle angenommen. Für den verwendeten Gfr α 2-Antikörper traten ebenfalls mehrere unspezifische Signale auf (Abb. 4.10b). Ein spezifisches Signal bei den erwarteten 47/52 kDa konnte in der getesteten Positivkontrolle, murinem Hirnextrakt, nachgewiesen werden, das in den Negativkontrollen nicht sichtbar war. Im Vergleich zur Positivkontrolle zeigten beide stabil mit Gfr α 2 transfizierten Neuro-2a Klone ein schwaches Expressionsniveau, das für Klon 33 etwas höher als für Klon 42 lag. Der verwendete β -Aktin-Antikörper detektierte in beiden Fällen eine größere Aktin-Isoform in den Herzgewebeproben.

4.1.6 HERSTELLUNG STABIL TRANSFIZIERTER B104 RET9 UND RET51 ZELLEN

B104 ist eine Neuroblastomazelllinie mit Ursprung im Zentralen Nervensystem der Ratte, die Gfr α 1, aber nicht RET9 oder RET51 endogen exprimiert (Pezeshki *et al.*, 2001). Zur Herstellung stabil transfizierter B104 Klone, die entweder nur die Rezeptor-Isoform RET9 oder die RET51-Isoform exprimieren, wurden entsprechende Expressionsvektoren kloniert. Die murine RET9 cDNA-Sequenz wurde aus einem RZPD Klon gewonnen und für eine C-terminale ECFP-Fluoreszenzmarkierung ohne Stoppcodon und mit zusätzlich eingefügter Kozaksequenz für optimierte Expression kloniert (Sequenzierung: s. Anhang II.I). Für das RET51-Konstrukt wurde der identische C-terminale Bereich aus einem unvollständigen RZPD-Klon über ortsspezifische Mutagenese mit der N-terminalen Sequenz des RET9-Konstrukts verknüpft und entsprechend für eine C-terminale Fluoreszenzmarkierung modifiziert (Sequenzierung: s. Anhang II.II).

Um stabil transfizierte B104 Klone zu erhalten, musste zuerst eine geeignete Transfektionsmethode für diese Zelllinie gefunden werden. Die Effizienz betrug für die Transfektionsreagenzien Fugene und Neurofect unter 1 % und für Lipofectamin etwa 5 %. Erst durch die Etablierung eines geeigneten Protokolls für die Nukleofektion nach Lonza/Amara konnten Transfektionsraten von mehr als 50 % für B104 Zellen erhalten werden (nicht dargestellt). Unter mehreren getesteten Bedingungen stellte sich das Programm A-030 am Nukleofektor als geeignet heraus. Dieses führte zwar zu einer hohen Zell-Sterberate, jedoch konnten durch einen zusätzlich zum Standardprotokoll eingeführten Zentrifugationsschritt direkt nach der Nukleofektion fast ausschließlich vitale, transfizierte Zellen erhalten werden. Stabile

Klone wurden mit 500 µg/mL G418 selektiert (Shaw *et al.*, 1993; Toda *et al.*, 1999) und über ihre ECFP-Markierung fluoreszenzmikroskopisch auf effiziente Transfektion untersucht (Abb. 4.11). Für nachfolgende Experimente wurden aus jeweils 24 Klonen für beide RET-Isoformen zwei stabil transfizierte Klone ausgewählt.

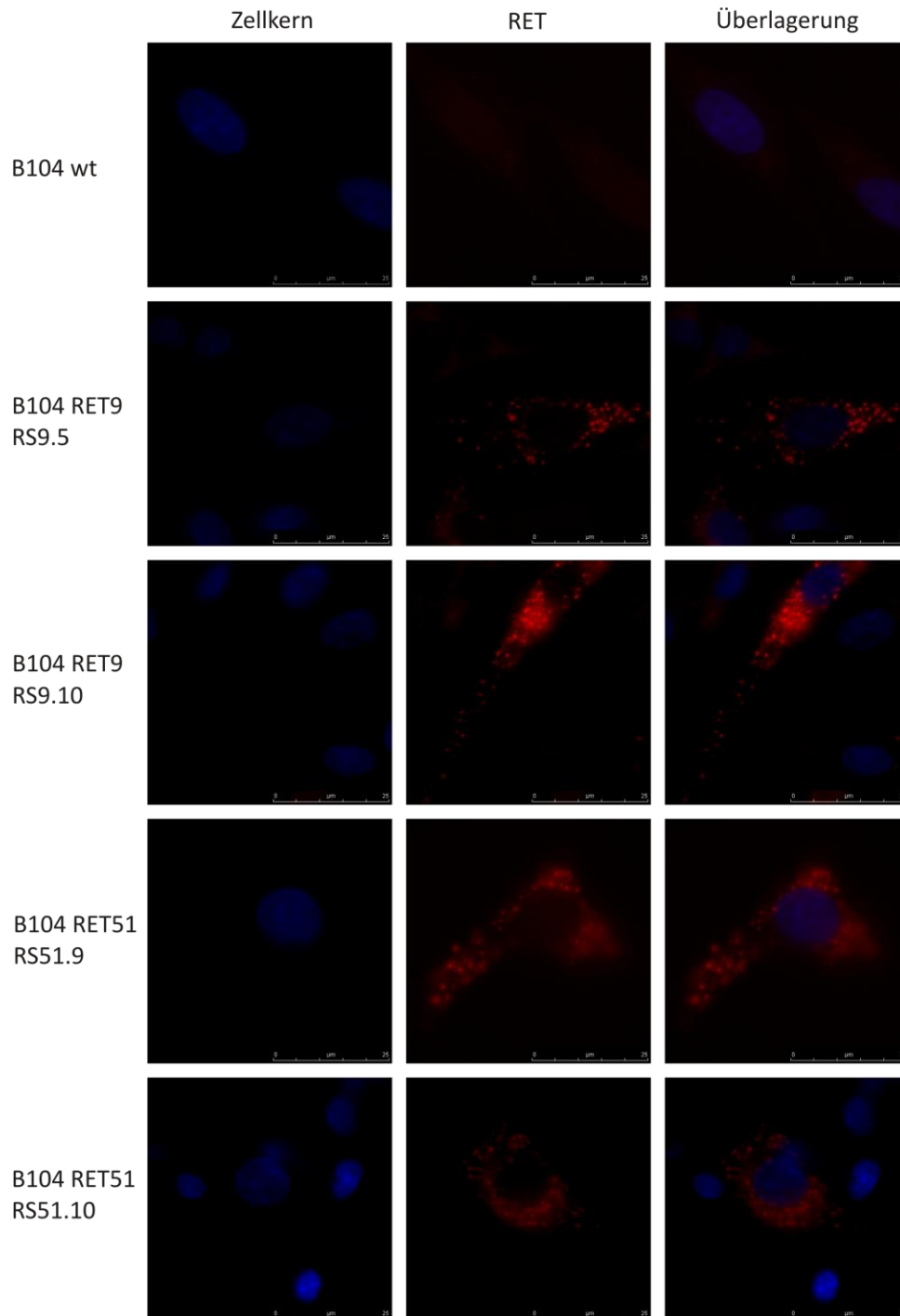


Abb. 4.11: Immunfluoreszenzen ausgewählter B104 Klone

Für ausgewählte stabil transfizierte B104 Klone konnte die Expression der Rezeptorisoformen RET9 und RET51 fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden. Die Zellkerne wurden HOECHST-gefärbt (blau), RET9 und RET51 wurden über ihren ECFP-Fluoreszenzmarker nachgewiesen (rot dargestellt). Vergrößerung: 1000x.

Für RET9 wiesen die Klone B104 RS9.5 und RS9.10 und für RET51 die Klone B104 RS51.9 und RS51.10 eine fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesene hohe Expressionsrate auf. Generell war für alle RET-transfizierten Klone eine heterogene Fluoreszenzstärke zu beobachten. Einige Zellen zeigten kaum stärkere Fluoreszenz als die Autofluoreszenz der Wildtypzellen, andere zeigten starke Überexpression. RET war in punktförmigen Strukturen vorhanden, die sich in Größe und Fluoreszenz stark unterschieden. Signifikante Unterschiede in der Lokalisation beider Isoformen waren nicht feststellbar. Eine direkte Plasmamembranfärbung war nicht nachzuweisen, allerdings traten die vesikulären Strukturen neben einer perinukleären Akkumulation vermehrt in Bereichen nahe der Plasmamembran und in den Neuriten auf (vgl. Abb. 4.11). Für eine Detektion des Proteinexpressionsniveaus von RET standen keine Antikörper zur Verfügung.

4.2 DAS NEURO-2A GFRA1 NEUROBLASTOMA-MODELLSYSTEM

4.2.1 VITALITÄTSTESTS VON NEURO-2A GFRA1 NEUROBLASTOMAZELLEN

Die Vitalitätsrate von Neuro-2a Gfr α 1 Zellen nach Aushungern in serumfreiem DMEM-Basalmedium war sehr gering. Das Austesten verschiedener Minimalmedien mit Serumkonzentrationen von 0-5 % für nachfolgende Experimente zum Aushungern und für die Stimulation dieser Zellen zeigte für DMEM-Basalmedium mit 0.5 % fötalem Kälberserum oder 0.5 % Pferdeserum die besten Resultate (nicht dargestellt). Unter diesen Bedingungen fand eine ausreichende Grundnährstoff-Versorgung noch ohne die Induktion einer Zellproliferation statt. An den stabil transfizierten Klonen N2a Gfr α 1 K34 und K39 wurde ein möglicher Einfluss der Wachstumsfaktoren GDNF und TGF- β auf die Zellvitalität untersucht (Abb. 4.12).

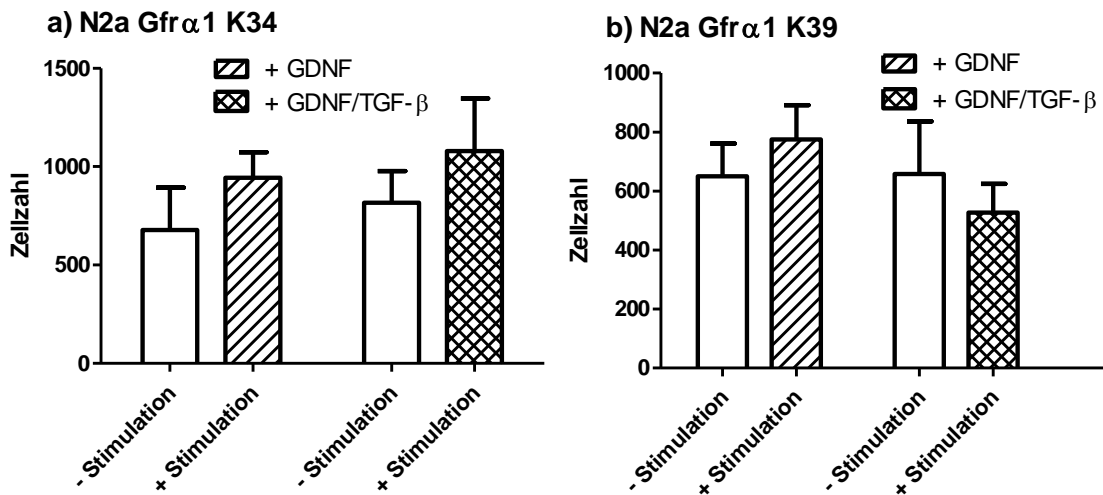


Abb. 4.12: Reaktion stabil transfizierter N2a Gfr α 1 Klone auf GDNF- und TGF- β -Stimulation

Der Wachstumsfaktor GDNF wirkte sich positiv auf das Überleben der stabil mit Gfr α 1 transfizierten N2a Klone K34 **(a)** und K39 **(b)** aus. Eine zusätzliche Stimulation mit TGF- β führte zu keiner signifikanten Steigerung der Vitalität von N2a Gfr α 1 K34 Zellen und verringerte sie sogar im Falle von Klon 39. N2a Gfr α 1 K34 und K39 Zellen wurden in DMEM-Basalmedium 0.5 % FKS für 16 h ausgehungert und anschließend für 2 d unstimuliert als Kontrolle, mit 50 ng/mL GDNF oder mit 50 ng/mL GDNF und 2 ng/mL TGF- β inkubiert. Es wurden vitale Zellen (Calcein-gefärbt) aus fünf zufällig ausgewählten Mikroskopfeldern gezählt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

GDNF steigerte die Vitalität gegenüber der unstimulierten Kontrolle um 39 % bei N2a Gfr α 1 K34 (Abb. 4.12a) und um 19 % bei K39 (Abb. 4.12b). In primären Neuronen ist nach Peterziel *et al.*, 2002 eine zusätzliche Stimulation mit TGF- β notwendig, um die überlebensfördernden Eigenschaften von GDNF zu aktivieren. Im Neuro-2a Modellsystem zeigte sich dieser Effekt nicht. Die additional Zugabe von TGF- β führte zu einer schwachen Reduktion der Vitalitätsrate, die aber noch immer 32 % über dem Kontrollwert lag. Im Falle von Klon 39 führte die kooperative Stimulation zu einer 20 %igen Verringerung der Vitalitätsrate.

4.2.2 NEURITENWACHSTUM VON N2A GFRA1 UND GFRA2 NACH GFL-STIMULATION

Der Einfluss von GDNF auf die Differenzierung von N2a Gfr α 1 und von NRTN auf die Differenzierung von N2a Gfr α 2 Zellen wurde mikroskopisch untersucht (Abb. 4.13).

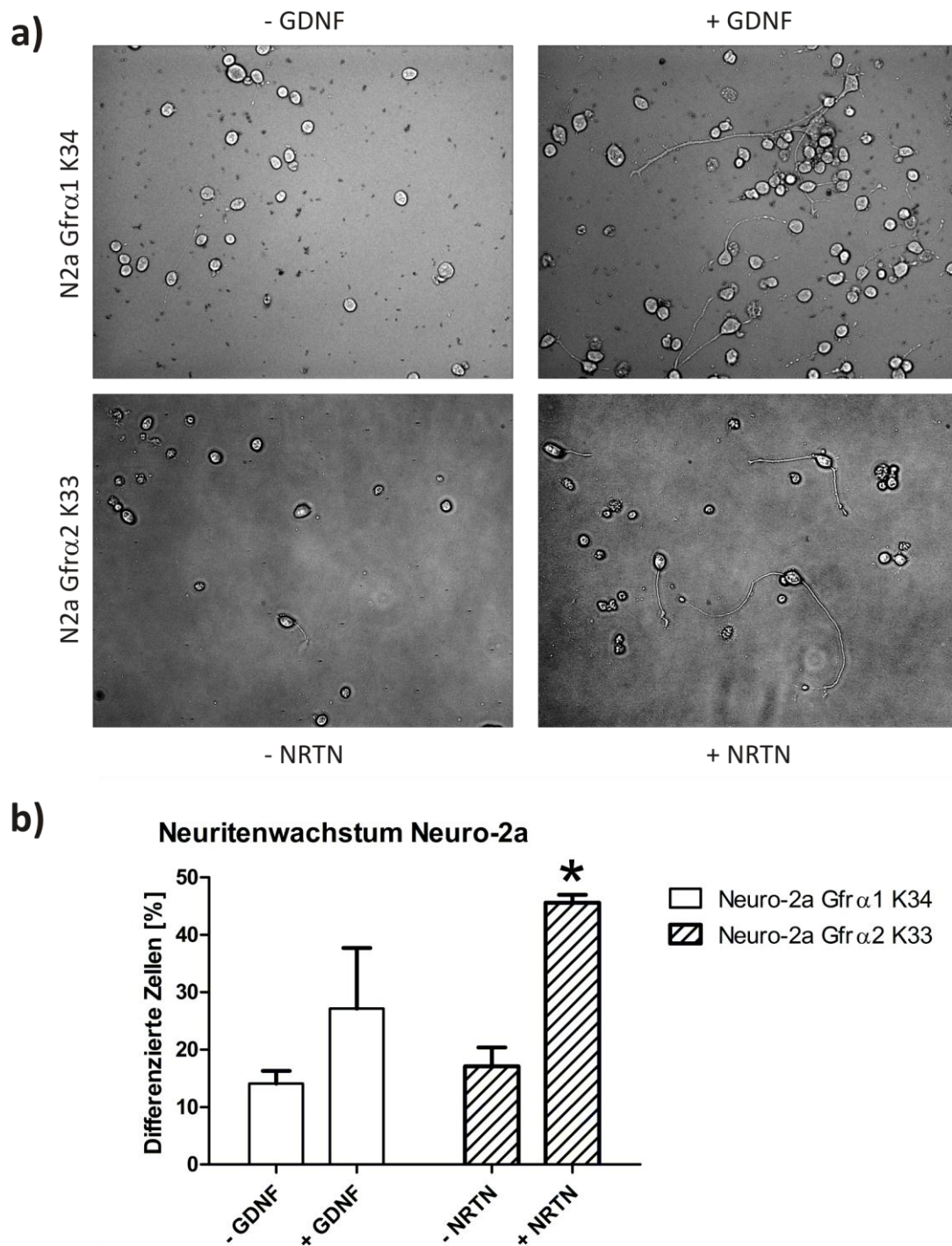


Abb. 4.13: Neuritenwachstum von Neuro-2a Gfr α 1 und Gfr α 2 Zellen nach GFL-Stimulation

Die Wachstumsfaktoren GDNF oder NRTN der GFL-Ligandenfamilie wirkten sich positiv auf das Neuritenwachstum der entsprechend stabil transfizierten Klone N2a Gfr α 1 K34 und Gfr α 2 K33 aus. Für NRTN und Gfr α 2 war dieser Effekt signifikant. N2a Gfr α 1 K34 Zellen wurden in DMEM-Basalmedium 0.5 % Pferdeserum und N2a Gfr α 2 mit DMEM-Basalmedium für 16 h ausgehungert und anschließend für 3 d unstimuliert als Kontrolle, mit 50 ng/mL GDNF oder 100 ng/mL NRTN inkubiert. Dargestellt sind Mikroskopie-Aufnahmen repräsentativer Zellen nach 3 d in 400-facher Vergrößerung **(a)**. Zellen aus fünf zufällig ausgewählten Mikroskopfeldern wurden gezählt, ab einer Neuritenlänge des doppelten Zelldurchmessers als differenziert gewertet und der Anteil differenzierter Zellen wurde grafisch dargestellt **(b)**. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$: ungepaarter Studentischer t-Test.

GDNF und NRTN sind potente Wachstumsfaktoren im Hinblick auf die Differenzierung Gfr α -transfizierter Neuro-2a Zellen. GDNF bewirkte einen Anstieg im Anteil differenzierter Gfr α 1-transfizierter Neuro-2a Zellen von 14 % auf 27 %. NRTN wirkte sich mit einer Steigerung von 17 % auf 47 % sogar signifikant auf das Neuritenwachstum differenzierter, Gfr α 2-transfizierter Neuro-2a Zellen aus.

4.2.3 AKTIVIERUNG SPEZIFISCHER SIGNALKASKADEN IN N2A GFRA1 UND GFRA2 NACH GFL-STIMULATION

Um zu untersuchen, inwieweit sich die Transfektion der jeweiligen Korezeptoren in den RET-abhängigen Signalwegen auf die Stimulation der MAP-Kinasen Erk1/2 (Abb. 4.14, 4.15) und der Proteinkinase B/Akt (Abb. 4.16, 4.17) auswirkt, wurden Immunblots mit Antikörpern gegen die entsprechenden Kinasen inkubiert.

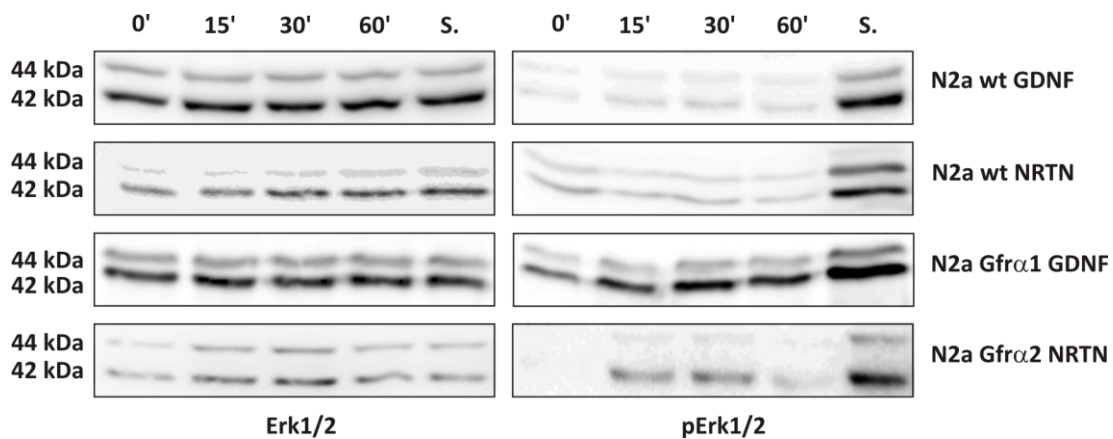


Abb. 4.14: GFL-induzierte Erk1/2-Aktivierung in Neuro-2a Gfr α 1 und Gfr α 2 Zellen

Durch eine Signalweiterleitung über den GDNF-Rezeptor Gfr α 1 oder den NRTN-Rezeptor Gfr α 2 wurde nach GDNF- oder NRTN-Stimulation eine transiente Phosphorylierung von Erk1/2 ausgelöst. Dargestellt sind repräsentative Immunblots gegen Erk1/2 (links) und pErk1/2 (rechts). Aufgetragen wurden Proteinextrakte der N2a Klone Gfr α 1 K34 und Gfr α 2 K33 ohne Stimulation (0 min) und nach 15 min, 30 min und 60 min Stimulation mit 50 ng/mL GDNF bzw. 100 ng/mL NRTN. Als Kontrolle zur Aktivierung von MAP-Kinasen diente die Inkubation mit 1 M Sorbitol (S.) für 15 min.

Die artifiziell induzierte Expression der am RET-Signalkomplex beteiligten Korezeptoren Gfr α 1 und Gfr α 2 scheint nach Stimulation mit GDNF bzw. NRTN in beiden Fällen zunächst zu einer transienten Erk1/2-Aktivierung mit einem Stimulationsmaximum nach 30 min zu führen. Eine anhaltende Stimulation lässt sich für Gfr α 1 im Hinblick auf die verhältnismäßig hohe Phosphorylierung bei 60 min und für Gfr α 2 unter Berücksichtigung des Erk1/2-Verlaufs jedoch nicht ausschließen. Zur besseren Übersicht wurde die Signalintensität der Proteinbanden densitometrisch ausgewertet (Abb. 4.15).

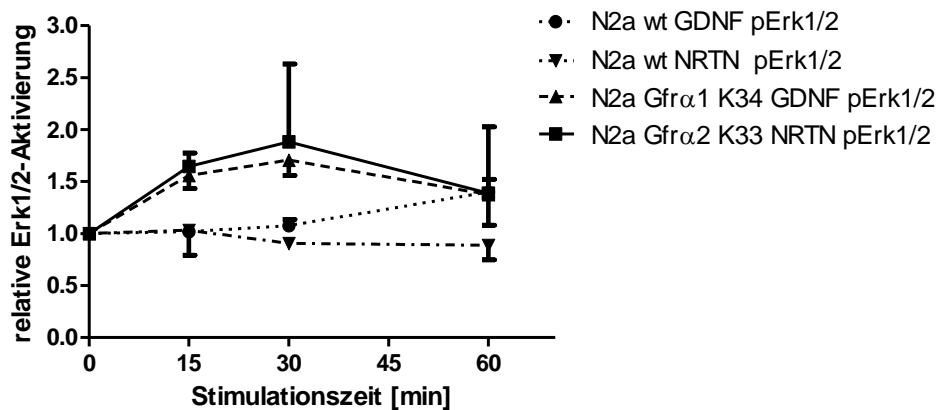


Abb. 4.15: Stimulationsniveau GDNF- und NRTN-vermittelter Erk1/2-Aktivierung in N2a Zellen

Die RET-vermittelte Erk1/2-Phosphorylierung führte nach 30 min GFL-Stimulation zu einem Anstieg der Erk1/2-Aktivierung um etwa 75 % gegenüber der basalen Stimulation. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der Immunblot-Signale der GDNF- und NRTN-vermittelten Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 in N2a wt Zellen und stabil transfizierten N2a Gfrα1 und N2a Gfrα2 Zellen (Abb. 4.14). Die Signale wurden anhand des Verhältnisses der Erk1/2-Werte auf ein einheitliches Proteinlevel normiert. Der jeweilige Nullwert der pErk1/2-Signale wurde auf den Wert 1 gesetzt und die 15-, 30- und 60'-Signale auf ihren jeweiligen Nullwert bezogen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Phosphorylierung der Erk1/2-Kinasen nahm nach GDNF-Stimulation in Gfrα1-transfizierten Neuro-2a Zellen und nach NRTN-Stimulation in Gfrα2-transfizierten Zellen beim Aktivierungsmaximum um durchschnittlich etwa 75 % zu. In beiden Fällen wurde der Ausgangswert nach einer Stunde nicht wieder erreicht. Der bereits zuvor aufgetretene schwache, anhaltende Anstieg des pErk1/2-Signals nach GDNF-Stimulation der Wildtypzellen war erneut zu beobachten. Parallel zu Erk1/2 wurde die Aktivierung der Proteinkinase B/Akt untersucht (Abb. 4.16).

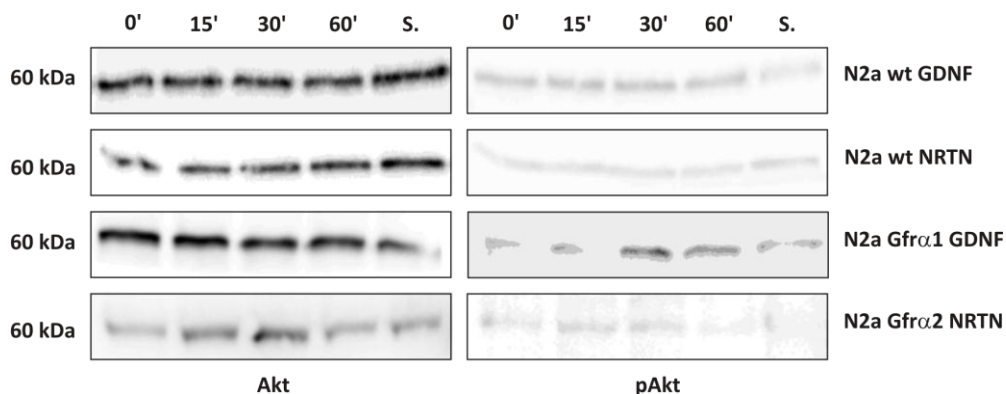


Abb. 4.16: Beteiligung der Akt-Kinase an der GFL-induzierten Signalweiterleitung in N2a Zellen

In Neuro-2a Gfrα1 K34 Zellen wurde nach GDNF-Stimulation eine geringe Phosphorylierung von Akt ausgelöst. Bei N2a Gfrα2 K33 war keine Aktivierung von Akt durch NRTN zu detektieren. Dargestellt sind repräsentative Immunblots gegen Akt (links) und pAkt (rechts). Aufgetragen wurden Proteinextrakte der N2a Klone Gfrα1 K34 und Gfrα2 K33 ohne Stimulation (0 min) und nach 15 min, 30 min und 60 min Stimulation mit 50 ng/mL GDNF bzw. 100 ng/mL NRTN. Als Kontrolle diente eine Reduktion des pAkt-Niveaus durch 15 min Inkubation mit 1 M Sorbitol (S.).

Durch GDNF-Stimulation über den Korezeptor Gfr α 1 wird Akt schwach und transient oder anhaltend aktiviert. Im Gegensatz zur Erk1/2-Aktivierung, die in Neuro-2a Zellen durch GDNF- oder NRTN-Behandlung gleich stark erfolgt, wird der Akt-Signalweg nicht über den NRTN/Gfr α 2/RET-Rezeptorkomplex ausgelöst. Auch die schwache und anhaltende Aktivierung von Erk1/2 nach GDNF-Stimulation bei Neuro-2a Wildtypzellen tritt bei der Akt-Kinase entsprechend nicht auf. Die Signalintensität der Proteinbanden wurde densitometrisch ausgewertet (Abb. 4.17).

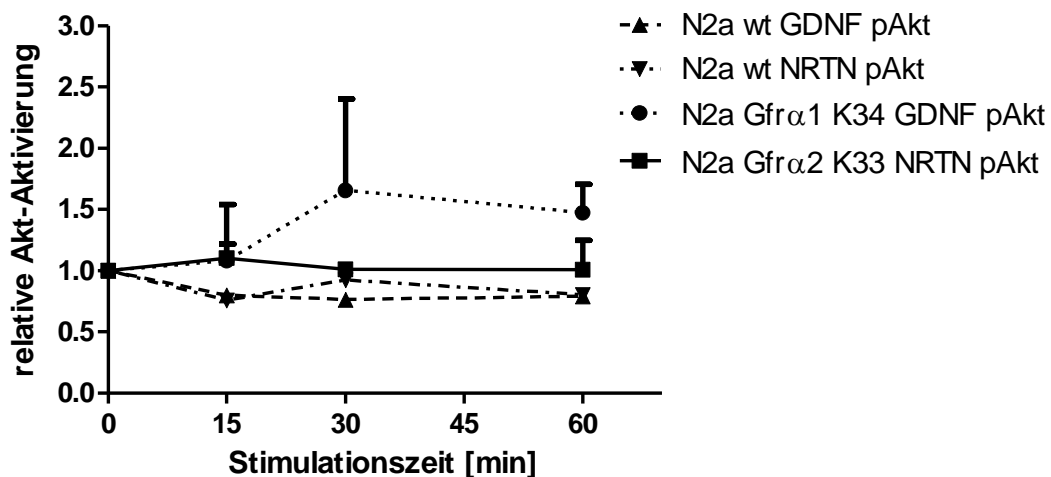


Abb. 4.17: Stimulationsniveau GFL-vermittelter Akt-Aktivierung in Neuro-2a Zellen

Die durch GDNF-Stimulation ausgelöste Akt-Phosphorylierung über Gfr α 1 zeigte einen bei 15 min beginnenden Anstieg zu einer Steigerung gegenüber der Akt-Phosphorylierung des Wildtyps um etwa 70 %. Im Verlauf von 30 bis 60 min fiel das Signal langsam auf einen um 50 % erhöhten Wert ab. NRTN löste kein pAkt-Signal in N2a Gfr α 2 Zellen aus. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der Immunblot-Signale der Akt-Phosphorylierung nach GDNF- oder NRTN-Stimulation von N2a wt, N2a Gfr α 1 und N2a Gfr α 2 Zellen (Abb. 4.16). Die Signale wurden anhand des Verhältnisses der Akt-Werte auf ein einheitliches Proteinlevel normiert. Der jeweilige Nullwert der pAkt-Signale wurde auf den Wert 1 gesetzt und die 15'-, 30'- und 60'-Signale auf ihren jeweiligen Nullwert bezogen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Phosphorylierung der Akt-Kinase begann erst nach 15 min GDNF-Stimulation in Neuro-2a Gfr α 1 Zellen und erreichte durchschnittlich eine Steigerung um etwa 70 % gegenüber dem Wildtyp. Nach 1 h war die Signalstärke noch immer um 50 % erhöht. Unter Einbeziehung der Standardabweichung lässt sich nicht ausschließen, dass eine anhaltende statt einer transienten Aktivierung vorliegt.

4.2.4 MODULATION GFL-VERMITTELTER SIGNALWEITERLEITUNG IN N2A ZELLEN

Die Modulation GFL-vermittelter Signalweiterleitung wurde am Modellsystem stabil Gfr α -transfizierter Neuro-2a Zellen im Rahmen einer Masterarbeit untersucht (Strunk, 2010).

4.3 DAS B104 RET NEUROBLASTOMA-MODELLSYSTEM

4.3.1 FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE ANALYSE DER RET-LOKALISATION

Um zu untersuchen, ob eine Änderung der zellulären Lokalisation des RET-Rezeptors nach Stimulation erfolgt, wurden stabil transfizierte B104 RET9 und RET51 Klone sowohl mit als auch ohne GDNF-Stimulation konfokal mikroskopiert (Abb. 4.18).

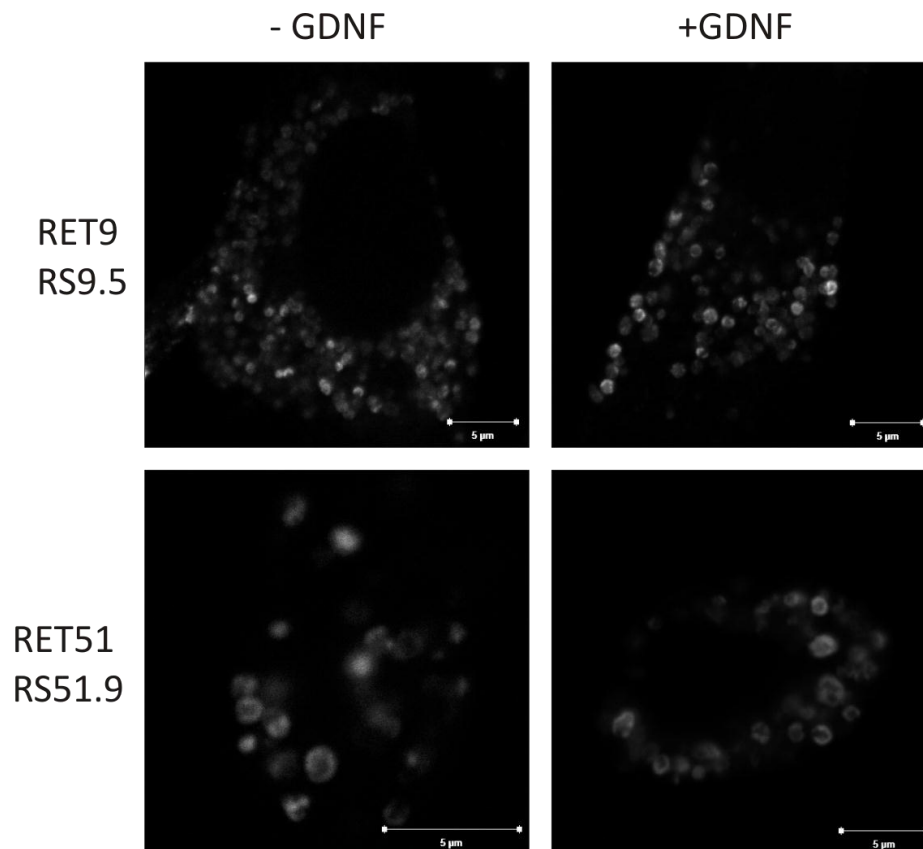


Abb. 4.18: Konfokale Aufnahmen stimulierter und unstimulierter B104 RET9 und RET51 Zellen

Weder für RET9 noch für RET51 traten Unterschiede in der Lokalisation nach GFL-Stimulation auf. B104 RS9.5 und B104 RS51.9 Zellen wurden für 10 min mit 50 ng/mL GDNF stimuliert. Als Kontrolle dienten die jeweiligen unstimulierten Zellen. Die Detektion erfolgte in beiden Fällen am konfokalen Mikroskop über einen ECFP-Fluoreszenzmarker der RET-Konstrukte. Vergrößerung: 1000x.

Die Fluoreszenz-markierten RET9 und RET51-Rezeptoren befinden sich vorwiegend in vesikulären endosomalen Strukturen. Dies scheint unabhängig davon zu sein, ob sie durch GDNF aktiviert wurden oder nicht. Besonders im Fall von RET51 wird sichtbar, dass RET in der Membran und nicht im Lumen der endosomalen Strukturen lokalisiert ist. Wie bereits zuvor bei der allgemeinen Fluoreszenzmikroskopie (nicht dargestellt), konnte auch in konfokalen Aufnahmen keine Plasmamembran-Lokalisation der RET-Rezeptoren detektiert werden. Bei konfokaler Betrachtung fiel jedoch auf, dass der RET-Rezeptor in dem RET9-transfizierten Klon B104 RS9.10 in

feineren vesikulären Strukturen und damit vielleicht in einem geringeren Expressionsniveau auftrat als im RS9.5 Klon (vgl. Abb. 4.18; Abb. 4.19).

RET9 RS9.10

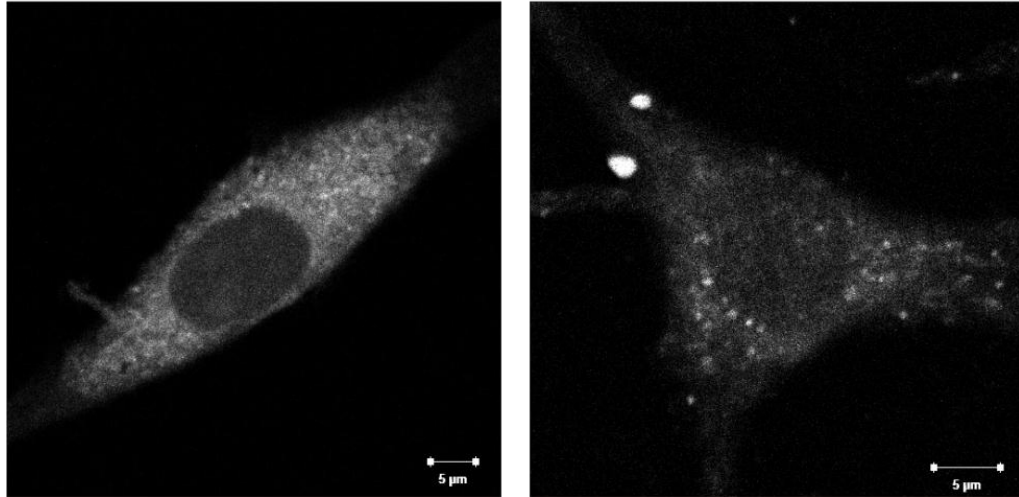


Abb. 4.19: Konfokale Aufnahmen des B104 RET9 Klons RS9.10

Die vesikulären Strukturen, in denen eine RET-Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar ist, traten im Vergleich zu dem B104 Klon RS9.5 (vgl. Abb. 4.18) im Klon RS9.10 in feiner über die Zelle verteilten Strukturen auf. Dargestellt sind zwei repräsentative konfokale Aufnahmen des B104 RET9 RS9.10 Klons. Die Detektion erfolgte am konfokalen Mikroskop über einen ECFP-Fluoreszenzmarker des RET-Konstrukts. Vergrößerung: 1000x.

Anhand der nachfolgenden Abbildung wird an B104 RET9 Zellen beispielhaft gezeigt, dass die RET-Lokalisation unabhängig von einer GDNF-Stimulation ebenfalls in den Neuriten detektiert werden kann (Abb. 4.20).

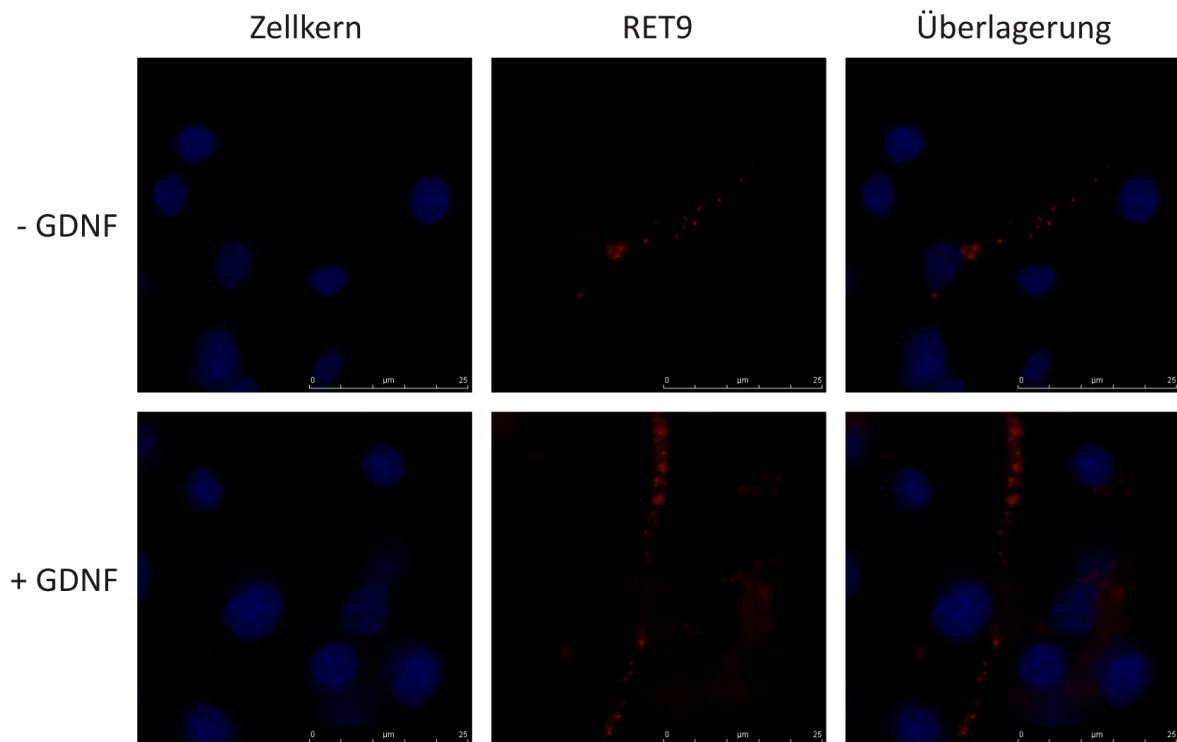


Abb. 4.20: Eine Lokalisation von RET9 in B104 Zellen in den Neuriten ist unabhängig von GDNF

RET9 war sowohl im stimulierten als auch im unstimulierten Zustand außer im Zellkörper ebenfalls in den Neuriten lokalisiert. B104 RET9 RS9.5 Zellen wurden für 10 min mit 50 ng/mL GDNF stimuliert und mikroskopisch mit einer unstimulierten Kontrolle verglichen. Die Zellkerne wurden HOECHST-gefärbt (blau), RET9 wurde über eine ECFP-Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen (rot dargestellt). Vergrößerung: 1000x.

Zur Überprüfung, ob es sich bei den endosomalen Strukturen eventuell um durch Überexpression hervorgerufene RET-haltige Lysosomen handeln könnte, wurden lysosomale Vesikel durch das Reagenz LysoTracker spezifisch angefärbt (Abb. 4.21).

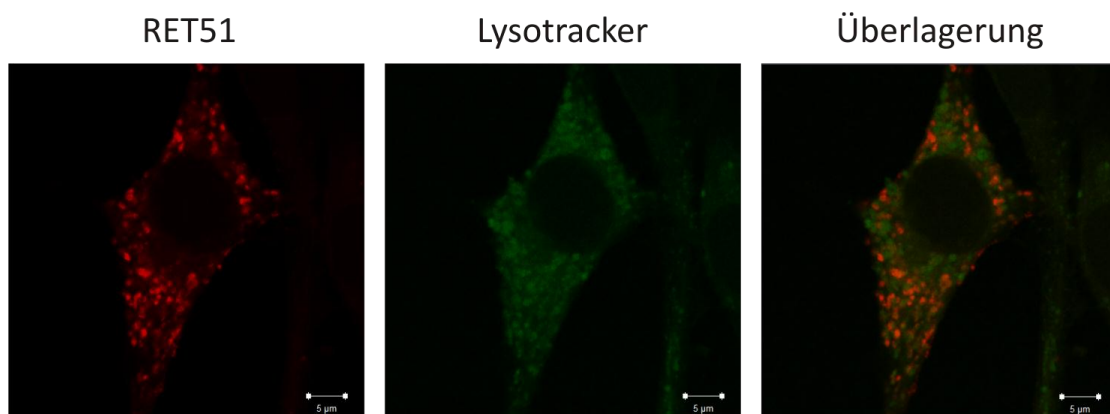


Abb. 4.21: Konfokale Aufnahmen einer LysoTracker-Lysosomenfärbung in B104 RET51 Zellen

Bei den endosomalen Strukturen, die in mit ECFP-markiertem RET transfizierten B104 Zellen fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen sind, handelt es sich nicht um Lysosomen. B104 RET51 RS51.10 Zellen wurden mit 50 nM LysoTracker für 30 min inkubiert und anschließend unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet. RET51 wurde über eine ECFP-Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen (rot dargestellt). LysoTracker ist eine schwache Base, die an einen Fluorophor gekoppelt ist (grün dargestellt). Vergrößerung: 1000x.

Es konnte keine Kolo­kalisierung von RET51 mit den durch Lyso­tracker ange­färbten aziden Kompartimen­ten fest­ge­stellt werden. Da das RET-Fusions­protein dem­nach nicht lysosomal abgebaut wird, wurde an­schlie­ßend mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Rab-GTPasen un­ter­sucht, um welche endosomalen Kompartimen­te es sich bei den RET-haltigen Struk­turen han­deln könnte (Abb. 4.22). Rab-GTPasen sind Marker­pro­teine für spezifische endosomale Struk­turen.

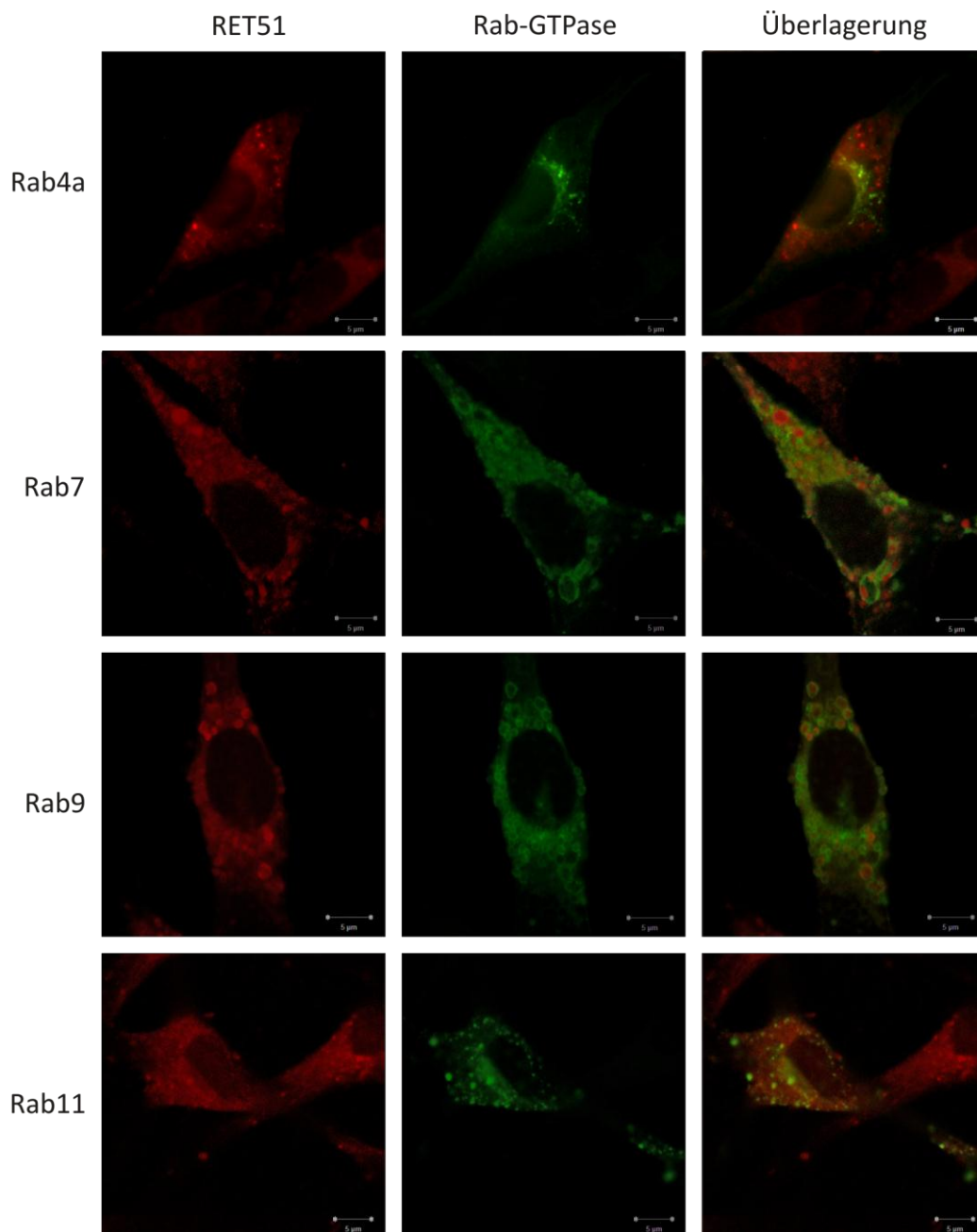


Abb. 4.22: Kolo­kalisationsmuster von RET51 und verschiedenen Rab-GTPasen in B104 Zellen

RET51 kolo­kalisier­te mit Rab11-positiven endosomalen Struk­turen. Weiterhin zeigte sich eine An­häu­fung von RET51 an Rab9-positiven Vesikeln. B104 RET51 RS51.10 Zellen wurden transient mit Plasmid-DNA für verschiedene EYFP-markierte Rab-GTPasen (grün dargestellt) trans­fiziert und über konfokale Fluoreszenz­mikroskopie un­ter­sucht. RET51 wurde über eine ECFP-Fluoreszenzmarkierung detektiert (rot dargestellt). Ver­größerung: 1000x.

Das in B104 Zellen exprimierte RET51-Fusionsprotein befand sich weder in Rab4a-positiven, frühen Endosomen noch in Rab7-positiven Vesikeln, die meist Aufgaben zwischen spätem Endosom und Lysosom übernehmen. Es zeigte sich eine Kollokalisierung mit dem für Recyclingendosomen spezifischen Rab11 und eine Lokalisation an Rab9-positiven Endosomen, die am Cargo-Transport später Endosomen zum Trans-Golgi-Netzwerk beteiligt sind. Bei genauerer Betrachtung lässt sich auch hier eine verstärkte Fluoreszenz entlang der endosomalen Membranen feststellen.

4.3.2 VITALITÄTSTESTS VON B104 NEUROBLASTOMAZELLEN

Die Vitalität von B104 RET9 Zellen wurde nach 3 d GDNF-Stimulation überprüft und mit unstimulierten Zellen verglichen (Abb. 4.23).

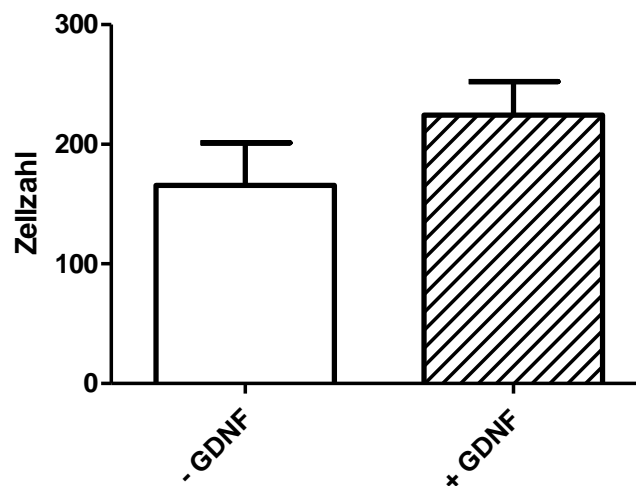


Abb. 4.23: Vitalität von B104 RET9 Zellen nach GDNF-Stimulation

GDNF führte zu einer nicht signifikanten Steigerung der Vitalitätsrate RET9-transfizierter B104 Zellen um 35 % gegenüber der unstimulierten Kontrolle. B104 RET9 RS9.10 Zellen wurden für 16 h in DMEM-Basalmedium ausgehungert und für 3 d mit 50 ng/mL GDNF stimuliert. Vitale Zellen aus fünf zufällig ausgewählten Mikroskopfeldern wurden gezählt und mit einer unstimulierten Kontrolle verglichen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

GDNF erhöhte die Vitalität RET9-transfizierter B104 Zellen um 35 % im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant.

4.3.3 NEURITENWACHSTUM VON B104 ZELLEN NACH GFL-STIMULATION

Nach Toda *et al.*, (1999) beenden B104 Zellen nach Serumentzug die Proliferation und ändern ihre Zellmorphologie von fibroblasten- zu neuronähnlich mit einer bipolaren Neuritenbildung. Ob diese durch GDNF oder NRTN verstärkt werden kann, wurde mikroskopisch an stabil transfizierten B104 RET9 Zellen untersucht (Abb. 4.24).

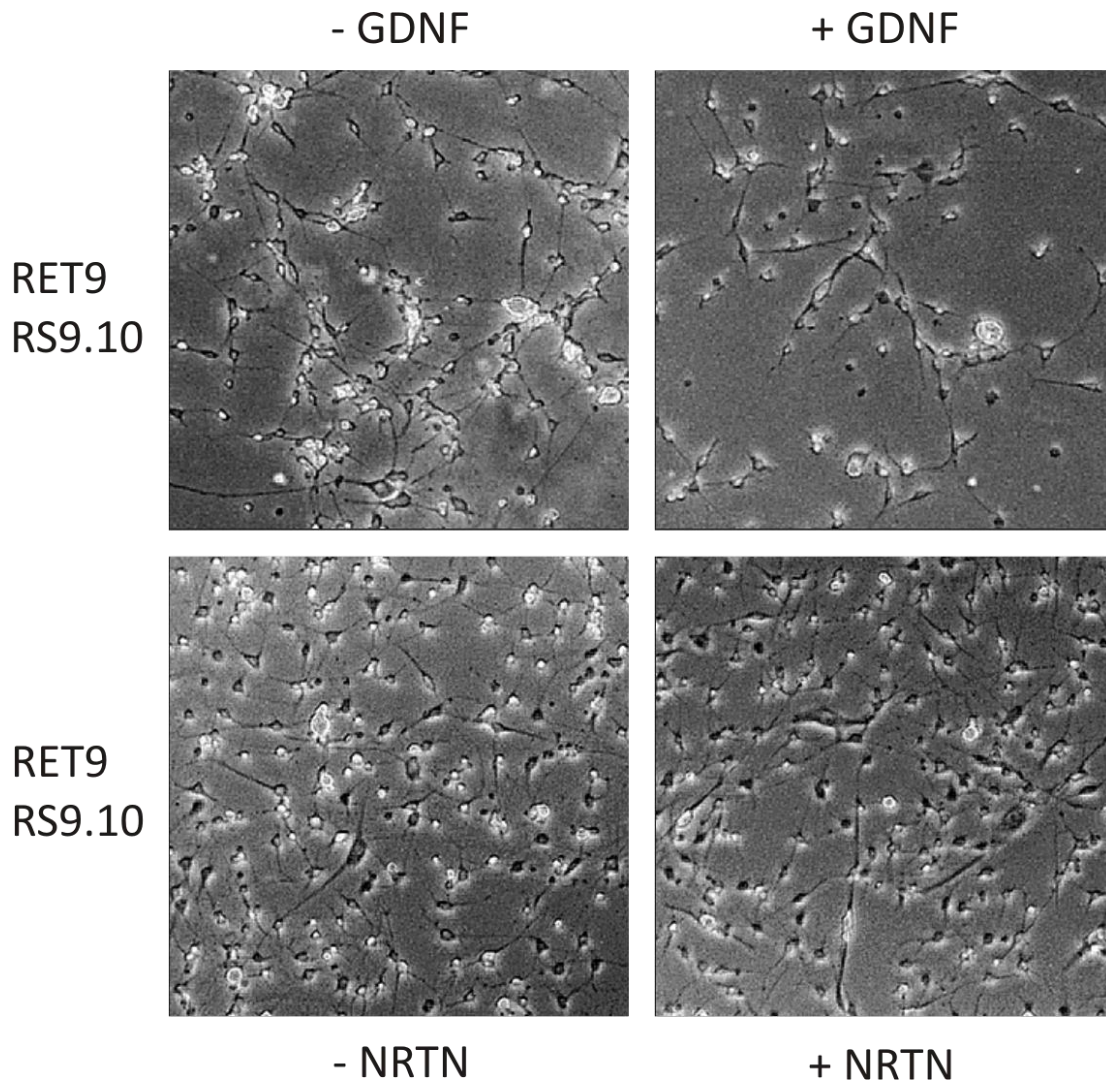


Abb. 4.24: Das Neuritenwachstum von B104 RET9 Zellen ist unabhängig von GDNF und NRTN

GDNF- und NRTN-Stimulation zeigten keine sichtbare Veränderung im Neuritenwachstum oder in der Neuritenlänge von B104 RET9 RS9.10 Zellen. Die Zellen wurden für 16 h in DMEM-Basalmedium ausgehungert und für 3 d mit 50 ng/mL GDNF oder 100 ng/mL NRTN stimuliert. Die Abbildung stellt Phasenkontrast-Aufnahmen nach 3 d Stimulation im Vergleich mit der jeweiligen unstimulierten Kontrolle dar. Vergrößerung: 400x.

Bereits die unstimulierte Kontrolle zeigte ein sehr starkes Neuritenwachstum nach 3 d serumfreier Kultivierung. Die GFL-Wachstumsfaktoren GDNF und NRTN führten zu keiner sichtbaren Verstärkung des Neuritenwachstums in B104 RET9 Zellen. Auch die durchschnittliche Neuritenlänge war vergleichbar.

4.2.3 AKTIVIERUNG SPEZIFISCHER SIGNALKASKADEN IN B104 RET9 UND RET51 NACH GFL-STIMULATION

Die Beteiligung der MAP-Kinasekaskade und des PI3-Kinase-Signalwegs an der RET-vermittelten Signaltransduktion wurde mit Hilfe von Immunblots, die mit Antikörpern gegen Erk1/2, Akt und deren phosphorylierte Formen inkubiert wurden, untersucht. Hierbei wurden B104 wt, B104 RET9 und B104 RET51 Zellen nach Stimulation durch GDNF und NRTN miteinander verglichen (Abb. 4.25).

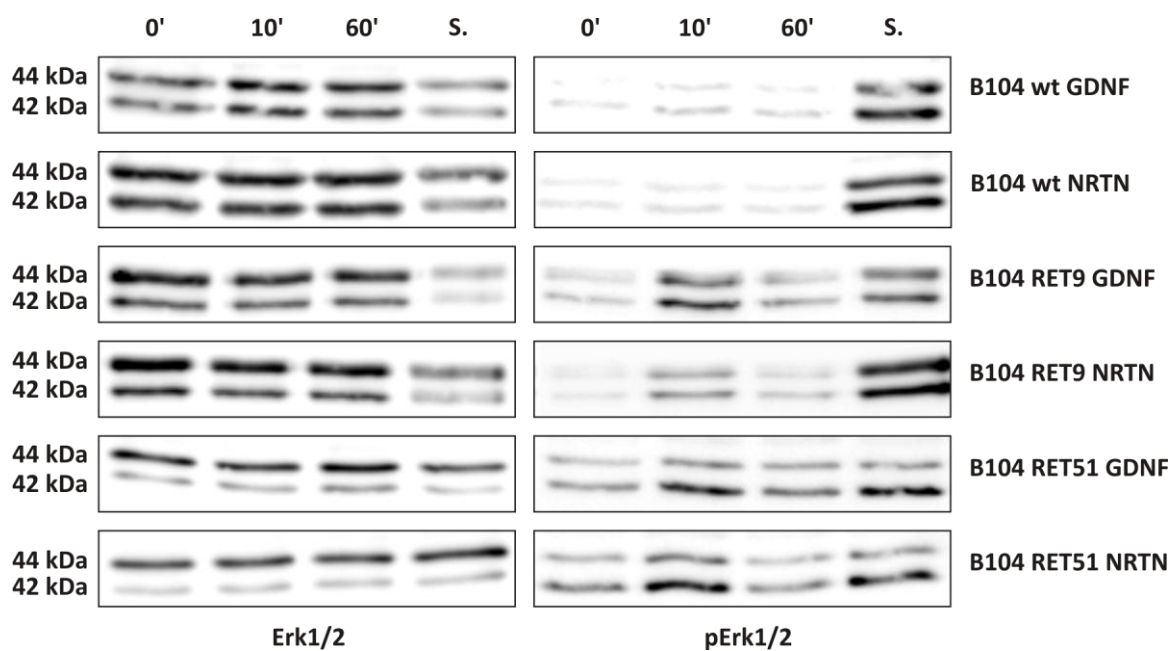


Abb. 4.25: GFL-induzierte Erk1/2-Aktivierung in B104 RET9 und RET51 Zellen

GDNF- und NRTN-Stimulation führen zur transienten Erk1/2-Aktivierung in B104 RET9 und B104 RET51 Zellen. Dargestellt sind repräsentative Immunblots gegen Erk1/2 (links) und pErk1/2 (rechts). Aufgetragen wurden Proteinextrakte von B104 wt, B104 RET9 RS9.5 und B104 RET51 RS51.9 Zellen, die für die angegebenen Zeitpunkte mit 50 ng/mL GDNF bzw. 100 ng/mL NRTN stimuliert wurden. Eine Aktivierung konnte in den B104 Klonen RS9.5, RS9.10 und RS51.9 ausgelöst werden. Für RS51.10 konnte keine Erk1/2-Aktivierung festgestellt werden. Als Kontrolle für eine aktivierte MAPK-Kaskade dienten 15 min Inkubation mit 1 M Sorbitol (S).

Durch die stabile Transfektion von B104 Zellen mit den RET9 und RET51 Isoformen des RET-Rezeptors konnte eine transiente Erk1/2-Aktivierung sowohl durch GDNF- (50 ng/mL) als auch durch NRTN-Stimulation (100 ng/mL) induziert werden. Die maximale Phosphorylierung trat in allen Fällen nach 10 min Stimulation auf. Es stellte sich heraus, dass eine ähnlich starke Stimulation bereits durch 50 ng/mL NRTN ausgelöst wird. Zur besseren Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit mit vorherigen Daten wurden jedoch weiterhin 100 ng/mL eingesetzt (Daten nicht gezeigt).

Die Signalintensität der Proteinbanden für die Erk1/2-Aktivierungen wurde densitometrisch ausgewertet (Abb. 4.26).

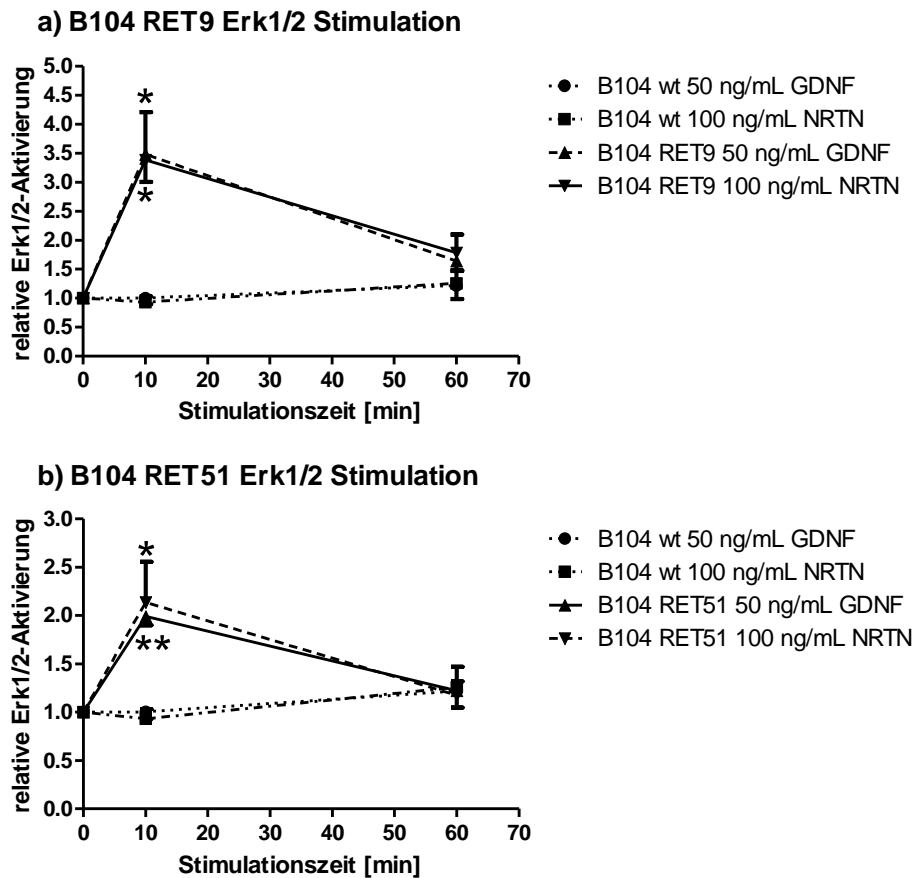


Abb. 4.26: Stimulationsniveau GDNF- und NRTN-vermittelter Erk1/2-Aktivierung in B104

Die RET-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 nach GFL-Stimulation war signifikant erhöht. RET9 führt zu einer stärkeren Erk1/2-Phosphorylierung als RET51. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der Immunblot-Signale der GDNF- und NRTN-vermittelten Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 (Abb. 4.25). Gezeigt ist der Vergleich von B104 wt Zellen mit stabil transfizierten B104 RET9 (2x RS9.5, 1x RS9.10) Zellen **(a)** und B104 RET51 (3x RS51.9) Zellen **(b)**. Die Signale wurden anhand des Verhältnisses der Erk1/2-Werte auf ein einheitliches Proteinlevel normiert. Der jeweilige Nullwert der pErk1/2-Signale wurde auf den Wert 1 gesetzt und die 10'- und die 60'-Signale auf ihren jeweiligen Nullwert bezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$: ungepaarter Studentischer t-Test.

Zwischen der Erk1/2-Stimulation durch GDNF und der durch NRTN konnte kein Unterschied festgestellt werden. Beide Mitglieder der GFL-Familie lösen demnach eine transiente Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade aus, die über den RET-Rezeptor verläuft. Das Signal über die Rezeptorisoform RET9 war stärker ausgeprägt als das RET51-vermittelte Signal. Die Aktivierung von RET9 führte zu einem signifikanten Anstieg der Erk1/2-Phosphorylierung auf das dreieinhalbfache Niveau des Kontrollwerts am maximalen Stimulationspunkt nach 10 min. Eine RET51-Aktivierung führte zu einem Anstieg auf das zweifache Niveau der basalen Erk1/2-

Phosphorylierung. Hierbei wurde der Ausgangswert der Erk1/2-Phosphorylierung nach einer Stunde Gesamtstimulationszeit wieder fast vollständig erreicht. Das über RET9 vermittelte aktive Signal hielt noch über den untersuchten Zeitraum von einer Stunde Stimulation hinaus an. Für den B104 Wildtyp war ein sehr schwacher Anstieg von phosphoryliertem Erk1/2 über die Stimulationsdauer zu beobachten.

Die Beteiligung des PI3-Kinase-Signalwegs in GFL-stimulierten B104 Klonen wurde mittels Immunblots gegen Akt und pAkt überprüft (Abb. 4.27).

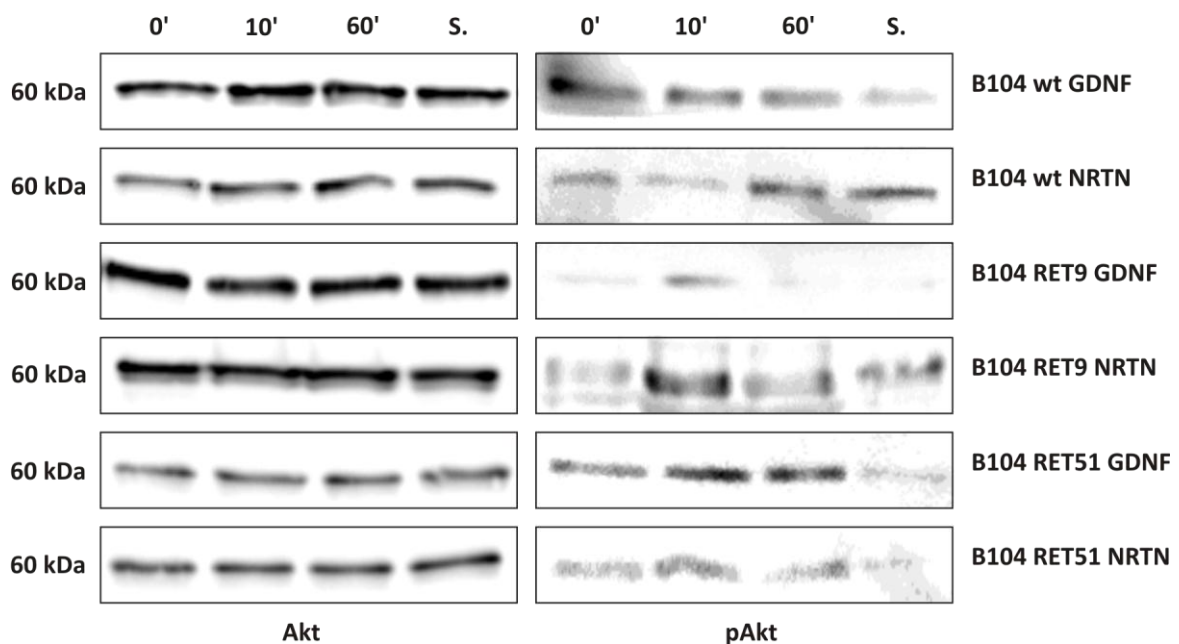


Abb. 4.27: GFL-induzierte Aktivierung der Akt-Kinase in B104 RET9 und RET51 Zellen

GDNF- und NRTN-Stimulation führten zur transienten Aktivierung von Akt in B104 RET9 und B104 RET51 Zellen. Dargestellt sind repräsentative Immunblots gegen Akt (links) und pAkt (rechts). Aufgetragen wurden Proteinextrakte von B104 wt, B104 RET9 RS9.5 und B104 RET51 RS51.9 Zellen, die für die angegebenen Zeitpunkte mit 50 ng/mL GDNF bzw. 100 ng/mL NRTN stimuliert wurden. Als Kontrolle diente eine Dephosphorylierung von Akt durch 15 min Stimulation mit 1 M Sorbitol (S.).

Neben der transienten Aktivierung von Erk1/2 (s. o.) wurde durch GDNF- oder auch NRTN-Stimulation in RET-transfizierten B104 Zellen zudem die Akt-Kinase in unterschiedlicher Stärke transient aktiviert. Die Aktivierung dieses Signalwegs konnte ebenfalls über beide Rezeptorisoformen RET9 und RET51 erfolgen. Die maximale Phosphorylierung trat in allen Fällen nach 10 min Stimulation auf. Eine Aktivierung konnte in den B104 Klonen RS9.5, RS9.10 und RS51.9 ausgelöst werden. Für RS51.10 konnte keine Aktivierung von Akt festgestellt werden. Die Signalintensität der Proteinbanden wurde densitometrisch ausgewertet (Abb. 4.28).

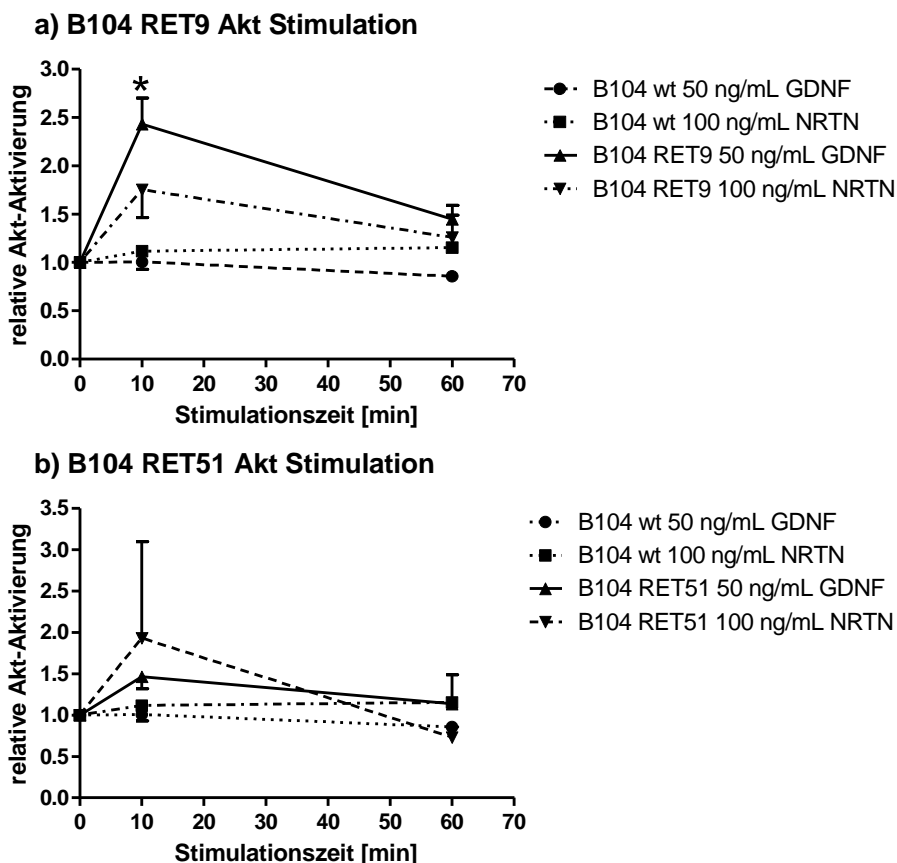


Abb. 4.28: Stimulationsniveau GDNF- und NRTN-vermittelter Aktivierung von Akt in B104

Die RET-vermittelte Aktivierung der Akt-Kinase durch GDNF war für RET9 signifikant erhöht. RET9 führte zu einer etwas stärkeren Akt-Phosphorylierung als RET51. Die NRTN-Stimulation erfolgte über RET9 nur etwa halb so stark und über RET51 etwa doppelt so stark wie für GDNF. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der Immunblot-Signale der GDNF- und NRTN-vermittelten Aktivierung der Akt-Kinase (Abb. 4.27). Gezeigt ist der Vergleich von B104 wt Zellen mit B104 RET9 (2x RS9.5, 1x RS9.10) Zellen (**a**) und B104 RET51 (3x RS51.9) Zellen (**b**). Die Signale wurden anhand des Verhältnisses der Akt-Werte auf ein einheitliches Proteinlevel normiert. Der jeweilige Nullwert der pAkt-Signale wurde auf den Wert 1 gesetzt und die 10'- und die 60'-Signalwerte auf ihren jeweiligen Nullwert bezogen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$: ungepaarter Studentischer t-Test.

Die Akt-Phosphorylierung erfolgte bei Stimulation mit GDNF über RET9 doppelt so stark und über RET51 nur halb so stark wie für NRTN. Das Signal nach GDNF-Stimulation, das über die Rezeptorisoform RET9 vermittelt wird, war stärker als bei RET51. Die Aktivierung von RET9 führte hierbei zu einem signifikanten Anstieg der Akt-Phosphorylierung um 250 % gegenüber dem Phosphorylierungs-Niveau der Wildtypzellen am maximalen Stimulationspunkt nach 10 min. Eine RET51-Aktivierung durch GDNF bewirkte lediglich eine Steigerung um etwa 50 % gegenüber der basalen Akt-Phosphorylierung am selben Zeitpunkt. Daher zeigt sich auch nur für diese Isoform nach einer Stunde Stimulation ein Rückgang der Signalstärke auf

das Ausgangsniveau. Ob NRTN tatsächlich in der Lage ist, über RET9 oder RET51 wie GDNF über RET9 Akt zu aktivieren, ist aufgrund des hohen Fehlerbereichs nicht eindeutig. Für GDNF zeigte sich jedenfalls ein klarer Unterschied in der Signalstärke beider RET-Isoformen, für NRTN hingegen verlief die Aktivierung gleich stark.

4.3.3 DER RAP1/MAPK-SIGNALWEG IN DER GDNF-VERMITTELTEN ZELLAKTIVIERUNG NEURONALER ZELLSYSTEME

Für das onkogene RET-Fusionsprotein RET/PTC1 und die humane Neuroblastomazelllinie TGW wurde eine Beteiligung der kleinen GTPase Rap1 und dem Rap1-spezifischen Nukleotidaustauschfaktor RapGEF1 (C3G) an der RET-vermittelten Signalweiterleitung nachgewiesen. Eine GDNF-Stimulation der Zellen führt hierbei zu einer anhaltenden Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und damit zu einem Neuritenwachstum (Uchida *et al.*, 2006; De Falco *et al.*, 2007). Eine entsprechende Beteiligung von Rap1 wurde durch fluoreszenzmarkiertes Rap1 im B104 RET9 Modellsystem mikroskopisch untersucht (Abb. 4.29).

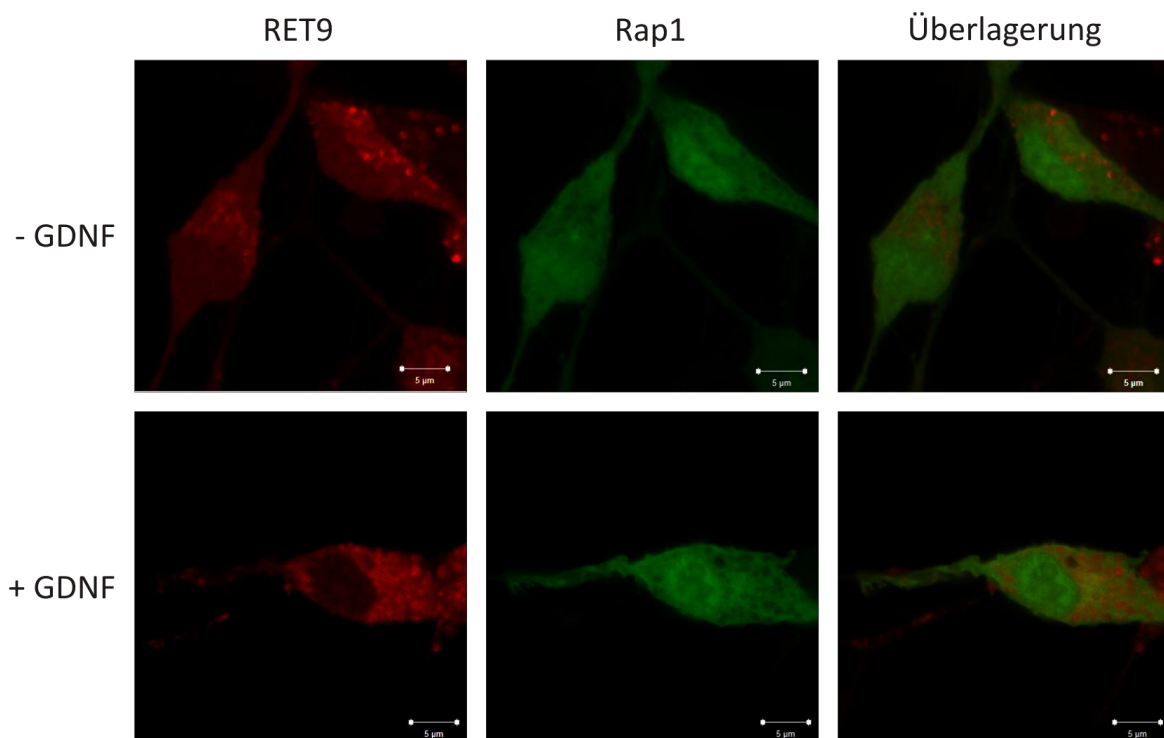


Abb. 4.29: Konfokale Aufnahmen von Rap1a in stimulierten und unstimulierten B104 Zellen

Rap1a ist zytosolisch verteilt. GDNF-Stimulation führte zu keiner sichtbaren Lokalisationsänderung von Rap1a oder RET9 in B104 RET9 RS9.5 Zellen. Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von B104 RET9 RS9.5 Zellen, die zuvor mit Plasmid-DNA für EYFP-markiertes Rap1a transfiziert, anschließend für 16 h in DMEM-Basalmedium ausgehungert und dann für 10 min mit 50 ng/mL GDNF stimuliert wurden. Die Lokalisationsbestimmung erfolgte im Vergleich mit einer unstimulierten Kontrolle, wobei RET9 über eine ECFP- (rot dargestellt) und Rap1a über eine EYFP-Fluoreszenzmarkierung (grün dargestellt) detektiert wurde. Vergrößerung: 1000x.

Rap1a ist zytosolisch verteilt und befindet sich nicht in den oder verstärkt an den endosomalen Strukturen, in denen RET lokalisiert ist. Eine vorherige GDNF-Stimulation führte zu keiner Lokalisationsänderung von RET9 oder Rap1a in diesem Zellsystem. Eine Beteiligung von RapGEF1, einem GEF für Rap1a, wurde analog untersucht (Abb. 4.30).

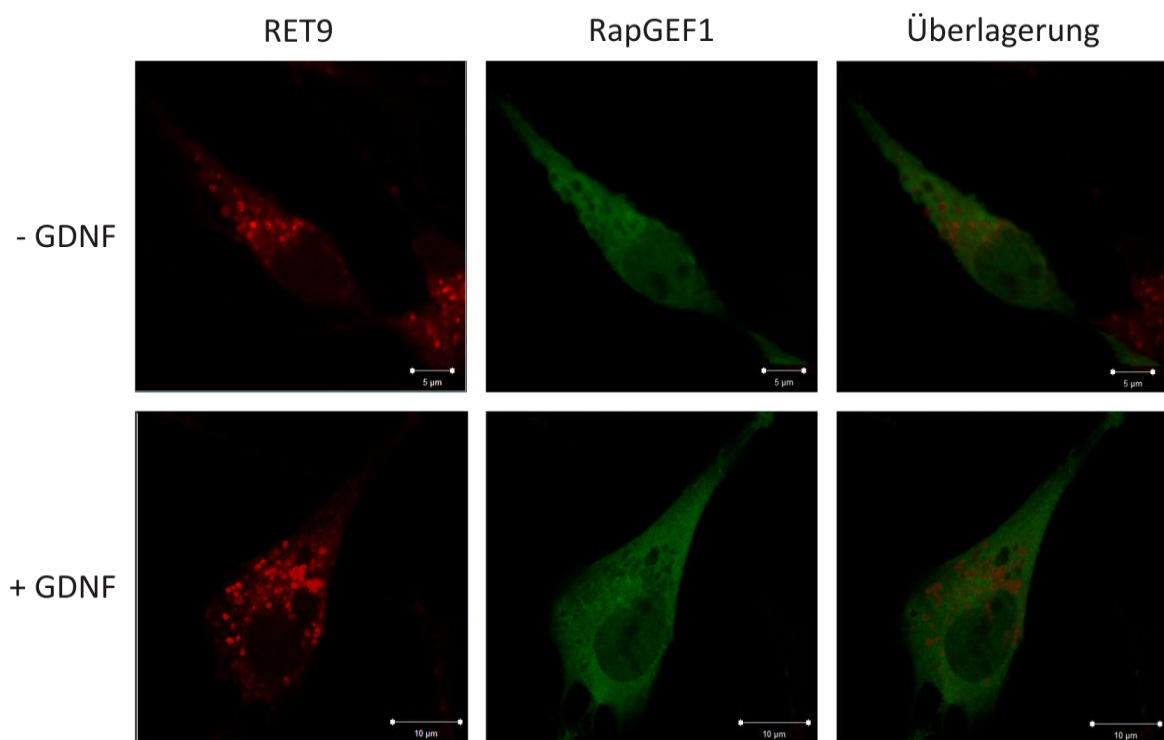


Abb. 4.30: Konfokale Aufnahmen von RapGEF1 in stimulierten und unstimulierten B104 Zellen

RapGEF1 ist zytosolisch verteilt. GDNF-Stimulation führte zu keiner sichtbaren Lokalisationsänderung von RapGEF1 oder RET9 in B104 RET9 Zellen. Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von B104 RET9 RS9.5 Zellen, die zuvor mit Plasmid-DNA für EYFP-markiertes RapGEF1 transfiziert, anschließend für 16 h in DMEM-Basalmedium ausgehungert und dann für 10 min mit 50 ng/mL GDNF stimuliert wurden. Die Lokalisationsbestimmung erfolgte im Vergleich mit einer unstimulierten Kontrolle, wobei RET9 über eine ECFP- (rot dargestellt) und RapGEF1 über eine EYFP-Fluoreszenzmarkierung (grün dargestellt) detektiert wurde. Vergrößerung: 1000x.

RapGEF1 ist ebenfalls zytosolisch und nicht endosomal lokalisiert. Eine Zellstimulation mit GDNF bewirkte auch hierbei keinen Unterschied im Hinblick auf die Lokalisation von RapGEF1 und RET9. Abschließend wurde die intrazelluläre Lokalisation von RapGEF2 (PDZ-GEF1), einem weiteren für Rap1a spezifischen GEF, konfokal betrachtet (Abb. 4.31).

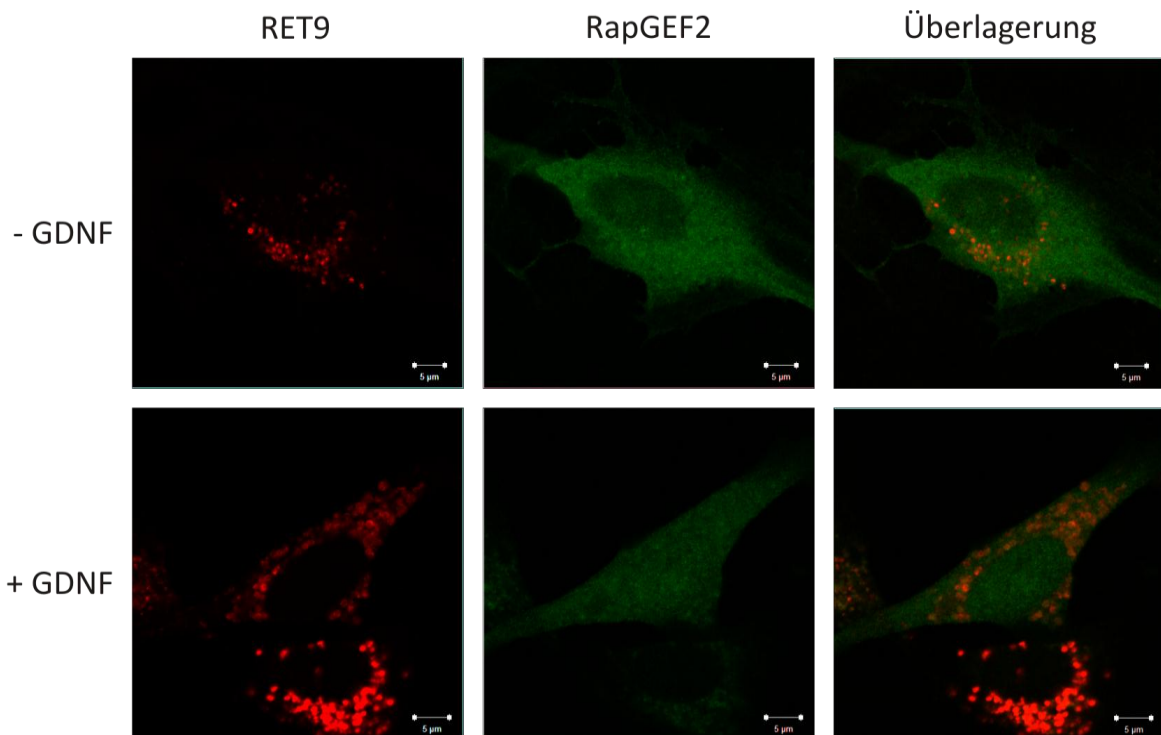


Abb. 4.31: Konfokale Aufnahmen von RapGEF2 in stimulierten und unstimulierten B104 Zellen

RapGEF2 ist zytosolisch verteilt. GDNF-Stimulation führte zu keiner sichtbaren Lokalisationsänderung von RapGEF2 oder RET9 in B104 RET9 Zellen. Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von B104 RET9 RS9.5 Zellen, die zuvor mit Plasmid-DNA für EYFP-markiertes RapGEF2 transfiziert, anschließend für 16 h in DMEM-Basalmedium ausgehungert und dann für 10 min mit 50 ng/mL GDNF stimuliert wurden. Die Lokalisationsbestimmung erfolgte im Vergleich mit einer unstimulierten Kontrolle, wobei RET9 über eine ECFP- (rot dargestellt) und RapGEF2 über eine EYFP-Fluoreszenzmarkierung (grün dargestellt) detektiert wurde. Vergrößerung: 1000x.

RapGEF2 liegt zytosolisch verteilt vor und zeigte keine Änderung der Lokalisation nach GDNF-Stimulation in B104 RET9 Zellen.

4.3.4 MODULATION GFL-VERMITTELTEN SIGNALWEITERLEITUNG IN B104 ZELLEN

Am Modellsystem der RET-isoformspezifisch transfizierten B104 Neuroblastomazellen wurde sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch proteinbiochemisch *via* Immunblots untersucht, inwieweit die Endozytose des RET-Rezeptorkomplexes einen Effekt auf die intrazelluläre Signalantwort ausübt.

4.3.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zum Einfluss der Endozytose auf die GFL-Signalgebung

Durch die Transfektion von B104 RET9 Zellen mit DNA-Plasmidkonstrukten für die dominant negative Dynamin-2 Mutante K44A und dem Dynamin-2 Wildtyp zum Vergleich, die beide eine Fluoreszenzmarkierung tragen, sollte die Bedeutung der Dynamin-abhängigen Endozytosewege an der RET-Signaltransduktion analysiert werden (Abb. 4.32).

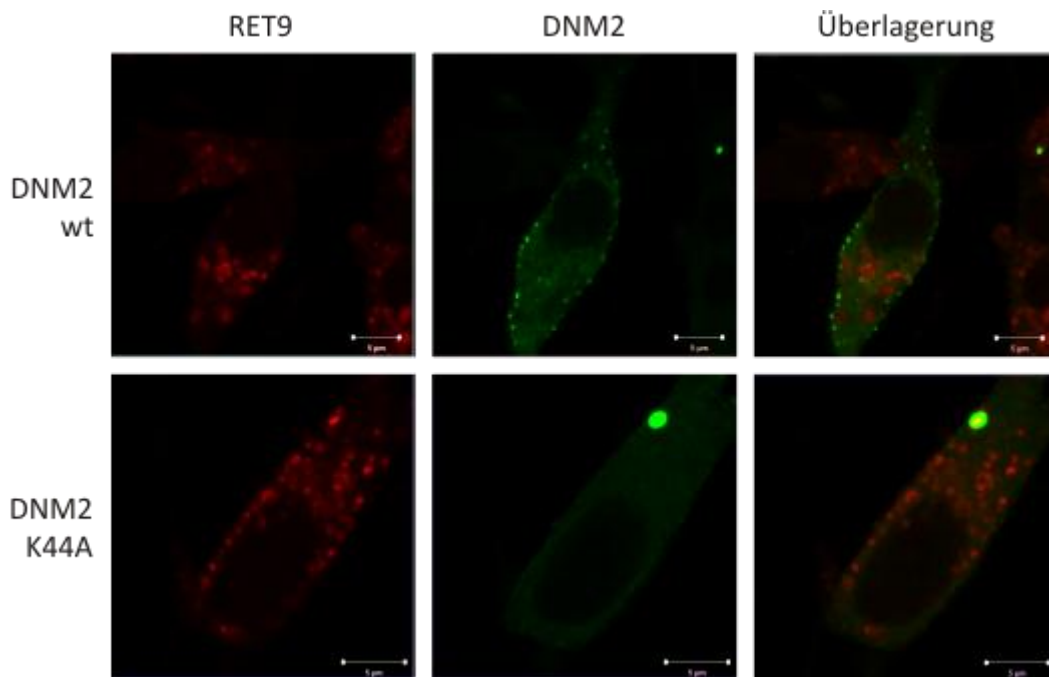


Abb. 4.32: Konfokale Aufnahmen von DNM2 wt und DNM2 K44A in stimulierten B104 Zellen

Dynamin-2 (DNM2) wt akkumuliert an der Plasmamembran. Durch Expression der dominant negativen Mutante K44A traten RET9-haltige Vesikel vermehrt in der Nähe der Plasmamembran auf. B104 RET9 RS9.5 Zellen wurden transient mit Plasmid-DNA für EYFP-markiertes DNM2 wt oder DNM2 K44A (grün dargestellt) transfiziert, für 16 h in DMEM-Basalmedium ausgehungert, 10 min mit 50 ng/mL GDNF stimuliert und über konfokale Fluoreszenzmikroskopie untersucht. RET9 wurde über eine ECFP-Fluoreszenzmarkierung detektiert (rot dargestellt). Vergrößerung: 1000x.

In der konfokal aufgenommenen Ebene ist die Lokalisation des Dynamin-2 Wildtyps in konzentrierten Bereichen an der Plasmamembran deutlich zu erkennen. RET9 war wie zuvor in endosomalen Vesikeln über die Zelle verteilt lokalisiert. In DNM2 K44A-positiven Zellen fand sich meist, jedoch nicht in allen Zellen, eine Anhäufung RET9-haltiger Vesikel in der Nähe der Plasmamembran verteilt. Durch die Aufnahme mehrerer geschichteter Ebenen, so genannter *Z-Stacks*, konnte eine 3-dimensionale Ansicht dieser Zellen ermöglicht werden. Hierin war zu sehen, dass die schwächer fluoreszenten RET9-Signale in den DNM2 K44A transfizierten Zellen im Wesentlichen ebenfalls in den Außenbereichen der Zelle zentriert waren (nicht dargestellt).

Eine geeignete Methode, um spezifisch nur die Clathrin-abhängigen Endozytosewege zu inhibieren und die RET-Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch zu verfolgen, ist die artifizielle Überexpression der Eps15 Mutante DIII und der funktionslosen Mutante DIIIΔ2 als Kontrolle (Abb. 4.33, vgl. 1.4.2).

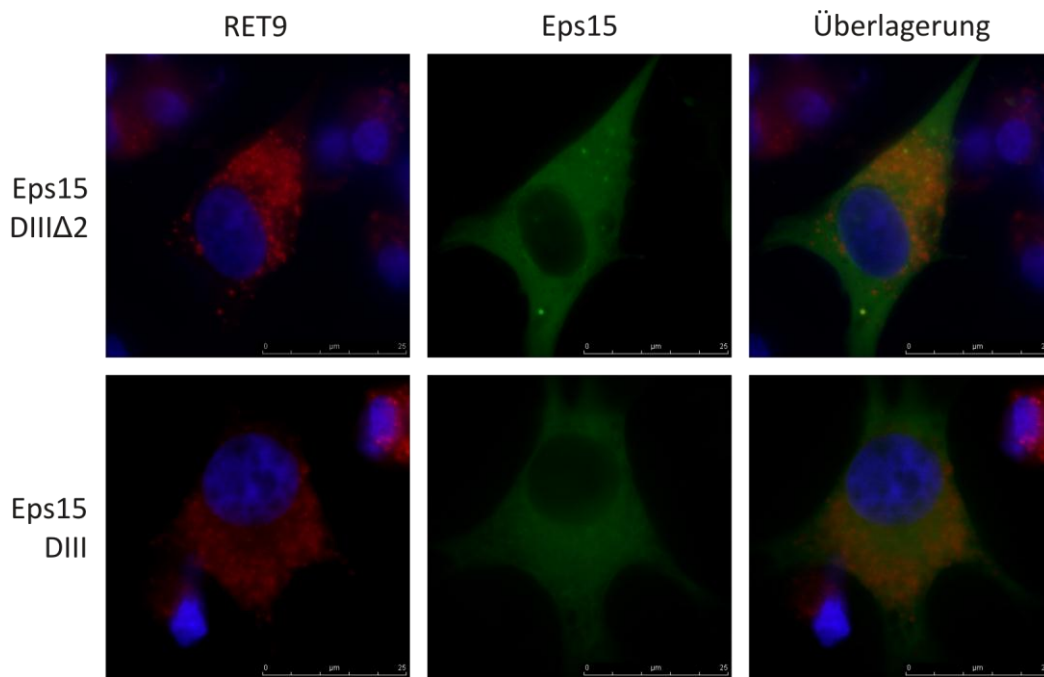


Abb. 4.33: Inhibition Clathrin-abhängiger Endozytose in B104 Zellen durch Eps15 DIII

Die Inhibition der Clathrin-abhängigen Endozytose in B104 RET9 Zellen führte zu keiner Lokalisationsänderung des RET-Rezeptors. B104 RET9 RS9.5 Zellen wurden transient mit Plasmid-DNA für die EYFP-markierte, dominant negative Eps15 Mutante DIII bzw. der funktionslosen Mutante DIIIΔ2 (grün dargestellt) transfiziert, für 16 h in DMEM-Basalmedium ausgehungert und für 10 min mit 50 ng/mL GDNF stimuliert. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen repräsentativer transfizierter Zellen. Die Zellkerne wurden HOECHST-gefärbt (blau) und zusammen mit RET51-ECFP (rot dargestellt) abgebildet. Vergrößerung: 1000x.

Eine Überexpression der dominant negativen Eps15 DIII Mutante in B104 RET9 Zellen löste keine sichtbare Veränderung der intrazellulären RET9-Verteilung im Vergleich zur DIIIΔ2 Mutante aus. Auch in der konfokalen Betrachtung transfizierter Zellen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

4.3.4.2 Proteinbiochemische Untersuchungen zum Einfluss der Endozytose auf die GFL-Signalgebung

Neben den mikroskopischen Untersuchungsmethoden zur Inhibition spezifischer Endozytosewege wurden B104 RET9 Zellen in Kultur mit verschiedenen Reagenzien behandelt, durch die zellulären Endozytosewege unterschiedlich beeinflusst wurden. Anschließend wurden Proteinextrakte dieser Zellen in Immunblots mit Antikörpern gegen Erk1/2, pErk1/2, Akt und pAkt untersucht (Abb. 4.34).

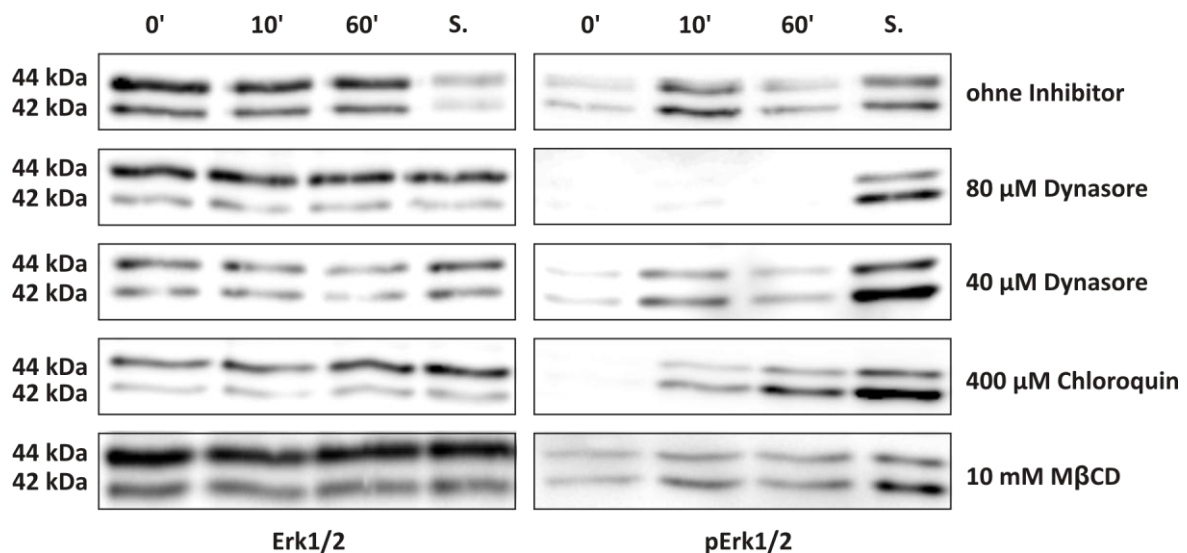


Abb. 4.34: Auswirkung der Endozytose-Modulation auf die Erk1/2-Aktivierung in B104 RET9

Mit steigender Dynasorekonzentration wurde die GDNF-induzierte Erk1/2-Aktivierung vollständig inhibiert. Auch Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) führte zu einer Inhibition der Erk1/2-Aktivierung. Nach Chloroquinbehandlung der Zellen wurde das pErk1/2-Signal von einer transienten zu einer zunehmend anhaltenden Aktivierung verschoben. Dargestellt sind repräsentative Immunblots gegen Erk1/2 (links) und pErk1/2 (rechts). Aufgetragen wurden Proteinextrakte von B104 RET9 RS9.5 Zellen, die für 16 h in DMEM-Basalmedium ausgehungert, ohne Inhibitor, für 30 min mit 80 μ M Dynasore, 40 μ M Dynasore, 400 μ M Chloroquin oder 10 mM M β CD vorinkubiert und anschließend für die angegebenen Zeitabschnitte mit 50 ng/mL GDNF stimuliert wurden. Als Kontrolle für eine aktivierte MAPK-Kaskade diente eine Inkubation von 15 min Dauer mit 1 M Sorbitol (S.).

Die chemische Auflösung cholesterreicher Membranbereiche der Plasmamembran, wie den *lipid rafts*, durch Methyl- β -Cyclodextrin führte zu einer Reduktion der GDNF-induzierten Erk1/2-Aktivierung. Etwas schwächer fiel diese Reduktion bei einer Vorinkubation der Zellen mit 40 μ M Dynasore aus. Dieses agiert als nichtkompetitiver Inhibitor der GTPase-Aktivität von Dynamin und blockiert damit die Dynamin-abhängigen Endozytosewege. Die doppelte Dynasorekonzentration (80 μ M) löste eine nahezu vollständige Inhibition der Erk1/2-Aktivierung aus. Chloroquin inhibiert den Endozytosemechanismus nicht, sondern verhindert lediglich die pH-Wert-abhängige Reifung endosomaler Transportschritte. In den damit behandelten Zellen wurde die durch GDNF ausgelöste Erk1/2-Aktivierung weitestgehend von einer transienten zur anhaltenden Aktivierung verschoben. Die Signalintensität der Proteinbanden wurde densitometrisch ausgewertet (Abb. 4.35).

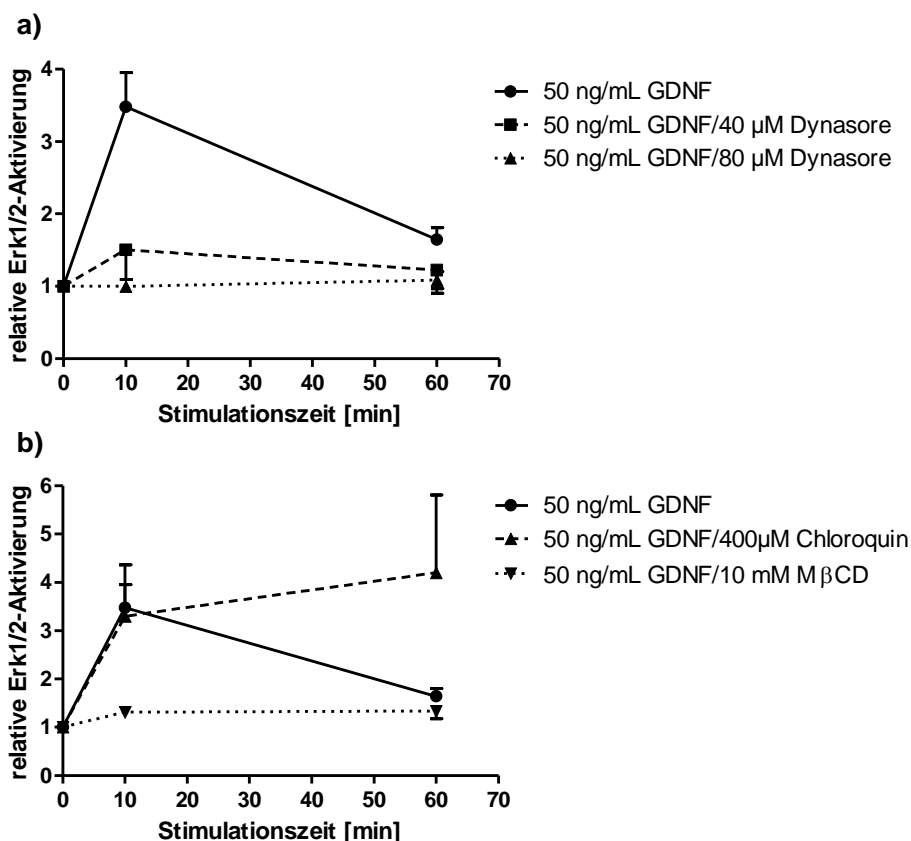


Abb. 4.35: Erk1/2-Stimulationsniveau nach Modulation der Endozytose in B104 RET9 Zellen

Die Reduktion der GDNF-induzierten Erk1/2-Aktivierung war nahezu äquivalent für 10 mM Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) und 40 μ M Dynasore. Die durch Dynasore vermittelte Reduktion war konzentrationsabhängig und führte bei höherer Konzentration zur vollständigen Inhibition der Erk1/2-Aktivierung. Für Chloroquin wurde nach 10 min derselbe Stimulationswert wie für die Kontrolle erhalten. Danach erfolgte ein Anstieg der Erk1/2-Phosphorylierung. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der Immunblot-Signale der GDNF-vermittelten Aktivierung der Erk1/2-Kinasen in B104 RET9 RS9.5 Zellen nach Modulation der Endozytose (Abb. 4.34). Gezeigt ist der Vergleich von mit 50 ng/mL GDNF stimulierten B104 RET9 Zellen ohne Inhibitorbehandlung zu stimulierten Zellen, die mit Dynasore in den angegebenen Konzentrationen **(a)** oder Chloroquin und M β CD in den angegebenen Konzentration **(b)** vorinkubiert wurden. Die Signale wurden anhand der Verhältnisse der Erk1/2-Werte auf ein einheitliches Proteinlevel normiert. Der jeweilige Nullwert der pErk1/2-Signale wurde auf den Wert 1 gesetzt und die 10'- und 60'-Signalwerte auf ihren jeweiligen Nullwert bezogen. Für M β CD und 80 μ M Dynasore konnten aus methodischen Gründen nur jeweils zwei Messreihen erhalten werden. Die Fehlerbalken geben hierbei die Standardabweichung an. In allen anderen Fällen stellen sie den Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten dar.

Der von Dynasore ausgeübte Effekt auf die Inhibition der durch GDNF ausgelösten pErk1/2-Aktivierung war konzentrationsabhängig. Für 40 μ M fand eine Inhibition des Signals um 80 % statt, bei 80 μ M war das Signal vollständig inhibiert. Methyl- β -Cyclodextrin inhibierte das Signal um 80 %, ebenso stark wie bei 40 μ M Dynasore. Für Chloroquin stieg das Aktivierungsniveau ab 10 min GDNF Stimulation weiter an. Die Stärke des Anstiegs variierte in jedem Experiment. Der maximal erfasste Wert war ein Anstieg um 640 % nach 60 min Stimulation. Das Signal verlief bis 10 min

nach Stimulation vollkommen synchron mit den nicht inhibierten Vergleichszellen und divergierte erst anschließend.

Die Experimente zum Einfluss der Endozytosemodulation auf den PI3-Kinase-abhängigen Akt-Signalweg wurden parallel durchgeführt (Abb. 4.36).

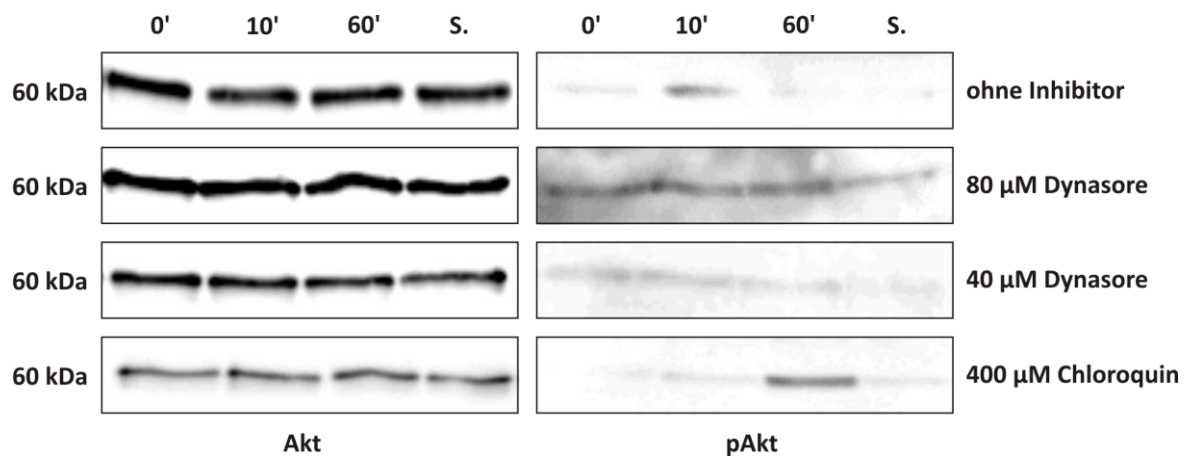


Abb. 4.36: Auswirkung der Endozytose-Modulation auf die Aktivierung von Akt in B104 RET9

Eine Behandlung der Zellen mit Dynasore inhibierte die GDNF-induzierte Aktivierung der Akt-Kinase. Nach Inkubation der Zellen mit Chloroquin wurde das pAkt-Signal von einer transienten zu einer anhaltenden Aktivierung verschoben. Dargestellt sind repräsentative Immunblots gegen Akt (links) und pAkt (rechts). Aufgetragen wurden Proteinextrakte von B104 RET9 RS9.5 Zellen, die für 16 h in DMEM-Basalmedium ausgehungert, für 30 min ohne Inhibitor, mit 80 μM Dynasore, 40 μM Dynasore oder 400 μM Chloroquin vorinkubiert und anschließend für die angegebenen Zeitpunkte mit 50 ng/mL GDNF stimuliert wurden. Als Kontrolle diente eine Reduzierung des pAkt-Niveaus durch 15 min Inkubation mit 1 M Sorbitol (S.).

Eine Inhibition der Dynamin-abhängigen Endozytosewege durch Dynasore führte neben der Inaktivierung des durch GDNF ausgelösten pErk1/2-Signals ebenfalls zu einer reduzierten pAkt-Signalstärke. Chloroquin bewirkte den bereits vorher für pErk1/2 gezeigten Wechsel von einer transienten zur anhaltenden Aktivierung auch für die Akt-Kinase. Für MβCD konnte aus methodischen Gründen kein pAkt detektiert werden (vgl. 5.3). Die Signalintensität der Proteinbanden wurde densitometrisch ausgewertet (Abb. 4.37).

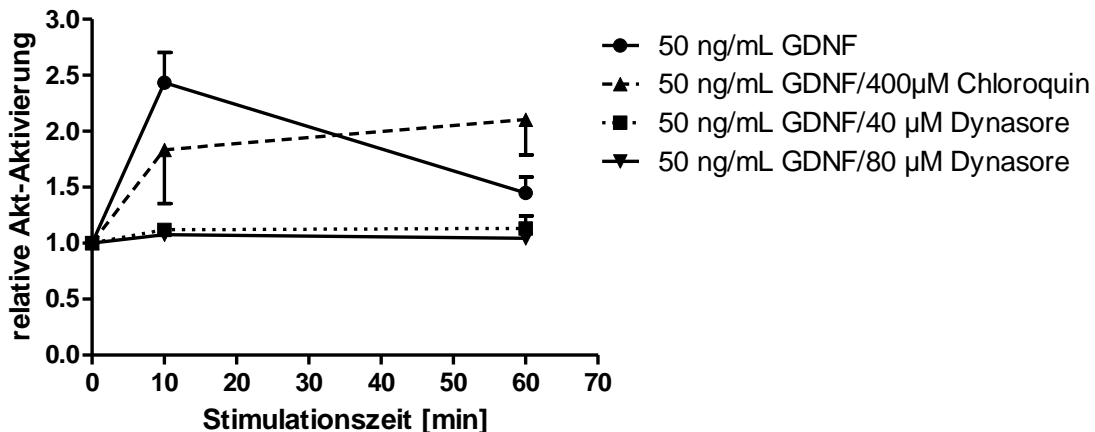


Abb. 4.37: Stimulationsniveau von Akt nach Modulation der Endozytose in B104 RET9 Zellen

Dynasore inhibierte die durch GDNF induzierte Akt-Stimulation bereits ab 40 μM fast vollständig. Nach Chloroquin-Behandlung wurde das pAkt-Signal schwächer. Das aktive Signal blieb jedoch bestehen und erreichte das gemessene Maximum nach 1 h Stimulation. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der Immunblot-Signale der GDNF-vermittelten Aktivierung der Akt-Kinase in B104 RET9 RS9.5 Zellen nach Modulation der Endozytose (Abb. 4.36). Die Signale wurden anhand der Verhältnisse der Akt-Werte auf ein einheitliches Proteinlevel normiert. Der jeweilige Nullwert der pAkt-Signale wurde auf den Wert 1 gesetzt und die 10'- und 60'-Signalwerte auf ihren jeweiligen Nullwert bezogen. Für 80 μM Dynasore konnte aus methodischen Gründen nur eine Messreihe erhalten werden. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten wieder.

Die fast vollständige Inhibition des pAkt-Signals in GDNF-stimulierten B104 RET9 Zellen wurde bereits durch 40 μM Dynasore ausgelöst. Der durch Chloroquin hervorgerufene Wechsel zu einer andauernden Aktivierung von Akt erscheint mit der gemessenen Verdopplung des maximalen Phosphorylierungsniveaus nach 60 min verglichen mit Erk1/2 nicht ganz so stark.

Der Vergleich des Einflusses einer 80 μM Dynasore-Vorinkubation auf B104 RET9 Zellen, die mit 10 ng/mL GDNF stimuliert wurden, erfolgte durch die Analyse aller Proteinextrakte auf einem SDS-Gel. Hierbei war im anschließenden Immunblot wiederholt eine Reduktion des pErk1/2-Signals für den 0-minütigen Stimulationswert im Vergleich zu entsprechenden Zellen ohne Inhibitorbehandlung zu beobachten (Abb. 4.38). Daher wurden in diesen Fällen die pErk1/2-Signale zuerst mittels der Erk1/2-Signale auf gleiche Proteinmenge normalisiert und anschließend alle pErk1/2-Signale auf den 0-minütigen pErk1/2-Stimulationswert der Zellen ohne Inhibitorbehandlung bezogen. Damit wurden alle Stimulationswerte in Relation zur basalen Stimulation von B104 RET9 Zellen gesetzt. Ein entsprechender Vergleich wurde ebenfalls für die Phosphorylierung der Akt-Kinase durchgeführt.

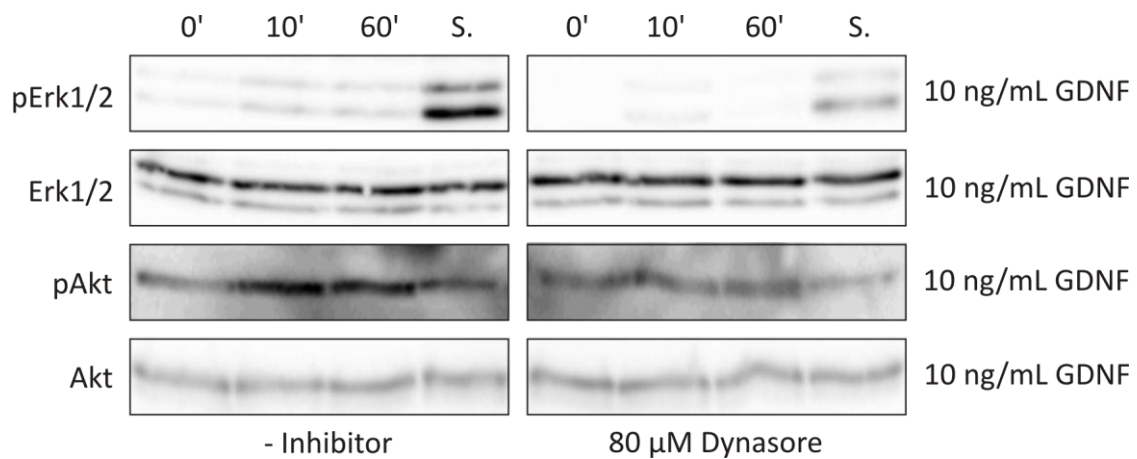
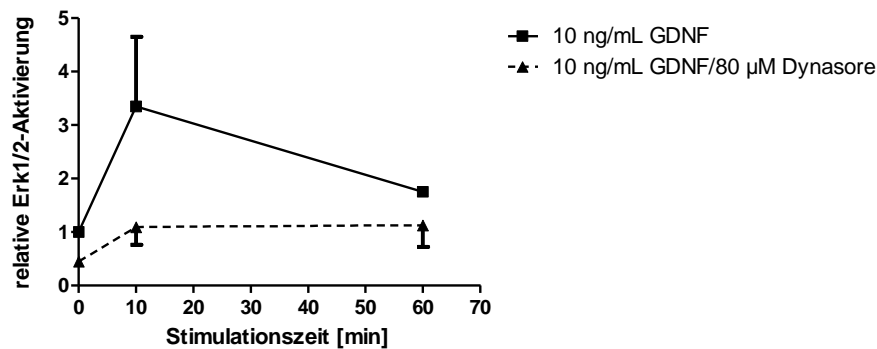


Abb. 4.38: Einfluss von Dynasore auf die basale Stimulation von Erk1/2 und Akt in B104 RET9

Dynasore inhibiert die basale Stimulation von Erk1/2 bereits am 0-minütigen Stimulationszeitpunkt. Für pAkt scheint dies nicht der Fall zu sein. Dargestellt sind repräsentative Immunblots gegen pErk1/2, Erk1/2, pAkt und Akt. Aufgetragen sind Proteinextrakte von B104 RET9 RS9.5 Zellen, die ohne Inhibitor (links) oder mit 80 μ M Dynasore (rechts) vorinkubiert und anschließend mit 10 ng/mL GDNF für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert wurden. Die Proben wurden alle auf einem SDS-Gel aufgetragen, so dass ein Vergleich untereinander gezogen werden kann. Als Kontrolle diente eine Stimulation von 15 min Dauer mit 1 M Sorbitol (S.).

Dynasore verringerte die Erk1/2-Aktivierung bereits vor der eigentlichen GDNF-Stimulation. Für pAkt war keine Reduktion der basalen Stimulation sichtbar. Zur genaueren Betrachtung wurde die Signalintensität der Proteinbanden densitometrisch ausgewertet (Abb. 4.39).

a) B104 RET9 Erk1/2 Stimulation und Inhibition



b) B104 RET9 Akt Stimulation und Inhibition

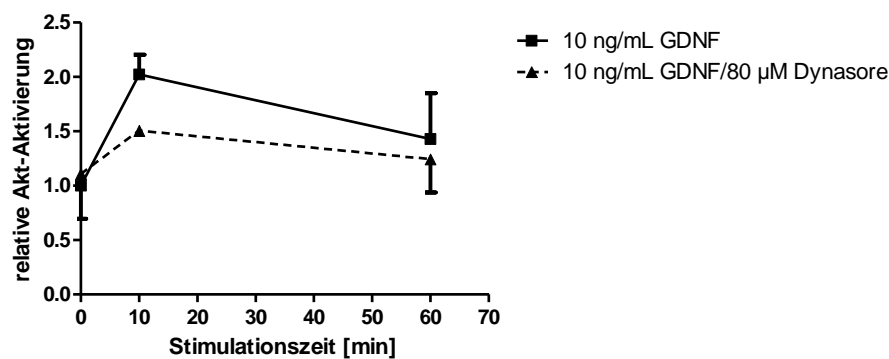


Abb. 4.39: Einfluss von Dynasore auf die basalen Stimulationsniveaus von Erk1/2 und Akt

Die Vorinkubation der Zellen mit Dynasore halbierte das basale Phosphorylierungsniveau von Erk1/2 bereits vor der Stimulation. Das Niveau von pAkt am Nullminutenwert blieb unverändert. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der Immunblot-Signale des Einflusses von Dynasore auf die basale Stimulation der MAP-Kinasen Erk1/2 **(a)** und der Akt-Kinase **(b)** in B104 RET9 Zellen (Abb. 4.38). Die Signale wurden anhand der Verhältnisse der Erk1/2- bzw. Akt-Werte auf ein einheitliches Proteinlevel normiert. Der Nullminutenwert der unstimulierten Kontrolle wurde auf den Wert 1 gesetzt und alle weiteren Signale in Relation zu diesem Wert gesetzt. **a)** Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten dar. **b)** Für die Akt-Stimulation nach 80 µM Dynasore-Behandlung konnten aus methodischen Gründen nur zwei Messreihen erhalten werden. Die Fehlerbalken stellen somit die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

B104 RET9 Zellen, die mit einer geringen Konzentration von 10 ng/mL GDNF stimuliert wurden, zeigten eine Reduktion der basalen Stimulation von Erk1/2 um die Hälfte. Dieser Effekt ließ innerhalb von 10 min nach, so dass das Signal auf die Grundstimulation der unbehandelten Kontrolle anstieg. Die Stärke der basalen Phosphorylierung von Akt blieb unbeeinflusst.

Um zu zeigen, dass die für Dynasore und Chloroquin beobachteten Effekte auf die GDNF-vermittelten Signalwege spezifisch auf ihre in der Literatur beschriebenen Auswirkungen auf die Endozytose der Zellen (vgl. 1.4.2) zurückzuführen sein können, wurden diese mikroskopisch über die Endozytose fluoreszenzmarkierten Transferrins überprüft (Abb. 4.40).

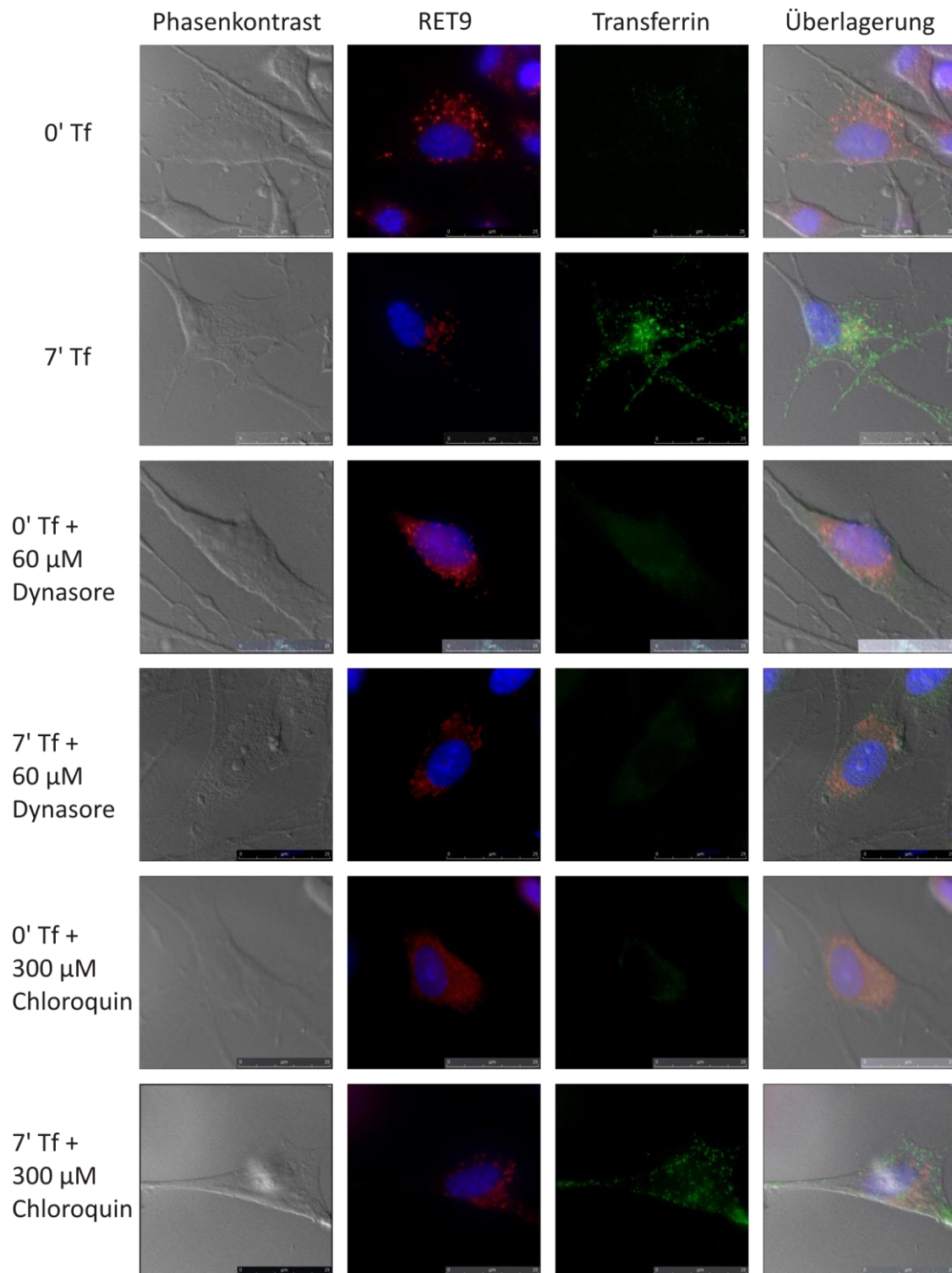


Abb. 4.40: Modulation der Transferrin-Aufnahme in B104 RET9 Zellen

Die Endozytose von Transferrin wurde durch eine Vorinkubation der Zellen mit Dynasore verhindert. Eine Chloroquinbehandlung führte zur Akkumulation früher endosomaler Strukturen nahe der Plasmamembran. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transferrinaufnahme repräsentativer B104 RET9 RS9.5 Zellen ohne und mit Endozytosemodulator. Die Zellen wurden für 5 h in DMEM-Basalmedium ausgehungert und für 10 min ohne Zusatz, mit 60 μ M Dynasore oder 300 μ M Chloroquin inkubiert. Anschließend erfolgte die Endozytose fluoreszenzmarkierten (Alexa Fluor 555) Transferrins (grün dargestellt) für 0 min und 7 min. Plasmamembran-gebundenes, nicht endozytiertes Transferrin wurde mit saurem Acetatpuffer entfernt. Die Zellmorphologie wurde im Phasenkontrast, die Zellkerne wurden HOECHST-gefärbt (blau) und zusammen mit RET9-ECFP (rot dargestellt) abgebildet. Vergrößerung: 1000x.

Fluoreszenzmarkiertes Transferrin fand sich 7 min nach Anlagerung an der Plasmamembran in unbehandelten B104 RET9 Zellen intrazellulär in endozytierten Vesikeln wieder. In den zuvor mit 60 μM Dynasore behandelten Zellen war keine intrazelluläre Fluoreszenz überhalb der Autofluoreszenz der Zellen detektierbar. Die Endozytose von Transferrin in dem untersuchten Zellsystem wird somit spezifisch durch Dynasore inhibiert. Weiterhin konnte bereits nach 10 min Vorinkubation mit 300 μM Chloroquin eine leichte Zunahme RET9-haltiger Vesikel nahe der Plasmamembran festgestellt werden, die nach weiteren 7 min noch verstärkt auftrat. Damit ist deutlich zu erkennen, dass Chloroquin unter den experimentellen Bedingungen nicht den Endozytosevorgang an sich hemmt, da fluoreszenzmarkiertes Transferrin in die Zelle internalisiert wurde. Dessen Aufenthalt war nicht mehr mit vermehrter perinukleärer Lokalisation über die Zelle verteilt, wie es für unbehandelte Zellen der Fall war, sondern nahe der Plasmamembran in frühen endosomalen Vesikeln vorzufinden.

4.3.4.3 Einfluss von Heparansulfaten auf GDNF-vermittelte Signalwege

Ein Einfluss der Heparansulfate der zellulären Proteoglykanmatrix auf die GDNF-vermittelte Signaltransduktion wurde exemplarisch anhand der Sulfatase Sulf1 überprüft. Hierzu wurde die enzymatisch vollständig aktive lösliche Mutante von Sulf1, Sulf1 ΔHDC , verwendet, bei der ein Großteil der stark geladenen, hydrophilen Domäne deletiert wurde (Frese *et al.*, 2009). B104 RET9 Zellen wurden mit Sulf1 ΔHDC inkubiert, bevor eine Stimulation mit 10 ng/mL GDNF durchgeführt wurde. Mit Proteinextrakten dieser Zellen wurden Immunblots gegen Erk1/2, pErk1/2, Akt und pAkt durchgeführt (Abb. 4.41).

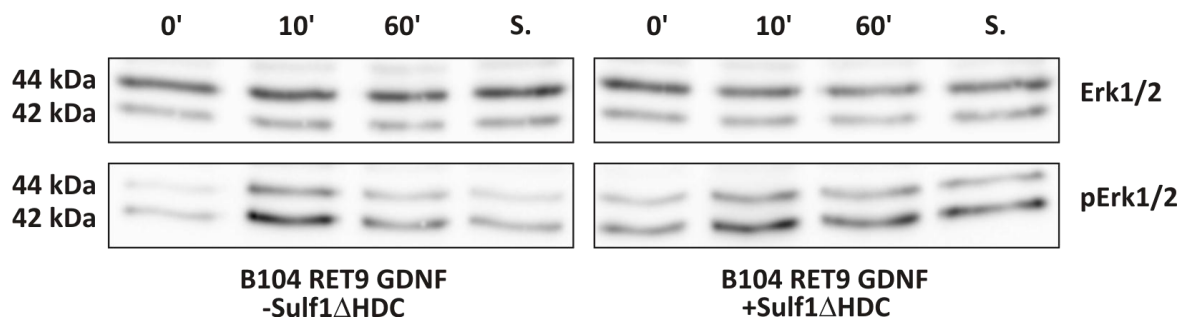
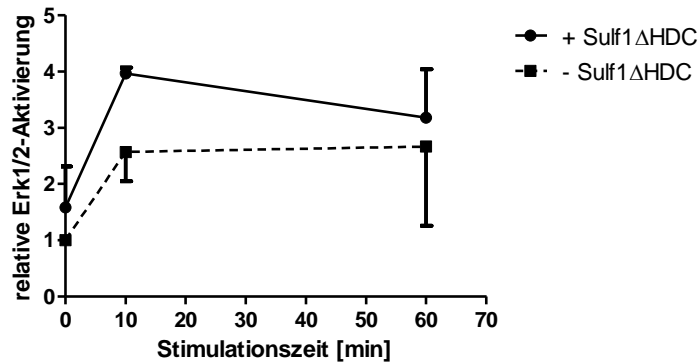


Abb. 4.41: Erk1/2-Aktivierung in GDNF-stimulierten B104 RET9 nach Sulf1 Δ HDC-Inkubation

GDNF-stimulierte B104 RET9 Zellen, die zuvor mit Sulf1 Δ HDC inkubiert wurden, zeigen erhöhte Erk1/2-Phosphorylierung im Vergleich zu unbehandelten, stimulierten Zellen. Besonders deutlich ist der Nullminutenwert erhöht. Dargestellt sind repräsentative Immunblots gegen pErk1/2 (unten) und Erk1/2 (oben). Aufgetragen sind Proteinextrakte von B104 RS9.5 Zellen, die ohne Sulf1 Δ HDC (links) oder mit Sulf1 Δ HDC (rechts) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit 10 ng/mL GDNF für die angegebenen Zeitspannen stimuliert wurden. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel aufgetragen, so dass ein Vergleich untereinander gezogen werden kann. Als Kontrolle diente eine Inkubation von 15 min Dauer mit 1 M Sorbitol (S.).

Eine 30-minütige Vorinkubation GDNF-stimulierter B104 RET9 Zellen mit löslicher Sulf1 Δ HDC erhöhte das Aktivierungsniveau der MAP-Kinasen Erk1/2. Die relative Verstärkung wurde durch den Vergleich mit Kontrollzellen bestimmt, die ebenfalls mit einer Konzentration von 10 ng/mL GDNF stimuliert, aber nicht mit Sulf1 Δ HDC behandelt wurden. Hierbei wird deutlich, dass bereits vor der GDNF-Stimulation die Erk1/2-Phosphorylierung in den mit Sulf1 Δ HDC inkubierten Zellen stärker war und dieser verstärkende Effekt bis 60 min nach GDNF-Stimulation anhielt. Die für pAkt erhaltenen Signale in den Sulf1 Δ HDC-behandelten Zellen waren zu schwach, um eine Auswertung in Bezug auf diese Proteinkinase zu ermöglichen (nicht dargestellt). Die Signalintensität der Erk1/2 und pErk1/2 Proteinbanden wurde densitometrisch ausgewertet (Abb. 4.42).

a) Effekt von Sulf1 Δ HDC auf GDNF-Stimulation von B104 RET9 Zellen



b) Relative Erhöhung der Erk1/2-Stimulation durch Sulf1 Δ HDC

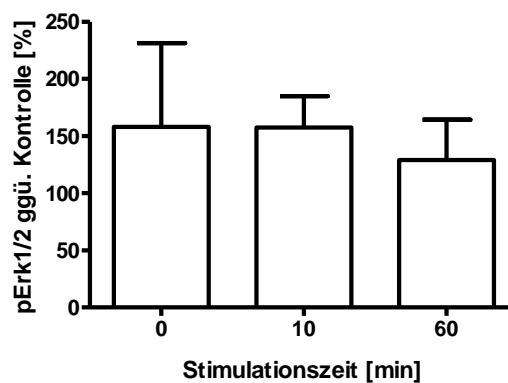


Abb. 4.42: Vergleich der GDNF-induzierten Erk1/2-Aktivierung in Abhängigkeit von Sulf1 Δ HDC

Sulf1 Δ HDC erhöhte das durch GDNF ausgelöste Erk1/2-Aktivierungssignal durchschnittlich um fast 60 %. **a)** Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der Immunblot-Signale der durch Sulf1 Δ HDC-Zugabe beeinflussten Modulation der GDNF-vermittelten Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 in B104 RET9 RS9.5 Zellen (Abb. 4.41). Die Signale wurden anhand des Verhältnisses der Erk1/2-Werte auf ein einheitliches Proteinlevel normiert. Der Nullwert der unbehandelten Kontrolle wurde auf den Wert 1 gesetzt und alle weiteren Signale in Relation zu diesem Wert gesetzt. **b)** Das Balkendiagramm stellt die relative Erk1/2-Stimulation der einzelnen Stimulationszeitpunkte zueinander dar. Angegeben ist der Stimulationswert der +Sulf1 Δ HDC-Probe in Prozent im Vergleich zur Probe der unmodifizierten Stimulation zum selben Zeitpunkt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten dar.

Das Stimulationsmuster in den mit Sulf1 Δ HDC behandelten Zellen entsprach dem bekannten Verlauf der transienten Aktivierung der Erk1/2-Kinasen durch GFL-Stimulation. Die Signalstärke war zu den 0- und 10-minütigen Stimulationszeitpunkten um 58 % und für den 60-minütigen Wert um 29 % gegenüber der unbehandelten Kontrollprobe am selben Zeitpunkt erhöht.

5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Dissertation sollten neuronale Modellsysteme entwickelt werden, an denen die Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren GDNF (1.2.2.1) und des eng verwandten Neurturins (1.2.2.2) über die Rezeptortyrosinkinase RET (1.3.1) untersucht werden können. Hierbei wurde darauf Wert gelegt, dass diese Zellsysteme so aufgebaut sind, dass eine gesonderte Betrachtung der einzelnen Komponenten auf den verschiedenen Signalebenen möglich ist. Zu unterscheiden waren die Stimulatoren GDNF und Neurturin, die Korezeptoren Gfr α 1 und Gfr α 2 und die Rezeptor-Isoformen RET9 und RET51. Anschließend sollte herausgefunden werden, ob die Signalweiterleitung dieser beiden Faktoren an der Plasmamembran erfolgt oder ob diese auch nach der Internalisierung des aktivierten Rezeptorkomplexes intrazellulär generiert werden kann. Dazu dienten einerseits Elemente des Rap1/MAPK-Signalwegs, der an der NGF/TrkA-vermittelten Signalweiterleitung für ein retrogrades endosomales *Signaling* beteiligt ist. Andererseits wurde die Endozytose der Zellen über verschiedene Methoden moduliert und der jeweilige Effekt auf die GFL-vermittelte Signalgebung mikroskopisch oder in Immunblots verfolgt. Ebenso sollte ein möglicher Einfluss der Heparansulfatseitenketten der Proteoglykane der extrazellulären Matrix auf die GDNF-vermittelte Signalweiterleitung aufgezeigt werden.

5.1 ETABLIERUNG NEURONALER MODELLSYSTEME

Die Kultivierung primärer Neuronen in Zellkultur ist ein relativ aufwändiger und langwieriger Prozess, der den Vorteil bietet, isolierte Neuronenpopulationen unter definierten Bedingungen betrachten zu können. Die Lebensdauer primärer Neuronen ist jedoch begrenzt und oftmals ist es problematisch, die Zellen auf definierten und einheitlichen Differenzierungsstadien zu kultivieren. Untersuchungen in primärer Zellkultur eignen sich somit gut für eine abschließende Überprüfung von Mechanismen, die in der Grundlagenforschung an etablierten Tumorzelllinien bereits analysiert worden sind.

Bereits bestehende zelluläre Modellsysteme zur Untersuchung möglicher RET-Rezeptorkomplexe sind häufig artifiziell und bauen auf chimären Fusionsproteinen onkogener RET-Mutanten wie RET/PTC oder RET/PTC2 (1.3.1.3) auf, bei denen die

zytoplasmatische Domäne des Rezeptors mit einem nicht verwandten Genabschnitt rekombiniert ist (Durick *et al.*, 1998; Borrello *et al.*, 2002). Solche Fusionsproteine besitzen eine konstitutiv aktivierte RET-Tyrosinkinasedomäne und sind aufgrund ihrer fehlenden Transmembrandomäne im Zytoplasma lokalisiert. Dadurch können mögliche Einflüsse verschiedener Plasmamembrandomänen, der Endozytose, endosomalen *Signalings* oder der Beschaffenheit der extrazellulären Matrix gar nicht erst untersucht werden.

Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung der Zelllinie PC12. Diese entstand aus einem Phäochromozytom des Nebennierenmarks der Ratte, sie ist somit neuroendokrinen Ursprungs und weist Charakteristika sympathischer Neuronen auf (Lee *et al.*, 1977). PC12 Zellen exprimieren die NGF-Rezeptoren p75NTR und TrkA endogen und sind damit gut zum Studium der NGF-Signalweiterleitung geeignet (Greene, 1978). Im Hinblick auf die GDNF-Forschung exprimieren sie jedoch weder RET noch Gfr α 1 oder Gfr α 2 Rezeptoren (Wang *et al.*, 2004a). Parallele Untersuchungen an Phäochromozytoma- und Neuroblastoma-Zelllinien haben gezeigt, dass die durch äußere Faktoren ausgelösten Zellantworten in beiden Zelltypen stark divergieren können. So führt beispielsweise der HSP-90 Chaperoninhibitor Geldanamycin, der unter anderem die Funktionen von c-Src und Raf-1 unterbricht, zur Aktivierung von JNK und zur Apoptose von PC12 Zellen. In Neuro-2a Zellen wird neben JNK zusätzlich Erk1/2 aktiviert und dadurch die Differenzierung auslöst (Lopez-Maderuelo *et al.*, 2001). Zur Rekonstitution des RET-Signalwegs in Zellsystemen, die möglichst nahe an authentische physiologische Bedingungen heranreichen, wurde der Fokus daher auf verschiedene murine Neuroblastomazelllinien gelegt.

Die untersuchten Neuroblastomazelllinien N4TG3, N18TG2, NS20Y und Neuro-2a exprimieren mRNA für beide RET-Isoformen RET9 und RET51 und für den Korezeptor Gfr α 1 (vgl. Abbn. 4.1, 4.2). Dieses Ergebnis unterstreicht die Wichtigkeit des RET-Rezeptorwegs in neuronalen Zellpopulationen. Eine erfolgreiche RT-PCR zur Überprüfung einer Expression des Korezeptors Gfr α 2 gelang erst durch den Einsatz modifizierter Primer während der Gfr α 2 cDNA-Gewinnung aus muriner Hirn-RNA (nicht dargestellt). Aufgrund fehlender geeigneter Kontrollen konnte zu diesem Zeitpunkt auch keine sichere Aussage über die Expression von Gfr α 1 und Gfr α 2 auf Proteinebene getroffen werden. Die Spezifität beider hierfür verwendeten Primärantikörper war in Immunblots sehr gering. Dieses Problem trat ebenfalls bei Yoong *et al.*, 2005 auf und könnte wahrscheinlich durch die Verwendung von

Antikörpern, die anstelle eines C-terminalen Peptids ein Epitop der extrazellulären Domäne erkennen, behoben werden.

Erst im späteren Verlauf der Arbeit konnten muriner Hirnextrakt als Positivkontrolle für Gfr α 2, Neuro-2a Wildtypzellen als Negativ- und B104 Wildtypzellen als Positivkontrolle für beide Gfr α -Proteine identifiziert werden (vgl. Abb. 4.10, (Strunk, 2010)). Herzgewebe wurde nicht weiter zur Kontrolle verwendet, da der zur Ladekontrolle verwendete β -Aktin-Antikörper die Aktin-Isoform des Herzens mit einem hohen Anteil glatter Muskelzellen nur schwach und bei höherer molekularer Masse erkennen konnte. Neuro-2a Zellen weisen trotz mRNA-Expression keine Proteinexpression von Gfr α 1 in Immunblots auf (vgl. Abb. 4.10a). Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Tansey *et al.*, 2000; Yoong *et al.*, 2005). Eine RT-PCR ist sensitiver als der Proteinnachweis in Immunblots, so dass eine sehr geringe Gfr α 1-Expression unterhalb der Nachweisschwelle für Immunblots in Neuro-2a Wildtypzellen wahrscheinlich ist.

In den Neuroblastomzelllinien N4TG3, NS20Y und N18TG2 findet die Gfr α 1-Expression wahrscheinlich ungehindert statt, da sich das Erk1/2-Stimulationsprofil nach GDNF-Zugabe von den Neuro-2a Zellen mit höchstens geringer Gfr α 1-Expression unterscheidet (vgl. Abb. 4.6). Durch diesen Unterschied ist zu vermuten, dass die transiente Erk1/2-Aktivierung mit dem Stimulationsmaximum nach 30 min über Gfr α 1 und RET oder NCAM stattfindet. Für Wildtyp Neuro-2a hingegen wird eine sehr schwache anhaltende Aktivierung von Erk1/2 mit einem gemessenen Maximum nach 1 h Stimulation detektiert. Es wäre interessant, dieses Signal über einen längeren Zeitraum hinweg zu beobachten, um Zeitpunkt und Stärke des Maximums zu bestimmen. Falls, wie zuvor vermutet, in den verwendeten Wildtypzellen tatsächlich noch geringe Mengen Gfr α 1 translatiert und exprimiert werden, könnte die beobachtete, schwache Erk1/2-Aktivierung hierüber zustande kommen. In einem *Screening* neuronaler Zelllinien war Neuro-2a die einzige, die beide wichtigen RET-Isoformen aber weder Gfr α 1 noch Gfr α 2 exprimiert (Pezeshki *et al.*, 2001). Die NCAM-Isoformen p120^{NCAM}, p140^{NCAM} und p180^{NCAM} hingegen werden endogen exprimiert (Yoong *et al.*, 2005). GDNF kann mithilfe von Gfr α 1 außer an RET auch hochaffin an p140^{NCAM} binden und dadurch Fyn und nachfolgend Erk1/2 transient aktivieren. Ohne die Beteiligung von Gfr α 1 wurde eine GDNF-Bindung mit geringer Affinität an p140^{NCAM} festgestellt. Über diese Bindung konnte kein intrazelluläres *Signaling* über Fyn detektiert werden (Paratcha *et al.*, 2003). Es ist allerdings möglich,

dass mit der schwachen Erk1/2 Aktivierung in Neuro-2a Wildtypzellen hier ein neuer Mechanismus entdeckt wurde. Dieser Mechanismus könnte über die niederaffine Bindung von GDNF an p140^{NCAM} verlaufen und aufgrund der relativ schwachen Signalstärke oder eines Fyn-unabhängigen Verlaufs bisher übersehen worden sein. Ein GDNF-Signal über das Heparansulfat-Proteoglykan Syndecan-3 ist eher unwahrscheinlich. Dieses Signal wäre zwar vermutlich Gfr α 1-unabhängig, sollte jedoch nur mit Matrix-gebundenem und nicht mit freiem GDNF erfolgen (Bespalov *et al.*, 2011).

Für die übrigen Gfr α -exprimierenden Neuroblastomazelllinien N18TG2, N4TG3 und NS20Y wurde überprüft, ob die durch GDNF ausgelöste transiente Erk1/2-Aktivierung zu einer Verstärkung der Proliferation, des Überlebens oder der Differenzierung der Zellen führt. Bei der mikroskopischen Vitalitätsbestimmung über Calcein und Propidiumiodid (3.2.16.1) trat das Problem auf, dass die Zellen innerhalb der Stimulationszeit stellenweise starke Zellaggregation und Migration zum Rand des Deckglases aufwiesen. Obwohl für GDNF ein Zellverteilungseffekt von Neuronen über RET9 und RET51 bekannt ist (Degl'Innocenti *et al.*, 2004), trat das Problem hier GDNF-unabhängig auf. Eine Beschichtung der Zellkulturplatten mit Poly-L-Lysin zeigte keine Verbesserung. Die übliche Auswahl fünf zufällig gewählter Mikroskopfelder war demnach sehr fehlerbelastet, so dass einmalig für die N4TG3 Zelllinie alle Bereiche ausgezählt wurden (vgl. Abb. 4.3). Die statistische Auswertung von fast 40,000 Zellen zeigte eindeutig, dass GDNF keinen proliferationsfördernden Effekt auf N4TG3 ausübt. Zur Vermeidung dieses methodischen Problems wurde die Vitalität anschließend, anstatt mikroskopisch, photometrisch bestimmt. Nachfolgende Neuritenwachstumstests mussten daher doch getrennt durchgeführt werden. Für N4TG3 konnte auch in den Resazurin-Vitalitätstests keine Reaktion auf GDNF aufgezeigt werden, was auf die Zuverlässigkeit der photometrischen Methode schließen lässt. NS20Y ist die einzige untersuchte Zelllinie, bei der GDNF eine signifikante Reduktion des Zellsterbens bewirkte. Ein Absterben von 30 % aller Zellen innerhalb von zwei Tagen konnte durch die Stimulation mit 50 ng/mL GDNF vollständig verhindert werden (vgl. Abb. 4.4). NS20Y war allerdings auch die einzige Zelllinie, die apoptotisch auf den Serumentzug reagierte. Wie bereits zuvor im Zusammenhang mit der PC12 Zelllinie angedeutet wurde, wird nicht automatisch in allen Zelllinien nach Serumentzug die Apoptose induziert. Hierfür ist in PC12 Zellen neben einer Inhibition der Erk1/2-MAP-Kinasen ebenfalls die Aktivierung Stress-

induzierter Signalkaskaden über JNK- und p38-MAP-Kinasen notwendig (Xia *et al.*, 1995). In mit Gfr α 1 transfizierten PC12 Zellen wurde festgestellt, dass der überlebensfördernde Effekt von GDNF fast ausschließlich auf einer Aktivierung der Akt-Kinase über den PI-3-Kinase-Signalweg beruht (Chen *et al.*, 2001). Die Akt-Kinase kann generell neben dem Überleben auch die Proliferation fördern, wohingegen die MAP-Kinasen Erk1/2 fast nur Proliferation und Differenzierung steuern (Kodama *et al.*, 2005). Der geringe Beitrag von Erk1/2 zur anti-apoptotischen Wirkung ist im Wesentlichen auf die Aktivierung von CREB zurückzuführen, der die Transkription von Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) erhöht (Riccio *et al.*, 1997; Riccio *et al.*, 1999; Finkbeiner, 2000). In allen untersuchten Zelllinien konnte Akt, jedoch in keiner pAkt nachgewiesen werden. Erst im späteren Verlauf der Arbeit konnte das sehr schwache pAkt-Signal durch eine Übernacht-Inkubation des Primärantikörpers bei 4 °C überhaupt detektiert werden. Das ohnehin extrem schwache pAkt-Signal könnte erklären, warum eine Beteiligung der Akt-Kinase an GDNF-vermittelten Signalwegen in weiteren Studien teils nachgewiesen wurde und teils nicht (Coulpier und Ibanez, 2004; Lee *et al.*, 2006). Eine vergleichbare transiente Aktivierung von Erk1/2 mit einem Maximum nach 25 min wurde bei Richardson *et al.*, 2006 festgestellt. Dort ging diese mit einer äquivalenten Aktivierung von Akt einher. Ein Einfluss auf Proliferation oder Differenzierung wurde jedoch nicht untersucht.

GDNF gilt neben seiner Fähigkeit, das Überleben neuronaler Zellen positiv beeinflussen zu können als Differenzierungsfaktor für viele primäre Neuronenpopulationen (1.2.2.1). Anhand der Zelllinien NS20Y und N4TG3 wurde exemplarisch untersucht, ob auch ein Effekt auf das Neuritenwachstum und die Differenzierung von Neuroblastomazellen beobachtet werden kann. Mit dieser Auswahl wurden Zelllinien untersucht, die zuvor in Vitalitätstest unterschiedlich auf GDNF-Stimulation reagierten. Hierdurch sollte zusätzlich ein Zusammenhang der Überlebens- und der Differenzierungs-fördernden Eigenschaften des neurotrophen Faktors abgeschätzt werden können. NS20Y Zellen konnten durch GDNF vor der Apoptose bewahrt werden, N4TG3 Zellen nicht (vgl. Abbn. 4.3, 4.4).

Es zeigte sich, dass sich die Anzahl der differenzierten NS20Y Zellen, bei denen sich GDNF auch neurotroph auswirkt, nahezu verdoppelt, während für N4TG3 Zellen kein verstärktes Neuritenwachstum durch GDNF-Stimulation feststellbar ist (vgl. Abb. 4.5b). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die durch GDNF ausgelöste, transiente Erk1/2-Aktivierung mit ähnlicher Kinetik in den Zelllinien N4TG3, NS20Y

und N18TG2 stattfindet, GDNF jedoch lediglich in NS20Y zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose und einer verstärkten Differenzierung führt. Ein proliferativer Effekt wurde in keiner der Zelllinien festgestellt. Allerdings unterlagen nur NS20Y Zellen überhaupt einem messbaren apoptotischen Zellsterben nach Serumentzug. Es ist daher trotzdem möglich, dass in allen genannten Neuroblastomazelllinien entweder die transiente Erk1/2-Aktivierung oder eine nicht detektierte Akt-Aktivierung durch GDNF überlebensfördernd wirken und ein anti-apoptotischer Effekt nur in den NS20Y Zellen sichtbar wird.

Durch die Inhibition von Komponenten des Ras/Erk1/2-Signalwegs konnte die Differenzierung, aber nicht die Proliferation von PC12 Zellen verhindert werden (Szeberenyi *et al.*, 1990). Die vorliegenden Daten zeigen jedoch, dass die transiente Erk1/2-Aktivierung allein nicht ausreichend ist, um die Differenzierung von Neuroblastomazellen zu sichern. In der Tat konnte bewiesen werden, dass sich Neuroblastomazellen, die mit Gfr α 1a und Zellen, die mit der um nur fünf Aminosäuren verkürzten Isoform Gfr α 1b transfiziert wurden, unterschiedlich verhalten. In beiden Zelllinien wurden durch Stimulation mit GDNF oder NRTN die transiente Aktivierung von Erk1/2 und eine anhaltende Aktivierung von Akt ausgelöst. Trotzdem wurde nur über Gfr α 1a ein starkes Neuritenwachstum festgestellt, da für die andere Isoform ein inhibitorischer Signalweg über RhoA, einem Antagonisten zu Rac und Cdc42, und ROCK (*Rho-associated protein kinase*) aktiviert wurde (Koh, 2006; Yoong *et al.*, 2009). Sollten in einer der untersuchten Zelllinien bereits geringe Mengen Gfr α 1b zusätzlich zu Gfr α 1a exprimiert werden, würde GDNF dort die Differenzierung inhibieren. Je nach Herkunft des ursprünglichen Neuroblastoms kann in der Zelllinie eine andere Isoform dominant vorliegen. In der *Substantia nigra* und im Thalamus ist Gfr α 1a die vorherrschende Form, im *Nucleus caudatus*, der Großhirnrinde, dem Putamen, dem *Nucleus subthalamicus* und dem Rückenmark ist die Expression von Gfr α 1b höher (Yoong *et al.*, 2005).

Sowohl das Gfr α 1a-induzierte, Rac- und Cdc42-abhängige Neuritenwachstum als auch die inhibitorische Rho-Aktivierung über Gfr α 1b sind Erk1/2-abhängig, da diese MAP-Kinasen eine wichtige Rolle in der Regulation der Rho-GTPasen zu spielen scheinen (Pullikuth und Catling, 2007). Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass GDNF einen weiteren Signalweg in den NS20Y Zellen aktiviert, der unabhängig von oder konzertiert zu den MAP-Kinasen Erk1/2 die Differenzierung begünstigen kann.

GDNF stimuliert das Wachstum der Axone in primären Neuronen RET-unabhängig über NCAM und Fyn (Paratcha *et al.*, 2003). Das lässt vermuten, dass die Länge der Neuriten bzw. eines Axons über NCAM und die Anzahl über RET vermittelt wird. Es wäre daher zu überlegen, ob eine Bestimmung der durchschnittlichen Neuritenanzahl einzelner Zellen statt des Anteils differenzierter Zellen sinnvoller wäre, um den beobachteten Effekt sicherer auf RET beziehen zu können.

Zusätzlich zu den Neuroblastomazelllinien wurden NG108-15 Hybridomazellen aus Maus Neuroblastoma x Ratte Glioma und NH15-CA2, doppelte Hybridomazellen aus Maus (Neuroblastoma x Glioma) x Ratte Glioma, untersucht. Obwohl GDNF und NRTN im Wesentlichen als Neuronen-spezifische Wachstumsfaktoren gelten, wurde in primären Gliazellen des zentralen Nervensystems eine Expression der an deren Signalkomplex beteiligten Korezeptoren Gfr α 1 und Gfr α 2 nachgewiesen (Franke *et al.*, 1998). Eine mögliche Erklärung könnte hierbei in der Präsentation von GFL/Gfr α -Komplexen der Gliazellen zu RET-exprimierenden Neuronen liegen, wodurch ein *in trans-Signaling* ermöglicht werden würde. In Oligodendrozyten wurde jedoch zusätzlich zu den Korezeptoren mRNA für RET detektiert, so dass ein GFL-Signaling in Gliazellen nicht auszuschließen ist (Strelau und Unsicker, 1999).

Hybridomazellen aus Glioma- und Neuroblastomazelllinien vereinigen Eigenschaften beider Zelltypen und besitzen dadurch eventuell Adapter- oder Signalproteine, die in reinen Neuroblastomazellen nicht vorkommen. Sie bilden *in vitro* synaptische Verbindungen zu Muskelzellen aus, die sich ähnlich zu normalen neuromuskulären Synapsen in einem frühen Entwicklungsstadium verhalten (Nelson *et al.*, 1976). Weiterhin bieten sie den Vorteil, unter Serumentzug oder als Reaktion auf einige neuronale Wachstumsfaktoren eine morphologische und biochemische Differenzierung einzugehen (Hamprecht, 1977). Hybridomazellen sind daher generell für die Erforschung neuronaler Prozesse gut geeignet. NG108-15 Zellen eignen sich auch im Hinblick auf GDNF, da sie endogen RET und Gfr α 1, aber kein Gfr α 2 exprimieren (Lee *et al.*, 2006). In der Zellkulturpraxis stellten sich jedoch beide untersuchten Hybridomazelllinien als ungeeignet für den Aufbau eines neuronalen Zellmodellsystems heraus. Erstens übte GDNF keinen messbaren Einfluss auf das Überleben der Zellen aus (vgl. Abb. 4.4). Zweitens sollten Hybridomazellen erst einige Passagen in Kultur sein, um einen differenzierteren Phänotyp zu erhalten, während die Experimente optimalerweise innerhalb von 14 bis 20 Passagen erfolgen sollten

(Hamprecht B., persönliche Kommunikation). Die gewünschten Modelle hätten eine stabile Transfektion mit Fluorophor-gekoppelten Komponenten der RET-Signalgebung beinhaltet. Für Kolokalisationsbestimmungen oder geplante FRET-Messungen hätte nach transienter Transfektion ein weiteres Protein mit dem entsprechenden Fluorophorpartner gekoppelt exprimiert werden müssen. Diese Ziele waren unvereinbar mit der kurzen Lebensdauer der Hybridomazellen in Zellkultur. Ein drittes Problem bestand darin, dass NG108-15 und NH15-CA2 nur in gering gehaltener Zelldichte überleben, so dass die gewonnene Proteinmenge aus Zellextrakten von 6-Well-Zellkulturplatten nicht für die Immunblots mit den Antikörpern gegen pErk1/2 und pAkt (vgl. Abb. 4.6) ausreichte. Eine Übertragung des Zellkulturvolumens auf größeren Maßstab hätte einen sehr hohen Verbrauch des Wachstumsfaktors nach sich gezogen.

Somit lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Hybridomazelllinie NG108-15 zukünftig für transiente Transfektionen mit anschließender Fluoreszenzmikroskopischer Analyse in Betracht gezogen werden kann, um Signalkomponenten der GDNF/Gfr α 1/RET-Signalkette zu untersuchen. Für die Etablierung stabiler neuronaler Modellsysteme sollte allerdings besser auf Neuroblastomazellen zurückgegriffen werden.

5.1.1 NEURO-2A GFRA1 UND NEURO-2A GFRA2

Mit der Neuroblastomazelllinie NS20Y konnte bereits eine Zelllinie gefunden werden, anhand derer die neurotrophen und neuritogenen Effekte von GDNF über Gfr α 1 und RET untersucht und beeinflusst werden können. Leider konnte keine Aussage über die endogene Gfr α 2-Expression in NS20Y Zellen getroffen werden.

Mit Neuro-2a fand sich stattdessen eine Zelllinie, deren Wildtyp keinen der beiden genannten Gfr α -Korezeptoren exprimiert. Dadurch war sie optimal geeignet, durch stabile Transfektion mit Gfr α 1 bzw. Gfr α 2 zwei Zelllinien zu generieren, mittels derer gezielt die Variable des Korezeptoreinflusses im RET-Signalkomplex analysiert werden konnte. Die stabile Transfektion der ausgewählten Klone N2a Gfr α 1 K34 und Gfr α 2 K33 konnte über Immunfluoreszenzmikroskopie und Immunblots verifiziert werden (s. o.).

In primären Neuronen ist nach Peterziel *et al.*, 2002 eine zusätzliche Stimulation mit TGF- β notwendig, um die überlebensfördernden Eigenschaften von GDNF zu

aktivieren. Ohne die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor TGF- β wurde der RET-Korezeptor Gfr α 1 über der Zelloberfläche verteilt vorgefunden. Nach Inkubation mit TGF- β wurde in der Immunfluoreszenz die Ausbildung definierter Strukturen auf der Plasmamembran festgestellt, in denen Gfr α 1 lokal konzentriert auftrat. Bei diesen Strukturen handelt es sich wahrscheinlich um *lipid rafts*, an denen die Gfr α 1-Rezeptoren über GPI-Anker befestigt sind.

Im hier erstellten Gfr α 1-transfizierten Neuro-2a Modellsystem wurden die beiden Klone K34 und K39 im Hinblick auf einen überlebensfördernden Effekt durch GDNF sowohl mit als auch ohne TGF- β -Einfluss untersucht (vgl. Abb. 4.12). Für K34 kann durch GDNF eine Vitalitätssteigerung um durchschnittlich 35 % gegenüber unstimulierten Zellen erreicht werden. Für den Klon K39 ist diese nur etwa halb so stark. Eine mögliche Erklärung liegt hier im Gfr α 1-Expressionsniveau der beiden Klone (vgl. Abb. 4.10a). In den von der aufgetragenen Proteinmenge quantitativ vergleichbaren Immunblots kann nur für Klon 34 überhaupt ein Signal detektiert werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine sehr schwache Gfr α 1-Expression oder sogar einen nachträglichen Verlust des Expressionsplasmids von Klon 39 hin.

Die zusätzliche Zugabe von TGF- β wird in Neuro-2a Gfr α 1 Zellen nicht benötigt, um die neurotrophen Eigenschaften von GDNF zu aktivieren. Sie führt sogar zum gegenteiligen Effekt in K39 und verringert die Vitalität noch um 20 %. Ob diese Diskrepanz des Messwerts von 20 % im Überleben durch GDNF bzw. im Zelltod durch GDNF/TGF- β in K39 nur innerhalb des Fehlerbereichs der Calcein-Vitalitätsbestimmung liegt oder ob TGF- β ohne einen ausreichenden kooperativen Effekt durch GDNF und Gfr α 1 zytotoxisch wirkt, bleibt unklar. Beide Erklärungen sind möglich, da TGF- β sowohl Überleben als auch Zelltod einiger Neuronenpopulationen reguliert (Krieglstein *et al.*, 2000).

Immunfluoreszenzen der stabil transfizierten Neuro-2a Gfr α 1 Zellen lassen teilweise stärker fluoreszierende Zusammenlagerungen des Korezeptors auf der Plasmamembran erkennen (vgl. Abb. 4.9). Diese Daten stehen im Einklang mit der Entdeckung, dass Gfr α 1 in gleichermaßen transfizierten Neuro-2a Zellen hauptsächlich innerhalb *lipid rafts* auf der Plasmamembran lokalisiert ist (Tansey *et al.*, 2000).

Die TGF- β -Abhängigkeit primärer Neuronen ist somit nicht auf das Neuro-2a Zellsystem übertragbar, da hier der Transport des Korezeptors in *lipid rafts* ohnehin bereits stattzufinden scheint.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass der überlebensfördernde Effekt von GDNF auf die Aktivierung der Akt-Kinase zurückzuführen ist, da die Erk1/2-Aktivierung mit gleicher Stärke und Kinetik transient durch GDNF über Gfr α 1 und durch NRTN über Gfr α 2 erfolgt (vgl. Abb. 4.15), eine Akt-Phosphorylierung jedoch nur über GDNF und Gfr α 1 stattfindet (vgl. Abb. 4.17). Neurturin ist ein neuritogener, aber kein Überlebensfaktor für zentrale noradrenerge Neuronen (Holm *et al.*, 2002). Generell scheinen das neuronale Überleben demnach von GDNF und die Differenzierung von GDNF und NRTN abzuhängen.

Eine GDNF-Stimulation in Gfr α 1-exprimierenden Neuro-2a Zellen führte zu einem vergleichbar starken Anstieg des Neuritenwachstums, wie bereits für NS20Y detektiert werden konnte. Während GDNF bereits eine Verdopplung der differenzierten Zellen hervorrief, konnte ein Neurturin-Signal über Gfr α 2 und RET die Anzahl differenzierter Zellen fast verdreifachen (vgl. Abb. 4.13). Die beobachtete transiente Aktivierung von Erk1/2 sollte kein Neuritenwachstum in Abwesenheit zusätzlicher Signale auslösen können (Ihara *et al.*, 1997). Es ist daher anzunehmen, dass für die neuritogenen Effekte weitere Signalwege aktiviert werden müssen. Hierfür käme PLC γ in Frage, worauf an späterer Stelle näher eingegangen wird. Das stärkere Neuritenwachstum über NRTN und Gfr α 2 könnte auch dadurch zustande kommen, dass ohne die Akt-Aktivierung ein anderer Endozytoseweg eingeschlagen wird oder andere Adapterproteine binden.

Bei der Unterscheidung differenzierter und undifferenzierter Zellen traten einige Probleme auf. Bei vielen neuronalen Zelltypen, auch bei Neuro-2a Zellen, leitet ein Serumentzug die Differenzierung ein (Klebe und Ruddle, 1969). Zellen wurden als differenziert gewertet, sobald einer ihrer Neuriten die doppelte Länge des Zelldurchmessers aufwies. Ein allein durch GDNF oder NRTN hervorgerufenen Neuritenwachstum ist verhältnismäßig schwach gegenüber dem Wachstum durch NGF. Bei vielen Experimenten, vor allem bei der Austestung verschiedener Minimalmedien, waren die meisten Zellen differenziert, so dass eventuelle Unterschiede kaum mehr feststellbar waren. In anderen Fällen reichte das Wachstum nicht aus, um die Zelle als differenziert gelten zu lassen. Die Behandlung mit Retinsäure als Positivkontrolle für einen klar differenzierten Phänotyp scheiterte.

Zur Verbesserung der Methode könnte als Positivkontrolle eine Kombination aus Retinsäure und GDNF oder NRTN eingesetzt werden. Erst dadurch wird eine zu NGF morphologisch vergleichbare Differenzierung erreicht (Hishiki *et al.*, 1998).

Außerdem könnte eine diskontinuierliche Stimulation durchgeführt werden, wie sie von Chung *et al.*, 2010 entwickelt wurde. Hierbei wurde eine zweistufige Stimulation durchgeführt, wie sie für NGF in der Zelle erfolgt. Die erste, transiente Stimulation sorgt für die Zellausbreitung und benötigt Erk1/2 und Gen-Transkription, aber nicht die PI3-Kinase. Die zweite, anhaltende Stimulation 12 h später induziert die Differenzierung und führt zu schnellem Neuritenwachstum, das Erk1/2 und die PI3-Kinase, aber keine Transkription benötigt (Chung *et al.*, 2010).

Nachfolgend wird beschrieben, dass NRTN bereits über Gfr α 1 eine unterschiedliche Zellantwort als GDNF auslösen kann. Die Ergebnisse hierzu unterscheiden sich leicht. Lee *et al.*, 2006 stellten in NG108-15 Hybridomazellen transiente Aktivierung von Erk1/2 und PLC γ durch GDNF und anhaltende Aktivierung beider Signalwege durch Neurturin fest. Die transiente und die anhaltende Aktivierung haben Stimulationsmaxima bei 5 min und sind innerhalb einer Stunde Messzeit kaum zu unterscheiden. Akt wurde in beiden Fällen nicht aktiviert. GDNF hat keine Auswirkung auf die Differenzierungsrate, NRTN bewirkt einen Anstieg von 40-50 % auf 80 % differenzierter Zellen nach drei Tagen. Trotz der anhaltenden Erk1/2-Stimulation für Neurturin ist das durch diesen Faktor ausgelöste Neuritenwachstum unabhängig von MAP- und Src-Kinasen und wird nur über PLC γ vermittelt. Die Proliferation hingegen wird über GDNF und Gfr α 1 durch Erk1/2 unabhängig von PLC γ herbeigeführt (Lee *et al.*, 2006).

Yoong *et al.*, 2009 stellten vergleichbare Aktivierung von Akt und Erk1/2 mit einem Maximum nach 5 min in Gfr α 1-transfizierten Neuro-2a fest. Obwohl sich pErk1/2 und pAkt kaum unterschieden, wurden durch GDNF und NRTN über Gfr α 1 verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. GDNF steigerte die Expression von *egr-1*, *egr-2*, *c-fos* und *fosB* stark. NRTN aktivierte *c-fos* überhaupt nicht, *egr-2* und *fosB* schwach und *egr-1* stark (Yoong *et al.*, 2009). Der Transkriptionsfaktor *egr-1* spielt eine wichtige Rolle in der neuronalen Differenzierung (Pignatelli *et al.*, 1999; Levkovitz *et al.*, 2001).

Ein Erklärungsansatz zu der Widersprüchlichkeit einer möglichen Aktivierung der Akt-Kinase am RET-Signaling könnte sich durch eine unterschiedliche Gas1-Expression in den beteiligten Zelllinien bieten. Gfr α -Korezeptoren können durch das strukturell ähnliche Gas1 ersetzt werden, das zur Ausbildung eines RET-Rezeptorkomplexes führt und die Aktivierung von Shc und Erk1/2 induziert. Seine

proapoptotische Wirkung könnte dadurch entfaltet werden, dass es die übliche Aktivierung von Akt verhindert (Cabrera *et al.*, 2006).

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass GDNF über Gfr α 1 hauptsächlich als Überlebensfaktor dient und dieser Effekt wahrscheinlich durch ein Zusammenspiel der MAP-Kinasen Erk1/2 und der selektiven Aktivierung von Akt erfolgt. Zusätzlich kann GDNF einen erheblichen Einfluss auf die neuronale Differenzierung nehmen, der vermutlich wie bei NRTN über den Transkriptionsfaktor *egr-1* verläuft. Welche Signalwege zu dessen Aktivierung führen, bleibt unklar. Neurturin ist ein stärkerer Differenzierungsfaktor als GDNF, der selbst bei einer Aktivierung der Akt-Kinase, vermutlich durch gleichzeitiges Einleiten eines inhibitorischen Signalwegs, keinen mitogenen Effekt hat. Der neuritogene Einfluss wird trotz anhaltender Erk1/2-Aktivierung durch die PLC γ -induzierte *egr-1*-Aktivierung ausgeübt. Daraus lässt sich folgern, dass eine anhaltende Erk1/2-Stimulation nicht unbedingt ein Neuritenwachstum bedingen muss und umgekehrt. Über Gfr α 2 ist die Stimulation des Neuritenwachstums eventuell etwas stärker ausgeprägt als über Gfr α 1, unterscheidet sich aber ansonsten nicht wesentlich von diesem. Dies deutet auf eine Liganden- statt auf eine Korezeptor-abhängige Spezifität im RET-Signalkomplex hin.

Die unterschiedliche Aktivierung intrazellulärer Kinasen durch GDNF und NRTN könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich ihr Bindungswinkel im heterotetrameren GFL₂/Gfr α 2-Komplex voneinander unterscheidet. Dies verändert die sonst starre Konformation der Gfr α -Rezeptoren, wodurch die extrazellulären Domänen von RET gezwungen sind, zur Bindung ihre Konformation zu verändern. Dadurch könnte sich die Position der intrazellulären RET-Domänen dahingehend verändern, dass verschiedene Tyrosinreste für Adapterproteine zugänglich gemacht werden (Parkash *et al.*, 2008).

Mit der Einführung neuer Stimulations-Messpunkte bei 5 min und beispielsweise bei 3 h, 8 h und 24 h und einer zusätzlichen Beobachtung der PLC γ -Aktivierung kann das hier erstellte Neuro-2a-Zellsystem als gutes Modell zur Analyse neuronaler Signalwege gewertet werden.

5.1.2 B104 RET9 UND B104 RET51

Die beiden RET-Isoformen RET9 und RET51 bilden eigenständige Signalkomplexe, die unterschiedliche Signalproteine rekrutieren und dadurch verschiedenste Zellantworten auslösen können (Borrello *et al.*, 2002; Tsui-Pierchala *et al.*, 2002a; Degl'Innocenti *et al.*, 2004).

Da alle zuvor getesteten Zelllinien bereits endogene RET-Expression aufweisen, wurde eine weitere Neuroblastomazelllinie benötigt, die eine getrennte Betrachtung der RET-Isoformen RET9 und RET51 ermöglichen würde. Mit B104 Neuroblastomazellen aus dem ZNS der Ratte konnte eine Zelllinie ausfindig gemacht werden, die im Hinblick auf die GDNF-Familien-spezifische Signalgebung zwar die Korezeptoren Gfr α 1 und Gfr α 2, jedoch nicht den RET-Rezeptor exprimiert (Pezeshki *et al.*, 2001). B104 weist Eigenschaften neuronaler Vorläuferzellen auf, indem sie die Fähigkeit zur Proliferation und ein unipotentes Differenzierungspotential besitzt, das unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren die weitere Entwicklung bestimmt (Bottenstein und Sato, 1979; Luo und Miller, 1999).

B104 Zellen wurden stabil mit RET9 und RET51 transfiziert. Die Rezeptoren wurden mit fluoreszierenden Markerproteinen fusioniert, um ihre zelluläre Lokalisation bestimmen zu können (5.1.2.1). Zusätzlich dazu wurden mögliche mit RET interagierende Proteine so fluoreszenzmarkiert, dass Fluorochromenpaare entstehen. Mittels derer sollten Kolokalisationsmessungen und bei Erfolg weiterführende FLIM- und FRET-Mikroskopien durchgeführt werden können (1.6).

Die Expression und Funktionalität der Klone B104 RET9 RS9.5, B104 RET9 RS9.10 und B104 RET51 RS51.9 wurden mikroskopisch und über Immunblots bestätigt und diese somit in nachfolgenden Experimenten eingesetzt (vgl. Abbn. 4.11, 4.25).

Im Falle der RET9 transfizierten B104 RS9.10 Zellen konnte die Anzahl vitaler Zellen durch GDNF um 35 % gegenüber unstimulierten Zellen erhöht werden (vgl. Abb. 4.23). Der mitogene Effekt fällt damit genauso stark aus wie bereits zuvor für GDNF und Gfr α 1 (s.o.). Hier zeigt sich ein weiterer methodischer Vorteil der photometrischen Vitalitätsbestimmung über Resazurin im Vergleich zur mikroskopischen Auszählung Calcein-angefärbter Zellen. Bei der Resazurinmethode wird die Gesamtzahl der Zellen vor und nach der Stimulation abgeschätzt, wodurch proliferative von Überlebens-fördernden Effekten unterschieden werden können. Der Vitalitäts-Anstieg für RET9 war zwar nicht signifikant, wurde jedoch mit dem Klon

RS9.10 durchgeführt, der mikroskopisch auf eine geringere RET-Expression als für Klon RS9.5 schließen lässt (vgl. Abbn. 4.18, 4.19). Die Auswirkung von GDNF auf die Vitalität von B104 RET9 RS9.5 und B104 RET51 Zellen könnte sich daher stark voneinander unterscheiden und sollte ebenfalls noch untersucht werden.

Auf das Neuritenwachstum von B104 RET9 Zellen hatten GDNF und NRTN keinen sichtbaren Einfluss. Die B104 Zelllinie stellte sich generell als eher ungeeignet zur Analyse neuritogener Effekte heraus, da bereits unstimulierte Zellen in serumfreiem Medium einen differenzierten Phänotyp mit dichtem Neuritennetzwerk aufweisen (vgl. Abb. 4.24). Wie bereits für weitere Neuroblastomazelllinien gezeigt werden konnte (s. o.), werden auch in B104 RET9 und RET51 Zellen Erk1/2 und Akt durch GDNF-Stimulation aktiviert (vgl. Abbn. 4.25-4.28). Da der Wildtyp nicht aktiviert wird, kann in beiden Fällen von einem Signal über RET ausgegangen werden. Für die Erk1/2-Aktivierung spielt hier keine Rolle, ob RET durch GDNF oder NRTN aktiviert wird. Dass diese beiden Faktoren unterschiedliche Zellantworten auslösen, wurde am Neuro-2a Modellsystem bereits aufgezeigt. Die hier vorliegenden Daten zeigen deutlich, dass die Erk1/2-Aktivierung für GDNF und NRTN exakt gleichermaßen erfolgt und demnach vermutlich auch für beide Zellantworten benötigt wird. Bei diesem Verlauf handelt es sich um eine klassische transiente Aktivierung. Das Signal steigt schnell auf einen Maximalwert zwischen 5 min und 10 min an und fällt dann erheblich langsamer ab als der Anstieg erfolgte. Diese Art kinetischen Verlaufs kommt vermutlich dadurch zustande, dass der internalisierte Rezeptorkomplex aus intrazellulären Vesikeln weiter signalisieren kann, bis ein Abbau in Proteasomen oder Lysosomen erfolgt (vgl. 5.3, (Taub *et al.*, 2007)). Unter Verwendung der zu diesem Zeitpunkt bereits optimierten Protokolle für die Zellstimulation und die nachfolgenden Immunblots konnte nachfolgend auch in den Neuro-2a Klonen N2a Gfr α 1 K34 und Gfr α 2 K33 das Aktivierungsmaximum nach 10 min detektiert werden (Strunk, 2010). Warum die Stimulationsmaxima für die Neuroblastomazelllinien NS20Y, N4TG3, N18TG2, N2a Gfr α 1 K34 und Gfr α 2 K33 hier unter ähnlichen Versuchsbedingungen bei 30 min auftreten, könnte dadurch erklärt werden, dass ein eher nach 5 min als nach dem bei B104 untersuchten Zeitpunkt von 10 min auftretendes Maximum übersehen wurde, das nach 15 min bereits kaum mehr detektierbar ist (Yoong *et al.*, 2009). Das bei Pezeshki *et al.*, 2001 auftretende RET-unabhängige Erk1/2-Signal über Gfr α 1 durch GDNF-Stimulation in B104 Wildtypzellen kann hier nicht bestätigt werden. Der pAkt-Antikörper führte trotz

Optimierung der Inkubationsbedingungen (s. o.) konstant zu erheblich schwächeren Signalen als der entsprechende Akt-Antikörper. Dies erschwerte die Auswertung aller pAkt-Experimente, da bereits leichter Hintergrund auf dem Immunblot die densitometrischen Daten verfälschte. Dadurch konnten viele Messungen nicht in die Auswertung mit aufgenommen werden, wodurch die Standardabweichung verhältnismäßig hoch ausfällt. Die einzig signifikante Aktivierung von Akt konnte durch GDNF über RET9 stimuliert werden. Im Gegensatz zu den Daten aus dem Neuro-2a Zellsystem konnte hier eine schwache Akt-Aktivierung für NRTN und RET9 beobachtet werden. Das im Vergleich zu GDNF nur etwa halb so starke Signal von NRTN steht jedoch im Einklang mit der geringen Bedeutung dieses Faktors für das Überleben der Zellen. Für die Akt-Stimulation in B104 RET51 sind die Signale zu schwach, um eine sichere Aussage treffen zu können (vgl. Abb. 4.28).

Was hauptsächlich auffällt ist, dass die Erk1/2-Stimulation über RET9 konsistent höher als über RET51 ausfällt. Für RET9 beträgt das Aktivierungsniveau den dreieinhalbfachen, für RET51 den doppelten Wert der basalen Erk1/2-Aktivierung (vgl. Abb. 4.26). Auch für die Phosphorylierung von Akt durch GDNF wird diese Tendenz sichtbar. Akt wird hier über RET9 etwa doppelt so stark wie über RET51 aktiviert (vgl. Abb. 4.28). Der Rezeptorabbau von RET gilt als wesentlicher Terminationsmechanismus der GFL-vermittelten Signale, da RET, Gfra1 und Gfra2 nach Aktivierung abgebaut werden. Die Degradation von RET51 erfolgt schneller und auf anderem Wege als für RET9. Das ist dadurch zu erklären, dass aktiviertes RET9 bevorzugt in *lipid rafts* rekrutiert wird und RET51 nicht. Dadurch wird die kürzere Isoform vor der außerhalb der *rafts* stattfindenden Ubitquiniierung durch E3-Ligasen der Cbl-Familie geschützt (Pierchala *et al.*, 2006). Diese Beobachtung zusammen mit den vorliegenden Erk1/2- und Akt-Stimulationsprofilen (vgl. Abbn. 4.26, 4.28) deuten darauf hin, dass durch die längere Verweildauer von RET9 innerhalb der *raft*-Domänen stärkere Erk1/2-Signale durch GDNF und NRTN und ein stärkeres Akt-Signal durch GDNF über RET9 induziert werden können. Dieser Effekt könnte ebenfalls durch eine unterschiedliche Expressionsstärke der RET-Klone zustande kommen und sollte daraufhin noch untersucht werden. Allerdings wurde zumindest für die beiden unterschiedlichen RET9 Klone RS9.5 und RS9.10 trotz vermutlich verschiedener Expressionsniveaus dieselbe Signalstärke und -kinetik detektiert.

RET kann aus verschiedenen Plasmamembrandomänen teilweise andere Adapterproteine zum Signalkomplex rekrutieren. Innerhalb *lipid raft*-Domänen

binden im Wesentlichen die lipidverankerten Proteine Src und FRS2 an RET. Über beide Adapterproteine können letztlich die PI-3-Kinase/Akt- und die MAPK-Kaskade initiiert werden. Außerhalb dieser Bereiche können dieselben Signalwege ebenfalls eingeschlagen werden. Dort wird dies jedoch hauptsächlich über lösliches Shc vermittelt (vgl. Abb. 5.1). Obwohl die Adapterproteine in der Lage sind, beide Signalkaskaden zu initiieren, wurde bisher die hauptsächliche Aktivierung der Akt-Kinase außerhalb und der MAP-Kinasen innerhalb *lipid rafts* angenommen (Encinas *et al.*, 2001; Airaksinen und Saarma, 2002).

In sympathischen Neuronen bewirkt NGF Gfr α -unabhängig gezielt die Phosphorylierung der Isoform RET51, um einen begünstigenden Effekt auf das Somawachstum und auf die Entwicklung eines reifen Neurotransmitter-Phänotyps auszuüben (Tsui-Pierchala *et al.*, 2002c). Mit dem hier etablierten B104 Modellsystem, das eine getrennte Betrachtung der RET-Isoformen erlaubt, könnte nun auch eine getrennte Stimulation von RET9 und RET51 mit NGF erfolgen. Falls dieser isoformspezifische Effekt in den Neuroblastomazellen ebenfalls auftreten sollte, könnte demnächst die Bedeutsamkeit Wachstumsfaktor-übergreifender Signalwege oder der RET51-Isoform näher untersucht und aufgeklärt werden.

5.1.2.1 RET-LOKALISATION IN B104 ZELLEN

Anhand der stabil transfizierten, fluoreszenzmarkierten RET-Isoformen RET9 und RET51 in B104 Neuroblastomazellen sollte die mikroskopische Detektion der zellulären Lokalisation des murinen Rezeptors erfolgen. Erwartet wurde hierbei zumindest teilweise eine Fluoreszenz in der Nähe der Plasmamembran, da es sich bei RET um eine membrandurchspannende, C-terminal markierte RTK handelt. Die bisherigen Lokalisationsbestimmungen unterschieden sich je nach verwendetem RET-Konstrukt und untersuchter Zelllinie. In Gfr α 1-überexprimierenden Neuro-2a Zellen konnte eine starke Plasmamembranfärbung von humanem, C-terminal GFP-markiertem RET nachgewiesen werden (Paratcha *et al.*, 2001). In der katecholaminergen, murinen Zelllinie CAD wurden GFP-markiertes RET9 und RET51 hauptsächlich intrazellulär detektiert (Schalm *et al.*, 2010). Ferner scheint die RET-Lokalisation auch von den gebundenen Signalproteinen abzuhängen. In neuronalen SK-N-MC Wildtypzellen und einer bevorzugt FRS2 statt Shc bindenden Mutante fand sich RET-GFP bevorzugt in Aggregaten an der Plasmamembran und intrazellulären

Vesikeln. In anderen Mutanten war fast ausschließlich zytosolische RET-Verteilung vorzufinden. Eine dieser Mutanten bindet bevorzugt Shc statt FRS2. Bei einer anderen Mutante wurde die PTB-Bindedomäne durch eine Mutation an Tyrosinrest Y1062 zu Phenylalanin inaktiviert (Lundgren *et al.*, 2008a; Lundgren *et al.*, 2008b). Die FRS2-Bindung an das RET-Tyrosin Y1062 ist wichtig zur Rekrutierung des Rezeptors in *lipid rafts* und scheint eine generelle Funktion zur Bildung von Rezeptoraggregaten zu besitzen. In den hier verwendeten B104 Zellen konnten für beide Isoformen lediglich vesikuläre Strukturen variabler Größe innerhalb der Zelle und keine spezifische Lokalisation an der Plasmamembran beobachtet werden. Da nicht klar sein konnte, ob es sich bei den Vesikeln um ein Artefakt der Überexpression handelt, wurde zunächst untersucht, ob der Rezeptor degradiert wird, bevor er die Plasmamembran erreicht. Die vesikuläre Beschaffenheit der beobachteten Strukturen ließen nur einen lysosomalen statt eines proteasomalen Abbaus vermuten. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden Koloalisations-Bestimmungen von RET51 mit einem fluoreszenzmarkierten Markerprotein für Lysosomen durchgeführt. Diese Isoform wurde ausgewählt, da aktiviertes RET9 sowohl im Proteasom als auch im Lysosom degradiert wird und RET51 normalerweise nur proteasomal abgebaut wird (Scott *et al.*, 2005; Pierchala *et al.*, 2006). Lysosomale Degradation von RET51 wäre daher ein klarer Hinweis auf einen fehlerhaften frühzeitigen Abbau des Rezeptors, konnte aber nicht bestätigt werden (vgl. Abb. 4.21). Zusätzlich wurden Immunfärbungen von B104 RET51 mit einem Primärantikörper gegen das lysosomal assoziierte Membranprotein LAMP1 (*lysosomal-associated membrane protein 1*) durchgeführt. Durch den gegen murines Protein gerichteten Antikörper konnte allerdings keine LAMP1-Anfärbung in Ratte B104 Zellen erzielt werden (nicht dargestellt). Konträr zum Abbau könnte sich das Protein auch in einer noch unvollständigen Synthesephase befinden. Der gereifte RET-Rezeptor ist hochglykosyliert. Während der Proteinbiosynthese wird er zuerst von einer 120 kDa Form im ER zu einer 150 kDa Form mit hohem Mannose-Anteil glykosyliert und anschließend zum Golgi-Apparat transportiert, wo weitere Glykosylierungen bis zur reifen 170 kDa Form erfolgen (Asai *et al.*, 1995; Hirata *et al.*, 2010). Selbst mittels konfokaler Mikroskopie konnte keine Plasmamembranfärbung von RET nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.18). Stattdessen wurde hier sichtbar, dass sich der Rezeptor in der Membran und nicht im Lumen der endosomalen Strukturen befindet. Dies deutet auf korrekte Membraninsertion und intrazellulären Transport des Rezeptors hin. Leider konnte

kein Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen ausgemacht werden, wodurch die geplanten FRET-Messungen als nicht mehr sinnvoll erschienen. Eventuell ließen sich durch den Einsatz des RET9 Klon RS9.10 für die mikroskopischen Methoden besser sichtbare Unterschiede vor und nach GDNF-Stimulation erzielen. Dieser Klon weist in konfokaler Ebene kleinere, feiner verteilte RET-Strukturen auf, die durch ein niedrigeres und somit vielleicht physiologischeres Expressionsniveau erklärbar wären (vgl. Abb. 4.19). Aus Mangel eines entsprechenden Primärantikörpers gegen RET konnte die Expression jedoch nicht überprüft werden. Die nachgewiesene Signalkaskaden-Aktivierung beider Isoformen in Immunblots (s. o.) weist darauf hin, dass zumindest ein Teil der Rezeptoren oberflächenaktiv ist und so eine GFL-Bindung erfolgen kann. Durch eine Biotinylierung Oberflächen-lokalisierter RET-Rezeptoren könnte ein möglicher Beweis hierfür erbracht werden. Diese könnten durch selektive Bindung an Streptavidin-Agarosebeads aus den Zelllysaten gewonnen und nachfolgend in Immunblots detektiert werden.

Für das Recycling des NGF-Rezeptors TrkA konnte gezeigt werden, dass sich zu einzelnen Zeitpunkten immer nur ein geringer Prozentsatz auf der Oberfläche befindet (Urdiales *et al.*, 1998). Es lässt sich daher vermuten, dass es sich bei den RET-tragenden Vesikeln ebenfalls um intrazelluläre Rezeptor-Pools oder Recyclingendosomen handelt und nur ein Bruchteil des dynamisch zwischen intrazellulären Kompartimenten und der Zelloberfläche recycelnden Rezeptors auf der Plasmamembran vorkommt. Faktisch tendieren Zellen mit hoher Rezeptorexpression dazu, große Pools aktivierter Rezeptoren in Endosomen beizubehalten (Sorkin, 2001).

Um die Beschaffenheit der endosomalen RET-Transportvesikel zu bestimmen, wurden Kolokalisationsbestimmungen mit Fluoreszenz-markierten Rab-GTPasen durchgeführt, die an spezifischen endosomalen Transport- und Fusionsschritten beteiligt sind (vgl. Abb. 4.22). Die Rab-Kolokalisationen wurden bisher lediglich für RET51 bestimmt, da angenommen wurde, dass sich die Lokalisation der beiden RET-Isoformen zumindest im unstimulierten Zustand nicht wesentlich unterscheidet.

Das normale Rezeptor-Recycling kann zwei verschiedene Wege einschlagen. Der eine Weg verläuft schnell und über periphere frühe Endosomen, die durch die GTPase Rab4 charakterisiert sind. Der andere Weg ist langsamer und durch Rab11-positive Vesikel gekennzeichnet. Hierbei findet das Recycling zwischen perinukleären

Recyclingvesikeln, dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran statt (Sheff *et al.*, 1999). RET51 kolokalisiert ausschließlich mit Rab11 und nicht mit Rab4, was auf ein langsames Rezeptor-Recycling schließen lässt. RET konnte außer im Zellkörper auch in Neuriten detektiert werden, was eventuell auf frühe Endosomen und eine Funktion im retrograden Signaltransport hinweist (vgl. Abb. 4.20). Eine Lokalisation in frühen Rab4-positiven Endosomen konnte allerdings für RET51, zumindest im unstimulierten Zustand, nicht nachgewiesen werden. Interessant wäre eine Überprüfung auf Rab5, das teilweise in anderen Subtypen früher Endosomen zu finden ist (vgl. 5.3). Die Klonierung eines geeigneten Rab5-Konstrukts verlief jedoch wiederholt erfolglos. Die Rab7-positiven spät-endosomalen Vesikel zeichnen sich klar ab, wobei deutlich zu sehen ist, dass keine Kolokalisation mit RET erfolgt. Diese Art von Vesikeln übernehmen meist Aufgaben zwischen spätem Endosom und Lysosom, wodurch bekräftigt wird, dass RET nicht zum Abbau bestimmt ist sondern konstitutiv recyclet wird. Stattdessen befindet sich RET51 in späten Rab9-positiven Vesikeln, die *in vitro* für das Recycling von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren von späten Endosomen zum TGN verantwortlich sind. Im Golgi kann einerseits die bereits erwähnte Prozessierung der N-glykosidisch verbundenen Oligosaccharide zu komplexen Zuckerketten erfolgen. Andererseits können die Rezeptoren von hier über sekretorische Vesikel zur Plasmamembran befördert werden, was im Einklang mit dem konstitutiven Recycling stünde. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass aktivierte RET-Rezeptoren wie viele andere RTK schnell endozytiert und zumindest teilweise zurück zur Plasmamembran recycelt werden. Weiterhin konnte herausgefunden werden, dass RET zu den 0- und 30-minütigen Stimulationszeitpunkten stark mit membrangebundenem Biotin kolokalisierte, zum 15-minütigen Zeitpunkt jedoch nicht (Richardson und Mulligan, 2010). Diese Beobachtung könnte erklären, warum zumindest nach 10 min Stimulation keine Plasmamembran-Lokalisation von RET detektiert wurde, lässt aber die Frage offen, warum die unstimulierte Kontrolle ebenfalls nur intrazellulär nachgewiesen werden konnte. Abschließend zu diesen Experimenten sollten parallele Rab-Kolokalisations-Bestimmungen beider RET-Isoformen im stimulierten Zustand durchgeführt und verglichen werden.

5.2 KOMPONENTEN DES RAP1/MAPK-VERMITTELTEN SIGNALWEGS

Die meisten neuronalen Wachstumsfaktoren können neben trophischen Effekten wie der Proliferation zusätzlich neuritogene Zellantworten wie die Differenzierung auslösen. Die Faktoren, die zu einem Wechsel zwischen diesen beiden Zellantworten beitragen, sind noch nicht vollständig bekannt.

Im Allgemeinen wird die Auffassung vertreten, dass eine Stimulation neuronaler Zellen durch das Neurotrophin NGF zu einer transienten Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und zur Proliferation oder zu einer anhaltenden Aktivierung dieser MAP-Kinasen und zur Differenzierung führen kann. Dieser Unterschied kommt dadurch zustande, dass transiente Erk1/2-Aktivierung nicht zur Translokation in den Zellkern und zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren führt, anhaltende aber schon (Marshall, 1995). Die schnelle transiente Phosphorylierung der MAPK kann bereits an der Plasmamembran durch die kleine GTPase Ras erfolgen. Eine anhaltende Aktivierung kann nach erfolgter Endozytose des aktivierten Rezeptorkomplexes aus stabilen perinukleären Signalendosomen durch anhaltend aktiviertes Rap1 und dadurch einem weiteren Stimulationsmaximum nach 40 min zusätzlich zur Ras-vermittelten Erk1/2-Aktivierung nach 5 min erreicht werden (York *et al.*, 1998; Mochizuki *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001). Das NGF-vermittelte neuritogene Signal scheint aus solchen Signalendosomen zu erfolgen, da eine Inhibition Dynamin-abhängiger Endozytose durch dominant negatives Dynamin sowohl die anhaltende Erk1/2-Stimulation als auch das Neuritenwachstum verhindert (Zhang *et al.*, 2000; Geetha *et al.*, 2005; Bronfman *et al.*, 2007). Auf den Aspekt der endosomalen Signalentstehung wird an späterer Stelle genauer eingegangen (vgl. 5.3).

Der exakte Ablauf dieses Signalnetzwerks und dessen Regulation ist unklar, da es sich bei Ras und Rap1 um kleine GTPasen handelt, die einem komplexen Regelkreislauf unterlegen sind. GEF-Proteine sind in der Lage, GTPasen durch den Austausch von GDP zu GTP zu aktivieren. GAP-Proteine verstärken ihre intrinsische GTPase-Aktivität, wodurch die kleinen GTPasen inaktiviert werden.

In den meisten nicht-neuronalen Zelltypen inhibiert aktiviertes Rap1 die Erk1/2-Phosphorylierung, indem es durch räumliche Abtrennung die Fähigkeit von Ras verhindert, Raf-1 zu aktivieren (Cook *et al.*, 1993; Carey *et al.*, 2003). In neuronalen und endokrinen Zellen wird neben Raf-1 die zusätzliche MEK-Kinase B-Raf exprimiert, die stattdessen, sofern sie durch Rap1 aktiviert wurde, zur anhaltenden

Aktivierung von Erk1/2 und CREB führt (Dugan *et al.*, 1999; York *et al.*, 2000). Zwar liegen Daten dafür vor, dass das NGF/TrkA-induzierte Neuritenwachstum in PC12 Zellen nicht über Rap1 oder die GTPase-Isoform H-Ras, sondern über M-Ras, Erk1/2 und CREB erfolgt (Sun *et al.*, 2006), jedoch konnte dieses Resultat seither nicht wiederholt werden. Stattdessen konnten im Zusammenhang mit GDNF/RET bereits Teile der NGF-typischen Rap1-Aktivierung bestätigt werden (Uchida *et al.*, 2006).

Die analytische Betrachtung des Rap1/MAPK-Signalwegs wurde an B104 RET9 Zellen durchgeführt, da die im späteren Verlauf beschriebenen Experimente ein endosomales *Signaling* für diese Isoform belegen (vgl. 5.3). Es sollte untersucht werden, ob retrograd transportierte Signale über RET wie bei NGF/TrkA über Rap1 aus Endosomen vermittelt werden. In B104 RET9 Zellen wurde Rap1 unabhängig von einer erfolgten GDNF-Stimulation zytosolisch lokalisiert nachgewiesen (vgl. Abb. 4.29). Rap1 ist eine ubiquitäre kleine GTPase, die im inaktiven Zustand zytosolisch vorliegt. In neuronalen Zelltypen wird Rap1 nach der Aktivierung durch einen GEF hauptsächlich zum Golgi-Apparat und zur Membran perinukleärer Endosomen rekrutiert (Nomura *et al.*, 2004). Eine Aktivierung von Rap1 durch GDNF konnte demnach im verwendeten Zellsystem nicht nachgewiesen werden. Der untersuchte Stimulationszeitpunkt nach 10 min hätte jedoch bereits aktiviertes Rap1 aufweisen müssen (York *et al.*, 2000). Es bestehen die Möglichkeiten, dass das Rap1-spezifische GEF im GDNF-Signalweg nicht in B104 Zellen exprimiert wird oder dass die Menge aktiver GEF an endosomalen Membranen nicht ausreicht, um überhalb des Hintergrunds fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden zu können. Für die NGF-Signaltransduktion sind im Wesentlichen RapGEF1 (C3G) und RapGEF2 (PDZ-GEF1) hierfür verantwortlich. Nicht aktiviertes RapGEF1 befindet sich hauptsächlich im Zytosol, wo es in einem Komplex mit Mitgliedern der Crk-Familie kleiner Adapterproteine vorliegt (Arai *et al.*, 1999). Phosphoryliertes RapGEF1 transloziert zum Golgi-Komplex und zum subkortikalen Aktinzytoskelett (Radha *et al.*, 2004). Die Phosphorylierung von RapGEF2, das ansonsten ebenfalls zytosolisch vorliegt, führt zur Translokation zu perinukleären Bereichen und zum Golgi und kolokalisiert dort mit aktiviertem Rap1 (Liao *et al.*, 2001). Weder für RapGEF1 (vgl. Abb. 4.30) noch für RapGEF2 (vgl. Abb. 4.31) konnte eine verstärkte perinukleäre Fluoreszenz nach GDNF-Stimulation detektiert werden. Beide Proteine zeigten die gleichmäßige zytosolische Verteilung, die typisch für inaktive GEF ist. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Rap1 im GDNF/RET-Signalweg durch andere GEF als bei NGF/TrkA

aktiviert wird. Mögliche Kandidaten hierfür wären RapGEF3 (EPAC) oder RapGEF6 (PDZ-GEF2; (de Rooij *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2001)).

Die Varianten des GFP-Markerproteins fügen mit etwa 27 kDa Proteingröße eine relativ lange Aminosäurekette an das Fusionsprotein an. Nur falls keine Fehlfaltung der Fluoreszenz-markierten Fusionsproteine inklusive RET stattgefunden hat, könnte vermutet werden, dass keine Aktivierung des Rap1/MAPK-Signalwegs in den B104 RET9 Zellen erfolgt. Diese Schlussfolgerung wäre konsistent mit der für diese Zelllinie unter identischen Bedingungen beobachteten transienten Aktivierung von Erk1/2 und der Unfähigkeit von GDNF, das Neuritenwachstum in diesem Zellsystem zu verstärken (s. o.).

In humanen TGW Neuroblastomazellen konnte jedoch eine anhaltende Aktivierung von Rap1, Erk1/2 und ein Neuritenwachstum über GDNF-stimulierte RET-Rezeptoren nachgewiesen werden (Uchida *et al.*, 2006). Es gilt also zu analysieren, in welchen Aspekten sich die beiden Zelllinien und die Versuchsbedingungen unterscheiden.

Die hohe Bedeutung inhibitorischer Signalwege wurde im Zusammenhang mit Gfra1b bereits verdeutlicht (s. o.). Für die Aktivierung von Rap1 ist die GAP-Regulation von höchster Wichtigkeit. Eine Aktivierung von Rap1 an der Plasmamembran wird durch eine dort höhere RapGAP-Aktivität und eine Aktivierung von Ras in der zentralen Kernregion durch die lokal höhere RasGAP-Aktivität verhindert. Durch die Aktivierung der GEF wird lediglich die räumliche Konstante reguliert. Ras sorgt für die schnelle Erk1/2-Aktivierung an der Plasmamembran und Rap1 verzögert aus späten Endosomen für die anhaltende Aktivierung (Ohba *et al.*, 2003). Die Schlüsselstelle scheint hier von einer Beteiligung der Proteinkinase A (PKA) abzuhängen. RET ist durch einen bisher noch unerforschten Mechanismus in der Lage, nach GDNF-Aktivierung cAMP und durch dessen Aktivierung PKA hochzuregulieren (Cai *et al.*, 1999). Zur vollständigen Aktivierung des Rap1/Erk1/2-Signalwegs über RET müssen vermutlich zwei Phosphorylierungen erfolgen. Rap1GAP muss über eine Phosphorylierung durch PKA inaktiviert und die beteiligten RapGEF für die Rap1-Aktivierung über entsprechende Adapterproteine phosphoryliert werden (Self *et al.*, 2001; McAvoy *et al.*, 2009). Letzterer Mechanismus verläuft über die Src-Kinase. Diese kann unter anderem durch PKA aktiviert werden, was im Falle von NGF zur Bildung des zur Aktivierung von Rap1 essenziellen Crk/Cbl/RapGEF1-Komplexes führt (Schmitt und Stork, 2002b). Die Src-Aktivierung

durch andere Stimuli und Kinasen bewirkt stattdessen die transiente Erk1/2- und Akt-Stimulation über Ras (Xing *et al.*, 2000; Schmitt und Stork, 2002a). Da sowohl die Regulation von Rap1GAP als auch die vieler RapGEF PKA-abhängig sind, ist es möglich, dass beide Aktivierungen bereits aufwärts der PKA verhindert werden. Hierzu kommen insbesondere zwei Möglichkeiten in Betracht. Der RET-Korezeptor Gfr α 1 ist in der Lage, das GDNF-Signal und dessen bewirkte Zellantwort zu schalten. Eine Beteiligung *in cis* am RET-Signalkomplex, also in membranständiger Form auf derselben Zelle, führt zur schnellen, transienten Rekrutierung von RET über Gfr α 1 in die *lipid rafts*, wodurch die transiente Phosphorylierung von Erk1/2 und Akt ausgelöst wird. Eine Aktivierung *in trans* bewirkt eine verzögerte RET-Rekrutierung in die *rafts* und eine anhaltende Aktivierung der Kinasen. Die Rekrutierung erfolgt hierbei unabhängig von Gfr α 1 und verläuft vermutlich mit Abhängigkeit von der RET-Kinaseaktivität über intrazelluläre, *raft*-lokalisierte Proteine wie FRS2.

Der Ausgang einer Stimulation könnte ebenfalls über die Endozytosekinetik reguliert werden. Die Internalisierung des EGF-Rezeptors verläuft schneller als die des NGF-Rezeptors TrkA und aktiviert das Zellwachstum (Countaway *et al.*, 1992). Eine EGFR-Mutante, die verzögert endozytiert wird, kann hingegen die Differenzierung von PC12 Zellen auslösen (Yamada *et al.*, 1996). Eine artifiziell induzierte schnellere TrkA-Internalisierung verschiebt darüber hinaus die anhaltende Erk1/2-Aktivierung in Richtung transient. Interessanterweise kann das *raft*-ständige Protein FRS2 hierbei nicht mehr phosphoryliert werden (Saragovi *et al.*, 1998). Ob jedoch die Endozytosekinetik die *lipid raft*-Rekrutierung reguliert oder umgekehrt die Anwesenheit eines Rezeptors in dieser Domäne seine Internalisierung verzögert, ist unklar. Falls die Rekrutierung in die *rafts* unbehindert erfolgen kann, und zumindest die Stimulationsverläufe über RET9 sprechen in diesem Falle dafür (vgl. 5.1.2), ist möglicherweise das Signal, das zur anhaltenden Rap1-Aktivierung führt, an einer Stelle aufwärts von Rap1 in der Signalkette unterbrochen. Unter der Voraussetzung, dass zumindest eines der beiden getesteten GEF für Rap1 im GDNF-Signalweg spezifisch ist, läge als mögliche Ursache hierfür das Fehlen eines Adapterproteins nach Rezeptoraktivierung an der Plasmamembran und vor der RapGEF-Phosphorylierung nahe.

Das Adapterprotein SH2B1 β steht im Zusammenhang mit dem Neuritenwachstum über die neuronalen Wachstumsfaktoren NGF, GDNF und FGF1, indem es die Signalwege über Erk1/2 und PI3-K/Akt verstärkt und verlängert (Wang *et al.*, 2004c;

Zhang *et al.*, 2006; Donatello *et al.*, 2007). Für FGF1 ist bekannt, dass dieser neuritogene Effekt im Wesentlichen über Mek/Erk1/2/*egr-1* ausgeübt wird und durch die Inhibition der Rho-Kinase ROCK ähnlich wie bei SH2B1 β verstärkt werden kann (Lin *et al.*, 2009). SH2B1 β könnte damit als molekularer Schalter in neuronalen Zelltypen fungieren, indem das Protein inhibierende Signalwege über Rho und ROCK blockiert.

Ein weiteres interessantes Adapterprotein ist Shank-3. Schuetz *et al.*, 2004 fanden heraus, dass das GDNF-Signal über RET51 transient Erk1/2 aktiviert und RET9 über Shank-3 zur anhaltenden Aktivierung von Erk1/2 und Akt führt. Erst über Shank-3 wird Grb2 zum Signalkomplex rekrutiert. Die Shank-3-Bindung an RET9 erfolgt über eine PDZ-Bindedomäne, die das Ende des C-Terminus von RET9 bildet (AS 1070-1073: FTRF). RET51 besitzt eine solche Domäne nicht (Schuetz *et al.*, 2004). Es wurde bereits vermutet, dass durch die Isoform RET9 und deren bevorzugte Rekrutierung in die *lipid rafts* die zu Neuritenwachstum führende Stimulation erfolgen könnte. Durch den Schutz vor proteasomalem Abbau und die zusätzlich verzögerte Endozytosekinetik aus den *lipid rafts* würden zusätzliche Signaladaptoren binden, zu denen RET51 keinen Zugang hat (vgl. Abb. 5.1). In dem vergleichbaren Experiment von Schuetz *et al.*, 2004, das in der sehr ähnlichen und auch hier verwendeten Zelllinie Neuro-2a durchgeführt wurde, führte die Expression des Adapterproteins Shank-3 zum Neuritenwachstum. Hier hingegen wird trotz transients Erk1/2-Aktivierung, die in den Neuro-2a Zellen nur bei RET51 auftrat, die für RET9 spezifisch zu sein scheinende Akt-Kinase aktiviert. Das lässt die Vermutung zu, dass RET9 einen anderen Endozytoseweg als RET51 einschlägt, bei dem Akt aus anderen Membranbereichen als für RET51 üblich aktiviert wird. Es deutet alles darauf hin, dass die Aktivierung von Akt zwar erfolgen kann, die intrazelluläre Aktivierung des Rap1/MAPK-Signalwegs jedoch durch das Fehlen eines Adapterproteins verhindert wird. Im möglichen Falle von Shank-3 wäre eine fehlende Expression in B104 Zellen denkbar. Auch die Shank3-Bindung könnte durch die C-Terminale CFP-Markierung verhindert werden. Im Einklang mit dieser Vermutung konnte gefunden werden, dass durch das Anfügen einer Sequenz an den C-Terminus von RET9 die Fähigkeit zur PDZ- und somit zur Shank-3 Bindung aufgehoben wird (Songyang *et al.*, 1997).

Eine N-terminale Fluoreszenzmarkierung könnte ebenfalls problematisch sein, da sich N-terminal meist hydrophobe Signalsequenzen zur Translokation in das ER und darauffolgend über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran befinden (Martoglio

und Dobberstein, 1998). Teilweise werden diese Sequenzen und damit auch eine fusionierte Fluoreszenzmarkierung auch nach der ER-Translokation des Proteins abgespalten. Ferner könnte eine N-terminale Fluoreszenzmarkierung die natürliche Interaktion von RET mit Gfr α oder GFL verhindern.

Ein weiteres Adapterprotein, das theoretisch die Lokalisation von RET beeinflussen kann, ist ENIGMA. Die Bindung von ENIGMA wird weniger von dem Fusionsmarker betroffen sein als Shank-3, da es statt der C-terminalen PDZ-Domäne an den Tyrosinrest Y1062 bindet und lediglich die Aminosäurereste +2 bis +4 der RET9-eigenen Sequenz zur Erkennung benötigt (Borrello *et al.*, 2002).

Bedeutungsäquivalent zu Shank-3 steht das Adapterprotein Dok-4. Die bisher einzig nachgewiesene Stimulation von Neuritenwachstum über RET und Rap1 erfolgte in humanen TGW Neuroblastomazellen. TGW Wildtypzellen mit endogener RET-Expression zeigten die dafür benötigte anhaltende Erk1/2- und Akt-Stimulation. In TGW Zellen, bei denen die endogene Dok-4-Expression mittels siRNA blockiert wurde, trat nur noch eine transiente Aktivierung von Erk1/2 und Akt mit einem Maximum nach 10 min Stimulation auf. Stimulationsverlauf und -stärke waren äquivalent zu den hier für die B104 RET9 Zellen erhaltenen Aktivierungen (Uchida *et al.*, 2006). Dies ist ein möglicher Hinweis darauf, dass diesen Zellen das entsprechende Dok-Adapterprotein fehlen könnte. Unterstützt wird diese These dadurch, dass Dok-Proteine mit RET in neuronalen Geweben koexprimiert zu werden scheinen und es sich bei B104 um eine der wenigen Neuroblastomazelllinien ohne endogene RET-Rezeptoren handelt (Crowder *et al.*, 2004). Eine Störung der Bindung wie für Shank-3 ist dahingehend eher unwahrscheinlich, da Dok-4 mit RET über den Tyrosinrest Y1062 interagiert (Grimm *et al.*, 2001). In der Maus ist Dok-6 für diese Adapterfunktion verantwortlich. In Neuro-2a wird Dok-6 exprimiert (Kurotsuchi *et al.*, 2010) und eine Überexpression von Dok-6 in N2a Gfr α 1 verstärkt das GDNF-induzierte Neuritenwachstum erheblich (Crowder *et al.*, 2004). Damit könnte eine Erklärung dafür gefunden sein, warum im hier etablierten Neuro-2a Zellsystem zwar eine Steigerung des Neuritenwachstums, aber keine starke, anhaltende Erk1/2-Aktivierung zu beobachten ist. Es ist möglich, dass diese nur in den ansonsten stark überexprimierenden Zelllinien auftritt und im physiologischen Expressionsbereich ein geringeres Niveau erreicht. Auch ist Dok-6 ein Substrat der Src-Kinase, die beim RET-Signalweg bevorzugt bei RET9 aus *lipid rafts* aktiviert wird (Crowder *et al.*, 2004), was wiederum für die Initiierung des neuritogenen Signals über RET9 aus

diesen Domänen spricht (vgl. Abb. 5.1). Für B104 wurde die Rap1-Aktivierung durch RET wie im humanen System über Dok-4 festgestellt, jedoch ist auch eine Beteiligung von Dok-6 möglich. Es empfiehlt sich, zuerst die Expression von Dok-4 in B104 mit den bei Uchida *et al.*, 2006 verwendeten rattenspezifischen Oligonukleotiden in einer RT-PCR zu überprüfen und bei Bestätigung der fehlenden Expression Dok-4 zu überexprimieren.

Unter Berücksichtigung der zuvor aufgeführten Möglichkeiten, die die Aktivierung von Rap1 verhindern könnten, sollten nun zunächst Bedingungen gefunden werden, bei denen eine anhaltende Erk1/2-Stimulation auftritt. Erst danach erscheint eine Wiederholung der mikroskopischen Lokalisationsanalysen sinnvoll. Alternativ dazu könnten NG108-15 Zellen transient mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und anschließend stimuliert und mikroskopisch untersucht werden. In diesen konnte eine cAMP- und PKA-unabhängige, zu Neuritenwachstum führende, anhaltende Aktivierung von Rap1, B-Raf und Erk1/2 durch extrazelluläre Stimuli beobachtet werden (Gendron *et al.*, 2003). Dies lässt auf das Vorhandensein aller hierfür beteiligten Adapterproteine schließen. Die für Rap1 spezifischen GEF RapGEF1 und RapGEF2 werden nicht durch cAMP aktiviert und könnten daher dort eine Rolle spielen (Kuiperij *et al.*, 2003).

Als Alternative zu den mikroskopischen Experimenten zur Rap1-Aktivierung könnte ein Rap1-*Pulldown-Assay* durchgeführt werden (Herrmann *et al.*, 1996). Aktiviertes Rap1-Protein wird hierbei über RalGDS-RBD (Ras-bindende Domäne), das an GST (Glutathion-S-Transferase)-Sepharose-*Beads* gekoppelt ist, gebunden. RalGDS ist ein Effektorprotein, das in der Signalkette abwärts von aktivem Rap1 liegt und spezifisch über seine RBD mit diesem interagieren kann. Nach Aufreinigung der *Beads* und SDS-PAGE (3.3.3) kann die Menge aktiven Rap1-Proteins in Immunblots mit Antikörpern gegen Rap1 untersucht werden.

5.3 ENDOSOMALES SIGNALING

Der Endozytoseweg, durch den Rezeptoren internalisiert werden, kann sowohl den Ausgang, die Dauer als auch die Stärke des vermittelten Signals bestimmen (vgl. Abb. 1.5). Anhaltende Aktivierungen werden meistens durch den Wechsel von einem degradativen auf einen Recycling-Transportweg erreicht.

Für den TGF- β -Rezeptor konnte gezeigt werden, dass seine Internalisierung klassisch durch Clathrin-abhängige Endozytose und auch Clathrin-unabhängig aus Caveolae erfolgen kann. Durch eine räumliche Trennung des Rezeptors von den *lipid rafts* wird eine Signalweiterleitung über den erstgenannten Endozytoseweg eingeleitet, bei dem die Signaldauer in frühen Endosomen über das Smad2-Ankerprotein SARA verlängert wird. Die Rezeptoraufnahme aus Caveolin- oder *lipid raft*-Bereichen bewirkt hingegen einen schnellen Rezeptorabbau und beendet das Signal, indem Smad7 mit Hilfe von Smurf2 den Zugang zum Transkriptionsfaktor Smad2 blockiert (Di Guglielmo *et al.*, 2003). Der TrkA-Rezeptor hingegen wird nach NGF-Stimulation über Flotilin, das Adapterprotein CAP (*c-Cbl associated protein*) und Cbl in *rafts* rekrutiert und verankert. Von dort wird über das Gerüstprotein FRS2 ein neuritogenes Signal über anhaltende Rap1- und Erk1/2-Aktivierung eingeleitet (Kao *et al.*, 2001; Limpert *et al.*, 2007). Cbl spielt eine multifunktionale Rolle als Ubiquitinligase und Adapterprotein. Die Verankerung von Cbl an CAP innerhalb *rafts* könnte dort für die geringere Ubiquitinierung und RET-Degradation verantwortlich sein.

Zur Klärung, ob der RET-Rezeptor in dem erstellten B104 RET9 Zellsystem Clathrin-abhängig oder -unabhängig aufgenommen wird, wurden GDNF-stimulierte Zellen mit dominant negativen Mutanten der für verschiedene Endozytosewege essenziellen Proteine Eps15 und Dynamin-2 transfiziert und mikroskopisch untersucht (vgl. Abb. 1.8). Hierbei stellte sich heraus, dass in vielen Zellen, die mit der Dynamin-2-Mutante K44A transfiziert wurden, gehäuft vesikuläre, RET-haltige Strukturen nahe der Plasmamembran auftraten (vgl. Abb. 4.32). In der normalen Funktion umschnüren Dynamin-2-Oligomere den Hals Clathrin- und Caveolin-ummantelter Plasmamembran-Einstülpungen und führen unter GTP-Verbrauch zur Abschnürung der Vesikel ins Zellinnere. Der Dynamin-2-Mutante K44A fehlt die intrinsische GTPase-Aktivität, wodurch Clathrin- und Caveolin-abhängige Endozytosewege auf dieser Stufe gehemmt werden können (Henley *et al.*, 1998). Da es so aussieht, als würden solche Intermediate bei der Mutante entstehen, scheint die Endozytose des RET-Rezeptors Dynamin-abhängig zu verlaufen. Da jedoch nicht klar ist, ob die

mikroskopisch zu beobachtende hauptsächliche RET-Lokalisation in intrazellulären Vesikeln ein Artefakt der Überexpression und deren Verteilung nahe der Plasmamembran eher zufälliger Natur sind, sollten weitere Experimente zur Verifikation des Ergebnisses durchgeführt werden. Eine transiente Transfektion der Zellen mit anschließender GDNF-Stimulation bietet sich an und sollte eine Reduktion des pErk1/2-Signals in Immunblots bewirken. Die RET-Lokalisation in den dominant negativen Eps15-Mutanten unterscheidet sich nicht von den funktionslosen Eps15 DIIIΔ2-Mutanten (vgl. Abb. 4.33). Eps15 ist ein ubiquitäres Protein, das konstitutiv an das Clathrin-bindende AP-2 gebunden ist. Im Falle Liganden-vermittelter, Clathrin-abhängiger Endozytose kann Eps15 dadurch Clathrinmoleküle über AP-2 an die Plasmamembran rekrutieren, um mit Clathrin ausgekleidete Plasmamembran-Einstülpungen auszubilden. Die Eps15-Mutante DIII bindet AP-2, ist durch die Deletion seiner drei EH-Domänen jedoch nicht mehr in der Lage, AP-2 mit der Plasmamembran zu verbinden, wodurch keine Clathrin-abhängige Endozytose mehr stattfinden kann (Benmerah *et al.*, 1999). Das Ergebnis deutet daher auf einen Clathrin-unabhängigen Mechanismus für die Endozytose des RET-Rezeptors hin. Als zusätzliche Kontrolle zu den dominant negativen Mutanten könnte die Expression von Dynamin-2 oder Eps15 durch den Einsatz von siRNA je nach Effizienz herabreguliert oder gar ausgeschaltet werden. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse sollte allerdings berücksichtigt werden, dass sich eine Unterbrechung der Funktionen dieser Proteine nicht nur auf die untersuchte Stimulation, sondern auf die gesamte Endozytose der Zelle auswirkt.

Der hauptsächliche Clathrin-unabhängige, aber Dynamin-abhängige Endozytose-Mechanismus ist die Internalisierung aktivierter Rezeptoren aus Caveolae oder *lipid rafts*. Als Nächstes wurde daher überprüft, ob weitere Hinweise auf eine *raft*-abhängige Endozytose gefunden werden können. Dazu wurden B104 RET9 Zellen eine halbe Stunde mit Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) vorinkubiert, um der Zelle chemisch das Cholesterin aus der Plasmamembran zu entziehen. Obwohl auch die Clathrin-abhängige Endozytose Cholesterin benötigt, werden mittels dieser Methode traditionell *lipid raft*-Bereiche aufgelöst. Hierbei trat das Problem auf, dass die Zellen bereits direkt nach Zugabe von MβCD größtenteils ihre Adhärenz verloren. Zur Vermeidung eines heterogenen Zellverlusts wurde daher auf den Mediumwechsel vor der Stimulation verzichtet. Stattdessen wurden die abgelösten Zellen nach Stimulationsende pelletiert und die Proteinextrakte mit denen der noch adhären

Zellen vereinigt. Eventuell könnte eine Reduktion der Inkubationszeit auf 15 min das Problem verringern (Pierchala *et al.*, 2007). In den nachfolgenden Immunblots konnte durch die M β CD-Behandlung eine drastische Reduktion der Erk1/2-Aktivierung erreicht werden (vgl. Abb. 4.35). Diese ist vergleichbar mit der durch M β CD ausgelösten, reduzierten Erk1/2-Aktivierung nach der Endozytose aktivierter TrkA-Rezeptoren aus Caveolae (Peiro *et al.*, 2000).

Die GDNF-induzierte Endozytose von RET ist damit Cholesterol- und Dynamin-abhängig, was darauf hindeutet, dass der aktivierte RET9-Rezeptor zuerst in *lipid rafts* rekrutiert und dann internalisiert wird. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass das GDNF-Signaling mit RET9 über den *lipid raft*-verankerten Korezeptor Gfra1 verläuft (vgl. Abb. 4.9). Die Rezeptoraufnahme kann hieraus sowohl Caveolin-abhängig als auch -unabhängig erfolgen. Unter dieser Annahme wäre es interessant zu sehen, ob in B104 RET51 Zellen eine Clathrin-abhängige Endozytose über Eps15 DIII als dominant negatives Instrument festgestellt werden könnte. Da in sympathischen Neuronen lediglich die aktivierte RET9-Rezeptorisoform in *lipid rafts* rekrutiert wird und RET51 außerhalb der *rafts* einem schnelleren proteasomalen Abbau unterliegt (Pierchala *et al.*, 2006), lässt sich eine Clathrin-Abhängigkeit der RET51-Internalisierung vermuten.

Alternativ zur M β CD-Behandlung sollten hier zwei weitere Methoden zur Auflösung der *lipid rafts* erwähnt werden, die eventuell keinen negativen Einfluss auf die Adhärenz der Zellen ausüben. Einerseits könnte statt M β CD Lovastatin für eine Inhibition der Cholesterol-Biosynthese verwendet werden (Pierchala *et al.*, 2006). Andererseits könnte der Plasmamembran statt des Cholesterols das Sphingomyelin entzogen werden. Die neutrale Sphingomyelinase (Smase) führt hierbei zur enzymatischen Auflösung von *lipid raft*-Strukturen innerhalb weniger Stunden (Scheek *et al.*, 1997).

Auch mechanistisch betrachtet, erscheint eine Clathrin-unabhängige Endozytose für RET9 aus *lipid rafts* plausibel. Diese Domänen zeigen eine lokal konzentrierte Anreicherung von Src-Kinasen, die wichtig für die wesentlichen RET-vermittelten Signalwege sind (Encinas *et al.*, 2001). In der Tat zeigt sich auch in sympathischen Neuronen, dass die Auflösung der *lipid rafts* über Lovastatin den Überlebensfördernden Effekt von GDNF vollständig verhindert (Pierchala *et al.*, 2006). Im Falle der RET9 transfizierten B104 Zellen konnte ebenfalls durch GDNF die Anzahl vitaler Zellen gegenüber unstimulierten Zellen erhöht werden (s. o.).

Richardson *et al.*, 2006 postulierten eine klassische Rezeptor-vermittelte und Clathrin-abhängige Endozytose (CDE) des RET-Rezeptors. Diese findet nicht innerhalb sondern außerhalb *lipid rafts* statt und verläuft über Clathrin-umhüllte Vesikel (CCV). Bei genauerer Betrachtung wurde dort jedoch nie ein direkter Beweis der CDE erbracht. Stattdessen wurde für die RET-Endozytose in Gfr α 1-transfizierten SH-SY5Y Neuroblastomazellen eine Dynamin-2-Abhängigkeit bewiesen, die gleichermaßen aus *lipid rafts* gegeben ist. Als nächstes Indiz wurde die Abhängigkeit der Endozytose von der Kinaseaktivität des RET-Rezeptors angeführt. Gerade diese wird allerdings nach Paratcha *et al.*, 2001 nur für die Rekrutierung von RET in die *lipid rafts* über intrazelluläre, *raft*-lokalisierte Proteine wie FRS2 benötigt. Zuletzt galt die Kolokalisation eines ohnehin fragwürdigen, künstlichen RET-Konstrukts, nämlich der intrazellulären RET-Domäne, die durch eine N-Myristoylierung schwach mit der Plasmamembran verankert ist, mit Rab5a-positiven frühen Endosomen als Beweis einer CDE. Da darüber hinaus die Homodimerisierung dieses Konstrukts durch einen künstlichen Liganden anstatt über GDNF erfolgte, ist die Bedeutung der dort beobachteten RET-Lokalisation als kritisch im Hinblick auf den natürlichen Rezeptor zu betrachten. Eine Kolokalisation von RET mit Rab5 konnte im hier erstellten B104 Modellsystem nicht überprüft werden. Jedoch wird gerade für Rab5 vermutet, dass es den Transport zwischen frühen Endosomen und Caveosomen während der Caveolae-vermittelten Endozytose reguliert (Pelkmans *et al.*, 2004). Dazu wurde erst kürzlich festgestellt, dass Rab5 durch Caveolin-1, ein konstitutiv an Caveolae gebundenes Strukturprotein, reguliert und aktiviert wird (Hagiwara *et al.*, 2009). Auch für den NGF-Rezeptor TrkA wurde ursprünglich zwar eine Aktivierung innerhalb *lipid rafts*, aber eine anschließende CDE außerhalb dieser vermutet (Howe *et al.*, 2001; Heerssen *et al.*, 2004).

Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass der Primärmechanismus der TrkA-Aufnahme eine vollständig Clathrin-unabhängige Mischung aus Makropinozytose und rezeptorvermittelter Endozytose darstellt. Diese Makroendozytose genannte Internalisierung ist Neuron-spezifisch und benötigt die Rho-GTPase Rac, Dynamin-2 und das für diesen Mechanismus einzigartige Protein Pincher (Shao *et al.*, 2002). Während Endosomen mit EGFR schnell Rab5 gegen Rab7 ersetzen und EGFR lysosomal abgebaut werden, bleiben die Makroendosomen Rab5-positiv und können lang andauernde Signale zum Zellkern weiterleiten (Valdez *et al.*, 2007).

Dieser Mechanismus erscheint auch für RET möglich und es sollte überprüft werden, ob die festgestellte Dynamin-abhängige Endozytose von RET9 ebenfalls Pincher benötigt. Sowohl Pincher als auch Dynamin vermitteln ein retrogrades Signal von NGF, aber nur Pincher rekrutiert selektiv die für retrograde Signale spezifische Kinase pErk5 (Valdez *et al.*, 2005; Valdez *et al.*, 2007). Da weder für das Neuro-2a noch für das B104 Zellsystem pErk5 festgestellt werden konnte (nicht dargestellt), wird hier eine Pincher-unabhängige Endozytose aus Caveolae für RET9 angenommen.

Der Endozytoseweg eines Rezeptors bestimmt die Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signalkaskaden. Deren Zusammenspiel bestimmt wiederum die weitere Entwicklung der Zelle. Ein möglicher Mechanismus, durch den die Zelle unterscheiden kann, über welchen Weg ein Rezeptor aufgenommen und intrazellulär transportiert wird, wird über die Konzentration des Liganden bestimmt. So wird beispielsweise der EGF-Rezeptor (EGFR) Clathrin-abhängig internalisiert, wenn nur geringe Mengen EGF vorliegen. Hierüber wird das induzierte Signal verlängert, indem der Rezeptor verstärkt recyclet wird. Bei hoher EGF-Dosis hingegen wird der EGFR zusätzlich zur CDE Ubiquitin-abhängig und Clathrin-unabhängig aufgenommen und verstärkt abgebaut (Sigismund *et al.*, 2005; Sigismund *et al.*, 2008). Bei der Durchführung der Experimente zum Effekt der Endosulfatase Sulf1 wurde eine sehr geringe Menge GDNF eingesetzt, um einen möglichen Freisetzungseffekt durch die Sulfatase detektieren zu können (vgl. Abb. 4.42). Dabei waren beide Male eine verringerte Erk1/2-Aktivierung von 250 % auf 150 % der basalen Stimulation nach 10 min und ein entsprechender Anstieg für den 60-Minuten-Wert festzustellen. Wie die Zelle durch eine unterschiedliche Dynamik im Ras- und Rap1-vermittelten *Signaling* auf verschiedene Liganden-Konzentrationen und deren zeitliche Verfügbarkeit reagieren kann, wird gut von Sasagawa *et al.*, 2005 zusammengefasst (Sasagawa *et al.*, 2005). Möglicherweise wird auch für den GDNF/RET-Rezeptorkomplex durch die geringere GDNF-Konzentration und Signalstärke ein Umschalten des intrazellulären Signals in Richtung anhaltender Aktivierung determiniert. Hierdurch könnte sich auch erklären, warum zu viel GDNF zur Proliferation und somit zur Tumorbildung spermatogener Stammzellen anstatt zur Differenzierung und zu wenig GDNF nur zur Differenzierung bei gleichzeitiger Apoptose führt. Nur durch die passende Dosis GDNF entsteht ein ausgeglichenes

Verhältnis proliferierender, sich differenzierender Zellen (Meng *et al.*, 2000; Meng *et al.*, 2001).

Trotz vieler Fortschritte auf dem Forschungsgebiet des endosomalen *Signalings* sind die ihm zu Grunde liegenden Mechanismen noch immer unklar. Neurotrophe Wachstumsfaktoren müssen dazu in der Lage sein, ein Signal zur Proliferation oder Differenzierung Dynein-abhängig über sehr weite Distanzen vom distalen Axonende zum Zellkörper zu transportieren. Dort können Kinasen wie Erk1/2 in den Nukleus translozieren, um spezifische Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Es wird angenommen, dass solche retrograd transportierten Signale aus langlebigen, vor Abbau geschützten Signalendosomen heraus entstehen.

Die Zelle besitzt mehrere Möglichkeiten, ein Signal intrazellulär lenken zu können. Während des endosomalen Transports können die Rezeptoren dazu beispielsweise ubiquitiniert, dephosphoryliert oder von ihrem Liganden getrennt werden. Aber auch die Fähigkeit aktivierter RTK, selbst nach der Endozytose ein Signal zu initiieren besteht, da die aktivierten C-Termini noch immer in das Zytosol ragen und mit weiteren Signalproteinen interagieren können. Durch die PIP₃-reiche endosomale Membranzusammensetzung werden Adapterproteine mit Domänen wie dem FYVE Zinkfinger spezifisch zu frühen Endosomen rekrutiert. Eines dieser Proteine ist ProF, das die Akt-Kinase mit ihren Substraten in frühen Endosomen verknüpft und dadurch für ihre endosomale Aktivierung verantwortlich sein könnte (Fritzius *et al.*, 2006; Hayakawa *et al.*, 2006). Ein entsprechender mit einer EYFP-Markensequenz versehener Säugerexpressionsvektor wurde erstellt und könnte zum Einsatz kommen, sobald die RET-Lokalisation mikroskopisch besser zu verfolgen ist. Dies könnte für den RET-Klon B104 RET9 RS9.10 der Fall sein (s. o.). Es könnte vermutet werden, dass die Signalkaskaden, die zur Proliferation führen, aus frühen Endosomen und diejenigen, die die Differenzierung begünstigen, aus späten Endosomen heraus initiiert werden. Die transiente Aktivierung der MAP-Kinasen, die zur Zellproliferation benötigt zu werden scheint, könnte nach dieser Theorie nur während der kurzen Verweilzeit des Rezeptors in frühen Endosomen erfolgen. Dieser Mechanismus würde als guter Schutz zur Vermeidung onkogener Proliferation dienen (Richardson *et al.*, 2006). Das Gerüstprotein MP1 und das Adapterprotein p14 kommen zusammen an spät-endosomalen Membranen vor und werden nur dort durch das Adapterprotein p18 zum Komplex verbunden (Teis *et al.*, 2002). Dieser ist

in der Lage, Mek1 und Erk1/2 zu binden, wodurch eine anhaltende Aktivierung von Erk1/2 stattfinden kann (Cox *et al.*, 2008).

Zur Untersuchung eines möglichen endosomalen *Signalings* über GDNF-stimulierte RET9-Rezeptoren wurden mehrere Methoden angewandt.

Zunächst wurde versucht, durch Behandlung von B104 RET9 Zellen mit Chloroquin die endosomale Reifung zu blockieren. Chloroquin erhöht den endosomalen pH-Wert und kann dadurch in geringer Konzentration die Reifung früher zu später Endosomen und in höherer Konzentration sogar den lysosomalen Abbau verhindern. Da Uneinigkeit herrscht, ob Chloroquin darüber hinaus bereits die Rezeptoraufnahme verhindern kann (vgl. 1.4.2), wurde seine Funktion über die Aufnahme von Transferrin-Rezeptoren überprüft. Dabei konnte der intrazelluläre Transport größtenteils bereits auf Höhe früher endosomaler Vesikel gehemmt werden (vgl. Abb. 4.40). Daher wird für Chloroquin von einer spezifischen Inhibition der endosomalen Reifung anstatt der Endozytose im B104 Neuroblastoma-Zellsystem ausgegangen.

B104 RET9 Zellen wurden mit Chloroquin vorinkubiert und anschließend nach Standardprotokoll (3.2.14) mit GDNF stimuliert. Die Behandlung mit Chloroquin führte zu einem fast vollständigen Verlust der Adhärenz, der durch PLL/Laminin-Beschichtung einigermaßen verringert werden konnte. Auch hier wurden die abgelösten Zellen am Ende pelletiert und die Proteinextrakte mit denen der noch adhärennten Zellen vereinigt (s. o.). In den nachfolgenden Immunblots verlief das Erk1/2-Signal für Zellen mit und ohne Chloroquinbehandlung bis 10 min nach Stimulationsbeginn exakt gleich. Für Akt war es mit Chloroquin leicht vermindert (vgl. Abbn. 4.35, 4.37). Anschließend stiegen das Erk1/2- und das Akt-Signal für die Chloroquin-behandelten Zellen mit unterschiedlicher Stärke weiter an. Die unbehandelten Zellen zeigten den normalen Verlauf. Der Anstieg der Signalstärke für pAkt kann als vergleichbar zu pErk1/2 gewertet werden. Er fällt grafisch nur nicht so stark wie für pErk aus, da die Signale durch den verwendeten Antikörper generell sehr schwach waren und der relative Anteil zum unstimulierten Nullminutenwert damit densitometrisch viel geringer ausfällt. Der relativ hohe Schwankungsbereich könnte dadurch zustande kommen, dass das sensible endosomale Transportsystem eventuell an unterschiedlichen Stellen und nicht immer genau an dem Punkt, an dem das endosomale Signal entsteht, unterbrochen wurde. Der Abbau von RET ist der Hauptmechanismus für die Termination eines RET-vermittelten Signals in sympathischen Neuronen. Chloroquin sollte also keinen Effekt auf die RET51-Isoform

haben, die hauptsächlich über das Proteasom abgebaut wird, während der Abbau von RET9 im Lysosom durch Chloroquin verhindert wird. Nach Taub *et al.*, 2007 beginnt endosomales Erk1/2-Signaling nach dem ersten Stimulationsmaximum nach 10 min (Taub *et al.*, 2007). Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis sowohl auf ein endosomales Erk1/2- als auch auf ein endosomales Akt-Signal für internalisierte GDNF/Gfr α 1/RET9-Rezeptorkomplexe. Diese Signale nehmen normalerweise langsam durch lysosomalen Abbau des Rezeptors ab. Chloroquin verhindert dies, wodurch die Signale weiterhin aktiv verstärkt werden. Unklar bleibt, ob das Signal aus frühen oder späten Endosomen erfolgt, da Chloroquin in sehr hoher Konzentration eingesetzt wurde, bei der es alle endosomalen Reifungsschritte verhindern sollte. Die mikroskopische Betrachtung fluoreszenzmarkierten Transferrins und der frühe Beginn des Signalanstiegs deuten auf frühe endosomale Signale hin.

Einerseits wird postuliert, dass Signale in Endosomen, aber auch an der Plasmamembran entstehen können. Andererseits wird vermutet, dass eine Rezeptorendozytose zwingend notwendig ist und die Signale lediglich an endosomalen Membranen generiert werden können (Sorkin und von Zastrow, 2009). Die EGF-Stimulation von Säugerzellen, deren rezeptorvermittelte Endozytose durch die Dynamin-2 Mutante K44A blockiert wurde, führte zu einem Anstieg der Zellproliferation und einer verstärkten Phosphorylierung von PLC γ und Shc. Der endosomale Transport hingegen wurde für die vollständige Aktivierung des EGF-Rezeptors, einer regulatorischen Untereinheit der PI-3-Kinase und der MAP-Kinasen Erk1/2 benötigt (Vieira *et al.*, 1996). Einzelne Signal- und Adapterproteine können somit zwar an der Plasmamembran aktiviert werden, jedoch ist die vollständige Internalisierung des Rezeptors notwendig, um wesentliche Zielfaktoren der Signalkette ebenfalls zu aktivieren.

In der RET-vermittelten Signaltransduktion wurden bisher gegensätzliche Daten dazu erhalten, ob die Endozytose und ein retrograder Transport für eine Aktivierung von Erk1/2 oder Akt essenziell sind. In humanen Gfr α 1-transfizierten SH-SY5Y Neuroblastomazellen wird die Endozytose nur für die Aktivierung von Erk1/2 benötigt. Akt kann zwar an der Plasmamembran aktiviert werden, findet sich jedoch nicht nach retrogradem Transport im Zellkern wieder (Richardson *et al.*, 2006). In sympathischen Neuronen wurde hingegen der retrograde Transport von RET und

Gfr α 1 und die intrazellulär stattfindende Phosphorylierung von Akt, aber nicht von Erk1/2 festgestellt (Coulpier und Ibanez, 2004).

Um zu bestimmen, ob die über Chloroquin festgestellten endosomalen Signale intrazellulär generiert werden müssen oder ob diese auch an der Plasmamembran entstehen können, wurde der Endozytose-Inhibitor Dynasore eingesetzt. Dynasore wirkt wie Dynamin-2 K44A, indem es die Abschnürung unfertiger Vesikel Dynamin-abhängiger Endozytosewege von der Plasmamembran inhibiert. Auch für Dynasore konnte diese Funktion über die erfolgreiche Inhibition der Transferrinaufnahme mikroskopisch in B104 Zellen bestätigt werden (vgl. Abb. 4.40).

B104 RET9 Zellen wurden, wie bereits für Chloroquin beschrieben, mit Dynasore vorinkubiert (s. o.). Die Erk1/2- und Akt-Stimulationsniveaus wurden mit und ohne Dynasore miteinander verglichen. Die Behandlung mit 40 μ M Dynasore führte zu einer starken Reduktion des Erk-Signals und einer fast vollständigen Inhibition der Akt-Aktivierung (vgl. Abbn. 4.35, 4.37). Anhand dieser Ergebnisse wäre für das Akt-Signal bereits die Notwendigkeit der vollständigen Endozytose belegt. Das Erk1/2-Signal hätte jedoch weiterhin an der Plasmamembran entstehen können. Durch den Einsatz der doppelten Dynasorekonzentration konnte eine Konzentrations-Abhängigkeit der Endozytose-Inhibition nachgewiesen und die Erk1/2-Aktivierung vollständig verhindert werden. Interessanterweise wird durch Dynasore bereits das Aktivierungsniveau der basalen Erk1/2-Stimulation gesenkt (vgl. Abb. 4.39). Der Endozytosemechanismus scheint also bereits für Prozesse benötigt zu werden, durch den die Zelle ein bestimmtes basales Erk1/2-Stimulationsniveau und damit verbundene Zellfunktionen aufrechterhält. Hierbei könnte es sich um ein Signal aus Recycling-Endosomen mit aktivierten RET-Rezeptoren handeln, jedoch sind auch andere Rezeptoren oder beteiligte Wachstumsfaktoren möglich. Auf die basale Akt-Stimulation nimmt Dynasore keinen Einfluss.

Für das hier vorliegende neuronale B104 Modellsystem konnte bewiesen werden, dass die Dynamin-abhängige Endozytose zwingend notwendig ist, um die am GDNF-Signalweg beteiligten Kinasen Erk1/2 und Akt zu phosphorylieren. Für Erk1/2 ist dieses Ergebnis nicht erstaunlich, da sowohl die Erk-aktivierenden Mek-Kinasen und Erk1/2 selber keine Membran-bindenden Domänen besitzen (Schaeffer *et al.*, 1998; Tanoue *et al.*, 2000). Die PI-3-Kinase und Akt werden dagegen in der Regel an der Plasmamembran aktiviert. Für 7-Transmembranhelix-Rezeptoren wurde alternativ

dazu eine Phosphorylierung der endosomalen PI3-Kinase-Isoform PI-3-Ky an Rab11-positiven Recycling-Endosomen beobachtet, die letztlich zur Aktivierung von Akt aus endosomalem Pools führt (vgl. Abb. 5.1a; (Garcia-Regalado *et al.*, 2008)). Für RET51 wurde das Recycling über Rab11-positive Endosomen über Kolokalisations-Bestimmungen bereits nachgewiesen. Es lässt sich daher vermuten, dass RET9 auch über diesen Transport konstitutiv recyclet wird. Bemerkenswert ist ebenfalls, dass bereits für den Proliferations-fördernden Effekt von GDNF, der nicht über die anhaltende Aktivierung der endosomalen GTPase Rap1 verlaufen zu scheint, ein intrazelluläres Signal generiert wird.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der aktivierte Rezeptor bis zum Zellkern transportiert wird und auf seinem Transportweg die nötigen Signalkaskaden aktiviert. Sie sind ein weiterer Beweis gegen das sogenannte Dominomodell, nach dem das axonale Signal an der Plasmamembran aktiviert und nur durch eine Reihe Liganden-unabhängiger Phosphorylierungs-Reaktionen zum Soma transportiert wird (Senger und Campenot, 1997). Durch den Einsatz kompartmentierter Campenot-Kammern können Unterschiede in der direkten Stimulation der Zellkörper oder distaler Axonenden betrachtet werden (Campenot und MacInnis, 2004). Auf diese Weise kann festgestellt werden, ob der an den Axonen endozytierte aktive RET-Signalkomplex nur lokale Effekte ausübt oder dafür auch tatsächlich retrograd zum Zellkörper transportiert wird.

Aus den Ergebnissen der Experimente zur Inhibition der Endozytose des RET9-Rezeptors im hier generierten B104 Zellmodellssystem kann weiterhin vermutet werden, dass die GDNF-vermittelte transiente Aktivierung von Erk1/2 über die GTPase H-Ras erfolgt. Im Gegensatz zu anderen Ras-Proteinen sind die Internalisierung und das endozytotische Recycling des Rezeptorkomplexes für die spezifische Raf/Mek/Erk1/2 Signalkaskade über H-Ras zwingend notwendig (Roy *et al.*, 2002). Auch zeigte sich, dass H-Ras über seinen palmitoylierten C-Terminus spezifisch mit Rab11-positiven Recycling-Endosomen interagiert, um eine Kompartimentierung des Ras-Signalings zu erreichen (Gomez und Daniotti, 2005). Es wurde postuliert, dass Signale über H-Ras kein Neuritenwachstum induzieren können (Sun *et al.*, 2006), was im Einklang mit der hier beobachteten proliferativen Zellantwort steht. Für RET51 wurde eine starke Kolokalisation mit Rab11-Recycling-Endosomen detektiert (vgl. 5.1.2.1). Es ist daher denkbar, dass auch RET51

endosomale Signale über H-Ras generieren kann. Es bleibt jedoch zu überprüfen, ob aktiviertes RET51 zur Aktivierung GDNF-spezifischer Signalkinasen ebenfalls zwingend endozytiert werden muss oder ob sich die Isoformen hierin unterscheiden. In Neuro-2a Zellen, die endogen beide Isoformen des RET-Rezeptors exprimieren, konnte keine vergleichbare Inhibition der Erk1/2- und Akt-Signale durch Dynasore und M β CD nachgewiesen werden (Strunk, 2010). Sollte die RET51-Isoform anders als RET9 internalisiert werden und dadurch keine intrazellulären Signale generieren können, würden sich eventuelle Unterschiede in den simultan RET9 und RET51 exprimierenden Zellen möglicherweise nicht bemerkbar machen. Die Unterschiede in den biochemischen Reaktionen einzelner Zelllinien neuronaler Herkunft wurden bereits zuvor diskutiert und könnten hier natürlich ebenfalls über unbekannte Faktoren die Zellantworten beeinflussen.

Mit den B104 Neuroblastomazellen wurde eine neuronale Zelllinie identifiziert, in der Endosomen eine Rolle in GDNF-abhängigen Signaltransportprozessen spielen. Durch die eventuelle Abwesenheit essenzieller Adapter- und Gerüstproteine kann vielleicht sogar die Wichtigkeit dieser Proteine für molekulare Schaltermechanismen zukünftig in den Vordergrund gerückt werden. Eine zusammenfassende Darstellung der hier postulierten unterschiedlichen Endozytosemechanismen und Signalwege der beiden RET-Isoformen RET9 und RET51 ist nachfolgend abgebildet (Abb. 5.1).

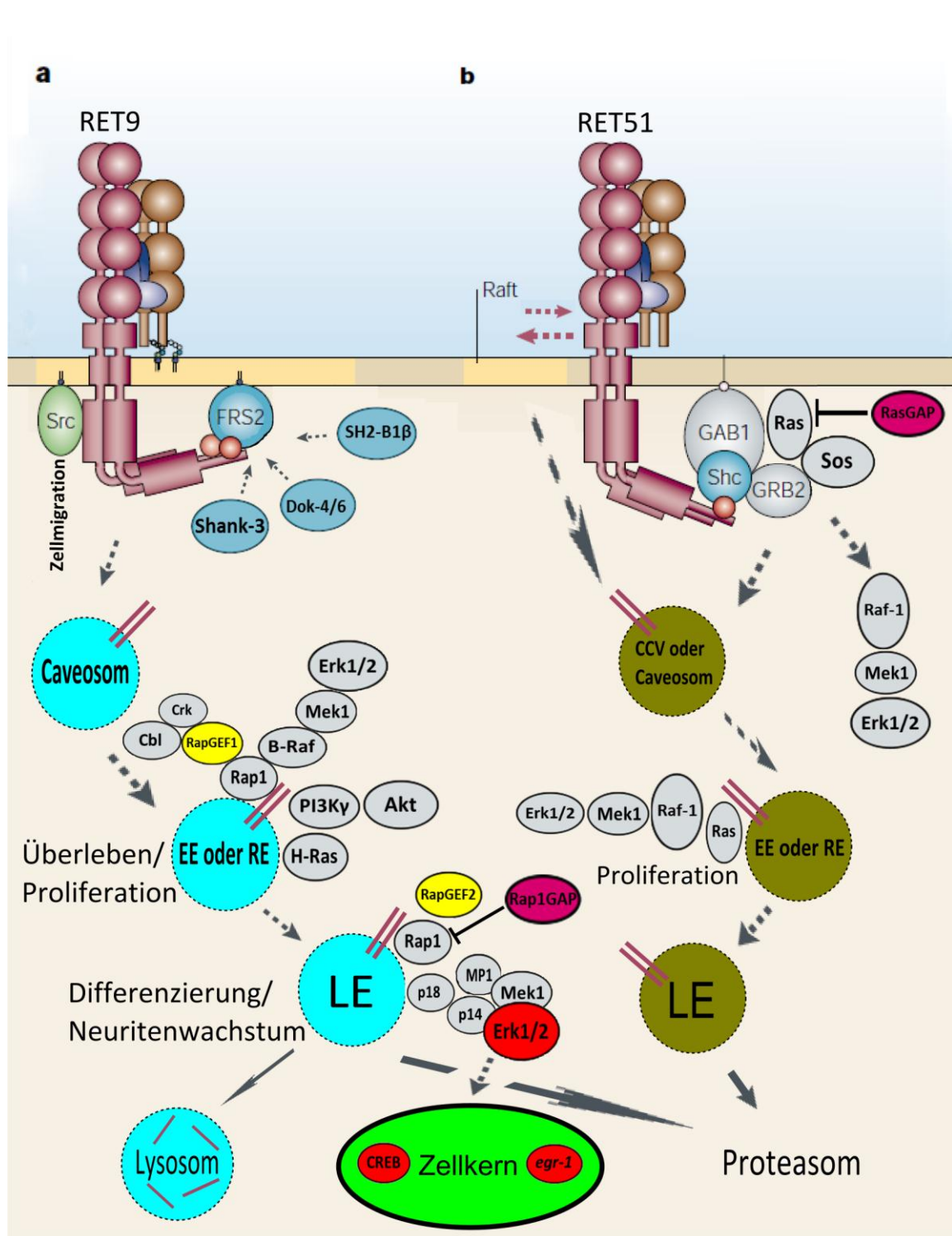


Abb. 5.1: Modell der unterschiedlichen Endozytose- und Signalwege von RET9 und RET51

In dem hier vorgeschlagenen Interaktionsmodell der RET-Isoformen RET9 (a) und RET51 (b) wird RET9 über GPI-verankerte Gfr α -Korezeptoren oder das Adapterprotein FRS2 in *lipid rafts* rekrutiert und über Caveolae in Caveosomen internalisiert. RET51 bindet bevorzugt das Adapterprotein Shc statt des *raft*-lokalisierten FRS2 und ist im Gleichgewicht innerhalb und außerhalb der *raft*-Domänen vorhanden. Der Endozytoseweg kann daher sowohl über Caveosomen als auch Clathrin-abhängig über CCV erfolgen. RET9 aktiviert Erk1/2, Akt und Src, RET51 hauptsächlich Erk1/2, wobei noch unklar ist, ob diese Aktivierung über RET51 an der Plasmamembran oder aus Endosomen erfolgt. Ausgefüllte Pfeile skizzieren bereits im Zusammenhang mit RET nachgewiesene Mechanismen, unterbrochene Pfeile postulierte Reifungen und Interaktionen. In Blau sind direkte Bindungspartner von RET, in Rot Transkriptionsfaktoren, in Violett inhibierende GAP, in Gelb aktivierende GEF und in Grau weitere Gerüst- und Signalproteine dargestellt. CCV: Clathrin-ummantelte Vesikel, EE: frühe Endosomen, LE: späte Endosomen, RE: Recycling-Endosomen. Modifiziert nach (Airaksinen und Saarma, 2002).

5.4 HEPARANSULFAT-EINFLUSS AUF DIE RET-VERMITTELTE SIGNALGEBUNG

Die extrazelluläre Matrix eukaryotischer Zellsysteme besteht größtenteils aus untereinander vernetzten Polysacchariden, den Glykosaminoglykanen. Diese sind aus repetitiven Disaccharideinheiten aus einer Uronsäure und einem Glukosamin oder Galaktosamin aufgebaut. Eine dieser negativ geladenen Disaccharidseitenketten stellt das Heparansulfat (HS) dar, das während der Biosynthese an den N-, 2-O-, 3-O- und 6-O-Positionen sulfatiert werden kann. Durch eine nicht immer vollständige, variable Sulfatierung, die die Ketten in Domänen unterschiedlicher Sulfatierung gliedert, besitzen Heparansulfate mehrere unterschiedliche Bindungsstellen, durch die sie in der Lage sind, Komponenten vieler Signalkomplexe miteinander zu verknüpfen. Für die Aktivierung mancher Signalwege ist die Bindung an spezifische Sulfatreste der Heparansulfate essenziell, da erst dadurch einige Liganden mit ihren Rezeptoren an der Zelloberfläche miteinander in Kontakt treten können. Ein Beispiel hierfür ist die Bildung eines ternären Komplexes aus Heparansulfat, dem Wachstumsfaktor FGF2 und seiner Rezeptor-Tyrosinkinase FGFR (Krufka *et al.*, 1996). Andere Wachstumsfaktoren, darunter auch GDNF, werden auf unterschiedliche Weise durch Heparansulfat beeinflusst. Zum einen wird die HS-Bindungsfähigkeit von GDNF dazu benötigt, um ein RET- und Gfr α -unabhängiges Signal über den erst kürzlich entdeckten Proteoglykan-Transmembranrezeptor Syndecan-3 weiterzuleiten. Es wird angenommen, dass GDNF eine duale Rolle einnimmt, in der es in freier Form mit den kanonischen Rezeptoren RET und NCAM interagiert und Matrix-gebunden Signale über Syndecan-3 initiiert. Syndecan-3 besitzt mehrere Heparansulfate als Seitenketten, über die GDNF hochaffin an den Transmembranrezeptor gebunden und auch selektiv durch Abspaltung freigesetzt werden kann (Bespalov *et al.*, 2011). Diese Bindung an Oberflächen-HS ist wichtig für das GDNF-vermittelte Signal über Gfr α 1 und RET (Barnett *et al.*, 2002; Parkash *et al.*, 2008). Freies GDNF könnte hierdurch lokal gebunden, konzentriert und anderen Zellen verfügbar gemacht werden. So wird zum Beispiel GDNF von sogenannten Sertoli-Zellen zur Aufrechterhaltung und Reproduktion spermatogener Stammzellen produziert und parakrin sekretiert. Während der Sekretion wird es an der Matrix gebunden und konzentriert (Langsdorf *et al.*, 2011). Die eigentliche Stimulation kann jedoch erst erfolgen, nachdem GDNF in der Nähe der Zielzellen von der Matrix abgespalten und dadurch bioverfügbar gemacht wird. Die Endosulfatasen Sulf1 und Sulf2 sind die wichtigsten Regulatoren der 6-O-Desulfatierung von Heparansulfat. Sie sorgen damit für eine verminderte

Bindung von GDNF an die extrazelluläre Matrix und eine lokale Bioverfügbarkeit des Wachstumsfaktors. Dadurch können das GDNF-Signal und das GDNF-induzierte Neuritenwachstum auf kanonischem Weg verstärkt werden. Hierbei scheint Sulf1 im Wesentlichen von den zu innervierenden Zielzellen zusammen mit GDNF und Sulf2 von den innervierenden Neuronen sezerniert zu werden (Ai *et al.*, 2007). Neben dem Sulfatierungsgrad soll auch die spezifische Glykosaminoglykan-Sequenz zur Signalmodulation ausschlaggebend sein (Pan *et al.*, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Sulf1 und damit der 6-O-Sulfatierung von Oberflächen-HS auf die GDNF-aktivierten MAP-Kinasen Erk1/2 untersucht. Hierzu wurde Sulf1 Δ HDC, eine Mutante von Sulf1, verwendet, die eine 158 AS große Deletion der sonst aus 319 AS bestehenden, stark geladenen hydrophilen Domäne besitzt. Diese Mutante der sonst an die Heparansulfatketten gebundenen Endosulfatase wird in größerem Umfang als das vollständige Enzym sezerniert, besitzt aber vollständige enzymatische Aktivität. Eine Reduktion des FGF2-Signalings durch diese Enzymvariante konnte in Sulf1/2-defizienten Fibroblasten bereits gezeigt werden (Frese *et al.*, 2009).

Vorexperimente ergaben, dass die starke Salzkonzentration des bei der Aufreinigung verwendeten Elutionspuffers für das Sulf1 Δ HDC-Enzym die Erk1/2-Aktivierung durch GDNF verhindert (Kooperation mit Fabian Milz, Daten nicht gezeigt). Durch eine Umpufferung in DMEM-Basalmedium konnte dieses Problem gelöst werden. Die relative Erk1/2-Aktivierung durch GDNF konnte durch eine vorherige Zellinkubation mit Sulf1 Δ HDC um durchschnittlich fast 60 % gesteigert werden (vgl. Abbn. 4.41, 4.42). Hierzu wurde eine geringe GDNF-Konzentration eingesetzt, um einen eventuell verstärkenden Effekt überhaupt detektieren zu können. Beachtlich ist hierbei besonders die Steigerung der Aktivität bereits vor Beginn der Stimulation. Diese deutet auf einen Freisetzungseffekt der Endosulfatase Sulf1 für GDNF oder andere Erk1/2-aktivierende Wachstumsfaktoren hin, die zuvor an Heparansulfat gebunden waren und nun für eine Verstärkung einer Rezeptoraktivierung zur Verfügung stünden. Die RET-Aktivierung durch GDNF ist mit einem Maximum bei 50 ng/mL konzentrationsabhängig (Lee *et al.*, 2006). Zusammen mit den Daten aus Abb. 4.42a kann auch auf eine GDNF-Konzentrationsabhängigkeit der Erk1/2-Aktivierung geschlossen werden. Diese Theorie steht im Einklang mit dem hier bereits zuvor vorgeschlagenen möglichen Schaltermechanismus für verschiedene Zellantworten durch unterschiedliche GDNF-Konzentrationen (vgl. 5.3). Die durch Sulf1 Δ HDC

ausgelöste Signalverstärkung nahm nach einer Stunde etwas ab. Zurückzuführen ist dieser Effekt wohl darauf, dass der Stimulationswert der unbehandelten Probe zu diesem Zeitpunkt, wie zuvor diskutiert, ungewöhnlich hoch ist und dadurch die Differenz kleiner ausfällt.

An der GDNF-HS-Bindung sind 2-O-, 6-O- und N-Sulfatgruppen beteiligt. Einerseits wird vermutet, dass die 2-O-Sulfatierung zwingend für die Interaktion vorhanden sein muss (Rickard *et al.*, 2003; Rider, 2003). Andererseits wurde gezeigt, dass die 2-O-Sulfatgruppen zwar wichtig, aber nicht essenziell für die Bindung sind (Davies *et al.*, 2003) und die 6-O- und die N-Sulfatierung ebenfalls entscheidend sind (Bespalov *et al.*, 2011). Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die 6-O-Sulfatierung sehr wichtig für die Bindung von GDNF an Oberflächen-HS ist und dass Sulf1 in vitalen neuronalen Zellen bereits in Form der löslichen Mutante Sulf1 Δ HDC einen Freisetzungseffekt auslösen kann.

Lösliche aktive Sulfatasen wie das Sulf1 Δ HDC könnten zukünftig auch als Medikament zum Einsatz kommen, um die Bioverfügbarkeit von GDNF bei Krankheiten, die mit dem RET-Rezeptor in Verbindung stehen (1.3.1.3) zu erhöhen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die von den neuroprotektiven Gliazellen sezernierten neurotrophen Wachstumsfaktoren GDNF und Neurturin (NRTN) gehören beide der GDNF-Ligandenfamilie (GFL) an. Diese stellt neben den Neurotrophen, deren bekanntestes Mitglied der Nervenwachstumsfaktor (NGF) ist, eine der wichtigsten Klassen mitogener und neuritogener Wachstumsfaktoren für eine Vielzahl von Neuronenpopulationen dar. Im Gegensatz zu nicht-neuronalen Wachstumsfaktoren müssen die neuronalen Vertreter in der Lage sein, Signale von den entfernten Axon-Enden schnell zum Zellkörper zu transportieren, um die Gentranskription im Zellkern zu regulieren. Für NGF ist bereits bekannt, dass diese Fähigkeit über einen retrograd transportierten Signalkomplex des endozytierten aktivierten NGF-Rezeptors TrkA erfolgt. Für den GFL-Rezeptor RET sind sowohl der Endozytosemechanismus als auch der retrograde Signaltransport noch weitestgehend unklar. Weiterhin scheint es vom verwendeten Zelltyp abzuhängen, ob die über den RET-Rezeptor aktivierten Kinasen Erk1/2 und die PI-3-Kinase-abhängige Akt-Kinase direkt an der Plasmamembran oder erst nach erfolgter Endozytose aus Signalendosomen heraus phosphoryliert werden. Ziel dieser Arbeit war demnach, die Fragen zu beantworten, ob RET wie TrkA in der Lage ist, Signale aus Endosomen zu generieren, welche Kinasen beteiligt sind und ob eine Zelllinie zur Untersuchung dieser Prozesse gefunden werden kann. Daher wurden sieben verschiedene neuronale Zelllinien auf die Expression von Rezeptor-Komponenten und die Aktivierung von Proteinkinasen der RET-Signaltransduktion überprüft. Ferner wurden Methoden und hierfür benötigte molekulare Werkzeuge entwickelt, die eine Analyse von Überlebens-, Proliferations- und Neuritenwachstumsfördernden Effekten von GDNF und NRTN in diesen Zelllinien ermöglichen. Dadurch gelang die Etablierung verschiedener Neuroblastoma-Modellsysteme, die zur Grundlagenforschung von Signalprozessen primärer Neuronen herangezogen werden können. Speziell die murine Zelllinie NS20Y exprimiert RET und den GDNF-Korezeptor Gfr α 1 endogen und zeigt signifikantes Überleben und Neuritenwachstum nach GDNF-Stimulation. Zur Betrachtung der Signalunterschiede von GDNF über den Korezeptor Gfr α 1 und von NRTN über Gfr α 2 wurden stabil transfizierte, ausschließlich den jeweiligen

Korezeptor überexprimierende Klone der endogen RET exprimierenden murinen Zelllinie Neuro-2a erstellt. GDNF stellte sich als mitogener und neuritogener Wachstumsfaktor und NRTN als erheblich stärkerer neuritogener Faktor ohne Einfluss auf das Überleben heraus. Dieses kann auf die fehlende Akt-Aktivierung von NRTN im Vergleich zu GDNF zurückzuführen sein. Aufgrund der äquivalenten Erk1/2-Phosphorylierung beider Faktoren ist das stärkere neuritogene Signal durch NRTN vermutlich auf weitere Faktoren als die Aktivierung der MAP-Kinasen zurückzuführen. Die Steuerung zwischen Überleben oder Proliferation und Differenzierung als mögliche, GDNF-induzierte Zellantworten könnte durch unterschiedliche Expression und Lokalisation der kurzen RET9- und der langen RET51-Isoform erfolgen. B104 Ratten-Neuroblastomazellen wurden stabil mit der jeweiligen RET-Isoform transfiziert. Diese wurden als fluoreszenzmarkierte Fusionsproteine exprimiert und ihre Lokalisation wurde über konfokale Mikroskopie hauptsächlich in intrazellulären Vesikeln festgestellt, die als Recycling-Endosomen unterschiedlicher Stadien identifiziert werden konnten. Das Signalmuster der durch GDNF aktivierten Kinasen in B104 Zellen über RET9 unterscheidet sich von dem über RET51 durch ein stärkeres und länger anhaltendes Signal für Erk1/2 und Akt und lässt eine andere Membrandomänen-Lokalisation der beiden Isoformen vermuten. Für RET9 deuten die Daten auf eine Clathrin-unabhängige Endozytose aus Cholesterol-reichen *lipid raft*-Domänen hin. Weiterhin wurden Hinweise gefunden, dass Erk1/2 und Akt erst nach erfolgter Endozytose von RET9 in B104 Zellen aus Signalendosomen aktiviert werden. Zum einen konnten durch eine fast vollständige Endozytose-Inhibition durch das Enzym Dynasore die Aktivierung von Erk1/2 und Akt annähernd komplett verhindert werden. Zum anderen zeigte die Inhibition der Reifung endosomaler Vesikel durch Chloroquin stark ansteigende, möglicherweise aus Endosomen generierte Signale. Die in Neuro-2a Gfr α 1 Zellen festgestellte Steigerung des Neuritenwachstums durch GDNF konnte in B104 RET9 Zellen nicht bestätigt werden. Es wird vermutet, dass das unterschiedliche Expressionsmuster von Adapterproteinen für die Zelllinien-spezifischen Zellantworten verantwortlich ist. In einem Kooperationsprojekt konnte das B104 Modellsystem bereits erfolgreich angewendet werden, um einen Signal-verstärkenden Freisetzungseffekt durch die Abspaltung gebundener Wachstumsfaktoren von den Heparansulfat-Proteoglykanen der extrazellulären Matrix mittels einer löslichen Enzymvariante der Endosulfatase Sulf1 in neuronalen Zellen nachzuweisen.

7 SUMMARY

The secreted neurotrophic factors glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its closest relative Neurturin (NRTN) are both members of the GDNF family of ligands (GFL). Like the neurotrophins, among which NGF is the most prominent representative, they account for one of the most important classes of mitogenic and neurotogenic growth factors for a wide variety of neuron populations. In contrast to non-neuronal growth factors, neurotrophic factors must provide the ability of transporting long-range signals quickly from the distal axons to the soma in order to regulate gene transcription in the nucleus. It has already been documented for NGF that this requirement is met by using a retrogradely transported signaling complex of the activated NGF-receptor TrkA. For the GFL-receptor RET, both, the endocytotic mechanism and the nature of its retrograde signal transport remain to be determined. Furthermore it seems to depend on the cell type, whether the kinases Erk1/2 and the PI-3-K-dependent Akt-kinase, which are known to be associated with RET-signaling, become directly phosphorylated at the plasma membrane or only after having been internalized into signaling endosomes. Thus, the core of this work is the question, whether RET is able to generate signals from endosomes just like TrkA. It was the aim to discover which kinases are involved and whether a cell line could be found to study these processes. Therefore, seven different neuronal cell lines have been analyzed for the expression of involved receptor components and the activation of protein kinases relevant for RET signal transduction. In addition, methods and adequate molecular tools that were needed to allow a proper analysis of proliferative, survival- and neurite growth-promoting effects of GDNF and NRTN in these cell lines have been established. By these means it was possible to create several different neuroblastoma model systems that can be used for fundamental studies of signaling processes in primary neurons. Particularly, murine NS20Y cells have been shown to express RET as well as the GDNF-coreceptor Gfr α 1 endogenously, exhibiting significant survival and neurite growth after GDNF-stimulation. In order to be able to examine the differences in RET-mediated signals of GDNF through Gfr α 1 and of NRTN through Gfr α 2, stably transfected clones of the murine neuroblastoma cell line Neuro-2a were generated. These clones showed the characteristic of overexpressing the relevant

coreceptors exclusively. GDNF was found to be a potent mitogenic and neurotogenic factor, whereas NRTN, while causing an even stronger neurite growth than GDNF, had no effect on cell survival. The GDNF-specific cell survival is probably caused by its activation of the Akt-kinase, which is missing for the NRTN-mediated pathway. Due to the equivalent phosphorylation of Erk1/2 for both GFL, it can be assumed that the strong neurotogenic effect for NRTN is ultimately caused by some other pathway than the activation of MAP-kinases. The regulation between survival or proliferation and differentiation as possible GDNF-induced cell responses could be internally controlled by a different expression and localization of the short receptor isoform RET9 and the longer isoform RET51. B104 rat neuroblastoma cells were stably transfected with the corresponding isoforms. These were designed to be expressed as fluorescing fusion proteins and their cellular distribution was analyzed by confocal microscopy. They were found to be mainly in recycling endosomes of different phases. The signal pattern of the GDNF-activated kinases in B104 cells through RET9 differs from the one through RET51 by stronger and longer attenuated signals and points toward the assumption that the isoforms are located in distinctive domains of the membrane. RET9 seems to be internalized from cholesterol-rich lipid raft domains via a Clathrin-independent mechanism. Moreover, hints were found that the Erk1/2- and Akt-kinases cannot be activated in B104 cells before the endocytosis of RET9 has been completed. On the one hand, the activation of Erk1/2 and Akt was almost completely abolished after the endocytosis has been inhibited to a great extent by the enzymatic Dynasore. On the other hand, a strong signal increase was observed after the inhibition of endocytotic vesicle maturation by Chloroquin. This increase could possibly be generated from prolonged endosomal retention time.

The previously detected GDNF-induced increase of neurite growth in Neuro-2a Gfr α 1 cells was irreproducible in B104 RET9 cells. It can be speculated that a different expression pattern of adaptor proteins might be responsible for the specificity of cell line responses.

The B104 neuronal model system has already been successfully implemented in the context of a cooperative project in order to substantiate a signal-enhancing release effect through cleavage of heparan sulfate-bound growth factors from the extracellular matrix. This was achieved by use of a soluble enzyme variant of the endosulfatase Sulf1.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aggeli, I. K., *et al.* (2001). "Activation of multiple MAPK pathways (ERKs, JNKs, p38-MAPK) by diverse stimuli in the amphibian heart." Mol Cell Biochem **221**(1-2): 63-69.
- Aguilar, R. C. und B. Wendland (2003). "Ubiquitin: not just for proteasomes anymore." Curr Opin Cell Biol **15**(2): 184-190.
- Ahmed, N. N., *et al.* (1997). "Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3627-3632.
- Ai, X., *et al.* (2006). "Substrate specificity and domain functions of extracellular heparan sulfate 6-O-endosulfatases, QSulf1 and QSulf2." J Biol Chem **281**(8): 4969-4976.
- Ai, X., *et al.* (2003). "QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling." J Cell Biol **162**(2): 341-351.
- Ai, X., *et al.* (2007). "SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation." Development **134**(18): 3327-3338.
- Airaksinen, M. S. und M. Saarma (2002). "The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value." Nat Rev Neurosci **3**(5): 383-394.
- Airaksinen, M. S., *et al.* (1999). "GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?" Mol Cell Neurosci **13**(5): 313-325.
- Alessi, D. R., *et al.* (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." EMBO J **15**(23): 6541-6551.
- Alessi, D. R., *et al.* (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." Curr Biol **7**(4): 261-269.
- Amano, T., *et al.* (1974). "High activity of choline acetyltransferase induced in neuroblastoma x glia hybrid cells." Exp Cell Res **85**(2): 399-408.
- Amano, T., *et al.* (1972). "Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites)." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(1): 258-263.
- Anders, J., *et al.* (2001). "Molecular modeling of the extracellular domain of the RET receptor tyrosine kinase reveals multiple cadherin-like domains and a calcium-binding site." J Biol Chem **276**(38): 35808-35817.
- Andjelkovic, M., *et al.* (1997). "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B." J Biol Chem **272**(50): 31515-31524.
- Andres, R., *et al.* (2001). "Multiple effects of artemin on sympathetic neurone generation, survival and growth." Development **128**(19): 3685-3695.
- Arai, A., *et al.* (1999). "CrkL activates integrin-mediated hematopoietic cell adhesion through the guanine nucleotide exchange factor C3G." Blood **93**(11): 3713-3722.
- Araque, A. und M. Navarrete (2010). "Glial cells in neuronal network function." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **365**(1551): 2375-2381.
- Arenas, E., *et al.* (1995). "GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo." Neuron **15**(6): 1465-1473.
- Arighi, E., *et al.* (1997). "Identification of Shc docking site on Ret tyrosine kinase." Oncogene **14**(7): 773-782.
- Asai, N., *et al.* (1995). "Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations." Mol Cell Biol **15**(3): 1613-1619.
- Attie, T., *et al.* (1994). "[Identification of mutation of RET proto-oncogene in Hirschsprung disease]." C R Seances Soc Biol Fil **188**(5-6): 499-504.
- Avantaggiato, V., *et al.* (1994). "Developmental expression of the RET protooncogene." Cell Growth Differ **5**(3): 305-311.
- Azevedo, F. A., *et al.* (2009). "Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain." J Comp Neurol **513**(5): 532-541.
- Baloh, R. H., *et al.* (1997). "TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret." Neuron **18**(5): 793-802.
- Baloh, R. H., *et al.* (1998). "Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex." Neuron **21**(6): 1291-1302.

- Barbero, P., *et al.* (2002). "Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells." *J Cell Biol* **156**(3): 511-518.
- Barnett, M. W., *et al.* (2002). "Signalling by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) requires heparan sulphate glycosaminoglycan." *J Cell Sci* **115**(Pt 23): 4495-4503.
- Bellacosa, A., *et al.* (1991). "A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region." *Science* **254**(5029): 274-277.
- Benmerah, A., *et al.* (1999). "Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant." *J Cell Sci* **112** (Pt 9): 1303-1311.
- Benmerah, A., *et al.* (1996). "The ear of alpha-adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15 protein." *J Biol Chem* **271**(20): 12111-12116.
- Benmerah, A., *et al.* (1998). "AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis." *J Cell Biol* **140**(5): 1055-1062.
- Bergeron, J. J., *et al.* (1995). "Endosomes, receptor tyrosine kinase internalization and signal transduction." *Biosci Rep* **15**(6): 411-418.
- Berkemeier, L. R., *et al.* (1992). "Human chromosome 19 contains the neurotrophin-5 gene locus and three related genes that may encode novel acidic neurotrophins." *Somat Cell Mol Genet* **18**(3): 233-245.
- Bespalov, M. M., *et al.* (2011). "Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin." *J Cell Biol*.
- Bongarzone, I., *et al.* (1993). "Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of ret tyrosine kinase and the regulatory subunit RI alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase A." *Mol Cell Biol* **13**(1): 358-366.
- Bonifacino, J. S. and A. M. Weissman (1998). "Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways." *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 19-57.
- Bordeaux, M. C., *et al.* (2000). "The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease." *EMBO J* **19**(15): 4056-4063.
- Boriack-Sjodin, P. A., *et al.* (1998). "The structural basis of the activation of Ras by Sos." *Nature* **394**(6691): 337-343.
- Borrello, M. G., *et al.* (1996). "The full oncogenic activity of Ret/ptc2 depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase Cgamma." *Mol Cell Biol* **16**(5): 2151-2163.
- Borrello, M. G., *et al.* (2002). "Differential interaction of Enigma protein with the two RET isoforms." *Biochem Biophys Res Commun* **296**(3): 515-522.
- Borrello, M. G., *et al.* (1994). "The oncogenic versions of the Ret and Trk tyrosine kinases bind Shc and Grb2 adaptor proteins." *Oncogene* **9**(6): 1661-1668.
- Bottenstein, J. E. and G. H. Sato (1979). "Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(1): 514-517.
- Bottner, M., *et al.* (2000). "The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions." *J Neurochem* **75**(6): 2227-2240.
- Bronfman, F. C., *et al.* (2007). "Endosomal transport of neurotrophins: roles in signaling and neurodegenerative diseases." *Dev Neurobiol* **67**(9): 1183-1203.
- Bucci, C., *et al.* (1992). "The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway." *Cell* **70**(5): 715-728.
- Buj-Bello, A., *et al.* (1995). "GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons." *Neuron* **15**(4): 821-828.
- Burgering, B. M. and P. J. Coffey (1995). "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction." *Nature* **376**(6541): 599-602.
- Cabrera, J. R., *et al.* (2006). "Gas1 is related to the glial cell-derived neurotrophic factor family receptors alpha and regulates Ret signaling." *J Biol Chem* **281**(20): 14330-14339.
- Cacalano, G., *et al.* (1998). "GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney." *Neuron* **21**(1): 53-62.
- Cai, D., *et al.* (1999). "Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism." *Neuron* **22**(1): 89-101.
- Campenot, R. B. and B. L. MacInnis (2004). "Retrograde transport of neurotrophins: fact and function." *J Neurobiol* **58**(2): 217-229.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." *Science* **296**(5573): 1655-1657.
- Carey, K. D., *et al.* (2003). "The requirement of specific membrane domains for Raf-1 phosphorylation and activation." *J Biol Chem* **278**(5): 3185-3196.
- Carter, M. T., *et al.* (2001). "Conservation of RET proto-oncogene splicing variants and implications for RET isoform function." *Cytogenet Cell Genet* **95**(3-4): 169-176.

- Cavalli, V., *et al.* (2001). "Endocytosis and signaling cascades: a close encounter." *FEBS Lett* **498**(2-3): 190-196.
- CeBiTec. (Bielefeld). von <https://scf.cebitec.uni-bielefeld.de/SeqOrderGFDB/>.
- Chalfie, M., *et al.* (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science* **263**(5148): 802-805.
- Chen, C. L., *et al.* (2009). "Inhibitors of clathrin-dependent endocytosis enhance TGFbeta signaling and responses." *J Cell Sci* **122**(Pt 11): 1863-1871.
- Chen, M. S., *et al.* (1991). "Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis." *Nature* **351**(6327): 583-586.
- Chen, Z., *et al.* (2001). "Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes survival and induces differentiation through the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathway respectively in PC12 cells." *Neuroscience* **104**(2): 593-598.
- Cheng, Z. J., *et al.* (2006). "Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements." *Mol Biol Cell* **17**(7): 3197-3210.
- Chiariello, M., *et al.* (1998). "Signalling of the Ret receptor tyrosine kinase through the c-Jun NH2-terminal protein kinases (JNKs): evidence for a divergence of the ERKs and JNKs pathways induced by Ret." *Oncogene* **16**(19): 2435-2445.
- Chomczynski, P. und N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.
- Chung, J., *et al.* (2010). "Timing-dependent actions of NGF required for cell differentiation." *PLoS One* **5**(2): e9011.
- Clark, S. G., *et al.* (1992). "C. elegans cell-signalling gene sem-5 encodes a protein with SH2 and SH3 domains." *Nature* **356**(6367): 340-344.
- Cody, C. W., *et al.* (1993). "Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein." *Biochemistry* **32**(5): 1212-1218.
- Cohen, S., *et al.* (1954). "A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180." *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**(10): 1014-1018.
- Coleman, M. L., *et al.* (2004). "RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5): 355-366.
- Colter, J. S., *et al.* (1962). "Observations on the use of phenol for the isolation of deoxyribonucleic acid." *Biochim Biophys Acta* **55**: 31-39.
- Cook, S. J., *et al.* (1993). "RapV12 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts." *EMBO J* **12**(9): 3475-3485.
- Cormack, B. P., *et al.* (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." *Gene* **173**(1 Spec No): 33-38.
- Coulpier, M. und C. F. Ibanez (2004). "Retrograde propagation of GDNF-mediated signals in sympathetic neurons." *Mol Cell Neurosci* **27**(2): 132-139.
- Countaway, J. L., *et al.* (1992). "Mechanism of desensitization of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase." *J Biol Chem* **267**(2): 1129-1140.
- Cox, L. J., *et al.* (2008). "Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival." *Nat Cell Biol* **10**(2): 149-159.
- Creedon, D. J., *et al.* (1997). "Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 7018-7023.
- Crowder, R. J., *et al.* (2004). "Dok-6, a Novel p62 Dok family member, promotes Ret-mediated neurite outgrowth." *J Biol Chem* **279**(40): 42072-42081.
- Davies, J. A., *et al.* (2003). "Structural determinants of heparan sulphate modulation of GDNF signalling." *Growth Factors* **21**(3-4): 109-119.
- de Almeida, R. F., *et al.* (2009). "Membrane lipid domains and rafts: current applications of fluorescence lifetime spectroscopy and imaging." *Chem Phys Lipids* **157**(2): 61-77.
- De Falco, V., *et al.* (2007). "RET/papillary thyroid carcinoma oncogenic signaling through the Rap1 small GTPase." *Cancer Res* **67**(1): 381-390.
- de Graaff, E., *et al.* (2001). "Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis." *Genes Dev* **15**(18): 2433-2444.
- de Rooij, J., *et al.* (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP." *Nature* **396**(6710): 474-477.
- Dechant, G. und Y. A. Barde (1997). "Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR." *Curr Opin Neurobiol* **7**(3): 413-418.

- Degl'Innocenti, D., *et al.* (2004). "Differential requirement of Tyr1062 multidocking site by RET isoforms to promote neural cell scattering and epithelial cell branching." *Oncogene* **23**(44): 7297-7309.
- Delcroix, J. D., *et al.* (2003). "NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals." *Neuron* **39**(1): 69-84.
- Di Guglielmo, G. M., *et al.* (1994). "Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma." *EMBO J* **13**(18): 4269-4277.
- Di Guglielmo, G. M., *et al.* (2003). "Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover." *Nat Cell Biol* **5**(5): 410-421.
- Didichenko, S. A., *et al.* (1996). "Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47phox by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase." *Curr Biol* **6**(10): 1271-1278.
- Dikic, I. und S. Giordano (2003). "Negative receptor signalling." *Curr Opin Cell Biol* **15**(2): 128-135.
- DiStefano, P. S., *et al.* (1992). "The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons." *Neuron* **8**(5): 983-993.
- Doherty, G. J. und R. Lundmark (2009). "GRAF1-dependent endocytosis." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 5): 1061-1065.
- Donatello, S., *et al.* (2007). "SH2B1beta adaptor is a key enhancer of RET tyrosine kinase signaling." *Oncogene* **26**(45): 6546-6559.
- Dudek, H., *et al.* (1997). "Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt." *Science* **275**(5300): 661-665.
- Dugan, L. L., *et al.* (1999). "Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf." *J Biol Chem* **274**(36): 25842-25848.
- Durick, K., *et al.* (1998). "Shc and Enigma are both required for mitogenic signaling by Ret/ptc2." *Mol Cell Biol* **18**(4): 2298-2308.
- Durick, K., *et al.* (1996). "Mitogenic signaling by Ret/ptc2 requires association with enigma via a LIM domain." *J Biol Chem* **271**(22): 12691-12694.
- Durick, K., *et al.* (1995). "Tyrosines outside the kinase core and dimerization are required for the mitogenic activity of RET/ptc2." *J Biol Chem* **270**(42): 24642-24645.
- Ederly, P., *et al.* (1994). "Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease." *Nature* **367**(6461): 378-380.
- Eide, F. F., *et al.* (1993). "Neurotrophins and their receptors--current concepts and implications for neurologic disease." *Exp Neurol* **121**(2): 200-214.
- Encinas, M., *et al.* (2008). "Analysis of Ret knockin mice reveals a critical role for IKKs, but not PI 3-K, in neurotrophic factor-induced survival of sympathetic neurons." *Cell Death Differ* **15**(9): 1510-1521.
- Encinas, M., *et al.* (2001). "c-Src is required for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligand-mediated neuronal survival via a phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K)-dependent pathway." *J Neurosci* **21**(5): 1464-1472.
- Eng, C., *et al.* (1996). "The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis." *JAMA* **276**(19): 1575-1579.
- Enomoto, H., *et al.* (1998). "GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys." *Neuron* **21**(2): 317-324.
- Ferretti, L. und V. Sgaramella (1981). "Temperature dependence of the joining by T4 DNA ligase of termini produced by type II restriction endonucleases." *Nucleic Acids Res* **9**(1): 85-93.
- Finkbeiner, S. (2000). "CREB couples neurotrophin signals to survival messages." *Neuron* **25**(1): 11-14.
- Forgie, A., *et al.* (1999). "Differences and developmental changes in the responsiveness of PNS neurons to GDNF and neurturin." *Mol Cell Neurosci* **13**(6): 430-440.
- Förster, T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." *Annalen der Physik* **437**(1-2): 55-75.
- Franke, B., *et al.* (1998). "CNS glia are targets for GDNF and neurturin." *Histochem Cell Biol* **110**(6): 595-601.
- Franke, T. F., *et al.* (1995). "The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase." *Cell* **81**(5): 727-736.
- Frech, M., *et al.* (1997). "High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity." *J Biol Chem* **272**(13): 8474-8481.
- Frese, M. A., *et al.* (2009). "Characterization of the human sulfatase Sulf1 and its high affinity heparin/heparan sulfate interaction domain." *J Biol Chem* **284**(41): 28033-28044.

- Fritzius, T., *et al.* (2006). "A WD-FYVE protein binds to the kinases Akt and PKCzeta/lambda." *Biochem J* **399**(1): 9-20.
- Fuchs, R. und R. Blakesley (1983). "Guide to the use of type II restriction endonucleases." *Methods Enzymol* **100**: 3-38.
- Futter, C. E., *et al.* (1996). "Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes." *J Cell Biol* **132**(6): 1011-1023.
- Ganley, I. G., *et al.* (2004). "Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability." *Mol Biol Cell* **15**(12): 5420-5430.
- Gao, X., *et al.* (2001). "Identification and characterization of RA-GEF-2, a Rap guanine nucleotide exchange factor that serves as a downstream target of M-Ras." *J Biol Chem* **276**(45): 42219-42225.
- Gao, X. und J. Zhang (2008). "Spatiotemporal analysis of differential Akt regulation in plasma membrane microdomains." *Mol Biol Cell* **19**(10): 4366-4373.
- Garcia-Regalado, A., *et al.* (2008). "G protein-coupled receptor-promoted trafficking of Gbeta1gamma2 leads to AKT activation at endosomes via a mechanism mediated by Gbeta1gamma2-Rab11a interaction." *Mol Biol Cell* **19**(10): 4188-4200.
- Geetha, T., *et al.* (2005). "Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling." *Mol Cell* **20**(2): 301-312.
- Gendron, L., *et al.* (2003). "Cyclic AMP-independent involvement of Rap1/B-Raf in the angiotensin II AT2 receptor signaling pathway in NG108-15 cells." *J Biol Chem* **278**(6): 3606-3614.
- Ghitza, U. E., *et al.* (2010). "Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: a review." *Neurosci Biobehav Rev* **35**(2): 157-171.
- Gill, S. S., *et al.* (2003). "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease." *Nat Med* **9**(5): 589-595.
- Gomez, G. A. und J. L. Daniotti (2005). "H-Ras dynamically interacts with recycling endosomes in CHO-K1 cells: involvement of Rab5 and Rab11 in the trafficking of H-Ras to this pericentriolar endocytic compartment." *J Biol Chem* **280**(41): 34997-35010.
- Gonsior, S. M., *et al.* (1999). "Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody." *J Cell Sci* **112** (Pt 6): 797-809.
- Gotoh, T., *et al.* (1995). "Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G." *Mol Cell Biol* **15**(12): 6746-6753.
- Greene, L. A. (1978). "Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium." *J Cell Biol* **78**(3): 747-755.
- Grewal, S. S., *et al.* (1999). "Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons." *Curr Opin Neurobiol* **9**(5): 544-553.
- Grieco, M., *et al.* (1990). "PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas." *Cell* **60**(4): 557-563.
- Grimes, M. L., *et al.* (1997). "A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(18): 9909-9914.
- Grimes, M. L., *et al.* (1996). "Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes." *J Neurosci* **16**(24): 7950-7964.
- Grimm, J., *et al.* (2001). "Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation." *J Cell Biol* **154**(2): 345-354.
- Gustin, J. A., *et al.* (2007). "Deciphering adaptor specificity in GFL-dependent RET-mediated proliferation and neurite outgrowth." *J Neurochem* **102**(4): 1184-1194.
- Guy, P. M., *et al.* (1999). "The PDZ domain of the LIM protein enigma binds to beta-tropomyosin." *Mol Biol Cell* **10**(6): 1973-1984.
- Hagiwara, M., *et al.* (2009). "Caveolin-1 activates Rab5 and enhances endocytosis through direct interaction." *Biochem Biophys Res Commun* **378**(1): 73-78.
- Hailstones, D., *et al.* (1998). "Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells." *J Lipid Res* **39**(2): 369-379.
- Hamilton, J. F., *et al.* (2001). "Heparin coinfusion during convection-enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin." *Exp Neurol* **168**(1): 155-161.
- Hamprecht, B. (1977). "Structural, electrophysiological, biochemical, and pharmacological properties of neuroblastoma-glioma cell hybrids in cell culture." *Int Rev Cytol* **49**: 99-170.
- Hamprecht, B., *et al.* (1985). "Culture and characteristics of hormone-responsive neuroblastoma X glioma hybrid cells." *Methods Enzymol* **109**: 316-341.

- Hayakawa, A., *et al.* (2006). "The WD40 and FYVE domain containing protein 2 defines a class of early endosomes necessary for endocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(32): 11928-11933.
- Heerssen, H. M., *et al.* (2004). "Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons." *Nat Neurosci* **7**(6): 596-604.
- Heim, R., *et al.* (1994). "Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26): 12501-12504.
- Hempstead, B. L., *et al.* (1991). "High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor." *Nature* **350**(6320): 678-683.
- Henderson, C. E., *et al.* (1994). "GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle." *Science* **266**(5187): 1062-1064.
- Henley, J. R., *et al.* (1998). "Dynamin-mediated internalization of caveolae." *J Cell Biol* **141**(1): 85-99.
- Herrmann, C., *et al.* (1996). "Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor." *J Biol Chem* **271**(12): 6794-6800.
- Herskovits, J. S., *et al.* (1993a). "Effects of mutant rat dynamin on endocytosis." *J Cell Biol* **122**(3): 565-578.
- Herskovits, J. S., *et al.* (1993b). "Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(24): 11468-11472.
- Heuckeroth, R. O., *et al.* (1999). "Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons." *Neuron* **22**(2): 253-263.
- Heumann, R., *et al.* (1979). "Clonal hybrid cell lines expressing cholinergic and adrenergic properties." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4674-4677.
- Hewlett, M. J., *et al.* (1977). "Separation and quantitation of intracellular forms of poliovirus RNA by agarose gel electrophoresis." *Biochemistry* **16**(12): 2763-2767.
- Hicke, L. (2001). "Protein regulation by monoubiquitin." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 195-201.
- Hierro, A., *et al.* (2004). "Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex." *Nature* **431**(7005): 221-225.
- Hiltunen, J. O., *et al.* (2000). "GDNF family receptors in the embryonic and postnatal rat heart and reduced cholinergic innervation in mice hearts lacking ret or GFRalpha2." *Dev Dyn* **219**(1): 28-39.
- Hiltunen, P. H. und M. S. Airaksinen (2004). "Sympathetic cholinergic target innervation requires GDNF family receptor GFR alpha 2." *Mol Cell Neurosci* **26**(3): 450-457.
- Hirata, Y., *et al.* (2010). "Acidification of the Golgi apparatus is indispensable for maturation but not for cell surface delivery of Ret." *J Neurochem* **115**(3): 606-613.
- Hisata, S., *et al.* (2007). "Rap1-PDZ-GEF1 interacts with a neurotrophin receptor at late endosomes, leading to sustained activation of Rap1 and ERK and neurite outgrowth." *J Cell Biol* **178**(5): 843-860.
- Hishiki, T., *et al.* (1998). "Glial cell line-derived neurotrophic factor/neurturin-induced differentiation and its enhancement by retinoic acid in primary human neuroblastomas expressing c-Ret, GFR alpha-1, and GFR alpha-2." *Cancer Res* **58**(10): 2158-2165.
- Hofman, E. G., *et al.* (2008). "EGF induces coalescence of different lipid rafts." *J Cell Sci* **121**(Pt 15): 2519-2528.
- Hohn, A., *et al.* (1990). "Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family." *Nature* **344**(6264): 339-341.
- Holm, P. C., *et al.* (2002). "Neurturin is a neuritogenic but not a survival factor for developing and adult central noradrenergic neurons." *J Neurochem* **81**(6): 1318-1327.
- Honma, N., *et al.* (1996). "Two types of apoptotic cell death of rat central nervous system-derived neuroblastoma B50 and B104 cells: apoptosis induced during proliferation and after differentiation." *J Neurochem* **67**(5): 1856-1865.
- Howe, C. L. und W. C. Mobley (2005). "Long-distance retrograde neurotrophic signaling." *Curr Opin Neurobiol* **15**(1): 40-48.
- Howe, C. L., *et al.* (2001). "NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway." *Neuron* **32**(5): 801-814.
- Huang, E. J. und L. F. Reichardt (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." *Annu Rev Neurosci* **24**: 677-736.
- Hunter, T. (1997). "Oncoprotein networks." *Cell* **88**(3): 333-346.
- Hurley, J. H. und X. Ren (2009). "The circuitry of cargo flux in the ESCRT pathway." *J Cell Biol* **185**(2): 185-187.
- Ichiba, T., *et al.* (1997). "Enhancement of guanine-nucleotide exchange activity of C3G for Rap1 by the expression of Crk, CrkL, and Grb2." *J Biol Chem* **272**(35): 22215-22220.

- Ihara, S., *et al.* (1997). "Dual control of neurite outgrowth by STAT3 and MAP kinase in PC12 cells stimulated with interleukin-6." *EMBO J* **16**(17): 5345-5352.
- Ikeda, I., *et al.* (1990). "Specific expression of the ret proto-oncogene in human neuroblastoma cell lines." *Oncogene* **5**(9): 1291-1296.
- Invitrogen. (2003). "Bakterienstamm DH5 α ." von Webseite: <http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/18263012.pdf>.
- Ip, N. Y., *et al.* (1991). "The neurotrophins and CNTF: specificity of action towards PNS and CNS neurons." *J Physiol (Paris)* **85**(3): 123-130.
- Ippoliti, R., *et al.* (1998). "The effect of monensin and chloroquine on the endocytosis and toxicity of chimeric toxins." *Cell Mol Life Sci* **54**(8): 866-875.
- Jhian, S. M. (2000). "The RET proto-oncogene in human cancers." *Oncogene* **19**(49): 5590-5597.
- Jiao, L., *et al.* (2010). "Rap1GAP interacts with RET and suppresses GDNF-induced neurite outgrowth." *Cell Res.*
- Jing, S., *et al.* (1996). "GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF." *Cell* **85**(7): 1113-1124.
- Johannessen, L. E., *et al.* (2006). "Activation of the epidermal growth factor (EGF) receptor induces formation of EGF receptor- and Grb2-containing clathrin-coated pits." *Mol Cell Biol* **26**(2): 389-401.
- Jones, K. H. und J. A. Senft (1985). "An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide." *J Histochem Cytochem* **33**(1): 77-79.
- Jordens, I., *et al.* (2005). "Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion." *Traffic* **6**(12): 1070-1077.
- Kalus, I., *et al.* (2009). "Differential involvement of the extracellular 6-O-endosulfatases Sulf1 and Sulf2 in brain development and neuronal and behavioural plasticity." *J Cell Mol Med* **13**(11-12): 4505-4521.
- Kao, S., *et al.* (2001). "Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells." *J Biol Chem* **276**(21): 18169-18177.
- Kaplan, D. R., *et al.* (1991). "Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF." *Nature* **350**(6314): 158-160.
- Kauffmann-Zeh, A., *et al.* (1997). "Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB." *Nature* **385**(6616): 544-548.
- Kennedy, S. G., *et al.* (1997). "The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal." *Genes Dev* **11**(6): 701-713.
- Kirchhausen, T., *et al.* (2008). "Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis." *Methods Enzymol* **438**: 77-93.
- Kirik, D., *et al.* (2004). "Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease." *Nat Neurosci* **7**(2): 105-110.
- Klebe, R. J. und F. H. Ruddle (1969). "Neuroblastoma: Cell culture analysis of a differentiating stem cell system." *J Cell Biol* **43**: 69a.
- Knusel, B., *et al.* (1992). "Brain-derived neurotrophic factor administration protects basal forebrain cholinergic but not nigral dopaminergic neurons from degenerative changes after axotomy in the adult rat brain." *J Neurosci* **12**(11): 4391-4402.
- Kodama, Y., *et al.* (2005). "The RET proto-oncogene: a molecular therapeutic target in thyroid cancer." *Cancer Sci* **96**(3): 143-148.
- Koh, C. G. (2006). "Rho GTPases and their regulators in neuronal functions and development." *Neurosignals* **15**(5): 228-237.
- Kokaia, Z., *et al.* (1999). "GDNF family ligands and receptors are differentially regulated after brain insults in the rat." *Eur J Neurosci* **11**(4): 1202-1216.
- Korsching, S. (1993). "The neurotrophic factor concept: a reexamination." *J Neurosci* **13**(7): 2739-2748.
- Korsching, S. und H. Thoenen (1983). "Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: correlation with density of sympathetic innervation." *Proc Natl Acad Sci USA* **80**(11): 3513-3516.
- Kotzbauer, P. T., *et al.* (1996). "Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor." *Nature* **384**(6608): 467-470.
- Kriegelstein, K., *et al.* (2000). "Reduction of endogenous transforming growth factors beta prevents ontogenetic neuron death." *Nat Neurosci* **3**(11): 1085-1090.
- Krufka, A., *et al.* (1996). "Two hierarchies of FGF-2 signaling in heparin: mitogenic stimulation and high-affinity binding/receptor transphosphorylation." *Biochemistry* **35**(34): 11131-11141.

- Kuiperij, H. B., *et al.* (2003). "Characterisation of PDZ-GEFs, a family of guanine nucleotide exchange factors specific for Rap1 and Rap2." *Biochim Biophys Acta* **1593**(2-3): 141-149.
- Kulik, G., *et al.* (1997). "Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt." *Mol Cell Biol* **17**(3): 1595-1606.
- Kurokawa, K., *et al.* (2003). "Cell signalling and gene expression mediated by RET tyrosine kinase." *J Intern Med* **253**(6): 627-633.
- Kurotsuchi, A., *et al.* (2010). "Analysis of DOK-6 function in downstream signaling of RET in human neuroblastoma cells." *Cancer Sci* **101**(5): 1147-1155.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lafourcade, C., *et al.* (2008). "Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization." *PLoS One* **3**(7): e2758.
- Lamballe, F., *et al.* (1991). "trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3." *Cell* **66**(5): 967-979.
- Langsdorf, A., *et al.* (2011). "Expression regulation and function of heparan sulfate 6-O-endosulfatases in the spermatogonial stem cell niche." *Glycobiology* **21**(2): 152-161.
- Laurikainen, A., *et al.* (2000). "Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in penis of adult rat and retrogradely transported in penile parasympathetic and sensory nerves." *Cell Tissue Res* **302**(3): 321-329.
- Lee, C. S., *et al.* (2005). "Neurotrophin and GDNF family ligands promote survival and alter excitotoxic vulnerability of neurons derived from murine embryonic stem cells." *Exp Neurol* **191**(1): 65-76.
- Lee, R., *et al.* (2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." *Science* **294**(5548): 1945-1948.
- Lee, R. H., *et al.* (2006). "Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin in RET/GFRalpha1-expressing cells." *J Neurosci Res* **83**(1): 80-90.
- Lee, V., *et al.* (1977). "Specific neural and adrenal medullary antigens detected by antisera to clonal PC12 pheochromocytoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(11): 5021-5025.
- Leibrock, J., *et al.* (1989). "Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor." *Nature* **341**(6238): 149-152.
- Leitner, M. L., *et al.* (1999). "Analysis of the retrograde transport of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin, and persephin suggests that in vivo signaling for the GDNF family is GFRalpha coreceptor-specific." *J Neurosci* **19**(21): 9322-9331.
- Lemjabbar-Alaoui, H., *et al.* (2010). "Sulf-2, a heparan sulfate endosulfatase, promotes human lung carcinogenesis." *Oncogene* **29**(5): 635-646.
- Levi-Montalcini, R. (1987). "The nerve growth factor 35 years later." *Science* **237**(4819): 1154-1162.
- Levkovitz, Y., *et al.* (2001). "Blockade of NGF-induced neurite outgrowth by a dominant-negative inhibitor of the egr family of transcription regulatory factors." *J Neurosci* **21**(1): 45-52.
- Li, K., *et al.* (1999). "Collagen-homology domain 1 deletion mutant of Shc suppresses transformation mediated by neu through a MAPK-independent pathway." *Oncogene* **18**(16): 2617-2626.
- Li, L. und A. H. Ross (2007). "Why is PTEN an important tumor suppressor?" *J Cell Biochem* **102**(6): 1368-1374.
- Liao, Y., *et al.* (1999). "RA-GEF, a novel Rap1A guanine nucleotide exchange factor containing a Ras/Rap1A-associating domain, is conserved between nematode and humans." *J Biol Chem* **274**(53): 37815-37820.
- Liao, Y., *et al.* (2001). "RA-GEF-1, a guanine nucleotide exchange factor for Rap1, is activated by translocation induced by association with Rap1*GTP and enhances Rap1-dependent B-Raf activation." *J Biol Chem* **276**(30): 28478-28483.
- Limpert, A. S., *et al.* (2007). "Nerve growth factor stimulates the concentration of TrkA within lipid rafts and extracellular signal-regulated kinase activation through c-Cbl-associated protein." *Mol Cell Biol* **27**(16): 5686-5698.
- Lin, L. F., *et al.* (1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." *Science* **260**(5111): 1130-1132.
- Lin, W. F., *et al.* (2009). "SH2B1beta enhances fibroblast growth factor 1 (FGF1)-induced neurite outgrowth through MEK-ERK1/2-STAT3-Egr1 pathway." *Cell Signal* **21**(7): 1060-1072.
- Lindahl, M., *et al.* (2001). "Human glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 4 is the receptor for persephin and is predominantly expressed in normal and malignant thyroid medullary cells." *J Biol Chem* **276**(12): 9344-9351.
- Ling, L., *et al.* (2003). "Src-CrkII-C3G-dependent activation of Rap1 switches growth hormone-stimulated p44/42 MAP kinase and JNK/SAPK activities." *J Biol Chem* **278**(29): 27301-27311.

- Lonka-Nevalaita, L., *et al.* (2010). "Characterization of the intracellular localization, processing, and secretion of two glial cell line-derived neurotrophic factor splice isoforms." *J Neurosci* **30**(34): 11403-11413.
- Lopez-Maderuelo, M. D., *et al.* (2001). "Opposite effects of the Hsp90 inhibitor Geldanamycin: induction of apoptosis in PC12, and differentiation in N2A cells." *FEBS Lett* **490**(1-2): 23-27.
- Lowenstein, E. J., *et al.* (1992). "The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling." *Cell* **70**(3): 431-442.
- Lundgren, T. K., *et al.* (2008a). "Differential membrane compartmentalization of Ret by PTB-adaptor engagement." *Febs J* **275**(9): 2055-2066.
- Lundgren, T. K., *et al.* (2008b). "Cell migration by a FRS2-adaptor dependent membrane relocation of ret receptors." *J Cell Biochem* **104**(3): 879-894.
- Lundmark, R., *et al.* (2008). "The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway." *Curr Biol* **18**(22): 1802-1808.
- Luo, J. und M. W. Miller (1999). "Transforming growth factor beta1-regulated cell proliferation and expression of neural cell adhesion molecule in B104 neuroblastoma cells: differential effects of ethanol." *J Neurochem* **72**(6): 2286-2293.
- Luzio, J. P., *et al.* (2001). "Relationship between endosomes and lysosomes." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 4): 476-480.
- Luzio, J. P., *et al.* (2000). "Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis." *J Cell Sci* **113** (Pt 9): 1515-1524.
- Macia, E., *et al.* (2006). "Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin." *Dev Cell* **10**(6): 839-850.
- Mak, Y. F. und B. A. Ponder (1996). "RET oncogene." *Curr Opin Genet Dev* **6**(1): 82-86.
- Marshall, C. J. (1995). "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." *Cell* **80**(2): 179-185.
- Martoglio, B. und B. Dobberstein (1998). "Signal sequences: more than just greasy peptides." *Trends Cell Biol* **8**(10): 410-415.
- McAvoy, T., *et al.* (2009). "Phosphorylation of Rap1GAP, a striatally enriched protein, by protein kinase A controls Rap1 activity and dendritic spine morphology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9): 3531-3536.
- Meier, R., *et al.* (1997). "Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta." *J Biol Chem* **272**(48): 30491-30497.
- Meier, R., *et al.* (1998). "Inactivation and dephosphorylation of protein kinase Balpha (PKBalpha) promoted by hyperosmotic stress." *EMBO J* **17**(24): 7294-7303.
- Meili, R., *et al.* (1999). "Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in Dictyostelium." *EMBO J* **18**(8): 2092-2105.
- Meng, X., *et al.* (2001). "Promotion of seminomatous tumors by targeted overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse testis." *Cancer Res* **61**(8): 3267-3271.
- Meng, X., *et al.* (2000). "Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF." *Science* **287**(5457): 1489-1493.
- Mercalli, E., *et al.* (2001). "Key role of Shc signaling in the transforming pathway triggered by Ret/ptc2 oncoprotein." *Oncogene* **20**(27): 3475-3485.
- Milbrandt, J., *et al.* (1998). "Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin." *Neuron* **20**(2): 245-253.
- Minna, J., *et al.* (1972). "Genetic dissection of neural properties using somatic cell hybrids." *Nat New Biol* **235**(60): 225-231.
- Mochizuki, N., *et al.* (2001). "Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1." *Nature* **411**(6841): 1065-1068.
- Moore, M. W., *et al.* (1996). "Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF." *Nature* **382**(6586): 76-79.
- Mori, N., *et al.* (1990). "Contributions of cell-extrinsic and cell-intrinsic factors to the differentiation of a neural-crest-derived neuroendocrine progenitor cell." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **55**: 255-264.
- Mori, N., *et al.* (1978). "Increase in the ratio of 18S RNA to 28S RNA in the cytoplasm of mouse tissues during aging." *Mech Ageing Dev* **8**(4): 285-297.
- Morimoto-Tomita, M., *et al.* (2002). "Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans." *J Biol Chem* **277**(51): 49175-49185.
- Mukherjee, S., *et al.* (1997). "Endocytosis." *Physiol Rev* **77**(3): 759-803.
- Mulligan, L. M., *et al.* (1993). "Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A." *Nature* **363**(6428): 458-460.

- Mullis, K., *et al.* (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Myers, S. M., *et al.* (1995). "Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET." *Oncogene* **11**(10): 2039-2045.
- Nakamura, T., *et al.* (1994). "Expression of the ret proto-oncogene product in human normal and neoplastic tissues of neural crest origin." *J Pathol* **172**(3): 255-260.
- Nankoe, S. R. und S. Sever (2006). "Dynasore puts a new spin on dynamin: a surprising dual role during vesicle formation." *Trends Cell Biol* **16**(12): 607-609.
- Narayanan, R., *et al.* (2005). "An internal GAP domain negatively regulates presynaptic dynamin in vivo: a two-step model for dynamin function." *J Cell Biol* **169**(1): 117-126.
- Nathans, D. und H. O. Smith (1975). "Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules." *Annu Rev Biochem* **44**: 273-293.
- Nawroth, R., *et al.* (2007). "Extracellular sulfatases, elements of the Wnt signaling pathway, positively regulate growth and tumorigenicity of human pancreatic cancer cells." *PLoS One* **2**(4): e392.
- Nelson, P., *et al.* (1976). "Synapse formation between clonal neuroblastoma X glioma hybrid cells and striated muscle cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(1): 123-127.
- Nomura, K., *et al.* (2004). "Identification of a novel domain of Ras and Rap1 that directs their differential subcellular localizations." *J Biol Chem* **279**(21): 22664-22673.
- Nozaki, C., *et al.* (1998). "Calcium-dependent Ret activation by GDNF and neurturin." *Oncogene* **16**(3): 293-299.
- O'Brien, J., *et al.* (2000). "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity." *Eur J Biochem* **267**(17): 5421-5426.
- Ochoa, G. C., *et al.* (2000). "A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes." *J Cell Biol* **150**(2): 377-389.
- Oh-hashii, K., *et al.* (2009). "Biosynthesis, processing, and secretion of glial cell line-derived neurotrophic factor in astroglial cells." *Mol Cell Biochem* **323**(1-2): 1-7.
- Ohba, Y., *et al.* (2003). "Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1." *EMBO J* **22**(4): 859-869.
- Ohkuma, S. und B. Poole (1978). "Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(7): 3327-3331.
- Olmsted, J. B., *et al.* (1970). "Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **65**(1): 129-136.
- Ostermeyer, A. G., *et al.* (1999). "Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein." *J Biol Chem* **274**(48): 34459-34466.
- Pachnis, V., *et al.* (1993). "Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis." *Development* **119**(4): 1005-1017.
- Pan, J., *et al.* (2010). "Chemically oversulfated glycosaminoglycans are potent modulators of contact system activation and different cell signaling pathways." *J Biol Chem* **285**(30): 22966-22975.
- Paratcha, G. und F. Ledda (2010). "The GTPase-activating protein Rap1GAP: A new player to modulate Ret signaling." *Cell Res.*
- Paratcha, G., *et al.* (2001). "Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts." *Neuron* **29**(1): 171-184.
- Paratcha, G., *et al.* (2003). "The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands." *Cell* **113**(7): 867-879.
- Parkash, V., *et al.* (2008). "The structure of the glial cell line-derived neurotrophic factor-coreceptor complex: insights into RET signaling and heparin binding." *J Biol Chem* **283**(50): 35164-35172.
- Pasini, A., *et al.* (1997). "Oncogenic activation of RET by two distinct FMTC mutations affecting the tyrosine kinase domain." *Oncogene* **15**(4): 393-402.
- Pasini, B., *et al.* (1995). "Loss of function effect of RET mutations causing Hirschsprung disease." *Nat Genet* **10**(1): 35-40.
- Peiro, S., *et al.* (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**(48): 37846-37852.
- Pelkmans, L., *et al.* (2004). "Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic." *Cell* **118**(6): 767-780.

- Perea, G. und A. Araque (2005). "Glial calcium signaling and neuron-glia communication." Cell Calcium **38**(3-4): 375-382.
- Perea, G., *et al.* (2009). "Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information." Trends Neurosci **32**(8): 421-431.
- Peterziel, H., *et al.* (2007). "Specificity in the crosstalk of TGFbeta/GDNF family members is determined by distinct GFR alpha receptors." J Neurochem **103**(6): 2491-2504.
- Peterziel, H., *et al.* (2002). "TGFbeta induces GDNF responsiveness in neurons by recruitment of GFRalpha1 to the plasma membrane." J Cell Biol **159**(1): 157-167.
- Pezeshki, G., *et al.* (2001). "Evidence for a ligand-specific signaling through GFRalpha-1, but not GFRalpha-2, in the absence of Ret." J Neurosci Res **66**(3): 390-395.
- Phonphok, Y. und K. S. Rosenthal (1991). "Stabilization of clathrin coated vesicles by amantadine, tromantadine and other hydrophobic amines." FEBS Lett **281**(1-2): 188-190.
- Pichel, J. G., *et al.* (1996). "Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF." Nature **382**(6586): 73-76.
- Pierchala, B. A., *et al.* (2004). "Nerve growth factor promotes the survival of sympathetic neurons through the cooperative function of the protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways." J Biol Chem **279**(27): 27986-27993.
- Pierchala, B. A., *et al.* (2006). "Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent recruitment of Ret into lipid rafts enhances signaling by partitioning Ret from proteasome-dependent degradation." J Neurosci **26**(10): 2777-2787.
- Pierchala, B. A., *et al.* (2007). "NGF augments the autophosphorylation of Ret via inhibition of ubiquitin-dependent degradation." J Neurochem **100**(5): 1169-1176.
- Pignatelli, M., *et al.* (1999). "Involvement of the NGFI-A gene in the differentiation of neuroblastoma cells." FEBS Lett **461**(1-2): 37-42.
- Piper, R. C. und J. P. Luzio (2007). "Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes." Curr Opin Cell Biol **19**(4): 459-465.
- Porter, A. G. und S. Dhakshinamoorthy (2004). "Apoptosis initiated by dependence receptors: a new paradigm for cell death?" Bioessays **26**(6): 656-664.
- Poteryaev, D., *et al.* (1999). "GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor alpha1." FEBS Lett **463**(1-2): 63-66.
- Pralle, A., *et al.* (2000). "Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells." J Cell Biol **148**(5): 997-1008.
- Prasher, D. C., *et al.* (1992). "Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein." Gene **111**(2): 229-233.
- Pullikuth, A. K. und A. D. Catling (2007). "Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective." Cell Signal **19**(8): 1621-1632.
- Radha, V., *et al.* (2008). "The guanine nucleotide exchange factor, C3G regulates differentiation and survival of human neuroblastoma cells." J Neurochem **107**(5): 1424-1435.
- Radha, V., *et al.* (2004). "Phosphorylated guanine nucleotide exchange factor C3G, induced by pervanadate and Src family kinases localizes to the Golgi and subcortical actin cytoskeleton." BMC Cell Biol **5**: 31.
- Rahhal, B., *et al.* (2009). "In vivo requirement of TGF-beta/GDNF cooperativity in mouse development: focus on the neurotrophic hypothesis." Int J Dev Neurosci **27**(1): 97-102.
- Raiborg, C. und H. Stenmark (2009). "The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins." Nature **458**(7237): 445-452.
- Riccio, A., *et al.* (1999). "Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons." Science **286**(5448): 2358-2361.
- Riccio, A., *et al.* (1997). "An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons." Science **277**(5329): 1097-1100.
- Richardson, D. S., *et al.* (2006). "RET ligand-induced internalization and its consequences for downstream signaling." Oncogene **25**(22): 3206-3211.
- Richardson, D. S. und L. M. Mulligan (2010). "Direct visualization of vesicle maturation and plasma membrane protein trafficking." J Fluoresc **20**(1): 401-405.
- Rickard, S. M., *et al.* (2003). "The binding of human glial cell line-derived neurotrophic factor to heparin and heparan sulfate: importance of 2-O-sulfate groups and effect on its interaction with its receptor, GFRalpha1." Glycobiology **13**(6): 419-426.
- Rider, C. C. (2003). "Interaction between glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) and 2-O-sulphated heparin-related glycosaminoglycans." Biochem Soc Trans **31**(2): 337-339.
- Rink, J., *et al.* (2005). "Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes." Cell **122**(5): 735-749.

- Rodal, S. K., *et al.* (1999). "Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles." *Mol Biol Cell* **10**(4): 961-974.
- Rodrigues, D. M., *et al.* (2010). "Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system." *Neurogastroenterol Motil.*
- Rodrigues, G. A. und M. Park (1994). "Oncogenic activation of tyrosine kinases." *Curr Opin Genet Dev* **4**(1): 15-24.
- Rodriguez-Tebar, A., *et al.* (1991). "Neurotrophins: structural relatedness and receptor interactions." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **331**(1261): 255-258.
- Rossi, J., *et al.* (1999). "Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor." *Neuron* **22**(2): 243-252.
- Roy, S., *et al.* (2002). "H-Ras signaling and K-Ras signaling are differentially dependent on endocytosis." *Mol Cell Biol* **22**(14): 5128-5140.
- Sanchez, M. P., *et al.* (1996). "Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF." *Nature* **382**(6586): 70-73.
- Santoro, M., *et al.* (2004). "Dysfunction of the RET receptor in human cancer." *Cell Mol Life Sci* **61**(23): 2954-2964.
- Santoro, M., *et al.* (1990). "The ret proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas." *Oncogene* **5**(10): 1595-1598.
- Santoro, M., *et al.* (1994). "An epidermal growth factor receptor/ret chimera generates mitogenic and transforming signals: evidence for a ret-specific signaling pathway." *Mol Cell Biol* **14**(1): 663-675.
- Saragovi, H. U., *et al.* (1998). "A TrkA-selective, fast internalizing nerve growth factor-antibody complex induces trophic but not neuritogenic signals." *J Biol Chem* **273**(52): 34933-34940.
- Sarbassov, D. D., *et al.* (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science* **307**(5712): 1098-1101.
- Sariola, H. und M. Saarma (2003). "Novel functions and signalling pathways for GDNF." *J Cell Sci* **116**(Pt 19): 3855-3862.
- Sasagawa, S., *et al.* (2005). "Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation." *Nat Cell Biol* **7**(4): 365-373.
- Schaeffer, H. J., *et al.* (1998). "MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade." *Science* **281**(5383): 1668-1671.
- Schalm, S. S., *et al.* (2010). "Phosphorylation of protocadherin proteins by the receptor tyrosine kinase Ret." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(31): 13894-13899.
- Scheek, S., *et al.* (1997). "Sphingomyelin depletion in cultured cells blocks proteolysis of sterol regulatory element binding proteins at site 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11179-11183.
- Schlessinger, J., *et al.* (2000). "Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization." *Mol Cell* **6**(3): 743-750.
- Schmitt, J. M. und P. J. Stork (2002a). "Galpha and Gbeta gamma require distinct Src-dependent pathways to activate Rap1 and Ras." *J Biol Chem* **277**(45): 43024-43032.
- Schmitt, J. M. und P. J. Stork (2002b). "PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1." *Mol Cell* **9**(1): 85-94.
- Schneider, Y. J. und A. Trouet (1981). "Effect of chloroquine and methylamine on endocytosis of fluorescein-labelled controlled IgG and of anti-(plasma membrane) IgG by cultured fibroblasts." *Eur J Biochem* **118**(1): 33-38.
- Schober, A., *et al.* (2007). "GDNF applied to the MPTP-lesioned nigrostriatal system requires TGF-beta for its neuroprotective action." *Neurobiol Dis* **25**(2): 378-391.
- Schubert, D., *et al.* (1974). "Clonal cell lines from the rat central nervous system." *Nature* **249**(454): 224-227.
- Schuchardt, A., *et al.* (1994). "Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret." *Nature* **367**(6461): 380-383.
- Schuetz, G., *et al.* (2004). "The neuronal scaffold protein Shank3 mediates signaling and biological function of the receptor tyrosine kinase Ret in epithelial cells." *J Cell Biol* **167**(5): 945-952.
- Scott, R. P., *et al.* (2005). "Distinct turnover of alternatively spliced isoforms of the RET kinase receptor mediated by differential recruitment of the Cbl ubiquitin ligase." *J Biol Chem* **280**(14): 13442-13449.
- Scott, R. P. und C. F. Ibanez (2001). "Determinants of ligand binding specificity in the glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha S." *J Biol Chem* **276**(2): 1450-1458.
- Seifert, G., *et al.* (2006). "Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective." *Nat Rev Neurosci* **7**(3): 194-206.
- Self, A. J., *et al.* (2001). "Analysis of R-Ras signalling pathways." *J Cell Sci* **114**(Pt 7): 1357-1366.

- Senger, D. L. und R. B. Campenot (1997). "Rapid retrograde tyrosine phosphorylation of trkA and other proteins in rat sympathetic neurons in compartmented cultures." *J Cell Biol* **138**(2): 411-421.
- Sever, S., *et al.* (1999). "Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis." *Nature* **398**(6727): 481-486.
- Shao, Y., *et al.* (2002). "Pincher, a pinocytic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes." *J Cell Biol* **157**(4): 679-691.
- Sharma, D. K., *et al.* (2003). "Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling." *J Biol Chem* **278**(9): 7564-7572.
- Shaw, Y. T., *et al.* (1993). "Partial reversion of transformed phenotype of B104 cancer cells by antisense nucleic acids." *Cancer Lett* **69**(1): 27-32.
- Sheff, D. R., *et al.* (1999). "The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions." *J Cell Biol* **145**(1): 123-139.
- Shimomura, O. (2005). "The discovery of aequorin and green fluorescent protein." *J Microsc* **217**(Pt 1): 1-15.
- Shimomura, O., *et al.* (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea." *J Cell Comp Physiol* **59**: 223-239.
- Sigismund, S., *et al.* (2008). "Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation." *Dev Cell* **15**(2): 209-219.
- Sigismund, S., *et al.* (2005). "Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 2760-2765.
- Simons, K. und E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* **387**(6633): 569-572.
- Simons, K. und D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1): 31-39.
- Slevin, J. T., *et al.* (2005). "Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor." *J Neurosurg* **102**(2): 216-222.
- Somsel Rodman, J. und A. Wandinger-Ness (2000). "Rab GTPases coordinate endocytosis." *J Cell Sci* **113 Pt 2**: 183-192.
- Songyang, Z., *et al.* (1995). "Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling." *Nature* **373**(6514): 536-539.
- Songyang, Z., *et al.* (1997). "Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains." *Science* **275**(5296): 73-77.
- Sonnichsen, B., *et al.* (2000). "Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11." *J Cell Biol* **149**(4): 901-914.
- Soppet, D., *et al.* (1991). "The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor." *Cell* **65**(5): 895-903.
- Sorkin, A. (2001). "Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 4): 480-484.
- Sorkin, A. und M. von Zastrow (2009). "Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(9): 609-622.
- Squinto, S. P., *et al.* (1991). "trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor." *Cell* **65**(5): 885-893.
- Stein, B. S., *et al.* (1984). "Complete inhibition of transferrin recycling by monensin in K562 cells." *J Biol Chem* **259**(23): 14762-14772.
- Stenmark, H. (2009). "Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(8): 513-525.
- Stockl, M. T. und A. Herrmann (2010). "Detection of lipid domains in model and cell membranes by fluorescence lifetime imaging microscopy." *Biochim Biophys Acta* **1798**(7): 1444-1456.
- Stratagene. (2002). "Bakterienstamm XL1-Blue." von <http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/200249.pdf>.
- Strelau, J. und K. Unsicker (1999). "GDNF family members and their receptors: expression and functions in two oligodendroglial cell lines representing distinct stages of oligodendroglial development." *Glia* **26**(4): 291-301.
- Strunk, U. (2008). Herstellung von Säugerexpressionsvektoren für GFR α 2 und RET9 und deren intrazelluläre Detektion in Neuro2a-Zellen. *Biochemie III*. Bielefeld, Universität Bielefeld.
- Strunk, U. (2010). Etablierung von Modellsystemen zur Charakterisierung der endosomalen Akt- und Erk1/2-Signalisierung über RET-Rezeptor-Tyrosinkinasen. *Biochemie III*. Bielefeld, Universität Bielefeld.

- Sun, P., *et al.* (2006). "Sustained activation of M-Ras induced by nerve growth factor is essential for neuronal differentiation of PC12 cells." *Genes Cells* **11**(9): 1097-1113.
- Szeberenyi, J., *et al.* (1990). "Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on neuronal differentiation of PC12 cells." *Mol Cell Biol* **10**(10): 5324-5332.
- Takahashi, M., *et al.* (1985). "Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement." *Cell* **42**(2): 581-588.
- Takeda, K., *et al.* (2001). "Osmotic stress-mediated activation of RET kinases involves intracellular disulfide-bonded dimer formation." *Antioxid Redox Signal* **3**(3): 473-482.
- Tanaka, S., *et al.* (1994). "C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8): 3443-3447.
- Tanoue, T., *et al.* (2000). "A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators." *Nat Cell Biol* **2**(2): 110-116.
- Tansey, M. G., *et al.* (2000). "GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival." *Neuron* **25**(3): 611-623.
- Taub, N., *et al.* (2007). "Late endosomal traffic of the epidermal growth factor receptor ensures spatial and temporal fidelity of mitogen-activated protein kinase signaling." *Mol Biol Cell* **18**(12): 4698-4710.
- Teis, D., *et al.* (2006). "p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis." *J Cell Biol* **175**(6): 861-868.
- Teis, D., *et al.* (2002). "Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction." *Dev Cell* **3**(6): 803-814.
- Thoenen, H., *et al.* (1987). "The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **109**: 145-178.
- Thomas, S. M., *et al.* (1992). "Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases." *Cell* **68**(6): 1031-1040.
- Tietze, C., *et al.* (1980). "Chloroquine and ammonium ion inhibit receptor-mediated endocytosis of mannose-glycoconjugates by macrophages: apparent inhibition of receptor recycling." *Biochem Biophys Res Commun* **93**(1): 1-8.
- Toda, M., *et al.* (1999). "Suppression of an actin-binding protein, drebrin, by antisense transfection attenuates neurite outgrowth in neuroblastoma B104 cells." *Brain Res Dev Brain Res* **114**(2): 193-200.
- Tomac, A., *et al.* (1995). "Retrograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor in the adult nigrostriatal system suggests a trophic role in the adult." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(18): 8274-8278.
- Tomac, A. C., *et al.* (2002). "Effects of cerebral ischemia in mice deficient in Persephin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9521-9526.
- Traber, J., *et al.* (1974). "Morphine antagonizes the action of prostaglandin in neuroblastoma cells but not of prostaglandin and noradrenaline in glioma and glioma times fibroblast hybrid cells." *FEBS Lett* **49**(2): 260-263.
- Trupp, M., *et al.* (1997). "Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS." *J Neurosci* **17**(10): 3554-3567.
- Trupp, M., *et al.* (1999). "Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells." *J Biol Chem* **274**(30): 20885-20894.
- Tsien, R. Y., *et al.* (1993). "FRET for studying intracellular signalling." *Trends Cell Biol* **3**(7): 242-245.
- Tsui-Pierchala, B. A., *et al.* (2002a). "The long and short isoforms of Ret function as independent signaling complexes." *J Biol Chem* **277**(37): 34618-34625.
- Tsui-Pierchala, B. A., *et al.* (2002b). "Lipid rafts in neuronal signaling and function." *Trends Neurosci* **25**(8): 412-417.
- Tsui-Pierchala, B. A., *et al.* (2002c). "NGF utilizes c-Ret via a novel GFL-independent, inter-RTK signaling mechanism to maintain the trophic status of mature sympathetic neurons." *Neuron* **33**(2): 261-273.
- Tsui, C. C. und B. A. Pierchala (2008). "CD2AP and Cbl-3/Cbl-c constitute a critical checkpoint in the regulation of ret signal transduction." *J Neurosci* **28**(35): 8789-8800.
- Tsui, C. C. und B. A. Pierchala (2010). "The differential axonal degradation of Ret accounts for cell-type-specific function of glial cell line-derived neurotrophic factor as a retrograde survival factor." *J Neurosci* **30**(15): 5149-5158.

- Uchida, M., *et al.* (2006). "Dok-4 regulates GDNF-dependent neurite outgrowth through downstream activation of Rap1 and mitogen-activated protein kinase." *J Cell Sci* **119**(Pt 15): 3067-3077.
- Ullrich, O., *et al.* (1996). "Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome." *J Cell Biol* **135**(4): 913-924.
- Urdiales, J. L., *et al.* (1998). "Cell cycle phase-specific surface expression of nerve growth factor receptors TrkA and p75(NTR)." *J Neurosci* **18**(17): 6767-6775.
- Valdez, G., *et al.* (2005). "Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors." *J Neurosci* **25**(21): 5236-5247.
- Valdez, G., *et al.* (2007). "Trk-signaling endosomes are generated by Rac-dependent macroendocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(30): 12270-12275.
- Vallenius, T., *et al.* (2000). "CLP-36 PDZ-LIM protein associates with nonmuscle alpha-actinin-1 and alpha-actinin-4." *J Biol Chem* **275**(15): 11100-11105.
- van der Blik, A. M., *et al.* (1993). "Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation." *J Cell Biol* **122**(3): 553-563.
- Van Obberghen, E. (1994). "Signalling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor." *Diabetologia* **37 Suppl 2**: S125-134.
- van Weering, D. H. und J. L. Bos (1997). "Glial cell line-derived neurotrophic factor induces Ret-mediated lamellipodia formation." *J Biol Chem* **272**(1): 249-254.
- van Weering, D. H., *et al.* (1998a). "Protein kinase B activation and lamellipodium formation are independent phosphoinositide 3-kinase-mediated events differentially regulated by endogenous Ras." *Mol Cell Biol* **18**(4): 1802-1811.
- van Weering, D. H., *et al.* (1995). "Ret receptor tyrosine kinase activates extracellular signal-regulated kinase 2 in SK-N-MC cells." *Oncogene* **11**(11): 2207-2214.
- van Weering, D. H., *et al.* (1998b). "Expression of the receptor tyrosine kinase Ret on the plasma membrane is dependent on calcium." *J Biol Chem* **273**(20): 12077-12081.
- Vanlandingham, P. A. und B. P. Ceresa (2009). "Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration." *J Biol Chem* **284**(18): 12110-12124.
- Varma, R. und S. Mayor (1998). "GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface." *Nature* **394**(6695): 798-801.
- Vieira, A. V., *et al.* (1996). "Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis." *Science* **274**(5295): 2086-2089.
- Vivanco, I. und C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(7): 489-501.
- Walker, K. S., *et al.* (1998). "Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha." *Biochem J* **331** (Pt 1): 299-308.
- Wang, L. H., *et al.* (1993a). "Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation." *J Cell Biol* **123**(5): 1107-1117.
- Wang, L. M., *et al.* (2004a). "Identification of the key amino acids of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha1 involved in its biological function." *J Biol Chem* **279**(1): 109-116.
- Wang, S., *et al.* (2004b). "QSulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(14): 4833-4838.
- Wang, X., *et al.* (2004c). "SH2-B is a positive regulator of nerve growth factor-mediated activation of the Akt/Forkhead pathway in PC12 cells." *J Biol Chem* **279**(1): 133-141.
- Wang, X. M., *et al.* (1993b). "A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release." *Hum Immunol* **37**(4): 264-270.
- Watson, F. L., *et al.* (2001). "Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response." *Nat Neurosci* **4**(10): 981-988.
- Weiner, M. P. und G. L. Costa (1994). "Rapid PCR site-directed mutagenesis." *PCR Methods Appl* **4**(3): S131-136.
- Weiner, M. P., *et al.* (1994). "Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction." *Gene* **151**(1-2): 119-123.
- Wilson, B. S., *et al.* (2000). "Observing FcepsilonRI signaling from the inside of the mast cell membrane." *J Cell Biol* **149**(5): 1131-1142.
- Windisch, M., *et al.* (1998). "Neurotrophic activities and therapeutic experience with a brain derived peptide preparation." *J Neural Transm Suppl* **53**: 289-298.
- Wollert, T. und J. H. Hurley (2010). "Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes." *Nature* **464**(7290): 864-869.

- Wood, K. W., *et al.* (1992). "ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK." *Cell* **68**(6): 1041-1050.
- Worby, C. A., *et al.* (1998). "Identification and characterization of GFRalpha-3, a novel Co-receptor belonging to the glial cell line-derived neurotrophic receptor family." *J Biol Chem* **273**(6): 3502-3508.
- Wu, C., *et al.* (2001). "Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes." *J Neurosci* **21**(15): 5406-5416.
- Wu, R., *et al.* (1996). "Specificity of LIM domain interactions with receptor tyrosine kinases." *J Biol Chem* **271**(27): 15934-15941.
- Xia, Z., *et al.* (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." *Science* **270**(5240): 1326-1331.
- Xing, L., *et al.* (2000). "c-Src signaling induced by the adapters Sin and Cas is mediated by Rap1 GTPase." *Mol Cell Biol* **20**(19): 7363-7377.
- Yamada, M., *et al.* (1996). "PC12h-R cell, a subclone of PC12 cells, shows EGF-induced neuronal differentiation and sustained signaling." *J Neurosci Res* **43**(3): 355-364.
- Yamada, T., *et al.* (2005). "RA-RhoGAP, Rap-activated Rho GTPase-activating protein implicated in neurite outgrowth through Rho." *J Biol Chem* **280**(38): 33026-33034.
- Yamazaki, M., *et al.* (2009). "Genipin suppresses A23187-induced cytotoxicity in neuro2a cells." *Biol Pharm Bull* **32**(6): 1043-1046.
- Yang, T. T., *et al.* (1998). "Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein." *J Biol Chem* **273**(14): 8212-8216.
- Yang, Y. and C. Han (2010). "GDNF stimulates the proliferation of cultured mouse immature Sertoli cells via its receptor subunit NCAM and ERK1/2 signaling pathway." *BMC Cell Biol* **11**: 78.
- Yoong, L. F., *et al.* (2005). "Tissue expression of alternatively spliced GFRalpha1, NCAM and RET isoforms and the distinct functional consequence of ligand-induced activation of GFRalpha1 isoforms." *Brain Res Mol Brain Res* **139**(1): 1-12.
- Yoong, L. F. and H. P. Too (2007). "Glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin inhibit neurite outgrowth and activate RhoA through GFR alpha 2b, an alternatively spliced isoform of GFR alpha 2." *J Neurosci* **27**(21): 5603-5614.
- Yoong, L. F., *et al.* (2009). "GDNF-induced cell signaling and neurite outgrowths are differentially mediated by GFRalpha1 isoforms." *Mol Cell Neurosci* **41**(4): 464-473.
- York, R. D., *et al.* (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**(21): 8069-8083.
- York, R. D., *et al.* (1998). "Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor." *Nature* **392**(6676): 622-626.
- Yuyama, K., *et al.* (2006). "Chloroquine-induced endocytic pathway abnormalities: Cellular model of GM1 ganglioside-induced Abeta fibrillogenesis in Alzheimer's disease." *FEBS Lett* **580**(30): 6972-6976.
- Zerial, M. and H. Stenmark (1993). "Rab GTPases in vesicular transport." *Curr Opin Cell Biol* **5**(4): 613-620.
- Zhang, Y., *et al.* (2000). "Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation." *J Neurosci* **20**(15): 5671-5678.
- Zhang, Y., *et al.* (2006). "Interaction of SH2-Bbeta with RET is involved in signaling of GDNF-induced neurite outgrowth." *J Cell Sci* **119**(Pt 8): 1666-1676.
- Zhou, Q., *et al.* (1999). "Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to alpha-actinin-2 and protein kinase C." *J Biol Chem* **274**(28): 19807-19813.

ANHANG

I VERWENDETE PLASMIDE

Plasmid	Selektionsmarker	Beschreibung	Referenz
pEGFP-hRab4a	KanaR	hRab4a in pEGFP-C3 über XhoI/HindIII	Marino Zerial
pEGFP-hRab5a	KanaR	hRab5a in pEGFP-C3 über HindIII/PstI	Marino Zerial
pEGFP-Rab11	KanaR	Rab11 in pEGFP-C3 über XhoI/HindIII	Marino Zerial
pEGFP-Rab9	KanaR	Rab9 in pEGFP-C3	Suzanne Pfeffer
pGfra1	AmpR	mGfra1 in pCMV-SPORT6.1 über EcoRV/NotI	Sascha Browski
pEYFP-Rab11	KanaR	Rab11 in pEYFP-C1	Tim Take*
pRAS1	AmpR	RET9 in pGEMT-easy	Roland Seibt
pRAS2	AmpR, NeoR	Gfra1 in pcDNA3.1(+) über BamHI/EcoRI	Roland Seibt
pUS1	AmpR	mGFR α 2 in pGEMT-easy über BamHI/EcoRI	Ulrike Strunk*
pUS2	AmpR, NeoR	mGFR α 2 in pcDNA3.1(+) über BamHI und EcoRI	Ulrike Strunk*
pRAS13	AmpR	RET9 +Kozak -Stop in pGEMT-easy	Roland Seibt
pRAS14	KanaR, NeoR	RET9 +Kozak -Stop in pEGFP-N1 über KpnI und Sall	Roland Seibt
pRAS6	KanaR	Wdfy2 in pEYFP-C1 über EcoRI und XhoI	Susanne Schöning
pRAS7	KanaR, NeoR	Ret9 -stop +Kozak in pECFP-N1 über KpnI/Sall	Roland Seibt
pRAS8	AmpR	Ret51 K2 in pGEMT-easy	Roland Seibt
pRAS9	AmpR	pGEMTeasy Ret51 +Kozak -Stop K2	Roland Seibt
pRAS10	AmpR	pGEMTeasy Ret51 +Kozak -Stop K4	Roland Seibt
pRAS11	KanaR, NeoR	RET51 +Kozak -stop über Sall-KpnI in pEGFP-N1	Roland Seibt
pRAS12	KanaR, NeoR	RET51 +Kozak -stop über Sall-KpnI in pECFP-N1	Roland Seibt
pDC1 (Rab9-YFP)	KanaR	Rab9 über Sall/BamHI in pEYFP-C1	Diana Chowdry
pDC3 (Rab11-YFP)	KanaR	Rab11 über Sall/BamHI in pEYFP-C1	Diana Chowdry
pDC6 (Rab5a-YFP)	KanaR	Rab5a in pEYFP-C1 über Sall/BamHI	Diana Chowdry
pRAS15	KanaR	Rapgef1 (C3G) Mus MusculusIRCLp5011 sequenziert	Sonja Brockmeyer*

pRAS16	AmpR	mRap1a in pGEMTeasy über EcoRI/XhoI	Sonja Brockmeyer*
pRAS17	AmpR	mC3G in pGEMTeasy über XhoI/HindIII	Sonja Brockmeyer*
pRAS18	KanaR, NeoR	mRap1a in pECFP-C1 über EcoRI/XhoI	Sonja Brockmeyer*
pRAS19	KanaR, NeoR	mRap1a in pEYFP-C1 über EcoRI und XhoI	Sonja Brockmeyer*
pRAS20	KanaR, NeoR	mC3G über XhoI und HindIII	Sonja Brockmeyer*
pRAS21	KanaR, NeoR	Dynamin2 Wildtyp	Mark McNiven
pRAS22	KanaR, NeoR	Dynamin2 K44A dominant negative Mutante	Mark McNiven
pRAS23	KanaR, NeoR	Eps15 E Δ 95/295 (EH29)	Dr. Alexandre Benmerah
pRAS24	KanaR, NeoR	Eps15 DIII	Dr. Alexandre Benmerah
pRAS25	KanaR, NeoR	Eps15 D3 Δ 2	Dr. Alexandre Benmerah
pRAS26	AmpR	pGEX-2T RALGefRBD 1-97	Prof. Alfred Wittinghofer
pRAS27	KanaR	Rab7 in pEYFP-C1 KpnI/XhoI	Svenja Bruns*
pRAS28	AmpR, KanaR	pDZ-GEF2 in pCR4-Topo Klon	Simone Schmücker*
pRAS29	KanaR	Eps15D3 Δ 2-pEGFP-C2 aus DH5 α in Dam-negative GM2163	Svenja Bruns*
pRAS30	KanaR	Eps15D3-pEGFP-C2 aus DH5 α in Dam-negative GM2163	Svenja Bruns*
pRAS31	KanaR	pEYFP-C1 from DH5 α in Dam-negative GM2163	Svenja Bruns*
pRAS32	KanaR	Eps15DIII (in GM2163) über XhoI/XbaI in pEYFP-C1 (in GM2163)	Svenja Bruns*
pRAS33	KanaR	Eps15DIII Δ 2 (in GM2163) über XhoI/XbaI in pEYFP-C1 (in GM2163)	Svenja Bruns*
pRAS35	KanaR	DNM2 Wildtyp in pVenus-N1 über HindIII/SmaI	Simone Schmücker*
pRAS36	KanaR	DNM2 K44A in pVenus-N1 über HindIII/SmaI	Simone Schmücker*
pRAS34	KanaR	hRab4a über Sall/BamHI in pEYFP-C1	Svenja Bruns*
pRAS37	KanaR	PDZ-GEF in pEYFP-C1 über XhoI/SacII	Simone Schmücker*
pRAS38	AmpR	PDZ-GEF in pGEM-Teasy über T/A-Klonierung	Simone Schmücker*
pRAS39	AmpR	PDZ-GEF in pGEM-Teasy über T/A-Klonierung	Simone Schmücker*

* = Bachelor- und Masterstudenten/innen

II SEQUENZIERUNGEN

II.I RET9 +KOZAKSEQUENZ –STOPPCODON

T7 Primer: Query; murine RET9 CDS: Sbjct

```

Query 54  ATGGCGAAAGCGACGTCCGGCGCCGCAGGGCTGGGGCTGAAGCTGATTTTGCTCCTGCCG 113
          |||
Sbjct 1   ATGGCGAAAGCGACGTCCGGCGCCGCAGGGCTGGGGCTGAAGCTGATTTTGCTCCTGCCG 60

Query 114 CTGCTAGGAGAAGCCCCACTGGGCCTCTATTTCTCAAGGGATGCTTACTGGGAGAGGCTG 173
          |||
Sbjct 61  CTGCTAGGAGAAGCCCCACTGGGCCTCTATTTCTCAAGGGATGCTTACTGGGAGAGGCTG 120

Query 174  TATGTAGACCAGCCAGCTGGCACACCTCTGCTCTATGTCCATGCCCTACGGGATGCCCT 233
          |||
Sbjct 121 TATGTAGACCAGCCAGCTGGCACACCTCTGCTCTATGTCCATGCCCTACGGGATGCCCT 180

Query 234  GGAGAAGTGCCGAGCTTCCGCCTGGGCCAGCATCTCTATGGCGTCTACCGTACACGGCTG 293
          |||
Sbjct 181  GGAGAAGTGCCGAGCTTCCGCCTGGGCCAGCATCTCTATGGCGTCTACCGTACACGGCTG 240

Query 294  CATGAGAATGACTGGATCCGCATCAATGAGACTACTGGCCTTCTCTACCTCAATCAGAGC 353
          |||
Sbjct 241  CATGAGAATGACTGGATCCGCATCAATGAGACTACTGGCCTTCTCTACCTCAATCAGAGC 300

Query 354  CTGGACCACAGTTCTGGGAACAGCTCAGCATCCGCAATGGTGGTTTCCCCCTGCTCACC 413
          |||
Sbjct 301  CTGGACCACAGTTCTGGGAACAGCTCAGCATCCGCAATGGTGGTTTCCCCCTGCTCACC 360

Query 414  ATCTTCTCCAGGTCTTTCTGGGGTCCACAGCCAGAGAGAGGGAGAATGCCATTGGCCA 473
          |||
Sbjct 361  ATCTTCTCCAGGTCTTTCTGGGGTCCACAGCCAGAGAGAGGGAGAATGCCATTGGCCA 420

Query 474  GGCTGTACCCGTGTGTACTTCTCCTTCATCAACGACACCTCCCAAATTGTAGCTCCTTC 533
          |||
Sbjct 421  GGCTGTACCCGTGTGTACTTCTCCTTCATCAACGACACCTCCCAAATTGTAGCTCCTTC 480

Query 534  AAAGCCCAGGATCTCTGCATCCCAGAGACAGCCGTGTCTTCCGAGTCAGGGAGAACAGG 593
          |||
Sbjct 481  AAAGCCCAGGATCTCTGCATCCCAGAGACAGCCGTGTCTTCCGAGTCAGGGAGAACAGG 540

Query 594  CCTCCTGGCACCTTCTACCACTTCCACATGTTACCCGTGCAGTTCTTTGTCCCAACATC 653
          |||
Sbjct 541  CCTCCTGGCACCTTCTACCACTTCCACATGTTACCCGTGCAGTTCTTTGTCCCAACATC 600

Query 654  AGTGTGAAGTACAGTCTCTTAGGAGGGGATAGTCTGCCCTTCCGTTGTGACCCAGACTGC 713
          |||
Sbjct 601  AGTGTGAAGTACAGTCTCTTAGGAGGGGATAGTCTGCCCTTCCGTTGTGACCCAGACTGC 660

Query 714  CTGGAGGTGAGCACTCGCTGGGCCCTGGATCGAGAGCTCCGGGAGAAGTATGTGCTGGAG 773
          |||
Sbjct 661  CTGGAGGTGAGCACTCGCTGGGCCCTGGATCGAGAGCTCCGGGAGAAGTATGTGCTGGAG 720

```

mret9 cDNA 1 F Primer: Query; murine RET9 CDS: Sbjct

```

Query 72  GCTTTGTGCATAG 84
          |||
Sbjct 721 GCTTTGTGCATAG 733

Query 85  TGGCAGGCCCTGGTGCCAACAAAGAGACGGTGACTCTGTCCTTCCCAGTGACAGTATATG 144
          |||
Sbjct 734  TGGCAGGCCCTGGTGCCAACAAAGAGACGGTGACTCTGTCCTTCCCAGTGACAGTGTATG 793

Query 145  ATGAGGACGACTCGGCGCCACCTTCTCTGGAGGTGTGGGCACTGCCAGCGCGGTGGTGG 204
          |||
Sbjct 794  ATGAGGACGACTCGGCGCCACCTTCTCTGGAGGTGTGGGCACTGCCAGCGCGGTGGTGG 853

Query 205  AGTTTAAAGCGGAAGGAGGGCACTGTGGTGGCCACCCTGCAGGTGTTTCGATGCAGATGTGG 264
          |||
Sbjct 854  AGTTTAAAGCGGAAGGAGGGCACTGTGGTGGCCACCCTGCAGGTGTTTCGATGCAGATGTGG 913

```

Query	265	TGCCAGCGTCTGGGGAGCTGGTGAGACGGTACACAAACACACTCCTCTCAGGGGACTCCT	324
Sbjct	914	TGCCAGCGTCTGGGGAGCTGGTGAGACGGTACACAAACACACTCCTCTCAGGGGACTCCT	973
Query	325	GGGCCCAGCAGACCTTCCGGGTGGAGCATTTCGCCCATCGAGACCTTGGTCCAGGTCAACA	384
Sbjct	974	GGGCCCAGCAGACCTTCCGGGTGGAGCATTTCGCCCATCGAGACCTTGGTCCAGGTCAACA	1033
Query	385	ACAACCTCCGTTCCGGGCAACCATGCACAATTACAAGCTGATTCTCAACAGGAGCCTGTCTA	444
Sbjct	1034	ACAACCTCCGTTCCGGGCAACCATGCACAATTACAAGCTGATTCTCAACAGGAGCCTGTCTA	1093
Query	445	TCTCAGAGAGCCGAGTCTGCAGCTCGCGGTCTGGTCAACGACTCAGACTTCCAGGGGC	504
Sbjct	1094	TCTCAGAGAGCCGAGTCTGCAGCTCGCGGTCTGGTCAACGACTCAGACTTCCAGGGGC	1153
Query	505	CTGGGGCAGGTGGTATCCTCGTCTCCATTTCAACGTGTCTGTAAGTCCCGTCAACCTGA	564
Sbjct	1154	CTGGGGCAGGTGGTATCCTCGTCTCCATTTCAACGTGTCTGTAAGTCCCGTCAACCTGA	1213
Query	565	ACCTACCCAGGGCCTACTCCTTCCAGTGAATAAGAGGGCCCGCGCTATGCCAGATCG	624
Sbjct	1214	ACCTACCCAGGGCCTACTCCTTCCAGTGAATAAGAGGGCCCGCGCTATGCCAGATCG	1273
Query	625	GGAAAGTCTGTGTGGAAAAGTCCAGGAGTTCAGCGGTGTCTCCATCCAGTACA	678
Sbjct	1274	GGAAAGTCTGTGTGGAAAAGTCCAGGAGTTCAGCGGTGTCTCCATCCAGTACA	1327

mret9 cDNA 2 F Primer: Query; murine RET9 CDS: Sbjct

Query	20	AGCTGCAGCCTTCCAGCATCAACTGCACTGCCCTAGGTGTGGTACCTCACCCGAGGACA	79
Sbjct	1328	AGCTGCAGCCTTCCAGCATCAACTGCACTGCCCTAGGTGTGGTACCTCACCCGAGGACA	1387
Query	80	CCTCGGGGACCCTATTTGTAATGACACAGAGGCCCTGCGGGCAGCTGAGTGACCAAGC	139
Sbjct	1388	CCTCGGGGACCCTATTTGTAATGACACAGAGGCCCTGCGGGCAGCTGAGTGACCAAGC	1447
Query	140	TTCAGTACACGGTGGTAGCCACTGACCGGCAGACCCGCAGACAGACCCAGGCTTCGCTAG	199
Sbjct	1448	TTCAGTACACGGTGGTAGCCACTGACCGGCAGACCCGCAGACAGACCCAGGCTTCGCTAG	1507
Query	200	TGGTCACTGTGGAGGGGACATCCATTACTGAAGAAGTAGGCTGCCCAAGTCTGTGCAG	259
Sbjct	1508	TGGTCACTGTGGAGGGGACATCCATTACTGAAGAAGTAGGCTGCCCAAGTCTGTGCAG	1567
Query	260	TAAACAAGAGGGCGCCCGAGTGTGAGGAATGTGGTGGCCTGGGTTCTCCAAGTGGCAGGT	319
Sbjct	1568	TAAACAAGAGGGCGCCCGAGTGTGAGGAATGTGGTGGCCTGGGTTCTCCAAGTGGCAGGT	1627
Query	320	GCGAGTGGCGCCAGGGAGATGGTAAAGGGATCACCAGGAAGTCTCCACCTGCTCCCCCA	379
Sbjct	1628	GCGAGTGGCGCCAGGGAGATGGTAAAGGGATCACCAGGAAGTCTCCACCTGCTCCCCCA	1687
Query	380	GTACCAGGACCTGCCCGACGGCCACTGTGATGCTGTGGAGAGCCGGGATGCCAACATTT	439
Sbjct	1688	GTACCAGGACCTGCCCGACGGCCACTGTGATGCTGTGGAGAGCCGGGATGCCAACATTT	1747
Query	440	GCCCCAGGACTGTCTCCGTGCCGACATTGTTGGAGGACACGAGCGAGGGGAGCGCCAGG	499
Sbjct	1748	GCCCCAGGACTGTCTCCGTGCCGACATTGTTGGAGGACACGAGCGAGGGGAGCGCCAGG	1807
Query	500	GCATTAAGCAGGCTACGGCATCTGCAACTGTTTCCCTGATGAGAAGAAATGCTTCTGCG	559
Sbjct	1808	GCATTAAGCAGGCTACGGCATCTGCAACTGTTTCCCTGATGAGAAGAAATGCTTCTGCG	1867
Query	560	AGCCAGAGGACAGCCAGGGCCCACTGTGTGATGCGCTGTGCCGCACGATCATCACAGCTG	619
Sbjct	1868	AGCCAGAGGACAGCCAGGGCCCACTGTGTGATGCGCTGTGCCGCACGATCATCACAGCTG	1927
Query	620	CCCTCTTCTCCCTTATCATCTCCATCCTGCTGTCCATCTTCTGTGTCTGCCACCACCACA	679
Sbjct	1928	CCCTCTTCTCCCTTATCATCTCCATCCTGCTGTCCATCTTCTGTGTCTGCCACCACCACA	1987

mret9 cDNA 3 F Primer: Query; murine RET9 CDS: Sbjct

```

Query 49   AGCATGGGCACAAGCCGCCATTGCATCAGCGGAAATGACCTTCTGC 95
          |||
Sbjct 1988  AGCATGGGCACAAGCCGCCATTGCATCAGCGGAAATGACCTTCTGC 2034

Query 96   CGGCCGGCCAGGGCTTCCCAATCAGTTATTCTCCTCAGGCACCCGCCGGCCCTCACTG 155
          |||
Sbjct 2035  CGGCCGGCCAGGGCTTCCCAATCAGTTATTCTCCTCAGGCACCCGCCGGCCCTCACTG 2094

Query 156  GATTCCACGGAGAACCAGGTTCTGTGGACTCTTTCAAGATCCCGGAGGATCCAAAGTGG 215
          |||
Sbjct 2095  GATTCCACGGAGAACCAGGTTCTGTGGACTCTTTCAAGATCCCGGAGGATCCAAAGTGG 2154

Query 216  GAATTTCTCGGAAGAACTTAGTTCTTGGGAAAACCTCTGGGAGAAGGCGAGTTTGAAAA 275
          |||
Sbjct 2155  GAATTTCTCGGAAGAACTTAGTTCTTGGGAAAACCTCTGGGAGAAGGCGAGTTTGAAAA 2214

Query 276  GTTGTCAAGGCCACAGCCTTCCGTCTGAAAGGCCGGGCAGGATACACCACAGTGGCTGTG 335
          |||
Sbjct 2215  GTTGTCAAGGCCACAGCCTTCCGTCTGAAAGGCCGGGCAGGATACACCACAGTGGCTGTG 2274

Query 336  AAAATGCTGAAAGAAAACGCCTCCAGAGTGAGTTACGAGACCTGCTGTCTGAGTTCAAC 395
          |||
Sbjct 2275  AAAATGCTGAAAGAAAACGCCTCCAGAGTGAGTTACGAGACCTGCTGTCTGAGTTCAAC 2334

Query 396  CTTCTGAAACAAGTCAACCATCCACATGTATCAAGTTGTATGGGGCCTGCAGCCAGGAT 455
          |||
Sbjct 2335  CTTCTGAAACAAGTCAACCATCCACATGTATCAAGTTGTATGGGGCCTGCAGCCAGGAT 2394

Query 456  GGGCCACTTCTTCTCATTGTGGAGTATGCCAAGTATGGCTCCCTGCGGGGATTCTCCGT 515
          |||
Sbjct 2395  GGGCCACTTCTTCTCATTGTGGAGTATGCCAAGTATGGCTCCCTGCGGGGATTCTCCGT 2454

Query 516  GACAGCCGCAAGATTGGGCTGCCTATGTGAGCGGTGGAGGCAGCCGCAACTCCAGCTCG 575
          |||
Sbjct 2455  GACAGCCGCAAGATTGGGCTGCCTATGTGAGCGGTGGAGGCAGCCGCAACTCCAGCTCG 2514

```

mret9 cDNA 4 F Primer: Query; murine RET9 CDS: Sbjct

```

Query 95   CTGGACCACCCAGATGAAAGGGTACTGACCATGGGTG 131
          |||
Sbjct 2515  CTGGACCACCCAGATGAAAGGGTACTGACCATGGGTG 2551

Query 132  ACCTCATCTCCTTCGCCTGGCAGATCTCGAGGGGTATGCAGTACTTGGCAGAAATGAAGC 191
          |||
Sbjct 2552  ACCTCATCTCCTTCGCCTGGCAGATCTCGAGGGGTATGCAGTACTTGGCAGAAATGAAGC 2611

Query 192  TTGTACATCGGGACTTAGCTGCCAGGAACATCTTGGTGGCTGAGGGACGGAAGATGAAGA 251
          |||
Sbjct 2612  TTGTACATCGGGACTTAGCTGCCAGGAACATCTTGGTGGCTGAGGGACGGAAGATGAAGA 2671

Query 252  TTTCCGACTTTGGGCTGTCCCGAGATGTTTATGAGGAAGATTCTATGTGAAGAAAAGCA 311
          |||
Sbjct 2672  TTTCCGACTTTGGGCTGTCCCGAGATGTTTATGAGGAAGATTCTATGTGAAGAAAAGCA 2731

Query 312  AGGGCCGATTCCCGTCAAGTGGATGGCAATTGAGTCCCTTTTCGATCACATCTATACTA 371
          |||
Sbjct 2732  AGGGCCGATTCCCGTCAAGTGGATGGCAATTGAGTCCCTTTTCGATCACATCTATACTA 2791

Query 372  CTCAAAGTATGTGTGGTCTTTGGAGTGCTGCTCTGGGAGATTGTGACCCTGGGAGGCA 431
          |||
Sbjct 2792  CTCAAAGTATGTGTGGTCTTTGGAGTGCTGCTCTGGGAGATTGTGACCCTGGGAGGCA 2851

Query 432  ACCCTACCCTGGAATTCCTCCTGAACGACTCTTCAACCTTCTGAAGACAGGCCACAGGA 491
          |||
Sbjct 2852  ACCCTACCCTGGAATTCCTCCTGAACGACTCTTCAACCTTCTGAAGACAGGCCACAGGA 2911

```

Sp6m 5' reverse Primer: Query; murine RET9 CDS: Sbjct

```

Query 109  GAATCTAGTAAATGCATGTGAAATTCTACCATAGAGCTTGTTTTCAATCCATGTGGAAGG 168
          |||
Sbjct 3219  GAATCTAGTAAATGCATGTGAAATTCTACCATAGAGTTTGTTTTCAATCCATGTGGAAGG 3160

```

Query	169	GAGGGAGCGCGGGAGGGGAGCATTGTTACAGTCCACCAGGGGTGTCTCCTCTTCTGAGAG	228
Sbjct	3159	GAGGGAGCGCGGGAGGGGAGCATTGTTACAGTCCACCAGGGGTGTCTCCTCTTCTGAGAG	3100
Query	229	CCCATCGTCATACAGCAGTGAGTCCGAAGGTGTGGATGCAGCCAGGTCCAAGTAGTCTCT	288
Sbjct	3099	CCCATCGTCATACAGCAGTGAGTCCGAAGGTGTGGATGCAGCCAGGTCCAAGTAGTCTCT	3040
Query	289	GCTCTTGACCATCATCTTCTCCAGATCCTTGCTGATGTCAGCAAACACTGGCCTCTTGTC	348
Sbjct	3039	GCTCTTGACCATCATCTTCTCCAGATCCTTGCTGATGTCAGCAAACACTGGCCTCTTGTC	2980
Query	349	TGGCTCCTGCTTCCAGCACTGCAGCATCAGACGGTACATTTCTCGCTGCAGTTGTCTGG	408
Sbjct	2979	TGGCTCCTGCTTCCAGCACTGCAGCATCAGACGGTACATTTCTCGCTGCAGTTGTCTGG	2920
Query	409	CCTCTCCA	416
Sbjct	2919	CCTCTCCA	2912

Sbjct 789: GTG → GTA: Stille Mutation für Valin
 Sbjct 3183: AAA → AAG: Stille Mutation für Lysin

II.II RET51 +KOZAKSEQUENZ –STOPPCODON

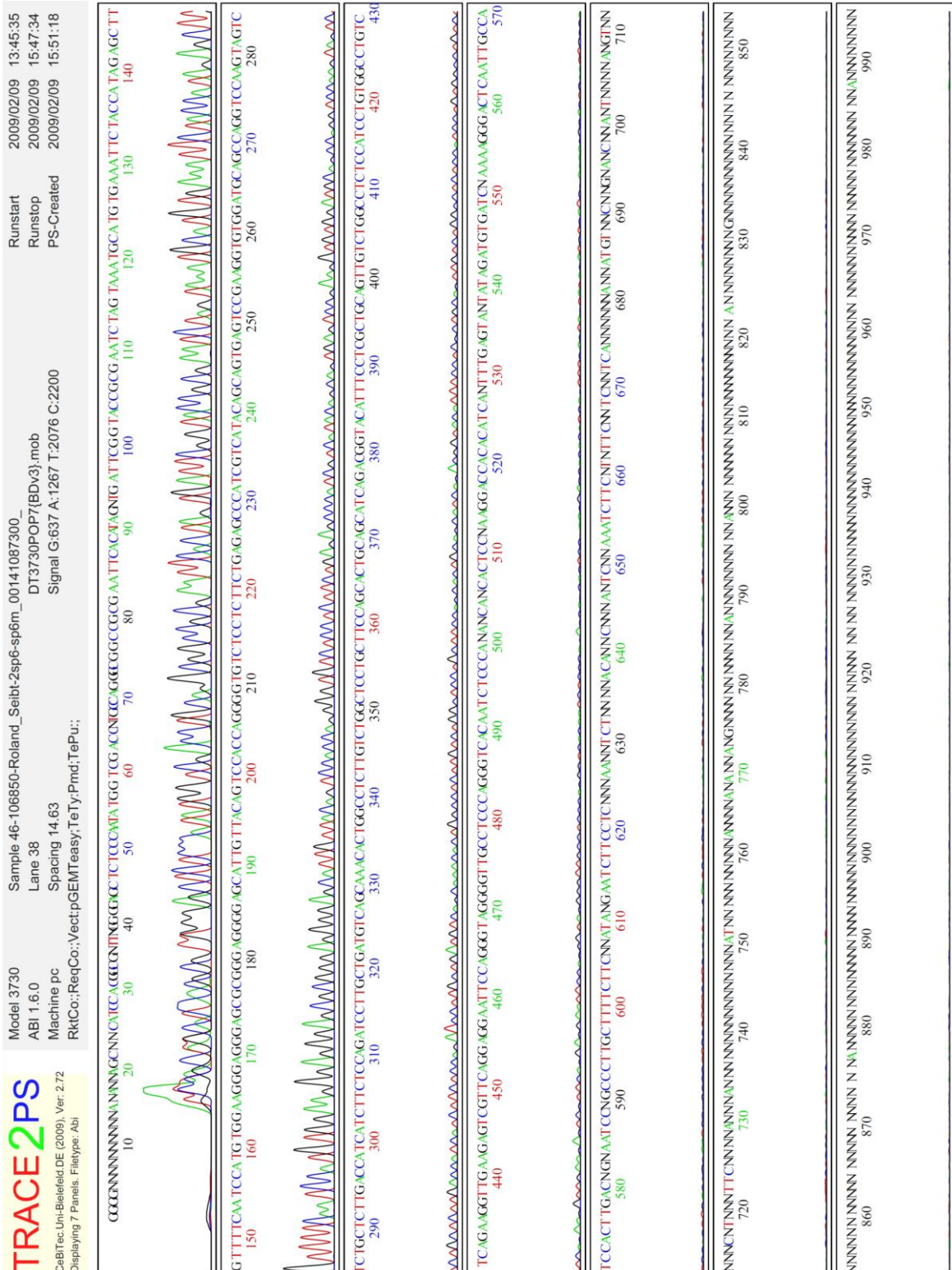
C-terminale Sequenz für die 51 individuellen Aminosäuren:

Sp6m 5' reverse Primer: Query; murine RET51 CDS: Sbjct

Query	84	GCTATCAAATGTGTCCATTAATTTTGCCGCTGAGGGTGAAACCATCCAGTTAGCATATAC	143
Sbjct	3345	GCTATCAAATGTGTCCATTAATTTTGCCGCTGAGGGTGAAACCATCCAGTTAGCATATAC	3286
Query	144	ACTATCATTTGCATATCTTGGGAACCCAGTGCTAGTGCCATCGGCTCTCGTGAGTGGTAC	203
Sbjct	3285	ACTATCATTTGCATATCTTGGGAACCCAGTGCTAGTGCCATCGGCTCTCGTGAGTGGTAC	3226
Query	204	AGGACTCTCTCCAGGCCAGTTCGGGTCTGACATG	241
Sbjct	3225	AGGACTCTCTCCAGGCCAGTTCGGGTCTGACATG	3192

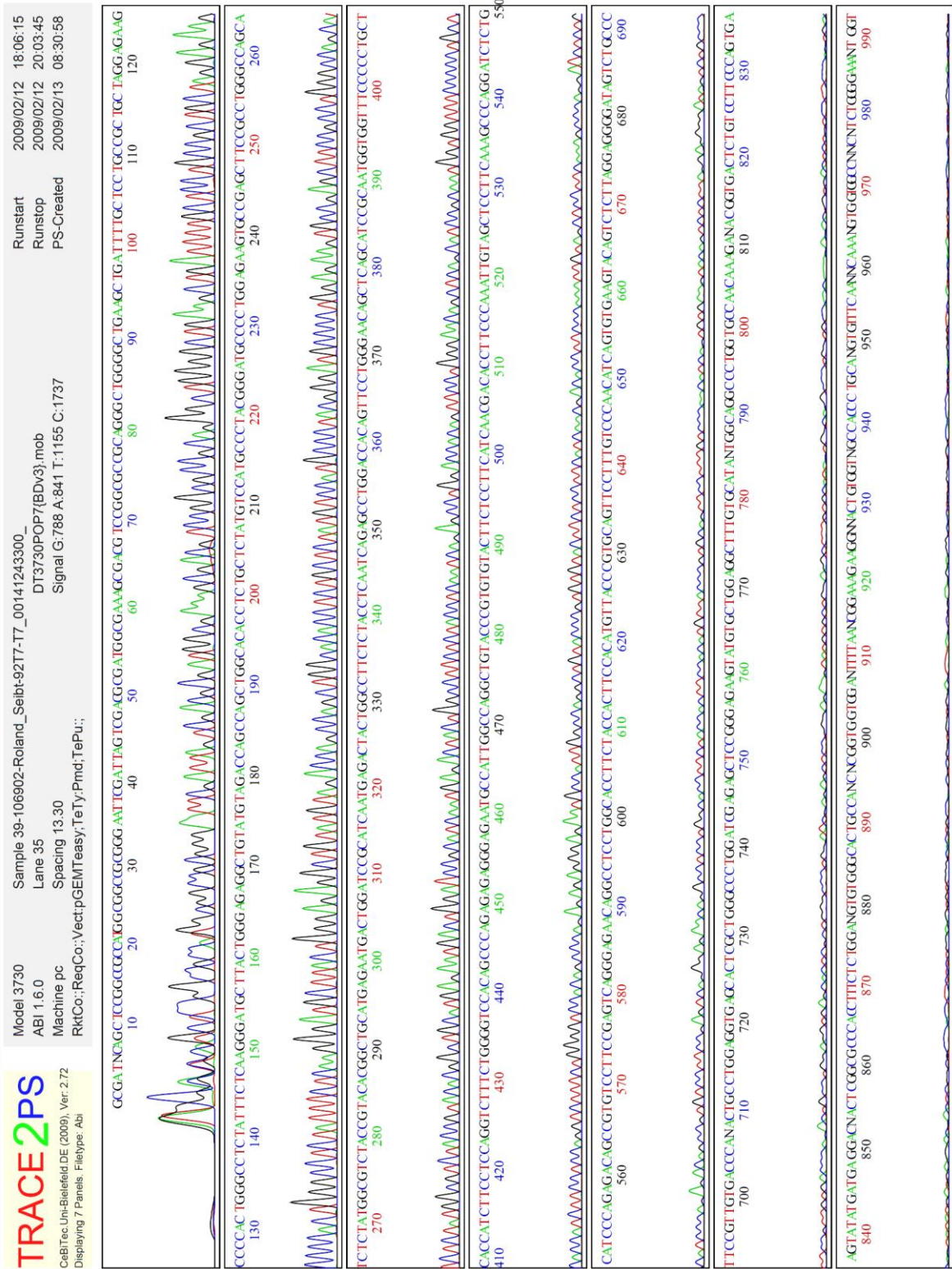
II.III ELEKTROPHEROGRAMME

Elektropherogramm für die Sequenzierung von RET9 mit dem 3'-Primer sp6m:
Bei Query 109 wurde das Stoppcodon deletiert.



Elektropherogramm für die Sequenzierung von RET9 mit dem 5'-Primer T7:

Bei Query 15-24 ist die eingefügte Kozaksequenz dargestellt.



ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Strukturen der RET-Isoformen und des chimären Onkoproteins RET/PTC2.....	9
Abb. 1.2: Übersicht der RET-Autophosphorylierungsstellen und deren Interaktionsproteine.....	10
Abb. 1.3: GDNF-Familie Liganden und ihre Rezeptorinteraktionen.....	11
Abb. 1.4: Interaktionsmodell von Rap1GAP in der GDNF-vermittelten RET-Signaltransduktion.....	18
Abb. 1.5: Verschiedene Endozytosewege der Säugerzelle.....	20
Abb. 1.6: Das endosomale System und die Sortierung von Cargo-Proteinen in Säugerzellen.....	22
Abb. 1.7a: Signalvorgänge an der Plasmamembran und in Endosomen.....	25
Abb. 1.7b: Modell eines retrograden, endosomalen Signalwegs in Neuronen.....	26
Abb. 1.8: Verschiedene Endozytosewege der Zelle und Möglichkeiten zu ihrer Inhibition.....	30
Abb. 1.9: Prinzip von FRET anhand des Fluorophorenpaars CFP und YFP.....	32
Abb. 3.1: Struktur von Resazurin und Resorufin.....	65
Abb. 4.1: Expressionsmuster ausgewählter neuronaler Zelllinien für RET9, RET51 und Gfra1.....	71
Abb. 4.2: Gfra1-Expression der Zelllinien NS20Y, N4TG3, N18TG2, N2a, NG108-15 u. NH15-CA2.....	72
Abb. 4.3: Calcein-AM/PI-Vitalitätstest von N4TG3 Neuroblastomazellen nach GDNF-Stimulation.....	74
Abb. 4.4: Resazurin Vitalitätstest neuronaler Zellen nach GDNF-Stimulation.....	75
Abb. 4.5: Neuritenwachstum von NS20Y und N4TG3 Zellen nach GDNF-Stimulation.....	76
Abb. 4.6: GDNF-induzierte Erk1/2-Aktivierung der Zelllinien N2a, NS20Y, N18TG2 und N4TG3.....	77
Abb. 4.7: Elektrophoretische Auftrennung von aus adultem Mäusehirn extrahierter RNA.....	78
Abb. 4.8: Reaktion von Neuro-2a Zellen auf verschiedene G418-Konzentrationen.....	79
Abb. 4.9: Immunfluoreszenzen ausgewählter Neuro-2a Klone.....	80
Abb. 4.10: Immunblots stabiler N2a Klone und ausgewählter Kontrollen gegen Gfra1 und Gfra2.....	81
Abb. 4.11: Immunfluoreszenzen ausgewählter B104 Klone.....	83
Abb. 4.12: Reaktion stabil transfizierter N2a Gfra1 Klone auf GDNF- und TGF- β -Stimulation.....	85
Abb. 4.13: Neuritenwachstum von Neuro-2a Gfra1 und Gfra2 Zellen nach GFL-Stimulation.....	86
Abb. 4.14: GFL-induzierte Erk1/2-Aktivierung in Neuro-2a Gfra1 und Gfra2 Zellen.....	87
Abb. 4.15: Stimulationsniveau GDNF- und NRTN-vermittelter Erk1/2-Aktivierung in N2a Zellen.....	88
Abb. 4.16: Beteiligung der Akt-Kinase an der GFL-induzierten Signalweiterleitung in N2a Zellen	88
Abb. 4.17: Stimulationsniveau GFL-vermittelter Akt-Aktivierung in Neuro-2a Zellen.....	89
Abb. 4.18: Konfokale Aufnahmen stimulierter und unstimulierter B104 RET9 und RET51 Zellen.....	90
Abb. 4.19: Konfokale Aufnahmen des B104 RET9 Klon RS9.10.....	91
Abb. 4.20: Eine Lokalisation von RET9 in B104 Zellen in den Neuriten ist unabhängig von GDNF.....	92
Abb. 4.21: Konfokale Aufnahmen einer Lyotracker-Lysosomenfärbung in B104 RET51 Zellen.....	92
Abb. 4.22: Kolokalisationsmuster von RET51 und verschiedenen Rab-GTPasen in B104 Zellen.....	93
Abb. 4.23: Vitalität von B104 RET9 Zellen nach GDNF-Stimulation.....	94

Abb. 4.24: Das Neuritenwachstum von B104 RET9 Zellen ist unabhängig von GDNF und NRTN.....	95
Abb. 4.25: GFL-induzierte Erk1/2-Aktivierung in B104 RET9 und RET51 Zellen.....	96
Abb. 4.26: Stimulationsniveau GDNF- und NRTN-vermittelter Erk1/2-Aktivierung in B104.....	97
Abb. 4.27: GFL-induzierte Aktivierung der Akt-Kinase in B104 RET9 und RET51 Zellen.....	98
Abb. 4.28: Stimulationsniveau GDNF- und NRTN-vermittelter Aktivierung von Akt in B104.....	99
Abb. 4.29: Konfokale Aufnahmen von Rap1a in stimulierten und unstimulierten B104 Zellen.....	100
Abb. 4.30: Konfokale Aufnahmen von RapGEF1 in stimulierten und unstimulierten B104 Zellen.....	101
Abb. 4.31: Konfokale Aufnahmen von RapGEF2 in stimulierten und unstimulierten B104 Zellen.....	102
Abb. 4.32: Konfokale Aufnahmen von DNM2 wt und DNM2 K44A in stimulierten B104 Zellen.....	103
Abb. 4.33: Inhibition Clathrin-abhängiger Endozytose in B104 Zellen durch Eps15 DIII.....	104
Abb. 4.34: Auswirkung der Endozytose-Modulation auf die Erk1/2-Aktivierung in B104 RET9.....	105
Abb. 4.35: Erk1/2-Stimulationsniveau nach Modulation der Endozytose in B104 RET9 Zellen.....	106
Abb. 4.36: Auswirkung der Endozytose-Modulation auf die Aktivierung von Akt in B104 RET9.....	107
Abb. 4.37: Stimulationsniveau von Akt nach Modulation der Endozytose in B104 RET9 Zellen.....	108
Abb. 4.38: Einfluss von Dynasore auf die basale Stimulation von Erk1/2 und Akt in B104 RET9.....	109
Abb. 4.39: Einfluss von Dynasore auf die basalen Stimulationsniveaus von Erk1/2 und Akt.....	110
Abb. 4.40: Modulation der Transferrin-Aufnahme in B104 RET9 Zellen.....	111
Abb. 4.41: Erk1/2-Aktivierung in GDNF-stimulierten B104 RET9 nach Sulf1ΔHDC-Inkubation.....	113
Abb. 4.42: Vergleich der GDNF-induzierten Erk1/2-Aktivierung in Abhängigkeit von Sulf1ΔHDC.....	114
Abb. 5.1: Modell der unterschiedlichen Endozytose- und Signalwege von RET9 und RET51.....	152

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
(E)CFP	<i>(enhanced) cyan fluorescent protein</i>
(E)GFP	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>
(E)YFP	<i>(enhanced) yellow fluorescent protein</i>
°C	Grad Celsius
A	Ampere
ACC	<i>accession number</i>
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AM	Acetoxymethylester
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARTN	Artemin
AS	Aminosäure
ATCC	<i>XVmerican type culture collection</i>
ATRA	<i>all-trans-Retinsäure</i>
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaare
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CAD	<i>cationic amphiphilic class of drugs</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAP	<i>c-Cbl associated protein</i>
Cbl	<i>casitas b-lineage lymphoma</i>
CCP	<i>clathrin coated pit</i>
CCV	<i>clathrin coated vesicle</i>
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
CDE	<i>clathrin-dependent endocytosis</i>
cDNA	komplementäre DNA
CDS	<i>coding sequence</i>
CLIC	<i>clathrin-independent carriers</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CrkL	<i>Crk-like protein</i>
c-Src	<i>cellular sarcoma</i>
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
d	Tag
ddH ₂ O	<i>double-distilled water</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	<i>detergent-insoluble complex</i>
DIG	<i>detergent-insoluble glycolipid-rich domain</i>
DIM	<i>detergent-insoluble material</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNM2	Dynamin-2
Dok	<i>downstream of tyrosin kinase</i>
DRG	<i>dorsal root ganglion</i>
DRM	<i>detergent-resistant membrane</i>
ds	<i>double-stranded</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	frühes Endosom
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EH	<i>Eps15-Homology</i>
Eps15	<i>EGFR pathway substrate clone 15</i>
Erk1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1 and 2</i>
Erk5	<i>extracellular signal-regulated kinase 5</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FLIM	<i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>
FMTC	<i>familial medullary thyroid carcinoma</i>
FRET	<i>Förster resonance energy transfer/ fluorescence resonance energy transfer</i>
g	Gramm
G418	Geneticinsulfat
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GEEC	<i>GPI-enriched endocytic compartments</i>
GEF	GDP/GTP-Austauschfaktor
GEM	<i>glycolipid-enriched membrane</i>
GFL	<i>GDNF family of ligands</i>
Gfra	<i>GDNF family receptor α</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GRAF1	<i>GTPase regulator associated with focal adhesion kinase-1</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HS	Heparansulfat
HS	Pferdeserum
ICLC	<i>Interlab cell line collection</i>
IGF1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IKK	I κ B-Kinasekomplex
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kana	Kanamycin
kb	1000 Basenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
LAMP1	<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LB	Luria-Bertani
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDM	<i>low-density membrane</i>
LE	spätes Endosom
LIM	Lin-1, Isl-1 and Mec-3
M	molar
m	Meter
MAP-Kinase, MAPK oder M	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>

Mek oder MK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MEN2	multiple endokrine Neoplasie Typ 2
Met	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MP1	<i>Mek1 partner 1</i>
MPR	Mannosephosphat-Rezeptor
MTC	<i>medullary thyroid carcinoma</i>
MVB	<i>multivesicular bodies</i>
MVE	<i>multivesicular endosomes</i>
M β CD	Methyl- β -Cyclodextrin
N2a	Neuro-2a
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NRTN	Neurturin
NT	Neurotrophin
N-Terminus	Amino-Terminus
NTRK	Nervenwachstumsfaktor-aktivierte Rezeptoren
OD	optische Dichte
p	Signifikanzniveau
p	Phospho-
p. t.	<i>post transfection</i>
p38MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
p75NTR	p75 Neurotrophin Rezeptor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phäochromozytom
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDK	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PDZ	<i>postsynaptic density 95, PSD-95; discs large, Dlg; zonula occludens-1, ZO-1</i>
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PFM	<i>photonic force microscopy</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
PI3-Kinase oder PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKC δ	Proteinkinase C δ
PLC γ	Phospholipase C γ
PLL	Poly-L-Lysin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	peripheres Nervensystem
PRD	prolinreiche Domäne
PSPN	Persephin
PTB	<i>phosphotyrosin-binding</i>
PTC	<i>papillary thyroid carcinoma</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Resistenz
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
Rap	<i>Ras-related protein</i>
Rap1GAP	<i>GTPase-activating protein for Rap1</i>
RA-RhoGAP	<i>Rap-activated Rho GAP</i>

Ras	<i>rat sarcoma</i>
RBD	Ras-bindende Domäne
RE	Recycling-Endosom
RET	<i>rearranged during transfection</i>
Rho	<i>Ras homolog gene family</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde
S	Svedberg
SARA	<i>SMAD anchor for receptor activation</i>
Sarkosyl NL	N-Lauroylsarkosin-Natriumsalz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sGfr α	lösliches Gfr α
SH2	<i>Src homology 2</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
Shc	<i>Src homology 2 domain containing</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
Src	<i>sarcoma</i>
ss	<i>single-stranded</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TIFF	<i>Triton X-100 insoluble floating fraction</i>
Trk	<i>tropomyosin-receptor-kinase</i>
U	<i>enzyme unit</i>
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett/Ultraviolettstrahlung
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenprozent
x g	relative Zentrifugalbeschleunigung (g-Zahl)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
ZNS	zentrales Nervensystem

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Nachname / Vornamen **SEIBT, Roland Armin**

Geburtsdatum und -ort 17.03.1982 in Gießen

Schulbildung

08/1991 bis 06/2000 Reismann-Gymnasium, Paderborn:
Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

Ausbildung

10/2001 bis 04/2007 Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie:
Studium der Biochemie. Diplomarbeit mit dem Thema
„Untersuchung zur Bindung von löslichem CD23 (sCD23) an membranständige IgE-Isoformen“ in der Arbeitsgruppe Biochemie II bei Prof. Dr. Frey. Abschluss als Diplom-Biochemiker.

05/2007 bis 03/2011 Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie:
Promotion in der Arbeitsgruppe Biochemie III bei Prof. Dr. Fischer von Mollard. Thema der Abschlussarbeit: *„Analyse und Modifikation der RET-vermittelten Signalweiterleitung in Neuroblastomazellen“*.

DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard für die Möglichkeit, meine Dissertation in Ihrer Arbeitsgruppe an einem so interessanten Thema anzufertigen. Ich danke Dir für die stets offene Tür und die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei neuen Ideen.

Prof. Dr. Thomas Dierks danke ich vielmals für die freundliche Übernahme des Koreferats und die Kooperation im Sulf1-Projekt.

Prof. Dr. K. Sandhoff von der Universität Bonn danke ich für die Bereitstellung der B104 Zelllinie und Prof. Dr. B. Hamprecht vom Physiologisch-Chemischen Institut Tübingen für persönliche Kommunikation und das Überlassen der Hybridzelllinien NG108-15 und NH15-CA2 sowie der Neuroblastomzelllinien N18TG2, N4TG3 und NS20Y.

Prof. McNiven gebührt Dank für die GFP-Konstrukte des Dynamin 2-Wildtyps und der K44A-Mutante und Dr. Alexandre Benmerah für die GFP-Konstrukte von Eps15 DIII und D3Δ2.

Dr. Mike Heilemann und Meike Heidbreder danke ich für die freundliche und kompetente Einweisung am konfokalen Mikroskop.

Dr. Sascha Browski danke ich für viele Jahre Freundschaft und die Rekrutierung in die BCIII.

Dr. Christiane Wiegand danke ich für mütterliche Fürsorge, für Hilfe und Antwort in allen Lebenslagen, Grill- und Weinabende, Organisationstalent und vieles mehr. Ohne Dich, Christiane, wäre dieses tolle Arbeitsklima niemals möglich gewesen!

Vielen Dank an Tim Take für die Weiterführung meines Themas und das reibungslose Zusammenspiel in der Endphase meiner Promotion (*We put the Tim in Teamwork!*). ☺

Fabian Milz danke ich für die kooperative und erfolgreiche GDNF/Sulf1-Zusammenarbeit.

Ich danke Rainer Beckmann für Rainer Beckmann!

Vielen lieben Dank an meine weiteren Kollegen Rimma Bachmann, Michael Gossing, Sonja Habelt, Alexander Moreth, Susanne Schöning und Dr. Herbert Wenzel sowie den Kollegen der BCI für die schöne Zeit auf F4.

Herzlichen Dank auch an meine Bachelorstudentinnen Sonja Brockmeyer, Svenja Bruns, Simone Schmücker und ganz besonders an meine Forschungspraktikantin und Masterstudentin Ulrike Strunk.

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Auszubildenden Renate Harder, Tatjana Heidebrecht, Milena Herbort, Anne Muschinski, Daniela Niebur und Claudia Prange.

Und zum Schluss danke ich natürlich meinen Eltern und meinen Brüdern, die mich immer gedanklich, finanziell, intellektuell und sportlich gefordert und gefördert haben.