Identifizierung einer neuen Signalkaskade des Nervenwachstumsfaktorrezeptors TrkA: c-Abl und Mena, das Säugerhomolog von Enabled, sind potentielle Schlüsselmoleküle in der neuronalen Differenzierung

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biochem. Alexandra Koch
geboren am 02.03.1972 in Rheydt (Mönchengladbach)

2001

Referent: Prof. Dr. Walter Müller
Korreferent: PD Dr. Teruko Tamura-Niemann
Tag der Promotion: 28.11.2000
Datum der Veröffentlichung: März 2001

Für

Wolfgang Mennicken (Str.)

ohne dessen Biologieunterricht ich mich vielleicht nie für diese Sache mit den Genen und den Klonen interessiert hätte.

Danksagungen:

Ich danke ganz besonders Frau Priv. Doz. Dr. Teruko Tamura dafür, daß sie mir ein so spannendes Thema anvertraut und mich mit so viel Geduld, Engagement und Freude durch diese Arbeit begleitet hat.

Prof. Dr. Heiner Niemann danke ich dafür, mit wieviel Einsatz er sich um das ganze Institut und jeden einzelnen von uns bemüht hat, und dafür, daß er nicht einfach nur „der Chef da oben" war.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Walter Müller für die Betreuung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Mariano Barbacid für die Bereitstellung der cDNA von TrkA bedanken, bei Dr. Rainer Niedenthal für seine Hilfe bei den Hefe-Arbeiten, bei Dr. Michael Weidner für verschiedene Hefevektoren. Bei Dr. Frank Gertler bedanke ich mich für die Bereitstellung der Mena-cDNA, bei Prof. Dr. Tadashi Yamamoto für die Bereitstellung des Shc-Vektors und natürlich bei Prof. Dr. Wolfram Ostertag, Dr. Carol Stocking und allen Mitarbeitern des Heinrich-Pette-Insituts für ihre Hilfe bei der Etablierung des retroviralen Transfektionssystems.
Bei Karsten Heidrich, Cosima Hakim, Heike Niebuhr, Roger Ritter, Regina Wilms und Monica Stefan bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Dr. Hans Joos und Dr. Annalisa Mancini möchte ich Dank sagen für ihre großartige Hilfe und die Geduld, die sie anfangs mit mir haben mußten („Wo steht denn bei Euch der PBS-Puffer?") und eine aufregende Zeit.

Ich danke meinen Eltern für ihre Unterstützung (in jeder Hinsicht) und dafür, daß sie die ganze Studiererei überhaupt ermöglicht haben,
meiner Schwester, die mich in dieser Zeit tapfer aus nächster Nähe ertragen hat,
Lutz Wiehlmann, ohne den das Studium nicht halb so viel Spaß gemacht und sicherlich länger gedauert hätte, und Margit Ritzka, die mich manchmal auch noch an etwas anderes als TrkA denken läßt.

Zusammenfassung

Der Nervenwachstumsfaktor NGF reguliert die Differenzierung und das Überleben neuronaler Vorläuferzellen während der embryonalen Entwicklung. Die Differenzierung geht dabei mit einer dramatischen morphologischen Veränderung einher, der Bildung von Neuriten. Das Neuritenauswachsen muß zugleich zeitlich wie räumlich exakt reguliert sein, da als Endzweck die Kontaktaufnahme zu einer bestimmten Zielzelle mittels einer synaptischen Verbindung besteht. Ein solcher Vorgang verlangt einen sehr spezifischen, zielgerichteten und ausführlichen Umbau des Zytoskeletts auf extrazelluläre Signale hin.
Das NGF-Signal wird im Fall der Differenzierung durch die Rezeptortyrosinkinase TrkA aufgenommen.
Diese Arbeit stellt nun einen bisher unbekannten Signaltransduktionsweg vor, der von TrkA zum Aktinzytoskelett führt:

- Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems konnten neue Interaktionspartner der Rezeptortyrosinkinase TrkA isoliert werden.
- Einer davon ist die Nicht-Rezeptortyrosinkinase c-Abl, die über ihre SH2-Domäne an die tyrosinphosphorylierte Aktivierungsschleife des Trk-Rezeptors bindet.
- Eine Expression der Abl-SH2-Domäne in PC12-Zellen zeigte jedoch, daß diese Domäne allein nicht ausreicht, die Neuritenbildung nach NGF-Stimulation zu unterbinden.
- Der Einsatz des Abl-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitors, STI 571(Novartis), allerdings beeinträchtigte die Neuritenbildung ganz unverkennbar und bestätigte somit die grundsätzliche Bedeutung der Abl-Kinase für das TrkA-vermittelte Differenzierungssignal in PC12-Zellen und damit c-Abl als eines der Schlüsselmoleküle in der Signaltransduktion von TrkA.
- Daneben erhöhte die Stimulation mit NGF in PC12-Zellen innerhalb von 60 min die Menge des Proteins Mena, des Säugerhomologs des D-Abl-Substrats Enabled, um mehr als das Zehnfache.
- Dieser Effekt läßt sich durch den Abl-Inhibitor STI 571 zurückdrängen.

Die Tatsache, daß Mena auf verschiedene Weise an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist, läßt nun erwarten, daß diese neu entdeckte Signalkaskade über TrkA, c-Abl und Mena weitere Einblicke in den molekularen Mechanismus vermittelt, der der NGF-induzierten Neuritenbildung zugrunde liegt.

Stichworte: neuronale Differenzierung; c-Abl-Tyrosinkinase; Ena/VASP-Proteine

Abstract

Nerve growth factor, NGF, regulates differentiation and survival of neuronal precursor cells during embryonic development. Part of the differentiation phenotype is a dramatic morphological change within these cells: the outgrowth of neurites. Neurite outgrowth is tightly regulated for one particular neurite must be able to contact one particular target cell to build up a synaptic connection. This process demands a highly specific nevertheless drastic rearrangement of the cytoskeleton upon extracellular stimuli. NGF-signaling leading to differentiation is performed by the receptor tyrosine kinase TrkA.
This work introduces a novel signal transduction pathway starting with activation of nerve growth factor receptor, TrkA, and ending at the cytoskeleton:

- Using the yeast two-hybrid-system novel interaction partners for the nerve growth factor receptor TrkA were isolated.
- One interaction partner, the non-receptor tyrosine kinase c-Abl, bound through its SH2-domain to phosphorylated tyrosine residue(s) in the activation loop of TrkA .
- The specific inhibitor of the Abl-kinase, STI 571 (Novartis), down-modulated the formation of neurites in PC12 cells used as model system for neuronal differentiation. This result clearly underlined a key role for the Abl-tyrosine kinase in TrkA mediated signaling pathway.
- Beside these observations, NGF stimulation of PC12 cells resulted in a more than 10-fold upregulation of the protein level of Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* Enabled.
- Once again, this effect was clearly abolished by the Abl-specific inhibitor, STI 571.

Taken into account that Mena is deeply involved in cytoskeletal rearrangement, this newly found cascade including NGF, TrkA, c-Abl and Mena provides further inside into the molecular mechanism leading to NGF-mediated neurite outgrowth.

keywords: neuronal differentiation; c-Abl tyrosine kinase; Ena/VASP proteins

Inhalt

ZUSAMMENFASSUNG I

1 HÄUFIG VERWENDETE ABKÜRZUNGEN 1

2 EINLEITUNG 3

2.1 NEURONALE ENTWICKLUNG 3
2.2 NEUROTROPHINE UND IHRE REZEPTOREN 4
2.2.1 Biologische Funktion der Neurotrophine 4
2.2.2 Struktur des NGF-Rezeptors TrkA 6
2.2.2.1 Rezeptortyrosinkinasen, allgemeine Struktur 6
2.2.2.2 Die Familie der Trk-Rezeptoren 6
2.2.3 Signalübertragung 7
2.2.3.1 Mechanismus der Aktivierung von TrkA 7
2.2.3.2 Signalweiterleitung über zytoplasmatische Proteine 8
2.2.3.3 Protein-Protein-Interaktionsdomänen 10
2.2.3.4 Signaltransduktionswege 11
2.2.3.5 Signaltransduktion durch TrkA 13
2.3 DIE NICHT-REZEPTOR-TYROSINKINASE C-ABL 15
2.3.1 Strukturelemente von c-Abl 15
2.3.2 Funktionen 17
2.3.2.1 Abl reguliert Umbauprozesse des Zytoskeletts 17
2.3.2.2 Abl in der Entwicklung des Nervensystems 17
2.4 MOLEKULARE VORGÄNGE IM WACHSTUMSKEGEL 18
2.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 20

3 MATERIAL 21

3.1 REAGENZIEN 21
3.2 ZELLINIEN 25
3.3 GERÄTE 25
3.4 SONSTIGE MATERIALIEN 26
3.5 FIRMEN 27

4 METHODEN 29

4.1 ARBEITEN MIT DNA 29
4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA 29
4.1.1.1 Minipräparation 29
4.1.1.2 Midi(Maxi)präparation 30
4.1.2 Restriktionsenzymspaltung 31
4.1.3 Dephosphorylierung 31
4.1.4 Phenol/Chloroform-Extraktion 31
4.1.5 Auftrennung von DNA-Molekülen durch Agarosegel-Elektrophorese 32
4.1.5.1 Herstellung von Agarosegelen 32
4.1.5.2 Probenvorbereitung und Durchführung der Elektrophorese 32
4.1.5.3 Größenmarker für die Agarosegel-Elektrophorese 32
4.1.6 Reinigung von DNA-Fragmenten 33
4.1.7 Ligasereaktion 33
4.1.8 Bakterielle Transformation 34
4.1.8.1 $CaCl_2$-Methode 34
4.1.8.2 Elektroporation 35
4.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 36
4.1.9.1 Verbinden zweier überlappender PCR-Produkte 37
4.1.10 Southern Blot 37
4.1.10.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden 38
4.1.10.2 Reinigung radioaktiv markierter DNA-Sonden 38
4.1.10.3 Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonden auf die Transfermembran 39

4.1.11 Sequenzierung von Plasmid-DNA ... 39
4.1.11.1 Aufreinigung der Sequenzprodukte ... 40
4.2 ARBEITEN MIT RNA ... 40
4.2.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen ... 40
4.2.1.1 Präparation von Poly A+ RNA aus der zytosolischen Gesamt-RNA ... 41
4.2.1.2 Auftrennung von RNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese ... 41
4.2.1.3 Probenvorbereitung und Durchführung der Formaldehyd-Gelelektrophorese ... 42
4.2.2 Northern Blot und Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden ... 42
4.3 ARBEITEN MIT PROTEINEN ... 43
4.3.1 Immunpräzipitation ... 43
4.3.1.1 Co-Immunpräzipitation ... 43
4.3.2 Bestimmung der in vitro *Kinaseaktivität (Kinase-Assay) ... 44*
4.3.3 Zelllysate ... 44
4.3.3.1 Lysate aus Zellkultur ... 44
4.3.3.2 Lysate aus Hefe ... 45
4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 45
4.3.4.1 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen nach der Elektrophorese ... 46
4.3.5 Western Blot ... 46
4.3.5.1 Immunologische Identifizierung von Proteinen auf der Western-Blot-Membran (Immunoblot) ... 47
4.3.6 Bindungs-Assays mit GST-Fusionsproteinen ... 48
4.3.6.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in Bakterien ... 48
4.3.6.2 In vitro Transkription/Translation ... 51
4.3.6.3 In vitro Bindungs-Assay ... 52
4.4 EXPRESSION VON PROTEINEN IN HEFEN ... 53
4.4.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Yeast-Two-Hybrid-System) ... 53
4.4.1.1 Material ... 54
4.4.1.2 Genbank-Amplifikation ... 57
4.4.1.3 Genbank-Screening ... 57
4.4.1.4 Interaktionassays ... 60
4.4.1.5 Konstruktion der Plasmide für die Expression in Hefen ... 60
4.4.2 Erzeugung von TrkA-Mutanten mit Hilfe der homologen Rekombination von S. cerevisiae ... *62*
4.5 ZELLKULTUR ... 63
4.5.1 Kultivierung und Passagieren der Zellen ... 63
4.5.1.1 Passagieren von Schwimmzellen ... 64
4.5.1.2 Passagieren von adherenten Zellen ... 65
4.5.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen ... 65
4.5.2 Transfektion von NIH3T3 Zellen mit Lipofektin zur Herstellung einer stabilen Zellinie ... 65
4.5.2.1 Selektion ... 66
4.5.3 Transiente Transfektion von PC12-Zellen ... 66
4.5.4 Transfektion mittels retroviraler Vektoren ... 67
4.5.4.2 Transiente Transfektion der Verpackungszellinie Phoenix Ampho ... 69
4.5.4.3 Ernten der Retroviren ... 70
4.5.4.4 Infektion der Zielzellen ... 70
4.5.4.5 Einfrieren der Retroviren ... 71
4.5.4.6 Bestimmung des Virentiters in SC-1 Zellen ... 71
4.5.4.7 Selektion der infizierten Zielzellen ... 71
4.5.5 Stimulation von PC12-Zellen ... 72
4.5.5.1 Beschichten von Kulturgefäßen mit Kollagen ... 72
4.5.5.2 Differenzierung ... 72
4.5.5.3 Phosphorylierung und Mena-Induktion ... 72
4.5.6 Immunfluoreszenz ... 73
4.5.6.1 Beschichtung mit Kollagen/Polylysin für Immunfluoreszenz ... 73
4.5.6.2 Fluoreszenzfärbung ... 73

5 ERGEBNISSE 75

5.1 GENBANK-SCREENING MIT HILFE DES HEFE-ZWEI-HYBRID-SYSTEMS 75

5.1.1 Etablierung des LexA-TrkA-Hybridproteins als Köder für ein Genbank-Screening 75

5.1.2 Identifizierung von c-Abl als potentiellen TrkA-Bindungspartner 76

5.1.3 Bindungsdomänen der potentiellen Interaktionspartner von TrkA 77

5.1.4 Die Interaktion der neuen potentiellen TrkA-Bindungspartner mit dem Rezeptor sind abhängig von dessen Kinaseaktivität 78

5.1.5 Bindungsspezifität von c-Abl und KIAA0017 80

5.2 IDENTIFIZIERUNG DER REZEPTORBINDUNGSSTELLE DER NEUEN TRKA-BINDUNGSPARTNER 82

5.2.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System: Interaktionen von TrkA-Mutanten mit Defekten in bekannten funktionellen Motiven 82

5.2.1.1 Mögliche Bindungsmotive 82

5.2.1.2 Herstellung der TrkA-Mutanten 82

5.2.1.3 Interaktion der TrkA-Mutanten mit den potentiellen TrkA-Bindungspartnern 84

5.2.2 In vitro-Bindungs-Assays mit GST-Fusionsproteinen von Abl und TrkA 86

5.2.2.1 Etablierung der TrkA überexprimierenden Mausfibroblasten-Zellinie T15 86

5.2.2.2 GST-Abl bindet an phosphoryliertes TrkA 87

5.2.2.3 Abl interagiert mit den phosphorylierten Tyrosinresten der Aktivierungsschleife von TrkA 89

5.2.2.4 Einzelne Punktmutationen der drei Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife von TrkA verringern die Bindung von Abl 91

5.3 C-ABL BEEINFLUßT DIE NEURITENBILDUNG IN PC12-ZELLEN 93

5.3.1 PC12-Zellen differenzieren unter dem Einfluß von NGF zu Neuronen ähnlichen Zellen 93

5.3.2 NGF induziert die Tyrosinphosphorylierung diverser Proteine in PC12-Zellen 94

5.3.3 Tyrosinphosphorylierte Proteine konzentrieren sich in den Spitzen auswachsender Neuriten in PC12-Zellen 95

5.3.4 Expression der Abl-SH2-Domäne in PC12-Zellen 96

5.3.4.1 Transfektion von PC12-Zellen 96

5.3.4.2 Etablierung des retroviralen Transfektionssystems für PC12-Zellen 96

5.3.4.3 Anreicherung EGFP-exprimierender Zellen im Durchflußzytometer 97

5.3.4.4 Infektion der PC12-Zellen mit R702/Abl-SH2 99

5.3.4.5 Abl interagiert mit TrkA möglicherweise über mehrere Bindungsstellen 100

5.3.5 Der Abl-Inhibitor STI 571 beeinflußt die Neuritenbildung in PC12-Zellen 101

5.4 NGF STEUERT VERÄNDERUNGEN DES ZYTOSKELETTS ÜBER DAS ZYTOSKELETT-ORGANISIERENDE PROTEIN MENA 103

5.4.1 Mena wird in PC12-Zellen exprimiert 103

5.4.2 Mena wird durch NGF induziert 104

5.4.3 Die Induktion von Mena durch NGF läßt sich durch den Abl-Inhibitor STI 571 unterbrechen 105

5.4.4 Die Mena-Induktion erfolgt nicht auf der Transkriptionsebene 106

6 DISKUSSION 108

6.1 DIE ABL-SH2-DOMÄNE IST AN DER INTERAKTION MIT TRKA BETEILIGT 109

6.2 TRKA INTERAGIERT MIT DER NICHTREZEPTOR-TYROSINKINASE C-ABL ÜBER SEINE AKTIVIERUNGSSCHLEIFE 110

6.3 DIE REGULATION DER TRK-KINASE UNTERSCHEIDET SICH VON DER ANDERER REZEPTOREN 112

6.4 ABL-INHIBITOR STI 571: ABL BEEINFLUßT DIE NEURITENBILDUNG IN PC12-ZELLEN 114

6.5 ABL IN DER NEURONALEN ENTWICKLUNG 115
6.6 DAS ZYTOSKELETT-ORGANISIERENDE PROTEIN MENA WIRD DURCH ABL REGULIERT 116

7 LITERATUR 121

8 ANHANG 133

8.1 TABELLENVERZEICHNIS 133
8.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 133
8.3 LEBENSLAUF 135

1 Häufig verwendete Abkürzungen

%	Prozent
&	und
°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarad
µL	Mikroliter
µM	mikromolar
3-AT	3-Aminotriazol
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	„Abl related gene“
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	break point cluster region
BDNF	„Brain derived neurotrophic factor“
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BTP	BisTrisPopan
bzw.	beziehungsweise
c-	zellulär
C-	Carboxy-
Cat.	Katalognummer
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
cm^3	Kubikzentimeter
cpm	„counts per minute“
D	Aspartat
D-	*Drosophila*
DABCO	Diazabicyclo-octan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreit
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermiswachstumsfaktor
Ena	Enabled
Erk	„Extracellular-signal-regulated kinase“
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
EVH	Ena/VASP-Homologie
F	Phenylalanin
F-	filamentös
FACS	„Fluorescence activated cell sotring“
FAK	„Focal adhesion kinase“
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
FITC	Fluorescein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
Grb	„Growth factor receptor bound protein“
GST	Glutathion-S-Transferase
GT	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
h	human
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thio-Galactopyranosid
IR	Insulinrezeptor
K	Lysin
kBq	Kilobequerel
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L	Liter
LiAc	Lithiumacetet
Lsg.	Lösung
m	aus Maus
M	Methionin
M	Molar
mA	Miliampère
MBq	Megabequerel
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MEK	„Mitogen-dependent Erk kinase“
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	„Messenger“ RNA
MW	Molekulargewicht
N-	Amino-
NaAc	Natriumacetat

Abkürzungen

NES	„Nuclear export signal“
ng	Nanogram
NGF	Nervenwachstumfaktor
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NT	Neurotrophin
Ø	Durchmesser
OD	Optische Dichte
p	Protein
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	„Platelet derived growth factor“
PDZ	PSD-95, Dlg-A, ZO-1
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PH	Pleckstrin-Homologie
PI-3‘K	Phosphatidylinositol-3‘-kinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PNS	peripheres Nervensystem
PP	Polypropylen
PTB	Phosphotyrosinbindungs-
pY	Phosphotyrosin
r	aus Ratte
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.u.	siehe unter
SCF	Stammzellfaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	Src-Homologie2
SH3	Src-Homologie3
sog.	sogenannt
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyl-ethylen-diamin
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
U	Einheiten
UV	Ultraviolett-Licht
V	Valin
v-	viral
V	Volt
v/v	Volumenanteil
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
Vol.	Volumen
w/v	Gewichtsanteil
x	-fach
X	beliebige Aminosäure
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3Indoyl-ß-D-galaktopyranosid
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
Δ	ohne
α-	anti-

2 Einleitung

2.1 Neuronale Entwicklung

Von allen Geweben entfaltet das Nervensystem vielleicht den größten Reichtum an verschiedenartigen Zelltypen. Schätzungen zufolge existieren in Säugern einige hundert neuronale Subtypen (Stevens, 1998).
Auf 1 cm^3 des menschlichen Gehirns können sich mehrere Millionen Nervenzellen befinden, von denen jede einzelne wiederum mit tausenden anderen in Kontakt steht, um die tägliche lebensnotwendige Datenübertragung und -verarbeitung eines Organismus zu gewährleisten. Das Nervensystem reguliert damit die schnelle und über große Distanzen verlaufende Signalübermittlung, -koordination und -kontrolle praktisch aller Körpervorgänge.
Dabei beginnt die erstaunliche Komplexität des ausgewachsenen Zentralnervensystems (ZNS) von Vertebraten in der Embryonalentwicklung ganz einfach. Vom ektodermalen Gewebe grenzt sich die sog. Neuralplatte ab, die noch aus lauter gleichartigen Zellen besteht. Für die Ausbildung des peripheren Nervensystems (PNS) wandern Zellen überdies von der sog. Neuralleiste über weite Strecken hinweg aus, um später die Verbindung von den Organen zum ZNS herzustellen. Insgesamt muß sich zur Entwicklung eines funktionsfähigen Nervensystems das Gefüge aus Neuronen, unterstützenden Gliazellen, sensorischen Zellen und Muskeln zu funktionellen, hochspezifischen Verbindungen organisieren. Dies geschieht, indem eine genau festgelegte Anzahl von neuronalen Vorläuferzellen entlang exakt vorgegebener Routen zu einer ganz bestimmten Zeit in der Entwicklung zu einem Zielort dirigiert wird, dort zu einer bestimmten Art von Nervenzelle ausdifferenziert und eine ganz präzise Verbindung knüpft.
Differenzierung bedingt nun im Falle einer Nervenzelle eine drastische morphologische und funktionelle Veränderung. Die Zelle bildet bis zu meterlange, µm dünne Auswüchse, die Axone und Dendriten (allgemein Neuriten), sie nimmt durch Bildung von Synapsen Kontakt zu den Zielzellen auf und stellt ihren Stoffwechsel so um, daß sie in die Lage versetzt wird, Signale zu empfangen und zu übertragen. Sie wird elektrisch erregbar und produziert Botenstoffe (Neurotransmitter).
Wenn die neuronale Vorläuferzelle differenziert, bildet sie an der Spitze des auswachsenden Prozesses eine stachelig erscheinende Vergrößerung, den sogenannten Wachstumskegel. Der Wachstumskegel bewegt sich durch das umgebende Gewebe und stellt sowohl den Motor als auch den Steuerapparat des sich bildenden Neuriten dar. Er streckt sogenannte Filopodien aus und zieht sie zurück oder heftet sich an das umliegende Gewebe an und wächst weiter. Er „tastet“ seine Umgebung ab, interpretiert von dort kommende Signale und reagiert darauf. Solche Signale können über Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle wie N-CAM und Cadherine vermittelt werden, über die extrazelluläre Matrix mit Hilfe von Rezeptoren der Integrin-Familie und auch über diffundierbare Faktoren, die von anderen Zellen abgegeben lokale Gradienten im Gewebe bilden und anziehend oder abstoßend auf den Wachstumskegel wirken (Review: Tessier-Lavigne & Goodman, 1996; Mueller, 1999). Zu diesen Faktoren gehören Neurotrophine wie der Nervenwachstumsfaktor NGF („nerve growth factor“, Levi-Montalcini et al., 1979; Gundersen & Barrett, 1979; Letourneau, 1978; Ming et al., 1997), deren Signale den Nervenzellen über Rezeptoren auf ihrer Oberfläche vermittelt werden. Neben ihrer Aufgabe bei der Steuerung bereits auswachsender Neuriten, sind es diese Wachstumsfaktoren, die bestimmte neuronale Vorläuferzellen überhaupt erst zur Differenzierung anregen und für ihr Überleben während der Embryonalentwicklung sorgen. Neurotrophine stellen damit weit mehr als bloße chemotaktisch wirksame Moleküle dar.

2.2 Neurotrophine und ihre Rezeptoren

Der Nervenwachstumsfaktor NGF bildet mit BDNF („brain derived neurotrophic factor), NT-3 (Neurotrophin-3) und NT-4 die Familie der Neurotrophine, die essentiell für Wachstum, Überleben/Apoptose und die Differenzierung von Nervenzellen während der Embryonalentwicklung sind, und im ausgewachsenen Organismus auch weiterhin für die Aufrechterhaltung der neuronalen Funktion sorgen. Neurotrophine vermitteln ihre Signale über zwei Arten von Rezeptoren, zum einen über die Rezeptortyrosinkinasen der Trk-Familie, TrkA, TrkB und TrkC, die mit den einzelnen Neurotrophinen sehr spezifisch interagieren (Tabelle 2.1), zum anderen durch den Rezeptor p75 (p75NTR), der mit dem Tumornekrosefaktorrezeptor und FAS verwandt ist (Review: Casaccia-Bonnefil et al., 1998). p75 kann mit allen Neurotrophinen interagieren (Rodriguez-Tebar et al., 1992).

Neurotrophinrezeptor	Neurotrophin
TrkA	NGF, (NT-3)
TrkB	BDNF, NT-4 (Neurotrophin), (NT-3)
TrkC	NT-3
p75NTR	NGF, BDNF, NT-3, NT-4

Tabelle 2.1: Neurotrophinrezeptoren und ihre Liganden nach Kaplan & Miller (1997).

2.2.1 Biologische Funktion der Neurotrophine

Neurotrophine binden an den entsprechenden Rezeptor und stimulieren dessen intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Dies ist der Anfang einer von der Zelloberfläche bis in den Kern reichenden Signaltransduktionskaskade, bei der durch Phosphorylierung intrazellulärer Proteine und Regulation intrazellulärer enzymatischer Funktionen letztendlich Einfluß auf Proteine genommen wird, die direkt für die Form einer Zelle verantwortlich sind, ebenso wie auf die Transkriptionsmaschinerie, die über Wachstum, Migration, Morphologieänderungen und Überleben einer Zelle bestimmt.
Während der Embryogenese ist die Expression der Trk-Rezeptoren gewöhnlich auf spezielle Arten von Neuronen und bestimmte Zeitpunkte beschränkt (Review: Barbacid, 1994). Besonders gilt dies für TrkA. Das Expressionsmuster von TrkB und C ist dagegen wesentlich breiter gefächert. Der Rezeptor TrkA findet sich hauptsächlich im PNS, in Zellen sympathischer Ganglien, sensorischen Neuronen aus dem Spinalganglion und Zellen aus dem Ganglion trigeminale, außerdem im ZNS in cholinergen Neuronen. Für diese Zellen konnte gezeigt werden, daß NGF und TrkA tatsächlich gezielt ihr Überleben unterstützen und auf andere Typen von Neuronen keinen Einfluß nehmen (Review: Davies, 1992; Korsching, 1993). Weitere Aufgaben von NGF, die es z.T. zusammen mit anderen Neurotrophinen ausübt, sind in Tabelle 2.2 zusammengefaßt.

Aufgabe	Neurotrophin	Referenz
Programmierter Zelltod	alle Neurotrophine	Davies, 1992
Axonwachstum (Zytoskelettveränderungen)	NGF	Snider & Johnson, 1989
Synaptische Verknüpfung	NGF	Maffei et al., 1992
Sprossen	NGF und NT-3	Schnell et al., 1994; Diamond et al., 1992
Verzweigung von Dendriten	NGF	Snider , 1988
Transmitterenzyme	NGF, BDNF, NT-4	Eide et al., 1993; Henderson et al., 1993
Peptide	NGF, BDNF	Snider & Johnson, 1989; Nawa et al., 1993

Tabelle 2.2: Funktionen von NGF/TrkA in neuronalen Zellen (Snider, 1994).

Direkten Aufschluß über die biologische Bedeutung der Neurotrophine bei der Entwicklung bestimmter Neuronen gaben besonders Studien an Knockout-Mäusen der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren (Snider, 1994). Alle Knockout-Tiere litten unter Symptomen, die mit dem Verlust bestimmter Neuronenpopulationen zusammenhängen. Besonders deutlich wird das bei $TrkB^{-/-}$ und $BDNF^{-/-}$ -Tieren, die sich drehen und bewegen, als haben sie die Orientierung verloren. In der Tat fehlen ihnen Neuronen des Vestibularappartes, so daß ihr Gleichgewichtssinn beeinträchtigt ist Ungewöhnliche Bewegungen beobachtet man ebenfalls bei $TrkC^{-/-}$ und $NT\text{-}3^{-/-}$- Tieren. Hier fehlen sensorische Neuronen, die vom Muskel ausgeführte Bewegungen an das Gehirn zurückmelden. Bei $TrkA^{-/-}$ - und $NGF^{-/-}$ -Mäusen wiederum scheint das Schmerzempfinden gestört zu sein, und Neuronen des Ganglion cervicale superius (99 %), des sensorischen Spinal- (70 - 80 %) und des Trigeminalganglions (70 %) fehlen. Das sind eben jene Neuronen, von denen TrkA-Expression und NGF-Abhängigkeit berichtet wurde. Neurotrophine werden daneben auch mit einigen neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, wie der Alzheimerschen und Parkinsonschen Krankheit und der Amyotrophischen Lateralsklerose (ALS). Am Entstehen der Alzheimerschen Krankheit z.B. sind die NGF- und BDNF-abhängigen cholinergen Neuronen im Frontalhirn und Hippocampus beteiligt (Eide et al., 1993).
Oft arbeiten nicht nur mehrere Neurotrophine und Trk-Rezeptoren zusammen, sondern auch Trk-Rezeptoren und p75. Diese beiden Arten der Neurotrophinrezeptoren werden häufig co-exprimiert und können direkt miteinander interagieren, was letztendlich ihr Signalverhalten beeinflußt (Bibel et al., 1999). Besonders eine Zusammenarbeit von p75 und TrkA, die gemeinsam einen hochaffinen NGF-Rezeptor bilden sollen, wird diskutiert (Hempstead et al., 1991; Berker Shooter, 1994; Hantzopoulos et al., 1994; Verdi et al., 1994), ebenso allerdings eine Trk-unabhängige p75-Signaltransduktion (Jing et al., 1992; Bono et al., 1999).

Die Wirkung von Neurotrophinen ist allerdings nicht ausschließlich auf neuronales Gewebe beschränkt. TrkA z.B. wird ebenfalls in Epithelzellen, Keratinozyten und B- und T-Lymphozyten exprimiert. TrkA als Rezeptortyrosinkinase und damit als potentiell proliferationsförderndes Agens, ist in Zellen nicht-neuronalen Ursprungs an einigen Krebsarten beteiligt und kann Einfluß auf den Verlauf von neuronalen Krebserkrankungen, wie dem Neuroblastom, nehmen.

2.2.2 Struktur des NGF-Rezeptors TrkA

2.2.2.1 Rezeptortyrosinkinasen, allgemeine Struktur

Rezeptortyrosinkinasen wie die Trk-Rezeptoren gehören zu Typ I der Transmembranproteine mit einem einzigen Membrandurchgang und extrazellulär gelegenem N-Terminus, der sich bei der Translation einem Signalpeptid zur Einschleusung des Proteins in den entsprechenden Synthese- und Sekretionsweg anschließt. Rezeptortyrosinkinasen tragen an diesem extrazellulären Teil oft N- manchmal aber auch O-Glykosylierungen. Die extrazelluläre Domäne ist unter den einzelnen Rezeptoren sehr variabel und für die Ligandenbindung oder Interaktionen mit der extrazellulären Matrix oder mit anderen Oberflächenproteinen zuständig.
Innerhalb der Zelle folgt dann eine Juxtamembrandomäne, anschließend die katalytisch aktive Tyrosinkinasedomäne. In diesem Bereich findet sich die größte Homologie innerhalb verschiedener Rezeptoren mit 32 bis 95 % (van der Geer et al., 1994). Schließlich folgt der C-Terminus, der sich bei den einzelnen Rezeptoren sehr unterschiedlich gestalten kann. Bei einigen Kinasen wie dem EGF („epidermal growth factor“)-Rezeptor (Honegger et al., 1988; Khazaie et al., 1988), dem M-CSF(„macrophage-colonie stimulating factor“)-Rezeptor , c-Fms (Roussel et al., 1987, 1988), und dem SCF(„stem cell factor“)-Rezeptor, c-Kit (Herbst et al., 1995), ist der C-Terminus an der Regulation der Kinaseaktivität beteiligt.

2.2.2.2 Die Familie der Trk-Rezeptoren

Die Familie der Trk-Rezeptortyrosinkinasen umfaßt drei Mitglieder, TrkA, B und C, mit sehr ähnlicher Allgemeinstruktur (Review: Barbacid (1995), Abb.2.1). In der extrazellulären N-terminalen Domäne besitzen diese zwei cysteinreiche Cluster, dazwischen ein leucinreiches Motiv und vor der membrandurchspannenden Domäne zwei IgG-ähnliche Strukturelemente. Es sind Isoformen der Rezeptoren gefunden worden, die sich im Fall von TrkA nur durch die Insertion der Aminosäuresequenz VSFSPV (Ein-Buchstaben-Code) in der Nähe der membrandurchspannenden Domäne unterscheiden. Das *trkA*-Gen kodiert für ein Protein mit 790 bzw. 796 Aminosäuren (AS), was bei vollständiger Glykosylierung 140 kDa entspricht (Review: Barbacid, 1994).
Bei TrkB und C dagegen kommen Formen vor, denen die gesamte Kinasedomäne fehlt. TrkC besitzt darüber hinaus Isoformen mit verschiedenen Insertionen in der Kinasedomäne. Das „vollständige“ TrkC-Protein (ohne Kinaseinsert) hat 825 AS (145 kDa). Das TrkB-Protein mit 821 AS entspricht ebenfalls 145 kDa. Die Homologie von TrkC (Schwein) zu TrkA (human) beträgt insgesamt 67 %, 54 % im extrazellulären Teil und 87 % in der Kinasedomäne. Die Homologie zu TrkB (Maus) beträgt 68 % insgesamt, 53 % extrazellulär und 87 % in der katalytischen Domäne (Review: Barbacid, 1994).

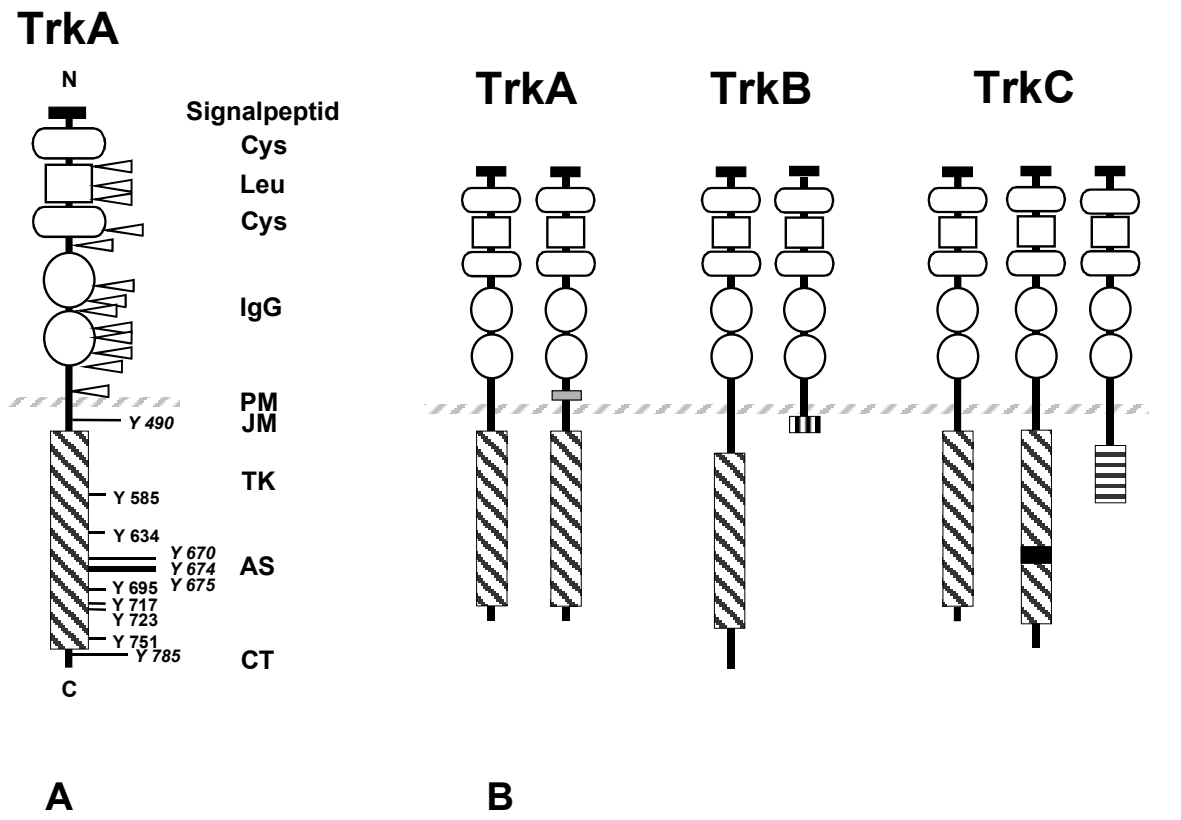

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Trk-Familie
A: Strukturelemente von TrkA. Dreiecke symbolisieren Glykosylierungsstellen. Die Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne sind mit Y bezeichnet und numeriert (hTrkA, Martin-Zanca et al., 1989). Phosphorylierbare Tyrosinreste sind kursiv gedruckt. **N:** N-Terminus, **Cys:** Cystein-Cluster, **Leu:** leucinreiches Motiv, **IgG:** IgG-ähnliche Domänen, **PM:** Plasmamembran, **JM:** Juxtamembrandomäne, **TK:** Tyrosinkinasedomäne, **AS:** Aktivierungsschleife, **CT:** C-Terminus. **B:** Mitglieder der Trk-Familie und ihre katalytischen und nicht katalytischen Isoformen. Das graue Rechteck bei TrkA repräsentiert die AS-Sequenz VSFSPV (Ein-Buchstaben-Code). Eine Form von TrkC enthält zusätzliche AS in der Kinasedomäne (schwarzes Rechteck).

2.2.3 Signalübertragung

2.2.3.1 Mechanismus der Aktivierung von TrkA

Die Aktivierung von TrkA erfolgt nach dem bei Rezeptortyrosinkinasen allgemein gültigen Mechanismus (Schlessinger & Ullrich, 1992): Die Bindung des jeweiligen Liganden führt zur Änderung der Konformation der Kinase. Im aktiven Zustand liegt der Rezeptor dann als Dimer vor (Jing et al., 1992).
Die Aktivierung äußerte sich zunächst in kreuzweiser Autophosphorylierung der Tyrosinreste der sog. Aktivierungsschleife des Rezeptors, was noch einmal eine Konformationsänderung bewirkt und die volle katalytische Aktivität der Kinase herstellt. Jetzt werden weitere Tyrosinreste der zytoplasmatischen Rezeptordomäne phosphoryliert, über die der Rezeptor dann seine nachgeordneten Substrate und Effektoren rekrutieren kann.
Weiteren Einblick in den Mechanismus der Kinaseaktivierung gaben inzwischen die Röntgenkristallstrukturen einiger Rezeptortyrosinkinasen. Im allgemeinen besteht die katalytische Domäne aus zwei Lappen, die einen Spalt bilden, in dem das Substrat und mit

Magnesiumionen assoziiertes ATP zur Reaktion gebracht werden. Der N-terminale Teil dieser Struktur enthält eine hochkonservierte Konsensussequenz GXGXXGX(15-20)K (Ein-Buchstaben-Code), die an der Bindung von ATP beteiligt ist. Ersetzt man das Lysin in dieser Sequenz, wird die Kinaseaktivität zerstört (Chou et al., 1987; Russel et al., 1987; Honegger et al., 1987; Chen et al., 1987; Williams, 1989).
Der C-terminale Teil der Kinasedomäne enthält eine regulatorische Struktur, die sogenannte katalytische Schleife („catalytic loop“) und die Aktivierungsschleife („activation loop“, Johnson et al., 1996), die zur Katalyse essentielle, unter den Tyrosinkinasen hochkonservierte Motive enthalten.
Aspartat in Position 644 (hTrkA): Dieser Aspartatrest der katalytischen Schleife ist invariant bei den verschiedenen Proteinkinasen (Johnson et al. 1996). Seine Aufgabe ist es, das Proton der Hydroxylgruppe vom Substrattyrosin abzuziehen (Bossmeyer, 1995).
DFG, Position 662-4 (hTrkA): Diese Sequenz stellt die Bindungsstelle für die Metallionen dar. Eine Mutation dieser Stelle führt zur Inaktivierung der Kinase (Cheng Koland, 1998; Longley et al.,1999)
Y670, Y674 und Y675 (hTrkA): Tyrosinkinasen enthalten ein bis drei phosphorylierbare Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife. Die Röntgenstrukturanalyse des Insulinrezeptors, der wie TrkA drei Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife trägt, zeigte, daß der Rest Y1162 (entspricht Y674 in TrkA) bei der inaktiven Kinase als Pseudosubstrat den Zugang für ATP und das Peptidsubstrat blockiert (Hubbard et al., 1994). Die Autophosphorylierung der Aktivierungsschleife bei Aktivierung des Rezeptors führt dann zu einer dramatischen Konformationsänderung in diesem Bereich, welche den Zugang zum aktiven Zentrum nun freigibt (Hubbard, 1997). Die phosphorylierten Tyrosinreste sind jetzt außerdem an der Stabilisierung der aktiven Konformation beteiligt. Ein ähnlicher Mechanismus ist für TrkA wahrscheinlich (Cunningham & Greene, 1998).

Abbildung 2.2: Aminosäuresequenz der katalytischen Schleife und der Aktivierungsschleife von humanem TrkA (Ein-Buchstaben-Code).
Funktionell bedeutsame AS sind unterstrichen.

2.2.3.2 Signalweiterleitung über zytoplasmatische Proteine

Wachstumsfaktoren bewirken biologische Reaktionen durch die Rekrutierung intrazellulärer Proteine zu den Rezeptoren an der Plasmamembran. Diese Rezeptorbindungspartner wiederum vermitteln das Signal auf andere Proteine und tragen es so durch das Zytoplasma und in den Kern, wo es schließlich in Form von Genregulation umgesetzt wird. Proteine, die an solchen Signalübertragungen beteiligt sind, gehören hauptsächlich folgenden Gruppen an:
Enzyme: Proteine, deren Aktivität durch Phosphorylierung beeinflußt werden kann, wie die Phosphatidyl-inositol-3‘kinase (PI-3‘K), die Phospholipase C-γ (PLC-γ), die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen Src und Abl, das Ras-GTPase aktivierende Protein p120RasGAP (Abb. 2.3), verschiedene Tyrosinphosphatasen, darunter die SH2-Domänen enthaltende Phosphatase (SHP)1 und 2, die eine Rolle für die Abschaltung der Rezeptoren spielen können (van der Geer, 1994).
Adaptorproteine: Proteine ohne intrinsische Enzymaktivität, die eine Verbindung vom Rezeptor zu anderen nachgeordneten Signalmolekülen darstellen, wie Shc, SH2-B, Grb („growth factor receptor bound protein)2, 7 und 10 (Abb. 2.3).

Strukturproteine: Proteine, die reguliert durch Phosphorylierung für Änderungen in der Organisation des Zytoskeletts verantwortlich sind, wie z.B. Paxillin (Munshi et al., 2000) und β-Catenin (Cohen et al., 1999).
Solche Proteine beinhalten spezielle Domänen zur Bindung an spezifische Strukturmotive (Abb. 2.3), mit deren Hilfe sie in der Lage sind, Signalkomplexe zu bilden. Die bekanntesten dieser Interaktions-Domänen werden in den nächsten Abschnitten vorgestellt.

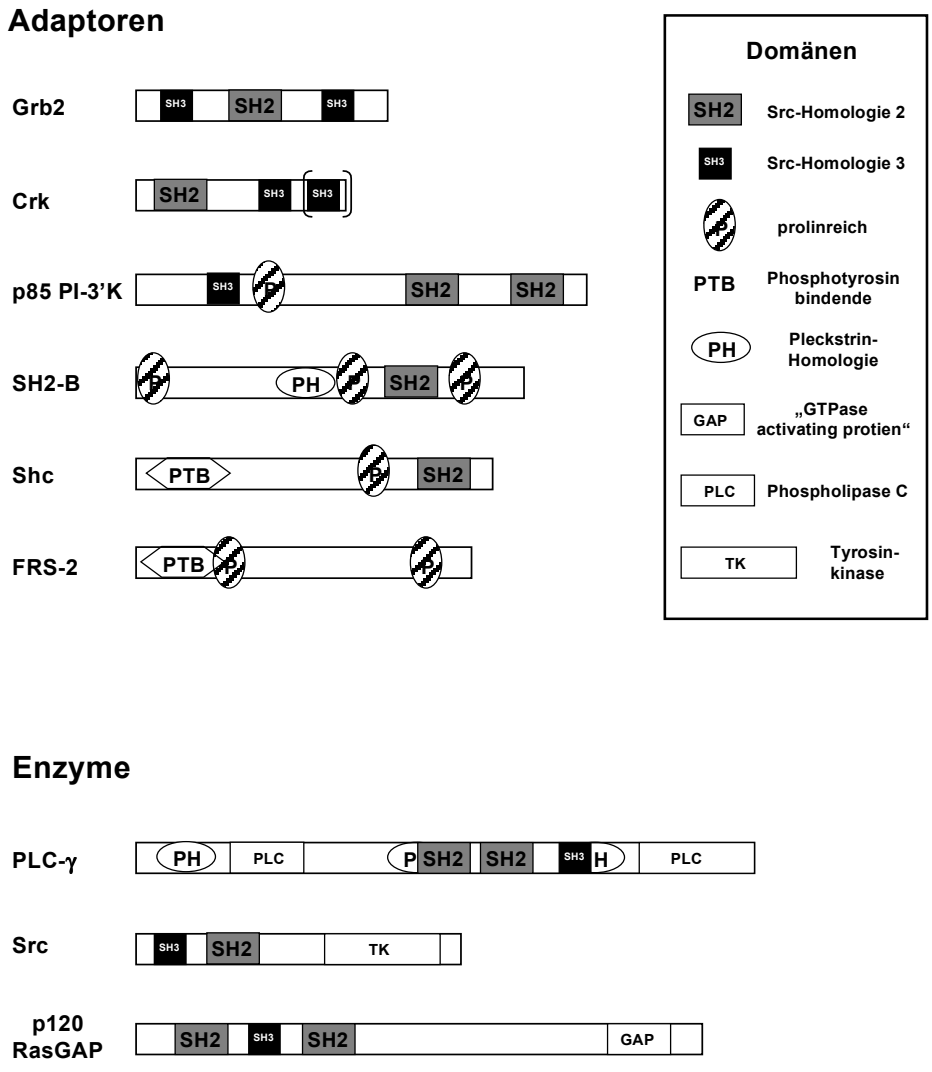

Abbildung 2.3: Schematische Darstellung einiger Zielproteine von Rezeptortyrosinkinasen mit ihren Protein-Protein-Interaktionsdomänen.
Grb2: „growth factor receptor bound protein"2; **Crk:** Zwei Formen des Adaptorproteins Crk, CrkI (eine SH3-Domäne) und CrkII (zwei SH3-Domänen); **p85 PI-3'-K**: regulatorische Untereinheit der Phosphatidylinositol-3'-kinase; **SH2-B:** prolinreiches, PH- und SH2-Domänen enthaltendes Protein; **Shc:** eine SH2-Domäne enthaltendes Adaptorprotein im Grb2/Ras-Signalweg; **FRS-2**: PTB-Domäne enthaltendes Adaptorprotein; **PLC-γ:** Phospholipase C-γ; **Src:** zytoplasmatische Tyrosinkinase, Onkoprotein des Rous-Sarkom-Virus; **p120RasGAP:** Ras GTPase aktivierendes Protein.

2.2.3.3 Protein-Protein-Interaktionsdomänen

SH (Src-Homologie)2-Domäne: Diese Art von Bindungsdomäne wurde erstmals von De Clue et al. (1987) für das Protein Src beschrieben. SH2-Domänen lassen sich leicht anhand konservierter AS-Sequenzen identifizieren (Schaffhausen, 1995). Die Domäne formt zwei Bindungstaschen für einen Peptidliganden in einer insgesamt globulären Umgebung aus einem β-Faltblattkern mit zwei flankierenden α-Helices (Booker et al., 1992; Overduin et al., 1992; Waksman et al., 1992). Die beiden Bindungstaschen umschließen einen phosphorylierten Tyrosinrest (pY) und einen weiteren spezifischen, oft hydrophoben AS-Rest („Spez.), so daß sich generell das Bindungsmotiv „pY X (+1) X (+2) Spez. (+3)" ergibt, wobei „X" eine beliebige AS darstellt. Insgesamt bestimmen drei oder fünf auf das Phosphotyrosin folgende AS-Reste die Spezifität der Bindung (Songyang et al., 1993). Zwei weitere von SH2-Domänen benutzte Bindungsmotive sind das sog. „immunoreceptor tyrosine based activation motif" ITAM (Cambier, 1995): Y X X L X_{6-8} Y X X L und das „immunoreceptor tyrosine based inhibition motif" ITIM (Unkeless & Jin, 1997): (V/I) X X Y X X (L/V).
SH2-Domänen sind die am besten charakterisierten Bindungsmodule der Signaltransduktion, nicht zuletzt deshalb, weil sie häufig vorkommen und grundlegende Bedeutung für das Verständnis der intrazellulären Signalübermittlung haben (Pawson et al., 1995).

PTB(Phosphotyrosin bindende)-Domäne: Die erste Domäne dieser Art wurde für das Protein Shc („SH2-containing") beschrieben(Kavanaugh & Williams, 1994; Blaikie et al., 1994). Die Zugehörigkeit zu dieser Klasse von Domänen definiert sich hauptsächlich aus deren Struktur, weniger aus der Aminosäuresequenz. PTB-Domänen bestehen aus einem 7-strängigen β-Sandwich, das C-terminal von einer α-Helix abgeschlossen wird (Zhou et al., 1996; Eck et al., 1996). Sie erkennen ebenfalls ein Phosphotyrosin enthaltendes Motiv: N P X pY (Zhou et al., 1995).

SH(Src-Homologie)3: Die SH3-Domäne wurde durch den Vergleich der Mitglieder der Src-Kinase-Familie entdeckt (Mayer et al., 1988; Stahl et al., 1988), wo diese Domäne neben der Bindung anderer Proteine an der Regulation der Kinasefunktion beteiligt ist. Fünf antiparallele β-Faltblätter formen eine kompakte, faßartige Struktur. Auf einer Seite dieser Struktur bilden konservierte, oft aromatische AS-Reste die Oberfläche, welche mit dem Liganden interagiert. SH3-Domänen wechselwirken mit prolinreichen Sequenzen, die zu einer linksgängigen Prolinhelix (Typ II) angeordnet sind (Ren et al., 1993 Yu et al., 1994).

WW-Domänen: WW-Domänen bestehen aus 38 Aminosäuren, darunter viele hydrophobe, aromatische oder Prolinreste. Zwei hochkonservierte Tryptophanreste gaben der Domäne ihren Namen. Die WW-Domäne besteht aus drei antiparallelen β-Faltblättern, die eine gebogene Oberfläche ausbilden (Macias et al., 1996). Ähnlich wie die SH3-Domäne bindet auch die WW-Domäne an prolinreiche Sequenzen mit der Konsensussequenz P P X Y.

PDZ(PSD-95, Dlg-A, ZO-1)-Domäne: Der Name dieser Domäne leitet sich von drei Proteinen her, bei denen sie zuerst entdeckt wurde: PSD-95 (Cho et al., 1992), dem *Drosophila* disc-large Tumor-suppressor DlgA (Woods & Bryant, 1991) und dem Tight

Junction-Protein ZO-1 (Itoh et al., 1993). Sechs β-Faltblätter und drei α-Helices bilden die Umgebung für eine Tasche, die besonders für die Aufnahme der C-terminalen Sequenz eines Liganden geeignet ist (Doyle et al., 1996). Paßt eine interne Sequenz in die Bindungstasche, kann aber auch diese gebunden werden (Brenman et al., 1996). Die bisher bekannten Konsensussequenzen für PDZ-Domänen lauten folgendermaßen:

E (S/T) X (V/I)	C-terminales Peptid
D X V	
ζ ζ ψ	(ζ = aromatische AS, ψ = hydrophobe AS)

2.2.3.4 Signaltransduktionswege

Die von Rezeptortyrosinkinasen auf Stimulation mit einem Wachstumsfaktor hin rekrutierten Proteine führen zu einer ganzen Anzahl zellulärer Antworten. Einige der wichtigsten und von den meisten Rezeptoren vermittelten Signalwege sind in Abb. 2.4 dargestellt und werden in den folgenden Abschnitten im einzelnen beschrieben.

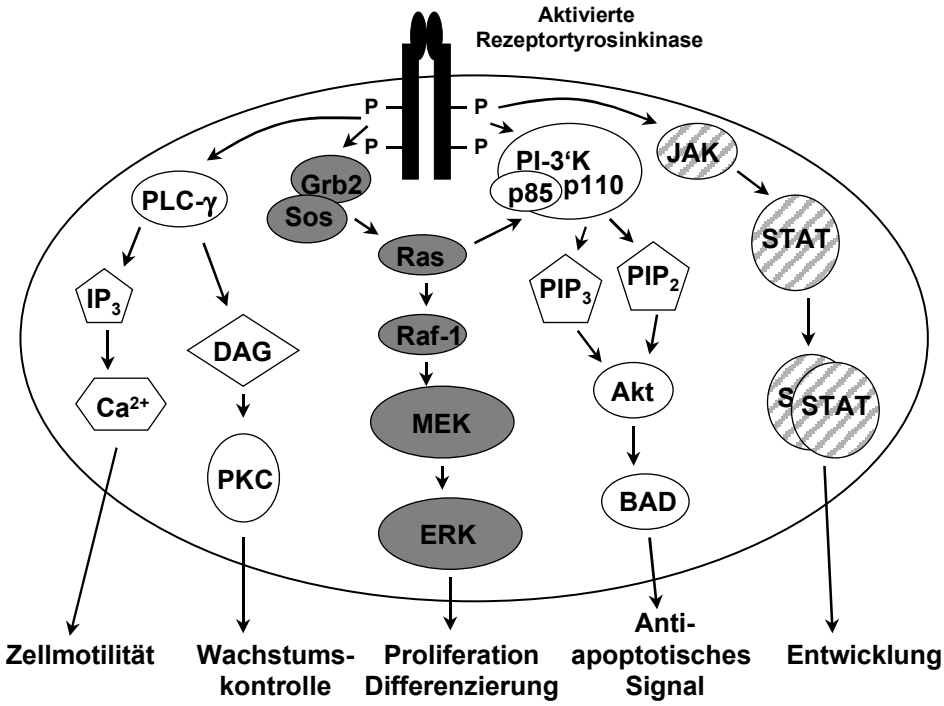

Abbildung 2.4: Allgemein benutze Signalwege von Rezeptortyrosinkinasen (variiert nach Porter & Vaillancourt, 1998).
P: Phosphotyrosin; **PLC-γ:** Phospholipase C-γ; **IP_3:** Inositol-1,4,5-triphosphat; **Ca^{2+}:** IP_3 stimuliert den Calciuminflux in die Zelle; **DAG:** Diacylglycerin; **PKC:** Proteinkinase C; **Grb2:** „Growth factor receptor bound protein"2; **Sos:** „Son of Sevenless"; **Ras:** GTPase, Onkoprotein aus dem Rattensarkom; **Raf-1**: Serin/Threoninkinase; **MEK:** „Mitogen-dependent Erk kinase"; **Erk:** „Extracellular-signal-regulated kinase**"; PI-3'K:** Phosphatidylinositol-3'-kinase; **PIP_3:** Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat; **PIP_2:** Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat; **Akt:** Proteinkinase B; **BAD:** Protein des Apoptosesignalwegs; **JAK:** Janus Kinase; **STAT:** „Signal transducer and activator of transcription".

2.2.3.4.1 Grb2/Sos/Ras

Das Adaptorprotein Grb2 verbindet die Rezeptortyrosinkinase mit der membranassoziierten GTPase Ras (eine onkogene Form wurde im Ratten-Sarkom entdeckt). Grb2 wird vom aktivierten Rezeptor direkt oder indirekt zur Plasmamembran rekrutiert, wo allein seine Nähe zu Ras ausreicht, die nachfolgende Signalkaskade auszulösen. Grb2 bindet mit seiner SH3-Domäne konstitutiv an das Protein Sos (Son Of Sevenless) (Rozakis-Adcock et al., 1993; Egan et al., 1993; Lowenstein et al., 1992), einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor, dessen Aufgabe es ist, die GTPase Ras durch Beladung mit neuem GTP zu aktivieren. Die GTP-geladene Form von Ras hat nun eine hohe Affinität zu der Serin/Threoninkinase Raf-1, deren Rekrutierung zur Plasmamembran eine Aktivierung der Kinase bewirkt (Vojtek et al., 1993; Leevers et al., 1994; Morrison & Cutler, 1997). Die Interaktion mit Ras allein ist hierbei jedoch nicht ausreichend für die stabile Aktivierung von Raf-1 (Traverse et al., 1993). Ein weiteres an der Raf-1-Aktivierung beteiligtes Protein ist 14-3-3, welches sowohl zur Aufgabe hat, Raf in Abwesenheit von GTP-Ras im inaktiven Zustand zu halten, wie auch für dessen Stabilisierung bei der Aktivierung zu sorgen (Tzivion et al., 1998). Aktiviertes Raf-1 interagiert nun über seine C-terminale katalytische Domäne wiederum mit zwei MAPK (Mitogenaktivierte Proteinkinasen)-kinasen, auch MEK-1 und 2 (Mitogenabhängige Erk-kinasen) genannt. MEK-1 und 2 werden dabei von Raf-1 phosphoryliert (Crews & Erikson, 1993). Sie selbst phosphorylieren sowohl Threonin als auch Tyrosinreste in dem Motiv T E Y (Ein-Buchstaben-Code) der MAP-kinasen $p42^{MAPK}$ und $p44^{MAPK}$ (auch als Erk-1 und -2 (durch extrazelluläre Signale regulierte Kinasen) bezeichnet). Sind diese durch Phosphorylierung aktiviert (Crews et al., 1992), translozieren sie in den Zellkern und phosphorylieren dort Transkriptionsfaktoren wie z.B. Elk-1, wodurch gezielt spezielle Gene reguliert werden (Marais et al., 1993).
Letztendlich führt der Ras-Signalweg im Allgemeinen zur Zellproliferation und/oder Differenzierung (Smith et al., 1986; Feig & Cooper, 1988; Cai et al., 1990; Koch et al., 1991).
Ganz so geradlinig wie hier verkürzt dargestellt, verläuft der Ras-Signalweg allerdings wahrscheinlich nicht. Es gibt durchaus Hinweise auf Kontakte zu anderen Signalwegen (Campbell et al., 1998).

2.2.3.4.2 Phosphatidylinositol-3'-kinase (PI-3'K)

Die Phosphatidylinositol-3'-kinase (PI-3'K) besteht aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit, p85 bzw. p110. p85 kann mit vielen Rezeptortyrosinkinasen direkt interagieren (van der Geer et al., 1994). Wird die PI-3'K auf diese Weise in Kontakt mit der Plasmamembran gebracht, kann sie dort Membranlipide zu Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PIP_2) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP_3) umsetzen (Auger et al., 1989). PIP_2 und PIP_3 rekrutieren nun die Proteinkinase B oder Akt über deren sog. PH(Pleckstrin homologe)-Domäne und aktivieren die Kinase (Franke et al., 1997; Klippel et al., 1997; Stokoe et al., 1997). Eins der wichtigsten Substrate von Akt ist das mit apoptotischen Signalen verknüpfte Protein BAD. Wird BAD von Akt serinphosphoryliert, verliert es die Fähigkeit, Heterodimere mit den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-x oder Bcl-2 zu bilden, welche, auf diese Weise freigesetzt, Proliferationssignale in den Kern senden (Zha et al., 1996). Die Aktivierung der PI-3'-Kinase kann neben dem direkten Weg zu den Rezeptoren auch über Ras erfolgen (Rodriguez-Viciana et al., 1994).

2.2.3.4.3 Phospholipase C (PLC)-γ

Die Phospholipase C-γ hydrolysiert bevorzugt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Diacylglicerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). Diacylglycerin fungiert als Aktivator der Proteinkinase C (PKC), die als Rezeptor für Tumorpromotoren wie den Phorbolester TPA entdeckt wurde (Forsbeck et al., 1985), und damit mit Wachstumskontrolle in Zusammenhang gebracht wird. IP_3 kann intrazelluläre Ca^{2+}-Vorräte mobilisieren und dadurch Ca^{2+}-abhängige Signale regulieren. Ca^{2+} beeinflußt u.a. zytoskelettorganisierende Proteine wie Gelsolin oder Profilin (Chen et al., 1996; Goldschmidt-Clermont et al., 1991).

2.2.3.4.4 Jak/STAT

Die STAT-Proteine („signal transducers and activators of transcription“) werden auf die Stimulation durch verschiedene Wachstumsfaktoren hin phosphoryliert und damit aktiviert. Sie enthalten SH2-Domänen, die sie entweder zur direkten Bindung an einen Rezeptor befähigen, oder die Rekrutierung geschieht über sog. Janus-Kinasen (JAK). Janus-Kinasen sind zytoplasmatisch und können ebenfalls an Rezeptoren binden, z.B. an den EGF- oder den PDGF-Rezeptor (Leaman et al., 1996; Vignais et al., 1996). Werden STAT-Proteine aktiviert, bilden sie Homo- oder Heterodimere (Greenlund et al., 1995), die in den Kern translozieren, dort an ihre Ziel-DNA-Sequenzen binden und so essentiell zur zytokinspezifischen Regulierung von Proliferations- und Entwicklungsprogrammen beitragen (Pellegrini & Dusanter-Fourt, 1997).

Die Rezeptortyrosinkinase TrkA nutzt die eben beschriebenen Signalwege im Allgemeinen genauso wie die meisten anderen Rezeptoren. Eigenheiten und die wichtigsten Signale des Trk-Rezeptors werden in Abb. 2.5 und im nächsten Abschnitt noch einmal zusammengefaßt.

2.2.3.5 Signaltransduktion durch TrkA

Das durch TrkA vemittelte NGF-Signal kann je nach Zellkontext ganz unterschiedliche Auswirkungen entfalten. In Fibroblasten führt es zur Proliferation, in humanen Medulloblastomzellen zur Apoptose (Muragaki et al., 1997; Chou et al., 2000) und in neuronalen und PC12-Zellen zur Differenzierung.
Trk aktiviert dazu eine ganze Reihe von Proteinen: Shc, Grb-2, Sos, PLC-γ-1, die PI-3‘K, Akt, Ras, die MAP-Kinasen/Erk-1 und 2, c-yes, die Proteintyrosinphosphatase-1C, die SH2-Domäne enthaltende Tyrosinphosphatase SH-PTP-2 (Review: Kaplan & Miller, 1997), die Csk homologe Tyrosinkinase CHK (Yamashita et al., 1999), und die Adaptoren FRS-2 (Kouhara et al., 1997; Meakin et al., 1999), SH2-B und rAPS (Qian et al., 1998).
Der von TrkA benutzte Grb2/Sos/Ras-Signalweg unterscheidet sich in einigen Punkten vom allgemeinen Bild (Review: Kaplan & Miller, 2000). TrkA bindet Grb2 nicht direkt, sondern rekrutiert dieses Protein durch Vermittlung eines weiteren Adaptors, Shc, der über seine PTB-Domäne an das Phosphotyrosin 490 der Juxtamembrandomäne von TrkA bindet, ebenso wie über die Adaproten SH2-B und FRS-2. FRS-2 interagiert über seine PTB-Domäne mit TrkA ähnlich wie Shc (Ong et al., 2000; Kouhara et al., 1997), SH2-B über seine SH2-Domäne mit der katalytischen Schleife (Y670, Y674 und Y675) des Rezeptors (Qian et al., 1998). Auch die PLC-γ, welche durch ihre SH2-Domäne an den C-terminalen Phosphotyrosinrest 785 von TrkA bindet, trägt zur Aktivierung des Ras-Signalwegs bei (Stephens et al., 1994). Der Ras-Signaltransduktionsweg führt bei TrkA zum einen über die MAP-Kinasen zu Differenzierungssignalen, zum anderen über die PI-3‘-kinase, die nicht direkt an TrkA binden kann, zu anti-apoptotischen Signalen. Diese

verlaufen über Akt (Inhibition apoptotischer Signale), daneben aber auch unter Beteiligung der MAP-kinasen und des Transkriptionsfaktors CREB („cAMP response element binding protein“) direkt über das anti-apoptotische Protein Bcl-2, dessen Expression durch NGF gesteigert wird (Liu et al., 1999). Akt ist außerdem an einem von der Depolarisation der Zelle abhängigen Überlebenssignal in Zusammenarbeit mit Calcium-Kanälen vom L-Typ beteiligt (Vaillant et al., 1999).

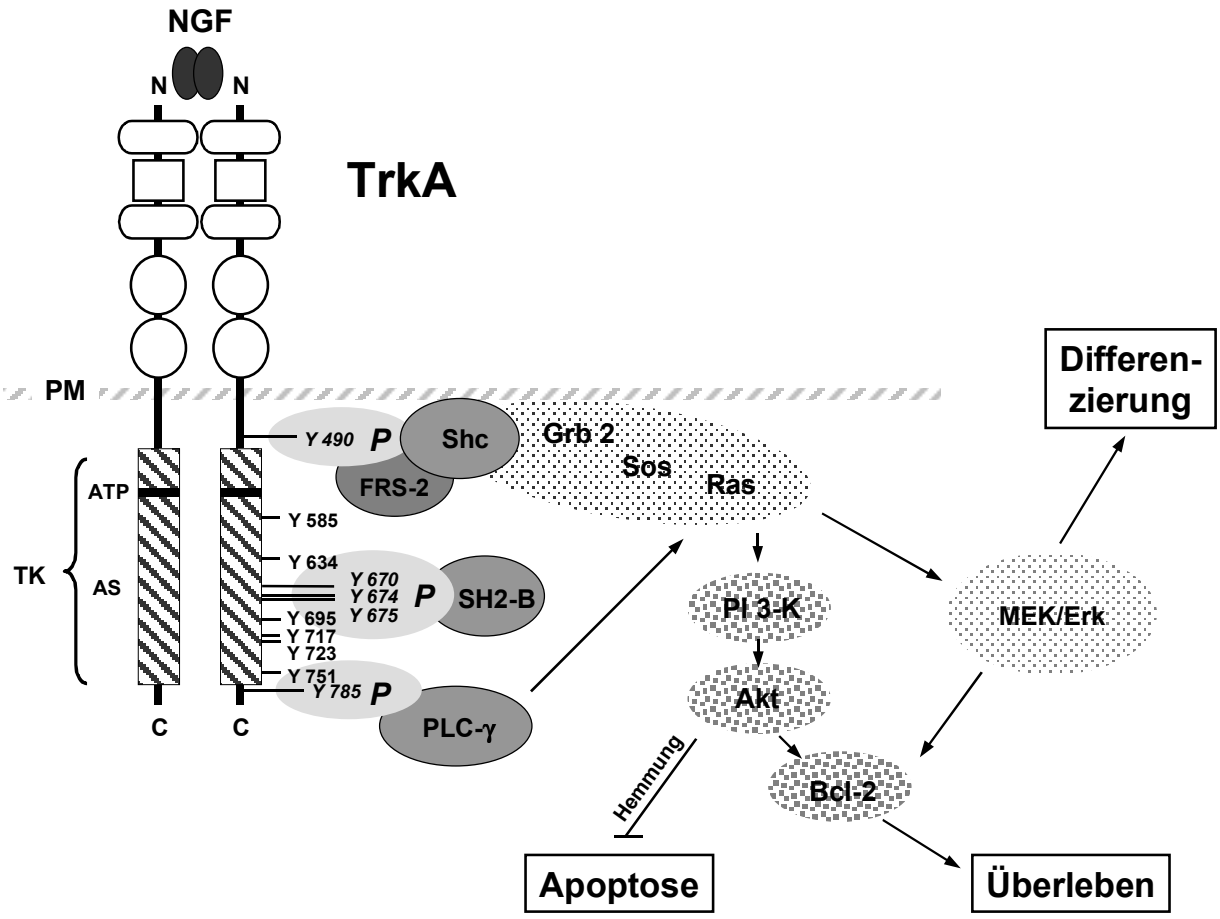

Abbildung 2.5: Wichtigste Signaltransduktionswege der Rezeptortyrosinkinase TrkA
PM: Plasmamembran, **TK:** Tyrosinkinase; **ATP:** ATP-Bindungsstelle; **AS:** Aktivierungsschleife; **NGF:** Nervenwachstumsfaktor. Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne sind numeriert. Phosphorylierungsstellen sind mit **P** markiert.

Eine der Hauptaufgaben von NGF und TrkA ist die Steuerung von Differenzierungsprozessen in neuronalen Zellen. Dieser Vorgang geht mit drastischen morphologischen Änderungen einher, die eine Neustrukturierung des Zytoskeletts bedingen. Die Steuerung solcher Zytoskelettveränderungen auf Stimulation durch Wachstumsfaktorrezeptoren im allgemeinen wird mit intrazellulären Signalproteinen wie den Nicht-Rezeptortyrosinkinasen der Src-Familie (Fincham & Frame, 1998; Fincham et al, 1996), FAK („focal adhesion kinase“) und c-Abl (Plattner et al., 1999) in Verbindung gebracht. Für Abl konnte besonders in *Drosophila* eine klare Verbindung zu Prozessen der neuronalen Entwicklung aufgezeigt werden (siehe Abschnitt 2.5.2.2). Daher stellt Abl auch in Säugern einen vielversprechenden Kandidaten als Regulator für Zytoskelettveränderungen im Nervensystem dar.

2.3 Die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Abl

Die intrazelluläre Tyrosinkinase Abl wurde erstmals im Zusammenhang mit der Abelson-Maus-Leukämie entdeckt und als deren auslösendes Agens beschrieben. Auch in verschiedenen anderen Leukämien [ALL (Akute lymphatische Leukämie), CML (Chronische myelozytische Leukämie) und CNL (Chronische neutrophile Leukämie)] spielen onkogene Abl-Formen, die BCR-Abl-Onkoproteine p185, p210 und p230, eine entscheidende Rolle. Diese Fusionsproteine entstehen durch Translokationen zwischen dem *c-abl*-Gen auf Chromosom 9 und dem *bcr* („break point cluster region")-Gen auf Chromosom 22 (Bildung des sog. Philadelphia-Chromosoms) und führen zur Expression dauerhaft aktivierter Abl-Kinasen (Melo et al., 1996).
Als zelluläres Homolog dieser onkogenen Abl-Formen konnte schließlich die Nicht-Rezeptortyrosinkinase c-Abl identifiziert werden.

2.3.1 Strukturelemente von c-Abl

In Säugern existieren zwei alternative Spliceformen der mRNA von Abl, Typ Ia und b im Menschen oder I und IV in der Maus, die von unterschiedlichen 5' Exons des *c-abl*-Gens mit unterschiedlichen Promotoren transkribiert werden. Die beiden daraus entstehenden Abl-Proteine gleichen sich im größten Teil der funktionellen Domänen, unterscheiden sich allerdings im N-Terminus, wobei eine Myristylierungsstelle in Typ Ib/IV diese Spliceform in die Lage versetzt, sich an der Innenseite der Plasmamembran zu plazieren. Diese Lokalisierung ist für das Transformationspotential aktivierter Abl-Kinase in Fibroblasten notwendig (Daley et al., 1992).
Die weiteren, in beiden Formen vorhandenen funktionellen Domänen sind gut charakterisiert (Abb. 2.6):

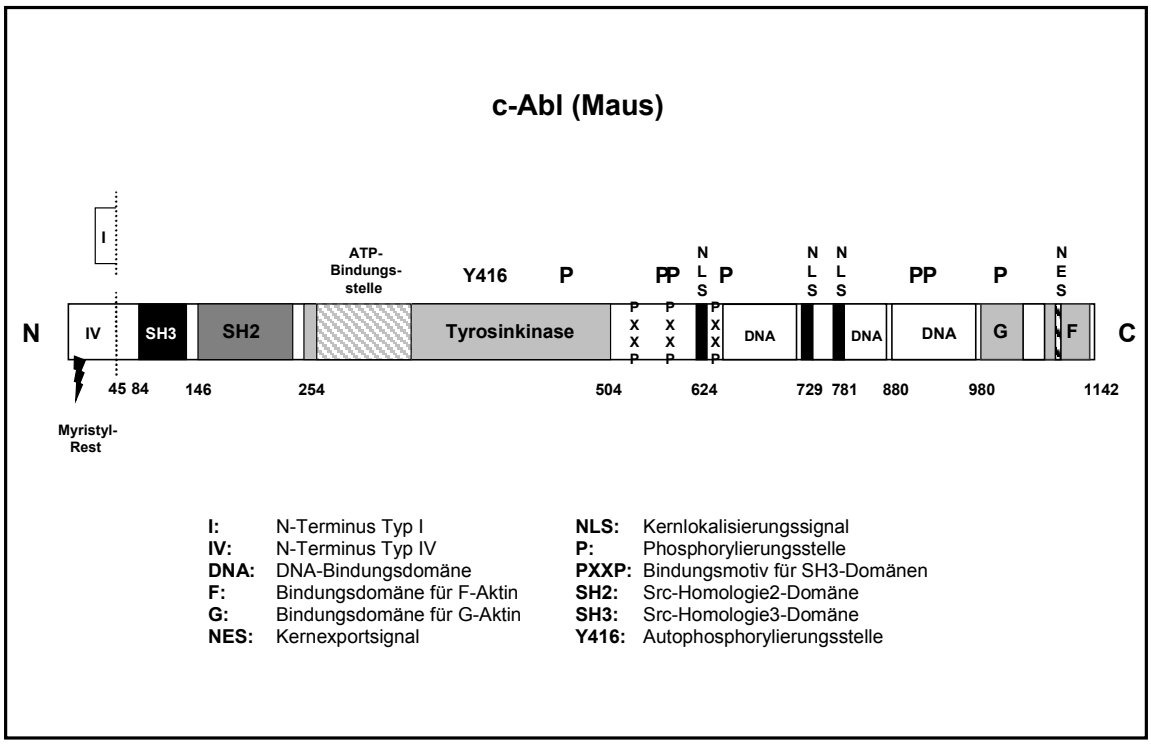

Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des murinen c-Abl nach Van Etten (1999).

SH3-Domäne: Die Abl-SH3-Domäne ist durch die Ausbildung einer intramolekularen Bindung mit einem Prolin-Rest in der Linkerregion zwischen SH2- und Kinase-Domäne an der Regulation der Kinaseaktivität beteiligt (Barilá & Superti-Furga, 1998). Daneben bindet sie spezifisch an Abl-Interaktionspartner wie z.B. Abi-1, Abi-2, Aap1, Atm, das p53-Homolog p73 (Agami et al., 1999) und das Aktin organisierende Protein Mena (Gertler et al., 1996).

SH2-Domäne: Unter bestimmten Bedingungen löst die Überexpression von c-Abl einen Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus aus (Wen et al., 1996), woran sowohl die SH2-Domäne als auch die Kinasefunktion des Proteins beteiligt sind. Ebenso ist die SH2-Domäne notwendig für die Transformation von Fibroblasten durch aktivierte Abl-Proteine (Mayer et al., 1992).

Kinase-Domäne: Die Tyrosinkinase-Funktion des Enzyms ist streng reguliert, so daß eine Überexpression von c-Abl allein nicht zur Transformation einer Zelle führt (Jackson & Baltimore, 1989), im Gegensatz zur Expression dauerhaft aktivierter Abl-Formen wie BCR-Abl oder v-Abl. Neben der genannten intramolekularen Stabilisierung einer inaktiven Konformation durch die SH3-Domäne, sind auch verschiedene Interaktionspartner an der Regulation beteiligt. Das Rb-Protein z.B. bindet die ATP-Bindungsstelle der Abl-Kinase und inhibiert das Enzym. Wird es von cdk4/6 phosphoryliert setzt es aktiviertes Abl frei, das in der S-Phase des Zellzyklus die RNA-Polymerase II phosphorylieren und damit regulieren kann. Möglicherweise fördert Abl so das Zellwachstum während der S-Phase.

DNA-Bindungsstellen: c-Abl besitzt drei beieinander gelegene DNA-Bindungsstellen, deren funktionelle Bedeutung weitgehend unklar ist. Möglicherweise sind sie in Komlex mit Creb und E2F-1 an der Modulation von deren Transkriptionsaktivität beteiligt oder für DNA-Reparatur-Prozesse nötig, bei denen Abl eine Rolle spielt (Review: Van Etten, 1999).

NLS: c-Abl verfügt über drei Kernlokalisierungssignale (NLS, „nuclear-localization signal“) mit redundanter Funktion. Im Zellkern (Wen et al., 1996) ist es an der Regulation des Zellzyklus, der Transkription (siehe Kinase-Domäne) und an Reparaturvorgängen und/oder dem Auslösen von Apoptose durch ATM, p53 und p73 (Yuan et al., 1999) beteiligt.

NES: Ein C-terminal gelegenes Kernexportsignal (NES, „nuclear export signal“) ermöglicht es dem Protein außerdem, auch Aufgaben im Zytoplasma wahrzunehmen.

G- und F-Aktin-Bindungsstelle: Abl kann *in vitro* direkt sowohl an G- als auch an F-Aktin binden. Da es allerdings in den meisten Zellen nur in geringen Mengen exprimiert wird, spielt es bei Veränderungen von Aktinfilamenten wahrscheinlich eher lokal eine Rolle.

P: c-Abl kann als Substrat verschiedener Kinasen dienen: Atm, Cdc2, PKC und DNA-abhängige Proteinkinasen.

PXXP: Abl besitzt mehrere Bindungsstellen für SH3-Domänen enthaltende Proteine wie Crk, Grb2, Nck, Abi-1 und -2.

2.3.2 Funktionen

Trotz der recht genauen Kenntnis der einzelnen funktionellen Domänen des Abl-Proteins ist seine exakte Aufgabe schwer zu beschreiben.
c-Abl wird sowohl im Embryo als auch im erwachsenen Organismus ubiquitär exprimiert und ist in eine ganze Reihe von zellulären Prozessen involviert. Darauf, daß c-Abl in unterschiedlichen Kompartimenten an sehr unterschiedlichen Aufgaben beteiligt sein kann, läßt bereits seine Fähigkeit schließen, verschiedene Lokalisationen in der Zelle einzunehmen. NLS und NES befähigen das Protein, sich sowohl im Kern, als auch im Zytoplasma aufzuhalten. Im Kern ist es in Regulationsprozesse des Zellzyklus, der Transkription, des Zellwachstums, der Apoptose und der DNA-Reparatur involviert.
In den letzten Jahren häufen sich allerdings die Hinweise, daß c-Abl seine Hauptaufgabe im Zytoplasma wahrnimmt.

2.3.2.1 Abl reguliert Umbauprozesse des Zytoskeletts

Eine, und vielleicht sogar die Hauptaufgabe von c-Abl ist nach neueren Erkenntnissen die Regulation von Umbauprozessen des Zytoskeletts. Fibroblasten, denen sowohl Abl wie auch die verwandte Kinase Arg fehlen, zeigen Veränderungen des Zytoskeletts (Koleske et al., 1998). Zytoskelettveränderungen in Fibroblasten hervorgerufen durch Abl fanden auch Kadlec & Pendergast (1997). Außerdem steigert BCR-Abl die Motilität von Zellen auf extrazellulärer Matrix und beschleunigt das Auswachsen und Zurückziehen von Pseudopodien (Salgia et al., 1997, Skorski et al., 1998).
Plattner et al. (1999) konnten c-Abl zum ersten Mal in der Signalkaskade von Wachstumsfaktorrezeptoren plazieren, die den membranassoziierten Anteil des Abl-Pools in der Zelle aktivieren und letztendlich Membrankräusel hervorrufen, ein Prozeß, der den ersten Schritt für Bewegungen einer Zelle darstellt, und in den das kleine G-Protein Rac involviert ist, welches wiederum von v-Abl aktiviert werden kann (Renshaw, 1996). Solche zellulären Bewegungsprozesse und Veränderungen des Zytoskeletts sind grundlegende Vorgänge bei der Differenzierung neuronaler Zellen.

2.3.2.2 Abl in der Entwicklung des Nervensystems

Es gibt einige Hinweise darauf, daß c-Abl in Säugern über seine regulatorische Funktion im Bereich des Zytoskeletts an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt ist. Diese Abl-Funktion konnte allerdings erst durch die Ausschaltung des *abl*-Gens und zusätzlich eines verwandten Gens, des sog. *arg* („abl related gene“, Kruh et al., 1986) von Koleske et al. (1998) gezeigt werden. Die Identität des Proteins Arg zu c-Abl beträgt 34 % am N-Terminus, 89 % in den SH2/3-Domänen, 94 % bei der Tyrosinkinase und 27 % in der C-terminalen Hälfte, wobei die drei PXXP-Motive konserviert sind. Auch Arg verfügt über G- und F-Aktin-Bindungsstellen, nicht jedoch über Kernlokalisationssignale, so daß seine Lokalisation ausschließlich zytosolisch und seine Funktion dort möglicherweise mit Abl redundant ist. Die kombinierte Ausschaltung des *abl*- und *arg*-Gens führte in Mäusen zu schweren Neurulationsdefekten mit fehlerhafter Organisation des Aktinzytoskeletts im Neuroepithel (Koleske et al., 1998).
Auf eine Rolle von Abl in der späteren Entwicklung des Gehirns deutet die sog. Scrambler-Mutation in Mäusen hin. Das mutierte Gen kodiert für mDab1, was Disabled bei *Drosophila* entspricht. Das Protein Dab ist in den Fliegen zusammen mit Abl für die Entwicklung des Nervensystems verantwortlich. Die Scrambler-Mutation führt in Mäusen zu Ataxie, Fehlformationen des Gehirns und dem kompletten Fehlen von Nervenschichten im Cortex (Goffinet, 1997).

In *Drosophila* ist der Zusammenhang zwischen Abl, dem Zytoskelett und neuronalen Entwicklungsvorgängen besonders deutlich. Das *Drosophila*-Homolog von c-Abl, D-Abl, zeigt in der N-terminalen Hälfte große Homologie zu seinem Verwandten: 47 % am N-Terminus, 82 % in den SH3/2-Domänen, 87 % bei der Tyrosinkinasedomäne und 28 % in der C-terminalen Hälfe.
Während der Embryonalentwicklung wird das *Drosophila* Abl-Homolog vor allem in Axonen von Nervenzellen des ZNS exprimiert. Eine Deletion des *D-abl*-Gens führt zu schwachen ZNS-Defekten und läßt das intersegmentale Motorneuron b im Wachstum anhalten, bevor es sein Ziel erreicht hat (Wills et al., 1999). Überexpression von D-Abl dagegen läßt das Neuron über sein Ziel hinaus wachsen (Wills et al., 1999a). Die durch den Verlust von D-Abl hervorgerufenen ZNS-Defekte können durch die gleichzeitige Inaktivierung verschiedener anderer Proteine verstärkt werden, von denen die meisten mit dem Zytoskelett zu tun haben:

Disabled	Adaptorprotein, D-Abl-Substrat	Gertler et al. (1989, 1993)
Fascilin	neuronales Zelladhäsionsprotein	Elkins et al. (1990)
Notch	Rezeptor in neuronalen Wachstumskegeln	Giniger (1998)
Armadillo	*Drosophila* β-Catenin	Loureiro et al. (1998)
DTrio	Guaninnukleotid-Austauschfaktor für Rho und Rac	Lanier & Gertler (2000)
Profilin	Regulator der Aktinpolymerisation	Wills et al. (1999)

Eine genau entgegengesetzte Wirkung hat die Ausschaltung zweier anderer Gene: Dlar und Enabled (Ena). Ihr Fehlen mildert den $Abl^{-/-}$-Phänotyp, bewirkt aber bei alleiniger Ausschaltung ebenfalls schwache ZNS-Defekte. Bei Dlar handelt es sich um eine Phosphatase, von der man annimmt, daß sie den regulatorischen Gegenspieler zur Tyrosinkinase D-Abl darstellt (Wills et al., 1999a). Ena kann sowohl mit D-Abl wie auch mit Dlar interagieren und als deren Substrat fungieren (Wills et al., 1999; Lanier et al., 1999), wobei die Phosphorylierung allein allerdings scheinbar nicht ausreicht, die Funktion von Ena in der neuronalen Entwicklung von *Drosophila* zu steuern (Lanier & Gertler, 2000). Dennoch stellt Ena durch seine Funktion bei der Polymerisation von Aktin ein wichtiges Verbindungsglied von Abl zum Zytoskelett dar und damit möglicherweise auch zu Vorgängen im Wachstumskegel bei der neuronalen Differenzierung.

2.4 Molekulare Vorgänge im Wachstumskegel

Der Wachstumskegel eines Neuriten ist die treibende und steuernde Kraft bei der neuronalen Differenzierung. Er besteht aus einem voluminöseren Zentralteil mit membrangebundenen Organellen und Mikrotubuli (Letoureau & Ressler, 1983; Forscher & Smith, 1988; Goldberg & Burmeister, 1989) und einer dünnen peripheren Zytoplasmaschicht mit dichtem Aktinnetzwerk, von der aus sich Filopodien mit Bündeln aus Aktinfilamenten (Letourneau & Ressler, 1983, Lewis & Bridgman, 1992) einige µm weit ausstrecken und die Umgebung abtasten können (Caudy & Bentley, 1986; Hammarback & Letourneau, 1986).

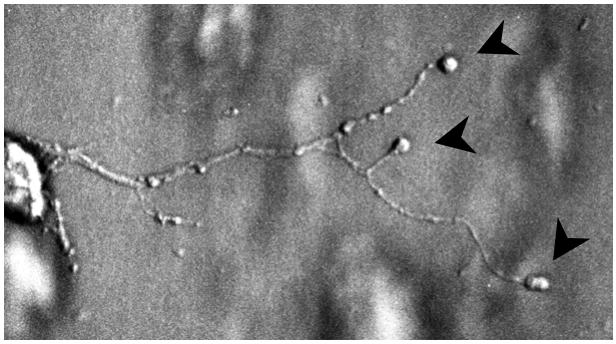

Abbildung 2.7: Auswachsender Neurit einer PC12-Zelle in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix.
Die Zellen wurden in ein Kollagengel eingegossen und anschließend 7 Tage lang mit NGF zur Differenzierung angeregt. Aus dem Zellkörper (ganz links im Bild) wächst ein sich verzweigender Neurit aus. Die Wachstumskegel am Ende der Neuritenverzweigungen (rechts im Bild) sind durch schwarze Pfeile markiert.

Der Wachstumskegel bewerkstelligt die Verlängerung des Neuriten ebenso wie Zu- und Abwenden von einem Ziel und letztendlich die Zielerkennung (Goldberg & Burmeister, 1986). Diese Prozesse sollten ähnlich verlaufen wie bei Bewegungen nicht-neuronaler Zellen:
Die Zelle bildet eine Polarität aus. Sie streckt einen Auswuchs in die entsprechende Richtung, was intrazellulär eine Bewegung von Aktinfilamenten in Richtung der Zellmembran bedeutet. Dann baut dieser Auswuchs halbstabile Kontakte zu seiner Umgebung auf, bildet Fokalkontakte mit Integrinen, zytosolischen Signal- und Zytoskelettproteinen, die nun bidirektionale Signale zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett vermitteln.
Sowohl Neurotrophine als auch die Extrazellularmatrix in Form von Laminin und Fibronektin und deren Rezeptoren, die Integrine, arbeiten bei der Förderung des Neuritenauswachsens zusammen und verstärken ihre Effekte dabei. NGF stimuliert die Formation aktinhaltiger Auswüchse und deren Beweglichkeit (Seeley & Greene, 1983; Aletta & Greene, 1988). Laminin 1 erleichtert das Voranschreiten der Mikrotubili und die Rekrutierung membrangebundener Organellen in die Auswüchse (Rivas et al., 1992). NGF stimuliert in PC12-Zellen die Integrinexpression (Zhang et al., 1993) und veranlaßt die Aggregation von Integrin in den Spitzen der Filopodien (Grabham & Goldberg 1997).
In die Bewegungsvorgänge der neuronalen Zellen sind GTPasen der Rho-Familie involviert (Jin & Strittmatter, 1997; Kaufmann et al., 1998; Kuhn et al., 1998, 1999), sowie zytoplasmatische Kinasen wie Src, FAK, Abl und zytoskelettorganisierende Proteine wie Paxillin, Ena und der Arp2/3-Komplex (Goldberg et al., 2000).
Der genaue molekulare Mechanismus, der all diese einzelnen Vorgänge miteinander verknüpft, ist allerdings nicht bekannt.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Auswachsen von Neuriten während der neuronalen Differenzierung wird von Neurotrophinen, besonders vom Nervenwachstumsfaktor NGF, gesteuert (Seeley & Greene, 1983; Snider & Johnson, 1989). Es beinhaltet die Bildung von Auswüchsen, das Wenden des Wachstumskegels in eine bestimmte Richtung und letztendlich die permanente Stabilisierung der vom Wachstumskegel vorgegebenen Form der Zelle. Dazu müssen dramatische Veränderungen des Zytoskeletts stattfinden.
Auf molekularer Ebene muß die Zelle das extrazelluläre NGF-Signal in Zytoskelettumbau umsetzten. Die dafür notwendige Signaltransduktionskaskade beginnt mit dem Zelloberflächenrezeptor TrkA und endet mit der zielgerichteten Polymerisation von Aktin.
Über welche intrazellulären Signalproteine und Modifikationsvorgänge erfolgt nun die Vermittlung dieses Signals?
Ein Schlüsselfaktor dabei ist sicherlich die Tyrosinphosphorylierung, wie die Beteiligung zytosolischer Kinasen und Phosphatasen im *Drosophila*-System deutlich demonstriert (Wills et al., 1999a). Im Gegensatz zu *Drosophila* ist in Säugern das Zusammenspiel zytoskelett-organisierender Proteine bei der neuronalen Differenzierung allerdings noch wenig erforscht, und die meisten für TrkA bekannten Signalkaskaden sind keineswegs spezifisch für diesen Rezeptor, sondern können von fast allen Rezeptortyrosinkinasen ausgelöst werden.
Diese Arbeit beschreibt nun einen neuen TrkA-spezifischen Signalweg, der eine Verbindung vom NGF-Rezeptor zu regulatorischen Proteinen des Aktinzytoskeletts knüpft. Zur Charakterisierung der nachgeordneten Signalkaskade wird dabei u.a. das Hefe-Zwei-Hybridsystems herangezogen, sowie die NGF-induzierte Neuritenbildung in PC12-Zellen, welche hier als Modellsystem für die neuronale Differenzierung dient.

3 Material

3.1 Reagenzien

Chemikalien:

6-Amino-n-hexan-säure	Serva
Acrylamid 2× kristallisiert	Serva
Adenin hemisulfat salt	Roth
Adenosin-5'-triphosphat (ATP) kristallisiertes Dinatriumsalz	Boehringer/Roche
Agar Agar	Merck
Agarose ultra pure DNA Grade	Bio-Rad
Aminotriazol	Roth
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Merck
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Serva
Benzamidin	Sigma
Bisacrylamid (Bis)	Serva
BisTrisPopan (BTP)	Sigma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
BSA (Bovines Serum Albumin)	Roth
Calciumchlorid	Merk
Caseinhydrolysat Pepton Nr. 140	Gibco BRL
Chloramphenicol	Boehringer/Roche
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliantblue	Sigma
DABCO	Sigma
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
Dextransulfat	Sigma
Difco Yeast Nitrogen Base	Difco
Dimethylformamid	Merck
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
dNTPs (Na-Salze)	Gibco BRL
DTT (Dithiothreitol)	Boehringer
Dulbecco‘s Modified Essential Medium (DMEM)	Gibco BRL
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck
Effectene	QIAGEN
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Boehringer/Roche
FCS (Fötales Kälberserum)	Gibco BRL
Formaldehyd 37%	Merck
Formamid	Merck
G418-Sulfat (Geneticin)	Gibco BRL
GeneShuttle 20	Quantum
Glukose	Merck
Glutamin	Merck
Glutathionsepharose 4B	Pharmacia
Glycerin	Merck

Glycin	Roth
Guanidiniumisothiocyanat	Sigma
HCl	Merck
Hefe-Extrakt	Gibco BRL
Hepes	Roth
H-Milch	Hansano
Indolacrylsäure	Roth
Ionenaustauscher-Harz (AG 501-X8, 20-50 mesh)	Bio-Rad
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Sigma
Isopropyl-ß-D-Thio-Galactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck
Kanamycin	Merck
Kollagen S (Kälberhaut)	Boehringer/Roche
L-ArgininHCl	Roth
L-Histidin	Roth
Lipofektin Reagenz	Gibco BRL
L-Isoleucin	Roth
Lithiumacetat	Merck
Lithiumchlorid	Merck
L-Leucin	Roth
L-Methionin	Roth
L-Phenylalanin	Roth
L-Threonin	Roth
L-Tryptophan	Roth
L-Tyrosin	Roth
L-Valin	Roth
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Manganchlorid	Merck
β-Mercaptoethanol	Serva
Methanol	Merck
Mineralöl	Sigma
Molekulargewichtsmarker, broad range	New England Biolabs
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	Roth
Mowiol	Höchst AG
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Natriumfluorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumvanadat (Na_3VO_4)	Merck
NGF (aus Maus Submaxillardrüsen 7S)	Boehringer/Roche
Nonidet P40	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma

PEG-4000	Merck
Penicillin	PAN
Pepton	Difco
Pferdeserum	PAA
Phenol	Roth
PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid)	Sigma
Polybrene	Sigma
Polylysin	Sigma
Ponceau S	Roth
Prolin	Sigma
Protamine Sulfate	Sigma
RNAse-Inhibitor (RNAse-Block)	Stratagene
Roti®-Fect	Roth
RPMI1640	Biochrom
Sarkosyl	Sigma
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva
Silikonlösung	Sigma
STI 571	Novartis Pharma AG
Stickstoff	Linde
Streptomcyin	PAN
Superfect	QIAGEN
SW13-Zellysat	Transduction Lab.
Szintillator	Roth
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethyl-ethylen-diamin)	Serva
Tetracyclin	Merck
Thiamin	Sigma
TransFast™	Promega
Trasylol	Bayer
Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan	Merck
Triton X-100 (Octophenolpolyethylen-glykolether)	Serva
Trypton	Merck
Tween20	Roth
Uracil	Roth
X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3Indoyl-ß-D-galaktopyranosid)	Merck
Xylenzyanol	Serva
Zinkchlorid	Merck

Transfektion von Zellkultur:

KCl	# P-5405	Sigma
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	# C-7902	
Chloroquin Diphosphat	# C-6628	
NaH_2PO_4	# S-3139	
HEPES	# H-4034	
D(+) Glucose	# G-6152	
Na_2HPO_4	# S-3264	
NaCl	# S-3014	

Radioaktive Substanzen:

γ[^{32}P]-ATP (3000 Ci/mmol)	ICN
α[^{32}P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	ICN
[^{125}J]-anti-Kaninchen aus Schaf (500-2000 Ci/mmol)	ICN
[^{125}J]-anti-Maus-IgG aus Schaf (500-2000 Ci/mmol)	ICN
[^{35}S] Trans-^{35}S-Label® (Methionin/Cystein)	ICN

Enzyme:

Klenow Polymerase (DNA Polymerase, 5U/µL	Amersham
Restriktionsendonukleasen	Stratagene
alkalische Phosphatase (1U/µL)	Boehringer/Roche
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	Gibco BRL
T4 DNA Ligase (aus *E.coli* NM 989)	Boehringer/Roche
Trypsin (5 x)	Gibco BRL

Desoxyribonukleinsäuren:

λ-DNA	Boehringer/Roche
Lachssperma-DNA	Sigma
Primer	Roth, MWG

Antikörper:

Schaf-IgG	Sigma
α-BCR (7C6), monoklonal	Santa Cruz
α-Kaninchen- IgG-FITC	Sigma
α-LexA Kaninchenserum freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. Martin Funk, Medigene, Matrinsried	
α-Maus IgG-FITC	Boehringer/Roche
α-Maus-IgA	Sigma
α-Mena, monoklonal	Transduction-Lab.
α-Phosphotyrosin (4G10), monoklonal	UBI
α-PLC-γ (SC-81), polyklonal	Santa Cruz
α-Trk (C14), polyklonal	Santa Cruz

Kits:

BigDye™Terminator	Perkin-Elmer
DNA-Sequenzier-Kit BigDye™Terminator,	Perkin-Elmer
Dynabeads® Oligo(dT)$_{25}$	Dynal
Jet Nick "Probe Purification after Labeling"	Genomed
Megaprime DNA labelling Kit RPN 1606/7	Amersham Buchler
pGEM-T	Promega
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extaction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
RNA matrix	Dianova
Rnaid® Plus Kit	BIO 101
TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega

3.2 Zellinien

PC12: Pheochromocytom-Zellen aus Ratte, DSM ACC 159
HEK 293: humane embryonale Nierenzellen, DSM ACC 305
K562: humane Zellen (chronisch myeloische Leukämie), exprimiert BCR-Abl und TrkA, ATCC CCL-243
NIH 3T3: Maus-Fibroblasten etabliert aus NIH Swiss Embryos (Jainchill et al., 1969)
FDC-P1-Mac11: Subklon der murinen hämatopoietischen Vorläuferzellinie FDC-P1. Die Zellen exprimieren den IL-3-, GM-CSF- und M-CSF-Rezeptor (Gliniak& Rohrschneider, 1990)
PhoenixAmpho: Verpackungszellinie für amphotrope Retroviren auf HEK 293-Basis (Swift et al., 1999)
SC-1: Mausembryo-Zellen, ATCC CRL-1404

3.3 Geräte

ABI Prism 310 Sequencer	Perkin-Elmer
Bakterienschüttler	GFL
Bioimager BAS-1500 Fujifilm	Fuji Photo Film
Brutschränke	Memmert
CO_2-Inkubator	Thermoquest
Durchflußzytometer (FACScalibur)	Becton-Dickinson
Elektrophoresekammern	Zentralwerkstatt Von Keutz
Elektroporator	Bio-Rad
Eppendorfzentrifuge 5804 (R)	Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop	Nikon
Forschungsmikroskop "Universal"	Zeiss
Fotoapparat	Nikon
Geldokumentationsanlage	Intas
Geltrockner	Zentralwerkstatt Von Keutz
GSA-Rotor	Sorvall/Du Pont Instruments
Heizblock	Eppendorf
Heraeus Biofuge	Heraeus Christ
Hybridisierungs-Inkubator	Biometra
JA10-Rotor	Beckmann
Kocher	Köttermann
Labofuge	Hettich
MoFlow	Cytomation Inc.
Sonifier	Branson
Sorvall Zentrifugen-Becher 200ml	DuPont
Sorvall-Zentrifuge	Sorvall/Du Pont Instruments
Spektralphotometer	Pharmacia
SS34 Rotor	Sorvall/Du Pont Instruments
Steril-Werkbank	Heraeus Christ
Stromspannungsquelle	Biometra
Szintillationszähler	Beckmann
Thermocycler	Biometra
Tischzentrifuge	Eppendorf
Tisch-Ultrazentrifuge	Beckmann
TLA-Rotor	Beckmann

Ultraschallwasserbad	Roth
UV-Lampe	Vilber Lourmat
Vakuum-Zentrifuge	Heraeus Christ
Videokamera	Visitron
Vortex	Eppendorf
Wasserbad	Köttermann
Westernblot-Kammer	Zentralwerkstatt Von Keutz
Zählkammer	Kühn & Bayer

3.4 Sonstige Materialien

6-Well-Platten	Nunc
24-Well-Platten	Nunc
Blottingpapier	Schleicher & Schuell
Chromatographie-Papier, Whatman 3MM	Pierce
Dynal MPC®-E Magnetständer	Dynal
Einmal-Sterilfilter (0,2µm)	Schleicher & Schuell
Elektroporationsküvetten	Eurogentech
Eppendorfreaktionsgefäße	Sarstedt
FACS-Gefäße	Greiner
Faltenfilter	Schleicher & Schuell
Filmkassetten Cronex high plus	DuPont
Filmkassetten ohne Verstärkerfolie	Siemens
Filterspitzen	Biozym
GeneScreen Plus™	DuPont
Gewebekulturflaschen mit Filter	Nunc
Kanülen (1.2×40mm, 0.45×12mm)	Terumo Europe
Kryoröhrchen	Nalgene Falcon
Nitrocellulose-Membran	Schleicher und Schuell
Petrischalen 15 cm, quadratisch	Greiner
Petrischalen für die Gewebekultur	Greiner
Petrischalen rund	Greiner
Röntgenfilm X-OMAT™	Kodak
sterile Spritzen 10 ml	Braun
Sterilfilter 0,22 µm	Sarstedt
Sterilfilter	Nalgene
Zentrifugengefäße 15ml	Sarstedt
Zentrifugengefäße 50ml	Falcon

3.5 Firmen

Amersham Life Sci.	Braunschweig, Deutschland
Bayer	Leverkusen, Deutschland
Beckmann Instruments	Palo Alto, USA
Becton-Dickinson	Heidelberg, Deutschland
BIO 101	La Jolla, USA
Bio Rad	Richmond, USA
Biochrom KG	Berlin, Deutschland
Biometra	Göttingen, Deutschland
Biozym	Hess. Oldendorf, Deutschland
Boehringer/Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Branson	USA
Braun	Melsungen, Deutschland
Clontech	Palo Alto, USA
Cytomation Inc.	Dubrillion, Helska Sys.
Dianova	Hamburg, Deutschland
Difco	Detroit, USA
DuPont	Bad Homburg, Deutschland
Dynal	Oslo, Norwegen
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eurogentech	Seraing, Belgien
Falcon	Heidelberg, Deutschland
Fuji Photo Film	Kanagawa, Japan
Genomed	Bad Oeynhausen, Deutschland
GFL	Burgwedel, Deutschland
Gibco BRL	Eggenstein, Deutschland
Greiner GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Heraeus Christ	Köln, Deutschland
Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Höchst AG	Frankfurt/M., Deutschland
ICN	Eschwege, Deutschland
Invitrogen	Groningen, Niederlande
Intas	Göttingen, Deutschland
Sorvall/Du Pont Instruments	Bad Nauheim, Deutschland
Kodak (Eastman Kodak Comp.)	New Haven, USA
Köttermann	Hänigsen, Deutschland
Kühn & Bayer	Nidderau, Deutschland
Memmert	Schwabach, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
MWG	Ebersberg, Deutschland
Nalgene (Nalge Nunc Int.)	Rochester, USA
New England Biolabs	Beverly, USA
Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Novartis Pharma AG	Basel, Schweiz
Nunc /Nalge Nunc Int.)	Rochester, USA
PAA Lab.	Cölbe, Deutschland
PAN	Aidenbach, Deutschland
Perkin-Elmer	Forster City, USA
Pharmacia	Freiburg, Deutschland
Pierce	Rockford, IL, USA

Promega	Madison, USA
QIAGEN	Hilden, Deutschland
Quantum Biotech. Inc.	Montreal, CAN
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Santa Cruz Biotech.	Santa Cruz, USA
Sarstedt	Nümbracht, Deutschland
Schleicher und Schuell	Dassel, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Siemens	Frankfurt/M., Deutschland
Sigma	München, Deutschland
Stratagene	La Jolla, USA
Terumo Europe	Leuven, Belgien
Thermoquest	Engelsbach, Deutschland
Transduction-Laboratories	Kensington, USA
UBI	Lake Placid, USA
Vilber Lourmat	Cedéx, Frankreich
Visitron	Puchheim, Deutschland
Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Zentralwerkstatt Von Keutz	Reiskirchen, Deutschland

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit DNA

4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die hier genannten DNA-Präparationsverfahren basieren auf der alkalischen Extraktionsmethode von Birnboim & Doly, 1979. Dabei macht man sich die unterschiedlichen Eigenschaften von genomischer Bakterien-DNA und Plasmid-DNA zunutze. So werden bei der alkalischen Lyse der Bakterienzellwand die linearen Stränge der hochmolekularen genomischen DNA irreversibel denaturiert. Die kovalent geschlossenen, ringförmigen Stränge der Plasmid-DNA dagegen können nicht voneinander getrennt werden. Diese erhalten bei der anschließenden Neutralisation ihre native Konformation zurück, während die chromosomale DNA mit den Zellwandtrümmern pelletiert wird.

Die Firma QIAGEN, deren Kits hier verwendet wurden, arbeitet mit Verfahren, die die DNA bei hohen Salzkonzentrationen auf eine Silicagel-Membran (QIAprep Spin-Säulen und QIAquick Gel Extraction Kit) oder bei niedrigen Salzkonzentrationen und einem bestimmten pH-Wert auf einen Anionaustauscher (Midi- und Maxi-Präparation) binden.

4.1.1.1 Minipräparation

(QIAprep Spin Miniprep Kit)
Eine Bakterien-Einzelkolonie wird in 3 mL 2YT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpft und bei 37°C für 12 - 16 h unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtkulur wird in Eppendorfgefäßen zentrifugiert: Tischzentrifuge / RT / 2 min / 14.000 rpm.
Das Bakterienpellet wird in 250 µL eiskaltem Puffer P1 resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien werden mit 250 µL P2 für 5 min bei RT lysiert und anschließend mit 350 µL N3 neutralisiert. Zelltrümmer und SDS-Salz werden pelletiert wie oben beschrieben. Der klare Überstand wird dann auf die Spin-Säule gegeben und 1 - 2 min auf die Membran zentrifugiert. Es wird mit 500 µL PB und anschließend 750 µL PE gewaschen. Zur möglichst vollständigen Entfernung des Salzes des PB-Puffers (für Sequenzierungen) kann der Puffer PE 5 min bei RT in der Säule stehengelassen werden, bevor er abzentrifugiert wird. Durch eine weitere 5-minütige Zentrifugation muß sichergestellt werden, daß der EtOH-haltige Puffer PE vollständig abgetrennt wird, bevor die DNA von der Säule mit 50 µL TE oder H_2O eluiert werden kann. Soll die DNA zur Transfektion in Zellkulturen eingesetzt werden, folgt eine EtOH-Fällung mit Wiederaufnahme in TE unter sterilen Bedingungen.

Ethanol-Fällung: Zu der DNA-Lsg. werden 1/10 Vol. 3 M NaAc, pH 5,2 und 2 Vol. absolutes Ethanol gegeben. Die DNA wird pelletiert: Tischzentrifuge / RT / 15 min / 14.000 rpm.
Das Pellet wird zur Entfernung des Salzes mit 400 µL 70 % EtOH gewaschen, anschließend bei RT oder 37 °C getrocknet und in TE oder H_2O wiederaufgenommen.

2YT-Medium (1 L):siehe 3.1.8.1.2 Transformation mit rekombinanter Plasmid-DNA
Antibiotikazusätze: siehe 3.1.8.1.2 Transformation mit rekombinanter Plasmid-DNA

P1:	50	mM	Tris/HCl	pH 8,0
	10	mM	EDTA	pH 8,0
	100	µg/mL	RNAse	
P2:	0,2	M	NaOH	
	1	%	SDS	

N3, PE und PB: Die genauen Inhaltsstoffe werden von der Firma QIAGEN nicht genannt.

TE-Puffer:	10	mM	Tris/HCl	pH 8,0
	1	mM	EDTA	pH 8,0

4.1.1.2 Midi(Maxi)präparation

(QIAGEN Plasmid Midi (Maxi) Kit zur Aufreinigung von DNA-Mengen bis zu 500 µg)
Eine Bakterien-Einzelkolonie wird in 5 mL 2YT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und für 5 - 6 h bei 37 °C im Schüttler vermehrt. Diese Vorkultur wird dann in 70 mL (200 mL) 2YT-Antibiotikum-Medium im Verhältnis 1 : 100 überimpft und für weitere 12 -16 h inkubiert, bis eine OD_{600} > 0,6 erreicht ist. Die Bakterien werden pelletiert: Sorvall-Zentrifuge / GSA-Rotor / 4 °C / 10 min / 10.000 rpm.
Das Pellet wird in 4 mL (10 mL) P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 mL (10 mL) P2 erfolgt die Lyse für 5 min bei RT. Nach der Zugabe von 4 mL (10 mL) eiskalter Lösung P3 wird die Suspension vorsichtig gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer werden abzentrifugiert: Sorvall-Zentrifuge / SS34-Rotor / 4 °C / 30 min / 12000 rpm.
Während der Zentrifugationszeit wird die QIAGEN-Säule mit 10 mL (30 mL) QBT-Puffer äquilibriert. Der gereinigte Überstand wird dann über ein Filter auf die Säule aufgetragen. Es wird zweimal mit je 10 mL (30 mL) QC-Puffer gewaschen. Anschließend wird die Plasmid-DNA mit 5 mL (15 mL) QF-Puffer eluiert und mit 3,8 mL (10,5 mL) Isopropanol (0,7 Volumenteile) bei RT präzipitiert. Die DNA wird pelletiert: Sorvall-Zentrifuge / SS34-Rotor / 4 °C / 30 min / 12.000 rpm. Sie wird anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen und an der Luft oder bei 37°C getrocknet. Die Plasmid-DNA wird dann in 1 mL TE-Puffer oder H_2O aufgenommen. Ist sie zur Transfektion bestimmt, wird nach der Isopropanolfällung unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

TE-Puffer: siehe 4.1.1.1 Minipräparation
P1, P2: siehe 4.1.1.1 Minipräparation

P3:	2,55	M	K-Acetat	pH 4,8
QBT-Puffer:	750	mM	NaCl	pH 7
	50	mM	MOPS	
	0,15	%	Triton X-100	
	15	%	Ethanol	
QC-Puffer:	1000	mM	NaCl	pH 7
	50	mM	MOPS	
	15	%	Ethanol	
QF-Puffer:	1250	mM	NaCl	pH 8,2
	50	mM	MOPS	
	15	%	Ethanol	

4.1.2 Restriktionsenzymspaltung

(Maniatis et al., 1982)
Restriktionsendonukleasen führen an bestimmten meist palindromischen Erkennungssequenzen oder in deren Nähe Doppelstrangbrüche in DNA ein. Dabei entstehen entweder stumpfe ("blunt") oder 5'- bzw. 3' überhängende ("kohäsive") Enden, die anschließend durch eine DNA-Ligase (4.1.7 Ligasereaktion) spezifisch wieder miteinander verbunden werden können. Restriktionsendonukleasen stellen somit nützliches Werkzeug zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle dar.
Die Restriktionsenzymspaltungen dieser Arbeit wurden unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Dabei werden 1 - 5 Einheiten (Units) Enzym/µg DNA eingesetzt. Der Verdau wird für mindestens 2 h (bis zu 24 h) bei der vorgeschriebenen Temperatur durchgeführt. Bei Spaltungen mit unterschiedlichen Enzymen wird zunächst dasjenige verwendet, das die niedrigere Ionenkonzentration benötigt. Nach Einstellen auf die erforderliche höhere Ionenkonzentration wird die Spaltung mit dem zweiten Enzym angeschlossen.
Das Volumen der zugegebenen Restriktionsendonuklease sollte nicht mehr als 1/10 des gesamten Restriktionsansatzes betragen, da der Aufbewahrungspuffer des Enzyms Glycerin enthält und dies in zu hoher Konzentration die Reaktion stört.
Die gewünschten DNA-Fragmente werden nach dem Restriktionsverdau über ein Agarosegel getrennt und isoliert (4.1.5. Agarosegelelektrophorese). Wird bei Plasmiden nur mit einem Enzym geschnitten unterbleibt dieser Schritt. Die DNA wird dann durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (4.1.4) von den Restriktionsenzymen befreit.

4.1.3 Dephosphorylierung

Um Religationen einfach geschnittener Plasmide zu verhindern, können diese mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert werden:

20	µL	Restriktionsspaltansatz
2	µL	Reaktionspuffer
0,5	µL	alkalische Phosphatase

Der Ansatz wird 30 min auf 37 °C inkubiert. Anschließend wird das Enzym durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt.

Reaktionspuffer:	500	mM	Tris/HCl	pH 9
	10	mM	$MgCl_2$	
	1	mM	$ZnCl_2$	

4.1.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die DNA-Lösung wird mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, gründlich gemischt und anschließend zentrifugiert: Tischzentrifuge / RT / 15 min / 14.000 rpm.
Die in der wäßrigen Phase wird vorsichtig abpipettiert und einer Ethanolfällung (4.1.1.1 Minipräparation) unterworfen.

4.1.5 Auftrennung von DNA-Molekülen durch Agarosegel-Elektrophorese

(Johnson & Grossmann, 1977)
Die Elektrophorese mit Agarosegelen dient der Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit linearer, doppelsträngiger DNA-Moleküle durch das elektrophoretische Feld eines Agarosegels umgekehrt proportional zum $\log_{10}$ ihrer Molekulargewichte (Helling et al., 1974).
Die aufgetrennten DNA-Banden können nach der Elektrophorese durch das fluoreszierende, interkalierende Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

4.1.5.1 Herstellung von Agarosegelen

In dieser Arbeit wurden Horizontal-Elektrophoresen mit 1 %igen Gelen durchgeführt.
Die Agarose wird durch Erhitzen im TAE-Puffer gelöst und zum Erhärten in eine Elektrophoresekammer gegossen. Ein Plastikkamm mit rechteckigen Zähnen hinterläßt in dem erstarrten Gel Aussparungen zum Auftragen der Proben.

kleines 1%iges Agarosegel:	0,25	g	Agarose
(5 x 7,5 cm)	25	mL	1 x TAE-Puffer
großes 1%iges Agarosegel:	0,8	g	Agarose
(11 x 14 cm)	80	mL	1 x TAE-Puffer
1 x TAE-Puffer:	40	mM	Tris, pH 8
	5	mM	NaAc
	1	mM	EDTA

4.1.5.2 Probenvorbereitung und Durchführung der Elektrophorese

DNA-Proben werden vor dem Auftragen mit 6 x Proben-Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgt in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 5 - 7 V/cm Agarosegel, bis die Bromphenolblau-Farbfront etwa 3/4 des Gels durchlaufen hat. Anschließend wird das Gel in Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/mL) für 15 - 30 min gefärbt und unter UV-Beleuchtung (254 nm) fotografiert. Sollen die DNA-Fragmente aufgereinigt werden, erfolgt die Detektion der Banden bei 366 nm.

1× Proben-Auftragspuffer:	30	% (v/v)	Glycerin
	0,25	% (w/v)	Bromphenolblau

4.1.5.3 Größenmarker für die Agarosegel-Elektrophorese

Mit Hilfe des Größenmarkers kann sowohl die Basenanzahl wie auch die DNA-Menge abgeschätzt werden. Der hier verwendete Marker entsteht durch Restriktionsverdau von λ-DNA mit HindIII:

200	µL	λ-DNA (0,25 µg/µL)
40	µL	Reaktionspuffer
160	µL	H_2O
1,5	µL	HindIII (40 Units/µL)

Nach dem Verdau wird mit 6 x Proben-Auftragspuffer auf 500 µL aufgefüllt. Der Marker zeigt nun folgendes Erscheinungsbild:

23.606	bp	(240 ng)
9636	bp	(97 ng)
6636	bp	(68 ng)
4333	bp	(44 ng)
3357	bp	(23 ng)
1985	bp	(20 ng)
561	bp	(6 ng)

4.1.6 Reinigung von DNA-Fragmenten

(QIAquick Gel Extraction Kit)
Zur Aufreinigung aus einem Agarosegel werden DNA-Banden möglichst schnell mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke werden mit 100 µL Puffer QG pro 100 mg Gel versetzt und im Heizblock 10 min bei 50 °C aufgelöst. Die Lösung wird auf eine Spin-Säule gegeben und zentrifugiert: Tischzentrifuge / RT / 2 min / 6000 rpm.
Die an die Säulenmatrix gebundene DNA wird mit 500 µL QG-Lösung und 750 µL PE gewaschen. PE wird vor der Elution in TE oder H_2O durch 5-minütige Zentrifugation gründlich abgetrennt. Die Menge der aufgereinigten DNA-Fragmente wird anhand eines Aliquots mittels Agarosegel-Elektrophorese bestimmt.

4.1.7 Ligasereaktion

Zur Herstellung rekombinanter DNA können unter Verwendung der T4-DNA-Ligase die kompatiblen überstehenden oder stumpfen Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente miteinander verknüpft werden (Weiss et al., 1968). Vektor und Insert-DNA sollte dabei in einem molaren Verhältnis zwischen 1 : 1 und 1 : 10 zusammengegeben werden. Als Kontrolle wird jeweils ein Ansatz ohne Vektor-DNA und ein Ansatz ohne Insert-DNA pipettiert.
Die einzusetzende Menge an Insert-DNA kann folgendermaßen abgeschätzt werden:

(100 ng Vektor · Anzahl der bp Insert · Größenverhältnisfaktor) / Anzahl der bp Vektor = ng Insert-DNA

Ligaseansatz:			
	100	ng	Vektor-DNA
	x	ng	Insert-DNA
	1	µL	10 x Ligasepuffer
	1	µL	T4-DNA-Ligase (1U/µL)

Der Ansatz wird auf 10 µL mit H_2O aufgefüllt und für 12 - 16 h bei 4 °C inkubiert.

10 x Ligasepuffer:			
	500	mM	Tris/HCl, pH 7,4
	100	mM	$MgCl_2$
	100	mM	DTT
	10	mM	BSA
	10	mM	ATP

4.1.8 Bakterielle Transformation

4.1.8.1 $CaCl_2$-Methode

(Cohen et al., 1972)
Die Aufnahme freier DNA durch Bakterien, die von Natur aus nicht in der Lage sind, DNA mit hoher Effizienz aufzunehmen, wird durch die Behandlung derselben mit Calciumchlorid ermöglicht. So behandelte Bakterien bezeichnet man als „kompetent". Diese Methode kann zur Vermehrung der DNA oder zur Expression rekombinanter Proteine (4.3.6.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in Bakterien) verwendet werden. Positive Transformanten lassen sich durch Antibiotika-Resistenzen selektieren, die auf den Plasmiden kodiert sind.

4.1.8.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Von einem geeigneten *E. coli*-Stamm wird eine Einzelkolonie in 5 mL 2YT überimpft und über Nacht herangezogen. Von dieser Vorkultur werden 500 µL in 50 mL 2YT-Medium angeimpft und für 2 - 4 h bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,5 (= $5 \cdot 10^7$ Zellen/mL) angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension für 10 min auf Eis gestellt und dann zentrifugiert: Eppendorfzentrifuge 5804 (R) / 4 °C / 10 min / 4000 rpm
Das Pellet wird in der Hälfte des ursprünglichen Volumens eiskalter Calciumchlorid-Lösung aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert, bevor die Bakterien erneut zentrifugiert werden. Das Pellet wird dann in 200 µL eiskalter Calciumchlorid-Lösung pro $1{,}5 \cdot 10^8$ Zellen (= 1 Transformationsansatz) vorsichtig resuspendiert. Nach Zugabe von 1/15 Volumenteilen Glycerin werden die kompetenten Bakterien in Stickstoff eingefroren und können so für mehrere Wochen bei -70 °C aufbewahrt werden.

Calciumchlorid-Lösung:	50	mM	$CaCl_2$
	10	mM	Tris/HCl, pH 8,0

4.1.8.1.2 Transformation mit rekombinanter Plasmid-DNA

Alle verwendeten Bakterienstämme sind Abkömmlinge des *E. coli* Sicherheitsstamms K12:

HB101: F^-, hsdS20 (r–B, m–B), recA13, ara–14, proA2, lacY1, galK–2, rpsL20(str_R), xyl- 5, mtl-1, supE44 (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969, Bolivar et al., 1977)
Dieser Bakterienstamm wird bevorzugt zur Transformation von Ligationsansätzen verwendet.

DH5α: F^-, recA1, endA1, gyrA96 (nal^+), thi, hsdR17, supE44, relA1 (Gibco BRL)
Aus diesem Stamm gewonnene DNA eignet sich besser zur Sequenzierung als die aus HB101.

JM101: F^-,Δ(lac-pro), proAB, supE, rK^+, mK^+, thi/F, traD36, lacIqZ, ΔM15
JM101-Bakterien werden beim Arbeiten mit dem Vektor pGEM-T (Promega) verwendet, da sie ein Blau-Weiß-Screening auf positive Klone erlauben.

Die Plasmid-DNA (entweder ein Ligaseansatz oder 100 - 400 ng DNA aus einer Minipräparation) wird mit 200 µL kompetenten Bakterienzellen für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wird für 1 min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend wird 1 mL 2YT-Medium ohne Antibiotikum zugegeben und 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wird der Transformatiosansatz (oder wenn eine hohe Transformationseffizienz zu erwarten ist, 1/10 desselben) auf antibiotikumhaltigen 2YT-Agar-Platten ausplattiert. Nach 12 - 16 h Inkubation bei 37 °C erscheinen einzelne Kolonien. Diese werden für eine DNA-Minipräparation mit sterilen Zahnstochern in 5 mL 2YT-Antibiotikum-Medium überimpft.

2YT-Medium (1 L): 16 g Trypton
10 g Hefe-Extrakt
5 g NaCl
für Platten: 20 g Agar
autoklavieren

Antibiotika:

100	µg/mL	Ampicillin
12,5	µg/L	Tetracyclin
25	µg/mL	Kanamycin
10	µg/mL	Chloramphenicol

4.1.8.1.3 Verwendung des Vektors pGEM-T (Promega)

pGEM-T wird zur Vervielfältigung von PCR-Produkten verwendet. Mit Taq-Polymerasen hergestellte Fragmente werden von dem Enzym mit 3´-Adeninüberhängen versehen, über die eine unspezifische Klonierung in den bereits linearisiert gelieferten Vektor pGEM-T möglich ist, da dieser überhängende 3´-Tymidinbasen besitzt.
Beim Arbeiten mit pGEM-T wird bei der Ligation nach Anleitung des Herstellers, im Prinzip aber wie unter 4.1.7 beschrieben, verfahren. Ein Ligationsansatz mit pGEM-T wird in 50 µL einer $CaCl_2$-kompetenten JM101-Bakteriensuspension 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock dauert 45 - 50 s bei 42 °C. Es folgt eine einstündige Inkubation in 200 µL 2YT bei 37 °C, bevor die Bakterien unter Zusatz von je 40 µL IPTG-Lösung (100 mM) und X-Gal (20 mg/mL in Dimethylformamid) auf Selektionsplatten ausgestrichen werden.

4.1.8.2 Elektroporation

4.1.8.2.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Ein 1 LB-Medium wird mit einer frischen *E.coli* Übernachtkultur in einer 1/100-Verdünnung angeimpft. Die Bakterien werden bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,47 - 0,53 angezogen, sie wachsen dazu etwa 4 h. Die Bakterien werden 15 min auf Eis abgekühlt und dann zentrifugiert: Sorvall-Zentrifuge / Rotor JA10 / 4°C / 15 min / 4000 rpm oder Eppendorf-zentrifuge 5804 (R) / 4 °C / 15 min / 3000 rpm.
Die Bakterien werden in abnehmenden Volumina eiskalten 10 %igen Glycerins vorsichtig resuspendiert und danach erneut zentrifugiert (1 L; 0,5 L; 20 mL; 2 - 3 mL). Die elektrokompetenten Zellen werden zu Portionen von 200 µL oder 400 µL aliquotiert. Eingesetzt werden pro Elektroporation 50 µl kompetente Zellen.

LB (Luria-Bertani 1 L): 10 g Caseinhydrolysat Pepton Nr. 140
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl

4.1.8.2.2 Elektroporation

Die Küvette, die Küvettenhalterung, die DNA und auch die kompetenten Bakterien müssen eine Temperatur von 4 °C haben. 1 - 5 µL DNA-Lösung werden mit 40 µL elektrokompetenten Bakterien gemischt, und die Mischung wird in die Küvette gegeben. Der Puls wird gesetzt, die Zeitdauer sollte etwa 4,5 ms betragen. Die Zellen werden sofort in 1 mL SOC-Medium aufgenommen, 1 h bei 37 °C inkubiert und danach auf geeigneten Selektionsplatten ausgestrichen. Bei Selektion auf Aminosäure-Prototrophie sollten die Bakterien nach der Inkubation in SOC mit PBS gewaschen werden.

Einstellungen der Werte am Elektroporationsgerät für die Transformation von Bakterien:

Werte für eine 2 mm Küvette:		**Werte für eine 1 mm Küvette:**	
200	Ohm	200	Ohm
25	µF	25	µF
2,5	KV	1,8	KV

SOC-Medium (1L):			
	20	g	Trypton
	5	g	Hefeextrakt
	100	mM	NaCl
	2,5	mM	KCl
	10	mM	$MgCl_2$
	20	mM	$MgSO_4$
	20	mM	Glukose

4.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR-Technik (Saiki et al. 1988) kann DNA durch eine thermostabile DNA-Polymerase *in vitro* spezifisch amplifiziert und/oder gezielt verändert werden.

Um Kontaminationen auszuschließen, sollten diese Arbeiten mit Filterspitzen auf den Pipetten und unter Verwendung entionisierten und autoklavierten Wassers durchgeführt werden.
Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

5 µL	10	x	PCR-Puffer
2 µL	10	mM	dNTP-Gemisch
1,5µL	50	mM	$MgCl_2$
2 µL	100	µM	Primer Gemisch
0,6µL			DMSO
0,5µL			DNA
1 µL	5	U/µL	Taq DNA-Polymerase

mit sterilem PCR-H_2O auf 50 µL auffüllen

Der Reaktionsansatz wird mit Mineralöl überschichtet und vor Zugabe der Polymerase 10 min lang auf 95 °C erhitzt. Die Reaktion läuft anschließend unter folgenden Bedingungen im Thermocycler ab:

PCR-Zyklen:			
	Denaturierung	1 min	94 °C
	Annealing	1 min	55 °C
	Verlängerung	3 min	72 °C

Dieses Programm wird 30 mal durchlaufen.

Zeiten und Annealing-Temperaturen werden auf die jeweils zu erstellenden Fragmente optimiert. Die erhaltenen Produkte werden über ein Agarosegel, wie unter 4.1.6 beschrieben, gereinigt.

10 x PCR-Puffer:	250	mM	Tris/HCl, pH 8,3
	375	mM	KCl
	15	mM	$MgCl_2$

dNTP-Stammlösung: dATP, dCTP, dGTP und dTTP je 2,5 mM.

4.1.9.1 Verbinden zweier überlappender PCR-Produkte

Punktmutationen lassen sich einfach durch Verwenden mutierter Primer in einer PCR-Reaktion erzeugen. Liegt die zu mutierende Base nicht an einer Stelle, die sich zum Restriktionsverdau für eine anschließende Klonierung eignet, können zwei an der mutierten Stelle überlappende PCR-Fragmente erzeugt werden. Die beiden Fragmente lassen sich anschließend mit Hilfe der Klenow-Polymerase verbinden:

2 µg		überlappende DNA im molaren Verhältnis 1:1
4 µL	5 mM	dNTP‘s
4 µL	10 x	Klenow-Puffer

Der Ansatz wird vor Zugabe der Polymerase für 10 min auf 95 °C denaturiert. Dann werden noch einmal frische dNTP‘s und die Polymerase zugefügt:

0,3µL	5 mM	dNTP‘s
2 µL	10 x	Klenow-Puffer
1 µL		Klenow-Polymerase (5U/µL)

Der Ansatz wird 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wird das erhaltene Produkt mit der PCR amplifiziert.

10 x Klenow-Puffer:	0,5	M	Tris/HCl, pH 7,2
	0,1	M	$MgSO_4$
	1	mM	DTT
	500	µg/mL	BSA

4.1.10 Southern Blot

(Southern, 1975)
Die Southern-Blot-Technik ermöglicht die Übertragung von DNA aus einem Agarosegel auf eine Membran und daran anschließend deren Nachweis mit Hilfe spezifischer radioaktiv markierter Sonden. In dieser Arbeit wurde der Southern-Blot zur Identifizierung mehrfach vorkommender Klone aus einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screening verwendet.

Die DNA wird einer Agarosegel-Elektrophorese unterzogen und mit Ethidiumbromid gefärbt wie unter 4.1.5 beschrieben.
Zur Übertragung auf die Membran wird das Gel 30 min in alkalischen Transferpuffer gelegt, die Membran (Gene Screen plus™) für die gleiche Zeit in H_2O. Der Blot wird anschließend folgendermaßen aufgebaut:

- Glaswanne gefüllt mit Transferpuffer
- über die Wannenbreite reichende Glasplatte
- mit Puffer befeuchtete Brücke aus 3 mm Whatman-Papier, deren Enden in den Puffer eintauchen
- Agarosegel
- Membran in Gelgröße
- 3 Lagen mit Puffer befeuchtetes Whatman-Papier
- Plastikschablone mit Aussparung in Gelgröße
- Stapel saugkräftiger Papiertücher
- 0,5 kg Gewicht

Der Transfer der DNA erfolgt über Nacht durch die Kapillarkräfte des saugfähigen Papiers.
Danach wird die Membran für 15 min in Neutralisationspuffer inkubiert und zur Fixierung der DNA abschließend 2 Stunden bei 80°C gebacken oder 2 x für 10 s mit UV-Licht bestrahlt.

Alkalischer Transferpuffer:	0,4	M	NaOH
	0,6	M	NaCl
Neutralisationspuffer:	0,5	M	Tris/HCl pH 7,0
	1	M	NaCl

4.1.10.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung von DNA-Sonden für die Hybridisierung erfolgt unter Verwendung des Megaprime DNA labelling Kit RPN 1606/7 (Amersham) nach Angaben des Herstellers:

	15	µg	eines geeigneten DNA-Fragments
	5	µL	Primer
mit H_2O auf	25	µL	auffüllen, 5 min bei 95 °C denaturieren
Zugabe von	5	µL	Labelling-Puffer
	0,5	MBq	^{32}P-dCTP
	1	µL	Klenow-Polymerase (5U/µL)
mit H_2O auf	33,5	µL	auffüllen, 10 min bei 37 °C inkubieren

4.1.10.2 Reinigung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die Reinigung der DNA-Sonden zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide nach der Markierung erfolgt mit Jet Nick "Probe Purification after Labeling" (Genomed) nach den Angaben des Herstellers.
Der Labelling-Ansatz wird mit Puffer B1 auf 100 µL aufgefüllt. Es werden 300 µL B2 und 20 µL Jetnick-Matrix zugegeben und für 5 min auf RT inkubiert. Die Matrix wird durch Zentrifugation pelletiert: Tischzentrifuge / RT / 30 s / 14.000 rpm.
Es wird zweimal mit je 300 µL B2 und B3 gewaschen. Die Matrix wird bei RT an der Luft getrocknet, bevor die Sonde schließlich mit 40 µL H_2O eluiert wird.
Ein Aliquot wird im Szintillationszähler gemessen.

4.1.10.3 Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonden auf die Transfermembran

Nach Fixierung der DNA wird die Membran für mindestens 4 h bei 42 °C in Prähybridisierungslösung (1 mL/10 cm^2 Membran) inkubiert.
Die radioaktiv markierte Sonde wird nun für 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend in die Prähybridisierungslösung gegeben: $5 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^6$ cpm/mL
Die Hybridisierung erfolgt bei 42 °C über Nacht.
Im Anschluß daran wird die Membran wie folgt gewaschen:

2 x SSC / 0,1% SDS	45 °C	15 min
1 x SSC / 0,1% SDS	45 °C	15 min
0,1x SSC / 0,1% SDS	60 °C	30 min

Ein Röntgenfilm wird dann in einer lichtundurchlässigen Filmkassette mit Verstärkerfolie für mehrere Stunden bis Tage der Membran exponiert. Bei unterschiedlich stark ausgeprägten Signalen wird eine Quantifizierung der Banden mit Hilfe des Bioimagers durchgeführt.
Zur Herstellung der Sonden gegen c-Abl wurde das NotI-Fragment des im Hefe-Zwei-Hybrid-Screenings gefundenen Klons Trk18 (bp 512 - 907, c-Abl Typ IV aus Maus, Ben-Neriah et al., 1986) als Template benutzt, für die Sonde gegen PLC-γ das NotI-Fragment des Klons Trk21 (entspricht: bp 1832 - 2328 der Phospholipase C aus Ratte, Genbank-Accession: J03806)

Prähybridisierungslösung:	50	%	Formamid
	1	%	SDS
	1	M	NaCl
	10	%	Dextransulfat
	100	µg/mL	Lachssperma-DNA
10 x SSC-Puffer:	1500	mM	NaCl
	150	mM	Natriumcitrat

4.1.11 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Alle Sequenzierungen wurden mit dem ABI Prism 310 Sequenziergerät der Firma Perkin-Elmer und dem entsprechenden DNA-Sequenzier-Kit (BigDye™Terminator) durchgeführt. Die Methode basiert auf der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al., 1977; Sanger 1981). In einer PCR-Reaktion werden mit vier verschiedenen Farbstoffen markierte 2‘,3‘-Didesoxynukleotide in die neu synthetisierten DNA-Stränge eingebaut, was zu einem kontrollierten, statistisch verteilten Kettenabbruch am 3‘-Ende mit spezifischer Fluoreszenzfärbung der letzten Base führt. Im Sequenziergerät werden diese PCR-Produkte in einer Kapillare gelelektrophoretisch aufgetrennt. Am Ende der Kapillare wird dann mit Hilfe eines Lasers das Fluoreszenzsignal des ankommenden DNA-Stranges gelesen. Ein Computer erstellt anhand der Abfolge der Fluoreszensmarkierungen die DNA-Sequenz.

Dazu wurden 250 ng einer DNA-Minipräparation mit 3 - 10 ng Primer versetzt und mit HPLC-Wasser auf ein Volumen von 8 µL gebracht. Nach Zugabe von 2 µL Reaktionslösung wird die Sequenzierreaktion im Thermocycler gestartet.

PCR-Programm:	Denaturierung	30 s	96 °C
	Annealing	15 s	50 °C
	Verlängerung	4 min	60 °C
	25 Zyklen		

Primer:	**pVP16 :**	vorwärts	5‘ GGA ATT GAC GAG TAC GGT GGG 3‘
		revers (M13)	5‘ AAC AGC TAT GAC CAT G 3‘
	R702:		5‘ CTCGAC AAA GTT AAG TAA TAG 3‘

Die Primer **T7, T3** und **SP6** sind kommerziell bei Stratagene, La Jolla, USA erhältlich.

4.1.11.1 Aufreinigung der Sequenzprodukte

Zu den 10 µL des PCR-Ansatzes werden 90 µL H_2O gegeben. Die DNA wird mit 10 µL 3 M NaAc und 250 µL EtOH gefällt (4.1.1.1. Minipräparation), in 25 µL H_2O aufgenommen und für 2 min auf 90°C erhitzt, bevor die Sequenz analysiert wird.

4.2 Arbeiten mit RNA

4.2.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

(modifiziert nach dem RNaid® Plus Kit)
Voraussetzung für eine RNA-Präparation ist die Minimierung von RNAse-Aktivität während der gesamten Präparation. Deshalb werden alle Lösungen mit DEPC behandeltem H_2O hergestellt. Chemikalien, die zur Isolierung von RNA benötigt werden, werden nur für diesen Zweck verwendet. Sämtliche RNA-Arbeiten werden mit Handschuhen durchgeführt.
$2{,}5 \cdot 10^8$ PC12 Zellen werden 4 h auf RPMI-Medium mit nur 0,1 % Pferdeserum gehalten und anschließend mit 200 ng/µL NGF für 0, 30, 60 und 180 min stimuliert (siehe auch 4.5.5.3 Phosphorylierung und Mena-Induktion). Die Stimulation wird mit 1 mL kaltem PBS gestoppt. Die Zellen werden in einer Tischzentrifuge pelletiert: 4°C/2 min/2000 rpm.
Das Pellet wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Lyse auf -80 °C gelagert.
Die Lyse erfolgt in 500µl Lysispuffer. Danach werden die Zellen fünfmal durch eine 21G-Kanüle gedrückt und nach der Zugabe von 500µl Phenol (auf 60 °C vorgewärmt) und 500 µL Chloroform/Isoamyl-Alkohol (24:1) für 15 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wird zentrifugiert: Tischzentrifuge / RT / 10 min / 14.000 rpm.
Die wäßrige Phase wird abgenommen und zweimal mit Chloroform nachextrahiert. Dann können die 500 µL des wäßrigen, RNA-haltigen Überstands abgenommen werden, der anschließend mit 50 µl RNA-Matrix für 5 min bei RT inkubiert wird.
Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 500µL RNA-Waschpuffer wird die RNA-Matrix in 200 µL DEPC-H_2O suspendiert und für 5 Minuten bei 55 °C inkubiert. Die Matrix wird pelletiert: Tischzentrifuge / RT / 5 min / 14.000 rpm.
Die Quantifizierung der RNA erfolgt durch Messung der OD_{260} in einer Verdünnung von 1:100 (40 µg/mL RNA entspricht 1 OD_{260}).

RNA-Lysispuffer:	4 M	Guanidinuiumisothiocyanat
	50 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	10 mM	EDTA
	2 %	Sarkosyl
	1 %	β-Mercaptoethanol

PBS: siehe 4.3.6.1.3 Aufeinigung der GST-Fusionsproteine

4.2.1.1 Präparation von Poly A+ RNA aus der zytosolischen Gesamt-RNA

Die Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA erfolgt mit Dynabeads®Oligo$(dT)_{25}$. Diese Methode ermöglicht die Reinigung von mRNA aus 75 µg Gesamt-RNA. Das Volumen der Gesamt-RNA wird mit DEPC-H_2O auf 100 µL aufgefüllt. Pro Ansatz werden 0,2 mL (1 mg) Dynabeads®Oligo$(dT)_{25}$ benötigt, die zuvor mit 100 µL 2 x Bindungspuffer gewaschen werden. Die magnetischen Dynabeads werden dazu in ein Eppendorfgefäß pipettiert und in den Dynal MPC®-E Magnetständer gestellt. Nach 30 Sekunden haben sich die Dynabeads an der Rückwand des Röhrchens gesammelt, so daß der Überstand abgenommen werden kann. Die gewaschenen Beads werden in 100 µL 2 x Bindungspuffer gelöst, bevor die vorbereitete Gesamt-RNA zugegeben wird. Liegt die Gesamt-RNA in einer Konzentration von weniger als 75 µg/100µL vor, gibt man das gleiche Volumen an 2 x Bindungspuffer dazu. Um Sekundär-strukturen zu zerstören, wird dieses RNA-Bindungspuffergemisch vor Zugabe der Beads für 2 min auf 65 °C erhitzt. Nach vorsichtigem Mischen und 5 min Inkubation bei RT wird zweimal mit je 200 µL Waschpuffer gewaschen. Besonders im letzten Waschgang muß darauf geachtet werden, den gesamten Überstand abzunehmen. Zur Elution der PolyA+ RNA werden die Dynabeads in 40 µL Elutionspuffer suspendiert und für 2 min auf 65 °C erhitzt. Die Reaktionsgefäße müssen dann sofort in den Magnetständer verbracht werden. Die PolyA+ RNA muß in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden.

2 x Bindungspuffer:	20	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1000	mM	LiCl
	2	mM	EDTA
	0,4	%	SDS
Waschpuffer:	10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	0,15	mM	LiCl
	1	mM	EDTA
	0,1	%	SDS
Elutionspuffer:	2	mM	EDTA, pH 7,5

4.2.1.2 Auftrennung von RNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese

Formaldehyd-Agarosegel 1 %:	0,8	g	Agarose
	59	mL	DEPC-H_2O
	8	mL	10 x MOPS-Puffer
	13	mL	Formaldehyd 37 % (v/v)

Die Agarose, das DEPC-H_2O und der 10 x MOPS-Puffer werden in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf 65 °C wird das Formaldehyd zugegeben.

10 x MOPS-Puffer:	0,4	M	MOPS
	100	mM	Natriumacetat
	10	mM	EDTA
	mit NaOH auf pH 7,0 einstellen		

Deionisiertes Formamid: Pro 100 ml Formamid wird 1g Ionenaustauscher XG8 Mischbettmatrix zugegeben. Nach 1 h Rühren wird die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert.

Laufpuffer: 1 x MOPS-Puffer

4.2.1.3 Probenvorbereitung und Durchführung der Formaldehyd-Gelelektrophorese

Die Gesamt-RNA wird nach photometrischer Mengenbestimmung in einer Vakuumzentrifuge auf 20 µg / 5,5 µL eingeengt. In der Northern Blot Analyse wurden 5-20 µg Gesamt-RNA, beziehungsweise die entsprechende Menge PolyA+ RNA (≅ 0,3 µg) eingesetzt. Die RNA wird mit DEPC-H_2O auf 5,5 µL aufgefüllt, mit 1 µL 10 x MOPS-Puffer, 3,5 µL Formaldehyd (37 %ig) und 10 µl Formamid versetzt. Die Probe wird für 15 min auf 55 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zusatz von 2 µL 10 x Probenpuffer wird die Probe auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei 70 V für kleine Gele bzw. bei 120 V für große Gele mit 1 x MOPS als Laufpuffer durchgeführt, bis die Bromphenolblaufarbfront 2/3 des Gels durchlaufen hat. Die Position der ribosomalen 28S- und 18S-RNA kann durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 254 nm auf einer Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator sichtbar gemacht werden.

10 x Probenpuffer:	0,4	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,4	% (w/v)	Xylenzyanol
	50	% (v/v)	Glycerin
	1	mM	EDTA

4.2.2 Northern Blot und Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Beim Northern Blot handelt es sich um eine Technik zur Übertragung von RNA auf eine Membran analog zum Southern Blot (4.1.10).
Das RNA-Agarosegel wird in 10 x SSC äquilibriert. Das Blotten erfolgt im Prinzip wie beim Southern Blot, allerdings auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran), und mit 10 x SSC anstelle des alkalischen Transferpuffers. Gelreste werden anschließend durch Waschen mit 10 x SSC entfernt, bevor die RNA durch Erhitzen der Membran für 2 h bei 80 °C fixiert wird.
Die Sondenherstellung, deren Reinigung, das Prähybridisieren des Blots, die Hybridisierung und das Waschen verlaufen wie beim Southern Blot (4.1.10.1-3).
Zur Herstellung der Sonden gegen Mena wurde ein mit BamHI erhaltenes Fragment benutzt. Das Plasmid pBluescript-KSII/Mena (Maus-Mena, Genbank Accession: U72520) wurde freundlicher Weise von Dr. F. Gertler, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA zur Verfügung gestellt.
Sonden gegen c-fos und β-Aktin wurden von den Vektoren pfos (Curran et al., 1982) bzw. pAktin (Tokunaga et al., 1986) mit PstI hergestellt.

10 x SSC :	siehe 4.1.10 Southern Blot
Prähybridisierungslsg.:	siehe 4.1.10 Southern Blot

4.3 Arbeiten mit Proteinen

4.3.1 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient der Isolierung eines Proteins mit Hilfe spezifischer Antikörper aus einem Zelllysat.

1 - 2 Petrischalen (Ø 10 cm) einer adherenten Zellinie (TrkA-Fibroblasten) werden mit 1 mL PBS gewaschen. Bei Schwimmzellen erfolgen die Entfernung des Mediums und das Waschen durch Zentrifugation: Eppendorfzentrifuge 5804 (R) / RT / 5 min / 1000 rpm.
Die Zellen werden in 1 mL Lysepuffer, bei adherenten Zellen mit Hilfe eines Gummischabers, in ein 1,5 mL Rektionsgefäß überführt.
Das Lysat wird zur Abtrennung der Zelltrümmer zentrifugiert: Tischzentrifuge/RT/2 min/ 14.000 rpm.
Der klare Überstand wird mit 500 - 800 ng des jeweiligen Antikörpers (α-Trk C14, Kaninchen-IgG polyklonal oder α-Mena, Maus-IgA, monoklonal) für 2 - 4 h bei 4°C inkubiert. Anschließend werden für 30 - 60 min 20 µl einer Suspension zugegeben, die in Formaldehyd fixierten *Staphylococcus aureus* (Stamm Cowan I) enthält. *Staph. aureus* exprimiert ProteinA, das eine hohe Affinität zu IgG aufweist, und kann daher wie ProteinA-Sepharose eingesetzt werden (Kessler, 1976). (Bei Verwendung des α-Mena-Antikörpers (Maus-IgA) werden 40 µL *Staph.-aureus*-Suspension eingesetzt, die vorher 2 h bei 4 °C mit 2 µg α-Maus-IgA-Antikörpern (Sigma) in Lysepuffer vorinkubiert und gründlich gewaschen wurden.)
Der Antikörperkomplex wird zur Abtrennung des restlichen Lysats wie oben abzentrifugiert.
Das Pellet wird zweimal in 1 mL Waschpuffer und einmal in 1 mL Wasser gewaschen. Danach wird es entweder mit 30 µl SDS-Auftragspuffer (4.3.3 Zellysate) für eine SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot (4.3.5) vorbereitet oder in einem Kinase-Assay eingesetzt (4.3.2).

Lysepuffer:	10	mM	Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 ,	pH 7
	50	mM	NaF	
	10	mM	EDTA	
	1,2	%	Triton X 100	
	1	%	Trasylol	
Waschpuffer :	10	mM	Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 ,	pH 7
	40	mM	NaF	
	10	mM	EDTA	
	1	M	NaCl	
	0,2	%	Triton X 100	
	1	%	Trasylol	

4.3.1.1 Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation verläuft im Prinzip wie eine Immunpräzipitation (4.3.1): Isolierung bestimmter Proteine aus einem Zelllysat mit Hilfe spezifischer Antikörper.
Allerdings wird hier nicht nur das primär vom Antikörper erkannte Protein detektiert, sondern auch ein mit diesem zusammen präzipitierender Bindungspartner.

Dazu werden die Lyse und die Waschschritte nach der Inkubation mit dem spezifischen Antikörper diesmal bei einer NaCl-Konzentration von 150 mM durchgeführt, um bestehende Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem gefällten Protein zu erhalten. Die Detektion der Wechselwirkungspartner erfolgt im Fall von BCR-Abl und TrkA durch ein anschließendes Kinase-Assay (4.3.2).

4.3.2 Bestimmung der *in vitro* Kinaseaktivität (Kinase-Assay)

Tyrosinkinasen haben die Fähigkeit, ihre Substratproteine und/oder sich selbst (Autophosphorylierung) an Tyrosinresten zu phosphorylieren. In einer *in vitro* Kinasereaktion kann diese enzymatische Aktivität mit Hilfe von radioaktiv markiertem ATP nachgewiesen werden, wobei die Kinase den γ-ständigen markierten Phosphatrest des ATP auf einen Tyrosinrest ihres Substrates überträgt. Dabei dienen Manganionen des Kinasepuffers als Kofaktoren.

Für ein Kinase-Assay werden Zellen lysiert und immunpräzipitiert (siehe 4.3.1 Immunpräzipitation). Das Pellet wird dann in 5 µl BTP-Lsg. aufgenommen und mit 15 µl des Reaktionsgemisches für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 250 µl Quenchpuffer, der unmarkiertes ATP im Überschuß enthält, wird der Einbau radioaktiven Phosphats abgestoppt. Der nun radioaktiv markierte Immunkomplex wird anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird entweder für ein Bindungs-Assay verwendet (4.3.6.3) oder zur Analyse mit SDS-Auftragspuffer versetzt und für eine SDS-PAGE vorbereitet (4.3.4).

Reaktionsgemisch:	0,5	µl	25	mM	BTP, pH 6
	2,5	µl	100	mM	$MnCl_2$
	2	µl	100	µM	ATP
	5	µl			^{32}P-γ-ATP (370 kBq)
Quenchpuffer:	100	mM	Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, pH 7		
	10	mM	EDTA		
	40	mM	NaF		
	1	mM	ATP		

4.3.3 Zelllysate

4.3.3.1 Lysate aus Zellkultur

Schwimmzellen ($5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen) werden wie unter 4.5.1.1 beschrieben abzentrifugiert und mit kaltem PBS gewaschen. Bei adherenten Zellen wird der Zellrasen nach dem Waschen mit PBS und der Hilfe eines Gummischabers von der Petrischale gelöst.
Das Zellpellet wird in ein Eppendorfgefäß überführt und dann, abhängig von der Zellzahl, in 100 - 200 µL 1 x Probenpuffer aufgenommen und für mindestens 15 min gekocht, ggf. zur Zerstörung der DNA noch bis zu 15 min im Ultraschall-Wasserbad behandelt.
Auf diese Weise gewonnene Lysate werden anschließend einer SDS-PAGE (4.3.4) unterzogen und im Westernblot (4.3.5) analysiert.

SDS-Auftragspuffer-Stammlsg.:	10 mL	20 %	SDS
	10 mL		Glycerin
	8 mL	1M	Tris/HCl, pH 6,8
	72 mL		H_2O
SDS-Auftragspuffer:	1 mL		SDS-Auftragspuffer-Stammlsg.
	80 µL	0,1 %	Bromphenolblaulösung
	50 µL		β-Mercaptoethanol

4.3.3.2 Lysate aus Hefe

Zur Überprüfung der Expression von Proteinen in Hefe werden Hefelysate für Westernblots folgendermaßen vorbereitet:
Die Hefe wird in 2 mL des entsprechenden Selektionsmediums bis zu einer OD_{600} von 2 gezogen, dann pelletiert: Tischzentrifuge / RT / 5 min / 3000 rpm.
Das Pellet wird mit 3 µL H_2O und 2 µl Oxalytikase versetzt und 1 h bei 30°C inkubiert. Zum Auftragen auf ein Polyacrylamid-Gel wird das Lysat mit 4 µL 4 x SDS-Auftragspuffer versetzt und gekocht.

4 x SDS-Auftragspuffer-Stammlsg.:	40 mL	20 %	SDS
	40 mL		Glycerin
	16 mL	1M	Tris/HCl, pH 6,8
	4 mL		H_2O
4 x SDS-Auftragspuffer:	1 mL	4 x	SDS-Auftragspuffer-Stammlsg.
	160 µL	0,1 %	Bromphenolblaulösung
	200 µL		β-Mercaptoethanol

4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung eines Proteingemischs wird in dieser Arbeit das Verfahren der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) und Davis et al. (1964) verwendet. Je nach Größe der zu detektierenden Proteine werden Polyacrylamidflachgele (9 cm x 6 cm) mit 7,5 % und 11 % und 15 % Acrylamid-Anteil eingesetzt.
Die Proben werden vor dem Auftragen 5 min in SDS-Auftragspuffer gekocht (siehe 4.3.3 Zelllysate). Bei Verwendung von *Staph.-aureus*-Suspension in Immunfällungen wird diese abzentrifugiert, nur der klare Überstand wird aufgetragen.
Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung von 130 V etwa 1,5 bis 2 h, bis der Bromphenolblau-Marker das Gel gerade verlassen hat. Das Gel kann nun wie nachfolgend beschrieben gefärbt, einem Westernblot unterzogen oder bei radioaktiv markierten Proteinen zur Autoradiographie auf einer Vakuumapparatur getrocknet werden.

Acrylamid-Lösung:	30 %	Acrylamid
	0,8 %	Bis-Acrylamid

Trenngel	**(7,5%):**	**(11 %):**	**(15 %):**	
1,5	mL	2,2 mL	3 mL	Acrylamid-Lösung
2,25	mL	2,5 mL	2,25 mL	1M Tris/HCl, pH 8,8
2,25	mL	1,55 mL	0,75 mL	H_2O
30	µL	30 µL	30 µL	20 % SDS
6	µL	6 µL	6 µL	TEMED
20	µL	20 µL	20 µL	10 % APS-Lösung

Sammelgel (5%):			
0,334	mL		Acrylamid-Lösung
0,25	mL	1M	Tris/HCl, pH 6,8
1,4	mL		H_2O
10	µl	20 %	SDS
3	µl		TEMED
10	µl	10 %	APS-Lösung

1x Laufpuffer:			
3,03	g		Tris
14,22	g		Glycin
1	g		SDS
auf 1	L		mit H_2O auffüllen

4.3.4.1 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen nach der Elektrophorese

Durch Anfärben des Gels nach einer SDS-PAGE können die Proteine der aufgetrennten Proben sichtbar gemacht werden.
Dazu wird das Gel über Nacht in einer Glasschale mit Coomassieblau-Färbelösung geschüttelt und dann für 3 - 4 Stunden in einer Entfärbelösung, bei mehrmaligem Wechsel derselben, geschwenkt, anschließend gewässert und im Geltrockner auf Chromatographiepapier getrocknet.

Färbelösung für Acrylamidgele:		
450	mL	Methanol
450	mL	H_2O
100	mL	Essigsäure
2,5	g	Coomassieblau

Entfärbelösung für Acrylamidgele: Zusammensetzung wie die Färbelösung ohne Coomassieblau

4.3.5 Western Blot

Mit Hilfe der Western-Blot-Technik können durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf eine Transfermembran übertragen werden (Kyhse-Anderson, 1984), um anschließend mit immunochemischen Techniken analysiert und charakterisiert zu werden (Towbin et al., 1979). In dieser Arbeit wird ein „halbtrockenes“ (semi-dry) Blotverfahren benutzt.
Dazu wird das Proteingel ohne das Sammelgel für 15 min in Kathodenpuffer äquilibriert, eine Transfermembran (Protran, Nitrozellulose) ebenso in Anodenpuffer II. Der Transfer erfolgt in einer Blot-Kammer, die aus zwei graphitbeschichteten Kunststoffplatten besteht.

Die Anode wird mit Anodenpuffer I, die Kathode mit Kathodenpuffer befeuchtet. Dazwischen wird der Blot wie folgt aufgeschichtet:

Anode

2 mit Anodenpuffer I getränkte Whatman-3-MM Filterpapiere
1 mit Anodenpuffer II getränktes Whatman-3-MM Filterpapier
Nitrozellulose-Membran
SDS-Polyacrylamidgel
3 mit Kathodenpuffer getränkte Whatman-3-MM Filterpapiere

Kathode

Die Proteine werden nun mit 0,8 mA/cm^2 Gel auf die Membran transferiert. Je nach Acrylamidkonzentration dauert der Transfer 1,5 Stunden für 7,5% Gele und 2,5 Stunden für 11 % Gele. Beim Blotten von größeren Proteinmengen, kann der Erfolg des Transfers durch Färben der Membran mit Ponceau-Rot überprüft werden. Gefärbt wird für einige min in Ponceau-S-Lsg.. Entfärbt wird mit Wasser, bis sich Proteinbanden abzeichnen. Vor der Weiterbehandlung des Blots wird schließlich so vollständig wie möglich entfärbt.

Anodenpuffer I (pH 10,4):	300	mM	Tris
	20	%	Methanol
Anodenpuffer II (pH 10,4):	25	mM	Tris
	20	%	Methanol
Kathodenpuffer (pH 9,4):	25	mM	Tris
	20	%	Methanol
	40	mM	6-Amino-n-Hexansäure
Ponceau-S-Lösung:	0,2	%	Ponceau S
	3	%	TCA

4.3.5.1 Immunologische Identifizierung von Proteinen auf der Western-Blot-Membran (Immunoblot)

Die Transfermembran wird 1 - 2 h bei RT mit proteinhaltigen Substanzen (BSA, Milch) in TTBS abgesättigt, um eine unspezifische Antikörperbindung auszuschließen. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgt in Absättigungslösung über Nacht bei 4°C. Anschließend wird der Blot 3 mal 10 min mit TTBS bei RT gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären ^{125}Jod-markierten Antikörper (30 - 40 kBq/mL in TTBS) findet 1 h bei Raumtemperatur statt. Anschließend wird wie beschrieben gewaschen. Die Detektion der markierten Proteine erfolgt mit Hilfe des Bioimagers BAS-1500 (Fujifilm) über Nacht. Zur Archivierung werden Autoradiographiefilme (Kodak X-OMAT) verwendet.

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS):	137	mM	NaCl
	20	mM	Tris/HCl, pH 7,6

Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (TTBS): 0,1 % Tween20 in TBS

Absättigungslösung:

TTBS mit 3% BSA	- alle Anwendungen außer Hefelysate
10 % TTBS, 90 % H-Milch (0,3 % Fett)	- Hefelysate, alle Antikörper außer Anti-Phosphotyrosin (4G10)

Konzentration der Antikörper beim Immunoblot:

Antikörper gegen:	Verdünnung
Mena	1 : 250
LexA	1 : 400
Phosphotyrosin (4G10)	1 : 1000
PLC-γ (SC-81)	1 : 500

4.3.6 Bindungs-Assays mit GST-Fusionsproteinen

4.3.6.1 Expression von GST-Fusionsproteinen in Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide pGEX-2T und pGEX-5X-1 (Pharmacia) erlauben die Expression chimärer Fusionsproteine, bei denen das Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) N-terminal an andere Proteine gekoppelt wird. Die Glutathion-S-Transferase zeichnet sich durch ihre hohe Affinität zu Gluthation aus. Diese Eigenschaft wird hier zur Aufreinigung der Proteinchimären genutzt (Smith & Johnson, 1988).

Die Expression erfolgt in den *E. coli*- Stämmen DH5α , TKX-1 (Stratagene) und BL21(DE)-pT-Trx. Alle Stämme zeichnen sich durch Proteasedefekte zum Schutz der exprimierten Fusionsproteine aus. Der Stamm TKX-1 bietet die Möglichkeit die exprimierten Fusionsproteine einer Tyrosinphosphorylierung zu unterziehen. Der Stamm BL21(DE)-pT-Trx exprimiert Thioredoxin, was sich positiv auf die Löslichkeit cysteinreicher Proteine auswirken kann.

Alle folgenden Bakterienstämme sind *E.coli* K12 Derivate:

DH5α: siehe 4.1.81.2 Transformation mit rekombinanter Plasmid-DNA

TKX-1®:Δ(mcrA)183, D(mcrB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F-, proAB, lacl^{q}ZDM15, Tn5(kan^r)], [pTK, tet^r], Stratagene, LaJolla, USA

BL21(DE)-pT-TRX: HsdS gal (λcIts857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7 gene1), [pT-Trx, Cm^r] Dieser Bakterienstamm wurde freundlicher Weise von Dr. S Ishii, Riken, Ibaraki, Japan zur Verfügung gestellt (Yasukawa et al., 1995).

4.3.6.1.1 Konstruktion der GST-Fusionsproteine

TrkA:

GST-TrkA-C-Term.: C-Terminus, humanes TrkA, bp 749- 790 in pGEX-2T
Primer: 5‘ GGA TCC GAG GTC TAC GCC ATC ATG CGG GG 3‘
5‘ GAA TCC CTA GCC CAG GAC ATC CAG GTA GAC AGG 3‘

GST-TrkA-YYY: Aktivierungsschleife, humanes TrkA, bp 667- 686 in pGEX-5X-1
Primer: 5‘ GAA TTC AGG GAT ATC TAC AGC ACC GAC 3‘
5‘ GAA TTC GCG AAT GGG CAG CAT GGT GCG G 3‘

GST-TrkA-FYY670: Aktivierungsschleife, Punktmutation Y670F, humanes TrkA, bp 667- 686 in pGEX-2T
Primer: 5‘ GGA TCC AGG GAT ATC TTC AGC ACC GAC 3‘
5‘ GAA TTC GCG AAT GGG CAG CAT GGT GCG G 3‘

GST-TrkA-YFY674: Aktivierungsschleife, Punktmutation Y674F, humanes TrkA, bp 667- 686 in pGEX-2T
Primer: 5‘ GGA TCC AGG GAT ATC TAC AGC ACC GAC TTT TAC C3‘
5‘ GAA TTC GCG AAT GGG CAG CAT GGT GCG G 3‘

GST-TrkA-YYF675: Aktivierungsschleife, Punktmutation Y675F, humanes TrkA, bp 667- 686 in pGEX-2T
Primer: 5‘ GGA TCC AGG GAT ATC TAC AGC ACC GAC TAT TTC C3‘
5‘ GAA TTC GCG AAT GGG CAG CAT GGT GCG G 3‘

c-Abl-SH2: SH2- Domäne, bp 629 - 916, Maus-Abl Typ IV (Ben-Neriah et al., 1986) in pGEX-2T
Primer: 5‘ GGA TCC TGG TAT CAT GGC CCT GTA TCT CG 3‘
5‘ GAA TTC GGA GCT GGG TAG TGG AGT GTG G 3‘

PLC-γ: N-terminale SH2-Domäne, bp 1742 - 2067 Phospholipase C aus Ratte (Genbank-Accession: J03806) in pGEX-2T
Primer: 5‘ GGA TCC TGG TTC CAC GGG AAG CTC GGG3‘
5‘ GAA TTC GGA ACA GGC TCT GAA AGG CGC 3‘

4.3.6.1.2 Expression der GST-Fusionsproteine

Die mit den jeweiligen Expressionsplasmiden (pGEX) transformierten Bakterien (4.1.8 Bakterielle Transformation) werden über Nacht in 2YT-Medium unter Antibiotika-Selektion angezogen. Danach werden die Bakterien in 50 mL Selektionsmedium auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt und bei 37 °C unter Schütteln angezogen, bis sie eine OD_{600} von etwa 0,6 erreicht haben. Jetzt wird die Proteinexpression durch IPTG (100 µM) induziert.
Die Expression erfolgt standardmäßig für 2 - 3 h bei 37 °C oder bei Proteinen, die leicht Einschlußkörper bilden, für 3 - 4 h bei 30 °C.
Die Induktion der Tyrosinphosphorylierung in TRX-1 erfolgt durch Überführen der Kultur in das Induktionsmedium und eine weitere Inkubation in diesem für 3 h bei 37 °C oder über Nacht bei RT.
Die Bakterien werden durch Zentrifugation geerntet: Eppendorfzentrifuge 5804 (R) / 4 °C / 10 min / 5000 rpm.

Selektionsmedien für pGEX-Plasmide:

in DH5α:			2YT-Medium
	100	µg/mL	Ampicillin
in TKX-1:			2YT-Medium
	0,4	%	Glukose
	100	µg/mL	Ampicillin
	12,5	µg/mL	Tetracyclin (Stocklsg. in EtOH/H_2O, 50% v/v)
	50	µg/mL	Kanamycin
in BL21(DE)-pT-Trx:			2YT-Medium
	100	µg/mL	Ampicillin
	34	µg/mL	Chloramphenicol (Stocklsg. in EtOH)
Induktionsmedium:	12,8	g/L	Na_2HPO_4 x 7 H_2O
	3	g/L	KH_2PO_4
	0,5	g/L	NaCl
	1	g/L	NH_4Cl
	0,2	%	Glukose
	1	mM	$MgSO_4$
	0,1	%	Pepton
	100	µL/L	0,5 %Thiamin
	10	mg/L	Indolacrylsäure

Expressionsbedingungen für die einzelnen GST-Fusionsproteine:

	TKX-1	DH5α	BL21(DE)-pT-Trx
GST-TrkA-YYY	30 °C, 3 - 4 h	30 °C, 3 - 4 h	
GST-TrkA-FYY670	30 °C, 3 - 4 h	30 °C, 3 - 4 h	
GST-TrkA-YFY674	30 °C, 3 - 4 h	30 °C, 3 - 4 h	
GST-TrkA-YYF675	30 °C, 3 - 4 h	30 °C, 3 - 4 h	
GST-TrkA-C-Term.	30 °C, 3 - 4 h		37 °C, 3 - 4 h
GST	30 °C, 3 - 4 h	30 °C, 3 - 4 h	
GST-Abl-SH2		37 °C, 3 - 4 h	
GST-PLCγ-SH2-N		37 °C, 3 - 4 h	

4.3.6.1.3 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Der Aufschluß der Bakterien erfolgt in 15 mL- PP-Röhrchen in 3 mL GST-Lysepuffer auf Eis: Branson Sonifier / Duty Cycle 50 % / Stufe 1 - 2 / 40 Zyklen.
Das Lysat wird durch Zentrifugation geklärt: Eppendorfzentrifuge 5804 (R) / 4 °C / 15 min / 5000 rpm.

Das Lysat wird mit 60 µL mit GST-Lysispuffer gewaschener Glutathionsepharose zusammengegeben und für 4 h oder über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Die Lysatreste werden anschließend durch Zentrifugation entfernt: Tischzentrifuge / RT / 5 min / 1000 rpm.
Es wird 3 mal mit je 1 mL kaltem Waschpuffer 1, dann mit 3 mal je 1 mL Waschpuffer 2 und einmal mit Bindungpuffer (siehe 4.3.6 Bindungs-Assay) gewaschen. Die GST-Fusionsproteine werden in Bindungspuffer aufgenommen und bei 4 °C nicht länger als 2 Wochen gelagert. Ausbeute und Reinheit werden mit einer SDS-PAGE überprüft.

GST-Lysispuffer:	10	mM	Hepes, pH 7,5
	1,5	mM	$MgCl_2$
	1	mM	$CaCl_2$
	0,5	%	Nonidet P 40
	15	mM	β-Mercapthoethanol
	400	µM	Na_3VO_4
	10	mM	Benzamidin
	0,5	%	Trasylol
Waschpuffer 1 :	50	mM	Tris/HCl, pH 7,9
	1	M	NaCl
	15	mM	β-Mercapthoethanol
	5	%	Trasylol
	20	µg/mL	PMSF
Phosphat-gepufferte Salzlsg.:	10	g/L	NaCl
(PBS)	0,25	g/L	KCl
	1,41	g/L	Na_2HPO_4
	0,3	g/L	KH_2PO_4, pH 7,2
Waschpuffer 2:	1	%	Triton X-100
	15	mM	β-Mercapthoethanol
	5	%	Trasylol
	20	µg/mL	PMSF
	in PBS		

4.3.6.2 *In vitro* Transkription/Translation

Die in vitro Transkription-Translation dient in dieser Arbeit der Herstellung der Abl-SH2-Domäne zum Einsatz im Bindungs-Assay (4.3.6). Dazu wird das TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System der Firma Promega verwendet. Der Reaktionsansatz wird nach Angaben des Herstellers zusammengestellt. Die Reaktion verläuft 3 - 5 h bei 30 °C.

	500 - 800	ng	Plasmid-DNA
	12,5	µL	Retikulozyten-Lysat
	1	µL	Reaktionspuffer
	0,5	µL	Aminosäuremix ohne Methionin
	0,5	µL	RNAse-Inhibitor (40U/µL)
	2	µL	Trans-^{35}S-Lable® (Methionin/Cystein)
	0,5	µL	RNA-Polymerase (T7, T3 oder SP6)
auf	25	µL	auffüllen mit sterilem, autokalviertem H_2O

4.3.6.3 *In vitro* Bindungs-Assay

(Koch et al. 2000)

4.3.6.3.1 Vorbereitung der Bindungspartner

A) Zum Nachweis der Bindung zwischen TrkA und der SH2-Domäne von c-Abl wird humanes TrkA aus der TrkA-exprimierenden Fibroblastenzellinie T15 immunpräzipitiert (4.3.1 Immunpräzipitation) und im Kinase-Assay (4.3.2) autophosphoryliert. Um den Rezeptor wieder vom Immunkomplex zu lösen, wird das Pellet in 17 µL SDS-Puffer 5 min lang gekocht. Das *Staph.-aureus*-Pellet wird durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wird in silikonisierten Eppendorf-Gefäßen mit 2 mL Bindungspuffer verdünnt, so daß die SDS-Konzentration unter 0,02 % sinkt.
B) Zur Identifizierung der Abl-Bindungsstelle in TrkA wird die SH2-Domäne von c-Abl durch i*n vitro* Transkription/Translation (4.3.6.2) des Plasmids pCDNA3Koz/Abl-SH2 hergestellt. In silikonisierten Eppendorf-Gefäßen werden 70 µL des Ansatzes mit 430 µL Bindungspuffer versetzt. Zur Entfernung unspezifischer Radioaktivität wird zentrifugiert: Tischzentrifuge / RT / 3 min / 14.000 rpm.
C) Als Positivkontrolle der Bindung an TrkA wird ein wie für eine Immunpräzipitation (4.3.1) hergestelltes PC12-Zellysat verwendet. Die aus diesem Lysat gefischten Proteine werden einem Westernblot (4.3.5) zur Detektion von PLC-γ unterzogen.

Vektoren:

pCDNA3Koz: pCDNA3 Invitrogen, über BamHI und NotI wurde eine Kozak-Sequenz eingeführt: GGA TCC GCC ATG GCG CGG CCG C. Das Leseraster bei Klonierung mit NotI entspricht dem von pVP16.

pCDNA3Koz/Abl-SH2: NotI-Fragment des Klons Trk10 (bp 351 - 905 Maus-Abl Typ IV, (Ben-Neriah et al., 1986) in pCDNA3Koz

4.3.6.3.2 Inkubation mit den GST-Fusionsproteinen

Die im vorangegangenen Abschnitt unter A), B) und C) beschriebenen Bindungspartner werden mit 2 -5 µg der GST-Fusionsproteine über Nacht bei 4 °C in Bindungspuffer inkubiert. Am nächsten Tag werden 50 µL GT-Sepharose zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 4°C wird die GT-Sepharose pelletiert: Tischzentrifuge / RT / 5 min / 1000 rpm.
Es wird dreimal mit je 1 mL Bindungspuffer gewaschen, wobei das Pellet zweimal in neue Gefäße überführt wird. Das Pellet wird anschließend mit 25 µL SDS-Auftragspuffer für eine SDS-PAGE vorbereitet.

SDS-Puffer:	50	mM	Tris/HCl, pH 6,8
	1	%	SDS
Bindungspuffer:	50	mM	Hepes, pH 7,5
	150	mM	NaCl
	0,1	%	Triton X-100
	400	µM	Na_3VO_4
	1	%	Trasylol

4.4 Expression von Proteinen in Hefen

4.4.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Yeast-Two-Hybrid-System)

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde entwickelt um Protein-Protein-Interaktionen eukaryotischer Zellen *in vivo* zu untersuchen (Fields & Song, 1989). Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde für dieses System ausgewählt, weil die Expression von Proteinen dort über Plasmide ähnlich einfach wie in Bakterien ist. Außerdem gleicht das Expressionssystem dem höherer Eukaryoten so weit, daß man auch für Säuger-Gene eine Transkription, Translation und Prozessierung zu funktionellen Proteinen erwarten kann. Außerdem ist das Hefegenom eines der am besten untersuchten überhaupt, womit eine große Anzahl an Selektionsmarkern zur Verfügung stehen, um für spezielle Anwendungen maßgeschneiderte genetische Umgebungen herstellen zu können.

Das System arbeitet mit zwei Fusionsproteinen (Hybriden). Auf einem Plasmid wird die DNA des zu untersuchenden Proteins (Köder) an die DNA-Bindungsdomäne LexA kloniert (Bartel et al., 1993; Bartel & Fields, 1995). Das zweite Plasmid kodiert für die VP16 Promotoraktivatordomäne und ist mit einem potentiellen Interaktionspartner für das Köderprotein fusioniert (McKnight et al., 1987; Vojtek et al., 1993). Daneben enthält das Fusionsprodukt noch eine Kernlokalisierungssequenz. Die beiden Plasmide werden nun in einem Hefestamm exprimiert, der ein geeignetes Reportersystem mit einer entsprechenden DNA-Bindestelle - hier für LexA - enthält, sowie einen geeigneten Promotor und einen Reporter. Als Reporter dienen das *his3*-Gen, ein Selektionsmarker im Histidin prototrophen Hefestamm L40 (Vojtek et al., 1993) oder das Gen für das grün fluoreszierende Protein GFP im Hefestamm YRN 974 (Mancini et al., 1997; Tamura et al., 1999). Bindet das Köderprotein nun seinen Interaktionspartner, ist der entstandene Komplex in der Lage in den Kern zu translozieren und die Expression des Reporters anzuschalten.
In dieser Arbeit wird das Hefe-Zwei-Hybrid-System benutzt, um mit der zytoplasmatischen Domäne von TrkA eine Mausembryo-Genbank nach neuen Bindungspartnern für den Rezeptor zu identifizieren. Das LexA-System bietet hierfür einen speziellen Vorteil: LexA dimerisiert und versetzt damit die Rezeptortyrosinkinase in die Lage, sich selbst zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (siehe 2.2.3.1 Mechanismus der Aktivierung von TrkA), ohne daß eine Stimulation mit dem entsprechenden Wachstumsfaktor notwendig ist. Bei einem solchen Genbank-Screening wird das *His3*-Reportersystem verwendet, um aus den überlebenden Hefezellen die positiven Interaktionspartner der Köder klonieren zu können.
Bei den folgenden halbquantitativen Messungen mit einzelnen potentiellen Bindungspartnern kommt dagegen das GFP-System zum Einsatz, wobei hier die relative Stärke der Interaktion per FACS-Analyse bestimmt werden kann.

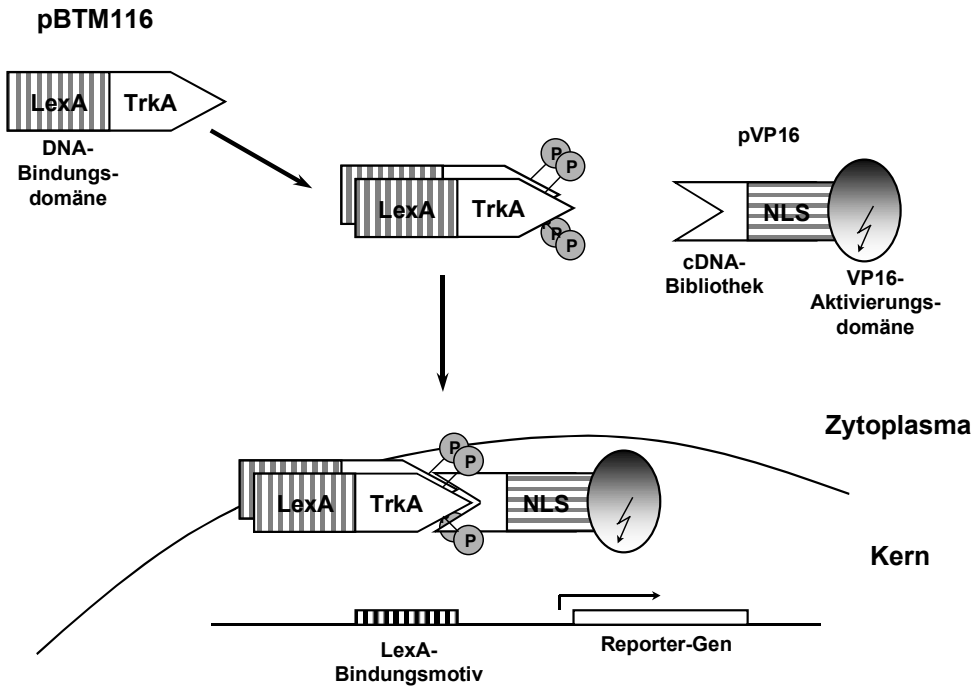

Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems
Die an LexA fusionierte Tyrosinkinase TrkA dimerisiert, wird dadurch aktiviert und phosphoryliert (P). SH2- oder PTB-Domänen enthaltende Proteine aus der cDNA-Bibliothek binden an die Tyrosinkinase. Der Komplex wird über das Kernlokalisierungssignal NLS in den Kern transloziert, wo LexA an das entsprechende Bindungsmotiv binden und die VP16-Aktivierungsdomäne die Transkription des Reportergens anschalten kann.

4.4.1.1 Material

4.4.1.1.1 Hefestämme

L40: Genotyp: MATa, trp1-901, leu2-3, 112ade2, his3D200, LYS2:: $(lexAop)_8$-LacZ :: $(lexAop)_4$-HIS3 URA3
Bei diesem Hefestamm wurden das his3-Gen und das lacZ-Gen als Reporter in das Genom integriert.

YRN 974: Genotyp: trp1, leu2, his3, URA3:: lexAop-gfp
Als Reporter dient hier GFP (yEGFP3, Cormack et al., 1996, 1997). Dieser Hefestamm wurde von Dr. Rainer Niedenthal, Inst. f. Phys. Chemie, Med. Hochschule Hannover, hergestellt.

4.4.1.1.2 Plasmide

pVP16 und pBTM116 wurden dem Labor freundlicher Weise von Dr. S. Fields (University of Washington, Seattle, USA) zur Verfügung gestellt (Bartel & Fields, 1995). Beide Plasmide tragen zur Vermehrung in *E.coli* eine Ampicillinresistenz. pBTM116 ist in Hefe über Tryptophan selektierbar, pVP16 über Leucin.

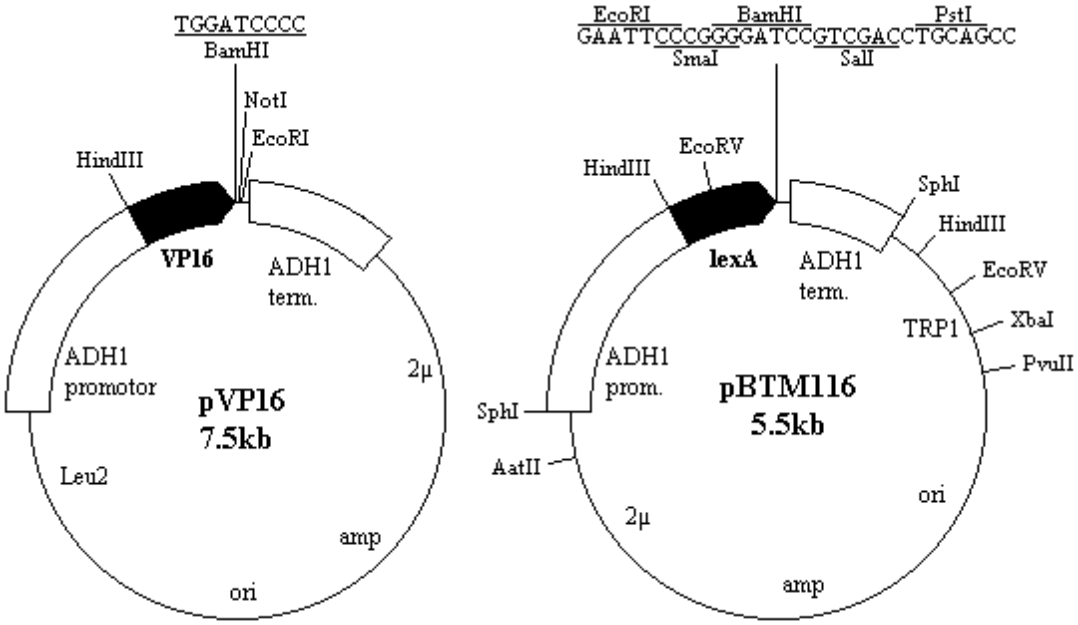

Abbildung 4.2: Plasmide des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (nach Bartel & Fields, 1995)

4.4.1.1.3 Genbank

(Vojtek et al., 1993)
Die Genbank enthält cDNA-Inserts von etwa 350 - 700 bp Länge aus Mäuse-Embryonen, Tag 9,5 -10,5, PolyA$^+$-RNA. Die Inserts sind über einen NotI-Linker in den Vektor pVP16 kloniert. Die Genbank enthält etwa $5 \cdot 10^6$ unabhänige Klone. Sie wurde von Dr. S. Hollenberg (Fred Hutchinson Cancer Center, Seattle, USA) hergestellt und dem Labor freundlicher Weise von Dr. M. Funk (MediGene, Martinsried, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

4.4.1.1.4 Medien

10 x SD-Stammlsg (1L): 17 g Difco Yeast Nitrogen Base (without Aminoacids Difco Cat. 0335-15-9)
50 g Ammoniumsulfat
in 600 mL H_2O lösen
vorsichtig mit 0,1 - 0,2 M NaOH bis pH 5,8 titrieren,
auf 1 l auffüllen, autoklavieren

10 x ΔTHULL / ΔTL / ΔL / ΔT Stammlösungen: (1L)

	10 x ΔTHULL-Mix	10 x ΔTL-Mix	10 x ΔT-Mix	10 x ΔL-Mix
L-Isoleucin	300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L
L-Valin	1500 mg/L	1500 mg/L	1500 mg/L	1500 mg/L
L-ArgininHCl	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L
L-Histidin		200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L
L-Leucin			1000 mg/L	
Lysin		300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L
L-Methionin	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L
L-Phenylalanin	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L	500 mg/L
L-Threonin	2000 mg/L	2000 mg/L	2000 mg/L	2000 mg/L
L-Tryptophan				200 mg/L
L-Tyrosin	300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L
Uracil		200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L
Adenin-hemi-sulfatsalt	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L

ΔTHULL-Medium (1L):
100 mL 10 x SD-Stammlösung
100 mL 10 x ΔTHULL Aminosäurenmix
50 mL 40 % Glukose
20 mL 1M Aminotriazol
autoklaviert (für Platten mit 20 g Agar)
100 µg/mL Ampicillin
25 µg/mL Tetracyclin

ΔTL/ΔL/ΔT-Medium (1L):
100 mL 10 x SD-Stammlösung
100 mL 10 x ΔTL/ΔL/ΔT Aminosäurenmix
50 mL 40 % Glukose
autoklaviert (für Platten mit 20 g Agar)
100 µg/mL Ampicillin
25 µg/mL Tetracyclin

4.4.1.2 Genbank-Amplifikation

4.4.1.2.1 Bestimmen der Transformationseffizienz

Mit Hilfe einer Test-Transformation wird die Transformationseffizienz bestimmt, damit nach der Amplifikation noch immer statistisch alle Klone enthalten sind.
Dazu werden 50 ng und 5 ng der Plasmid-DNA in HB101 elektroporiert (4.1.8.2 Elektroporation). Von diesen Ansätzen werden Anteile (1/1000, 1/10.000 und 1/100.000) ausgestrichen. Am nächsten Tag werden die Kolonien ausgezählt, um die Anzahl der erhaltenen Klone/µg DNA zu errechnen.

4.4.1.2.2 Amplifikation

Die hier verwendete Mausembryo-Genbank enthält $6 \cdot 10^6$ unabhängige cDNAs. Ein Transformationsansatz zur Amplifikation sollte mindestens die doppelte Anzahl an Klonen ergeben. Für diese Genbank wurden $2 \cdot 10^7$ Klone transformiert.
Die DNA wird in 2,5 µL-Aliquote aufgeteilt, damit die Ionenkonzentration in den Ansätzen nicht zu hoch wird. Die DNA wird wie unter 4.1.8.2 Elektroporation beschrieben in HB101 elektroporiert. Die Ansätze werden nach der einstündigen Inkubation in SOC vereinigt.
(Um eine höhere Amplifikation zu erreichen, können die Transformationsansätze nach der SOC-Inkubation mit Selektionsmedium auf 50 - 75 mL verdünnt und wenige Stunden angezogen werden, bis sie eine optische Dichte von 1 überschritten haben. Diese Bakterien können mit 10 % Glycerin eingefroren und längerer Zeit bei -80 °C gelagert werden.)
Es werden Anteile ($1/10^5$ und $1/10^6$) zum Auszählen auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht angezogen. Der Rest wird bei 4 °C gelagert.
Nach dem Auszählen werden insgesamt $2 \cdot 10^7$ Klone auf 50 Agarplatten (Ø 15 cm) ausplattiert. Die Platten sollen dicht bewachsen sein, wobei einzelne Klone aber erkennbar bleiben müssen. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Kolonien mit PBS unter leichtem Schwenken für 15 min von den Platten herunter gewaschen. Die Bakterien werden pelletiert: Sorvall-Zentrifuge / GSA-Rotor / 4 °C / 7 min /
5000 rpm
Das Pellet wird in 4 Portionen geteilt, um mit Hilfe von Maxipräparationen die DNA zu gewinnen (4.1.1.2).

4.4.1.3 Genbank-Screening

4.4.1.3.1 Plasmidtransformation in Hefe

Eine Übernachtkultur wird in 10 mL YPD-Medium bei 30 °C angezüchtet. Diese Kultur wird in 100 mL Medium auf $OD_{600} \cong 0{,}5$ verdünnt und für weitere 4 h angezüchtet. Die Hefe wird in einem Beckman JA-10 Rotor bei 2500 rpm pelletiert und mit 50 mL H_2O gewaschen. Danach wird sie in 1 mL 100 mM LiAc / 0,5 x TE aufgenommen und 1 h bei 30 °C stehen gelassen. Carrier-DNA (DNA aus Lachssperma, geschert auf eine Länge von 600-6000 Basen) wird frisch für 5 min bei 95 °C denaturiert. Pro Transformation werden zusammengegeben:

50	µL	kompetente Hefe
100	µg	Carrier-DNA
1	µg	Plasmid-DNA
500	µL	PEG-4000 40 % / 100 mM LiAc / 1 x TE

Anschließend wird vorsichtig gemischt. Es folgen Inkubationen für 30 min bei 30 °C, dann 15 min bei 42 °C. Die Hefezellen werden pelletiert: Tischzentrifuge / RT / 5 min / 3000 rpm.
Dann werden sie in 1 mL PBS gewaschen, bevor sie auf Selektionsplatten für die transformierten Plasmide ausgestrichen werden.

YPD-Medium:	20	g/L	Pepton
	10	g/L	Hefeextrakt, pH auf 5,8 einstellen
	autoklaviert (für Platten mit 20 g Agar)		
	2	%	Glukose
	100	µg/mL	Ampicillin
	25	µg/mL	Tetracyclin

TE: siehe Plasmid-Minipräparation 4.1.1.1

4.4.1.3.2 Hocheffiziente Transformation von Genbanken und Hefe-Zwei-Hybrid-Screening

Für ein Screening wird zuerst das Köderplasmid (hier pBTM-TrkA) wie unter 4.4.2.1 beschrieben in die Hefe (L40) transformiert. Nachdem die korrekte Expression des Köders mit einem Westernblot bestätigt wurde, wird diese Hefe für die Genbanktransformation vorbereitet.

Transformationskompetente Hefe wird über folgende Kulturenabfolgen in ΔT-Medium hergestellt:

- 5 mL Übernachtkultur aus einer eingefrorenen Glycerinkultur
- daraus eine 200 mL-Kultur, die bis $OD_{600} \cong 1$ angezogen wird
- daraus eine 1L-Kultur, die mit $OD_{600} \cong 0{,}3$ angeimpft und bis $OD_{600} \cong 0{,}5\text{-}0{,}6$ angezogen wird.

Die Hefe wird zentrifugiert und in 500 mL H_2O gewaschen: Sorvall-Zentrifuge / Rotor GS-3 / RT / 5 min / 2500 rpm.
Danach wird sie in 20 mL 100 mM LiAc / 0,5 x TE aufgenommen. Es erfolgt die Zugabe von einer Mischung aus 12 mg Carrier-DNA und 250 - 500µg Plasmid-Genbank-DNA. Die DNA-Menge soll mindestens zweimal die Menge unabhängiger Klone der Genbank beinhalten. Nach dem Mischen werden 140 mL (PEG-4000 40 % / 100 mM LiAc / 1 x TE) zugegeben und nochmals gemischt. Es folgt eine 30 min Inkubation bei 30 °C. Danach werden 17,6 mL DMSO zugegeben und für 15 min auf 42 °C inkubiert. Die Hefe wird anschließend sofort in Eiswasser abgekühlt. Die Zellen werden wie oben zentrifugiert und gewaschen und danach in einem Liter YPD für 1 h angezogen, wiederum zentrifugiert und gewaschen. Die Hefe wird in 1 L ΔTL-Medium wiederaufgenommen. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz werden 1 mL, 100 µL und 10 µL der 1 L-Kultur auf Selektionsplatten (ΔTL) für die transformierten Plasmide ausgestrichen. Für ein erfolgreiches Screening im Falle der hier verwendeten Genbank sollten mindestens $5 \cdot 10^6$ Transformanten erzeugt werden.
Die restliche Kultur wird über Nacht angezogen, um eine Amplifikation der Klone mit Interaktion zu erreichen. 10, 1 und 0,1 µL der Übernachtkultur werden auf ΔTL-Platten ausgestrichen, um die Amplifikationsrate zu bestimmen.

Danach werden die Hefen zentrifugiert und gründlich gewaschen, um restliches Histidin zu entfernen, bevor sie auf Interaktionsselektionsmedium ΔTHULL plattiert werden. Diese Platten enthalten außerdem Aminotriazol, ein Histidinanalog, das den Hintergrund durch Klone, die nur sehr wenig Histidin synthetisieren, herabsetzt. Überlebende Klone werden über 5 Tage lang mit sterilen Zahnstochern gepickt und zur Anzucht für eine DNA-Präparation auf ΔTL-Patten übertragen.

TE: siehe 4.1.1.1 Minipräparation

4.4.1.3.3 Plasmid-DNA-Präparation aus Hefe

Die Hefe wird in einer 2 mL-Übernachtkultur mit entsprechendem Selektionsmedium angezogen. Sie wird zentrifugiert und mit PBS gewaschen, dann in 300 µL Lysis-Puffer aufgenommen. Es werden 300 µL Phenol/Chloroform (1:1) und 200 mg säuregewaschene Glasperlen (Ø 0,45 - 0,5 mm) zugegeben. Dieser Ansatz wird 1 min gevortext und danach 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird zweimal mit Ethanol gefällt: Zugabe von 1/10 Vol. NaAc (3 M, pH 5,2) und 2 - 3 Vol. EtOH, Zentrifugation in der Tischzentrifuge / RT / 15 min / 14.000 rpm.
Zum Schluß wird einmal mit 70 % EtOH gewaschen. Die gefällte DNA wird in H_2O aufgenommen. Sie kann jetzt für eine Elektroporation in *E.coli* (4.1.8.2) oder als Template für PCR verwendet werden.

Lysepuffer:	50	mM	Tris/HCl, pH 8
	2,5	M	LiAc
	62,5	mM	EDTA
	2	%	Triton X-100

4.4.1.3.4 Selektion von pVP16 aus einem pVP16-pBTM116 Gemisch

Bei der Plasmid-DNA-Präparation aus Hefe wurde aus den Interaktionsklonen ein Gemisch aus zwei ampicillinresistenten Plasmiden pBTM116 und pVP16 isoliert, von denen nur pVP16 die zu identifizierende cDNA eines möglichen Bindungspartners enthält. Die Selektion auf dieses Plasmids wird nach der Elektroporation (4.1.8.2) der Hefe-DNA im Leucin prototrophen *E.coli* Stamm HB101 vorgenommen, in dem das auf pVP16 vorhandene leu2-Gen auch verwendet werden kann.

Selektionsmedium ΔL/Amp:	12,8	g/L	$Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$
	3	g/L	KH_2PO_4
	0,5	g/L	NaCl
	1	g/L	NH_4Cl
	0,4	%	Glukose
	100	mL/L	10 x ΔTHULL-Lsg.
	40	mg/L	Prolin
	20	mg/L	L-Tryptophan
	30	mg/L	Lysin
	20	mg/L	Uracil
	100	mg/L	L-Histidin
	100	µL/L	0,5 %Thiamin
	100	µg/mL	Ampicillin

4.4.1.4 Interaktionassays

(Mancini et al., 1997; Tamura et al., 1999)
Das Interaktionsassay mit GFP als Reporter dient zur Elimination falsch positiver Klone aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen, außerdem zur Messung der relativen Bindestärke der verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen. Die Hefe YRN 974 wird mit den entsprechenden Plasmiden, pBTM116 und pVP16, kodierend für die gewünschten Interaktionsproteine, wie unter 4.4.1.3.1 beschrieben transformiert. Für die anschließende FACS-Messung werden 2 mL-Übernachtkulturen von vier unabhängigen Klonen in SD/His/Ura-Medium angeimpft, die am folgenden Morgen 1:10 verdünnt werden. Sie wachsen für vier weitere Stunde, dann wird die Kultur wiederum 1:10 in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 verdünnt. Diese Suspension wird in einem Becton-Dickinson Durchflußzytometer (FACSCalibur) gemessen. Die Signalverstärkereinstellung wird so gewählt, daß die Eigenfluoreszenz der Hefe im Durchschnittswert 10 - 20 relative Fluoreszenzeinheiten ausmacht. Gemessen werden jeweils 10.000 Zellen. Bei der Auswertung werden mit Hilfe von FL-2 Fluoreszenzen im roten Bereich ausgeschlossen, die abgestorbene Hefe repräsentieren.
Die Qualität der Messung läßt sich am Fluoreszenzmikroskop überprüfen: Blaufilter B-2A (Nikon, EX450-490 nm, DM 505, BA 520). Lebendige Hefe mit Interaktion fluoreszieren grün. Abgestorbene Hefen erscheinen gelb.

SD/His/Ura-Medium (1L):	100	mL	10 x SD-Stammlösung
	10	mL	L-Histidin (2g/L)
	10	mL	Uracil (2g/L)
	50	mL	40 % Glukose
	autoklaviert (für Platten mit 20g Agar)		
	100	µg/mL	Ampicillin
	25	µg/mL	Tetracyclin

4.4.1.5 Konstruktion der Plasmide für die Expression in Hefen

4.4.1.5.1 Rezeptortyrosinkinasen: in pBTM116

TrkA, c-Kit, c-Met, Insulinrezeptor: Alle hier aufgezählten Konstruktionen sind in den Vektor pBTM116 kloniert. Die Plasmide enthalten die humanen Gene und wurden freundlicher Weise von Dr. M. Weidner, Roche Diagnostics (früher Boehringer) Mannheim, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

c-Fms und v-Fms: Diese Plasmide wurden im Rahmen seiner Dissertation von Dr. H. Joos hergestellt. Der zytoplasmatische Bereich von c-Fms und v-Fms wurde über PCR aus cDNA amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden über die Restriktionsenzyme EcoRI und SalI ist in den Vektor pBTM116 kloniert.

Primer c-Fms: 5‘ CA AGC GAA TTC TAC AAG TAC AAG CAG AAG CCG AAG 3‘
5‘CAA GCG TCG ACT CAG CAG AAC TGG TAA TTG TTA GG 3‘
Primer v-Fms: 5‘ CA AGG GAA TTC TAC AAG TAT AAG CAG AAG CCC AAG 3‘
5‘ CAA GCG TCG ACG CCG TTT CAC CTG GCT ACA GGG 3‘

4.4.1.5.2 TrkA-Mutanten in pBTM116

Die Numerierung der Aminosäure in den Mutanten orientiert sich an der Zählweise von Martin-Zanca et al. 1989 bei humanen TrkA.

K538M: kinase-inaktive Trk-Mutante, bei der die ATP-Bindungsstelle durch den Austausch von Lys 538 zu Met zerstört wurde (Ross et al., 1996), hergestellt durch homologe Rekombination in Hefe mit PCR-Produkt und NarI geschnittenem Plasmid.

Primer: 5‘ AAA GTC GAA CTG TTG CCA GAA AAT AGC GAG 3‘
5‘ CCT TCA GTG CCA TGA CAG CCA CCA G 3‘

Die Mutation ist unterstrichen.

D668V: Der Austausch von Asp zu Val in einer hochkonservierten Sequenz der Kinasedomäne führt bei den Rezeptoren c-Kit, c-Met und c-Fms zu gesteigerter Kinaseaktivität (Tamura, 1999, Yokouchi, 1997, Kitayama, 1995). Eine entsprechende Mutation für TrkA wurde in überlappende PCR-Produkte eingeführt, die mit Klenow-Polymerase aufgefüllt wurden. Kloniert wurde die Mutante über KpnI und NcoI.

Primer: A) 5‘ CCT CCG ATC CCA TGG ACC CGA TGC C 3‘
5‘ AAT AGT CGG TGC TGT AGA TAA CCC TGC TC 3‘
B) 5‘ TGG CAT GAG CAG GGT TAT CTA CAG C 3‘
5‘ CCG TGT TGG AGA GCT GGT ACC AGG GC 3‘

Y490F: Das für die Bindung von Shc essentielle Tyr 490 wurde durch Phe ersetzt (Peng et al., 1995), hergestellt durch homologe Rekombination in Hefe mit PCR-Produkt und NarI geschnittenem Plasmid.

Primer: 5‘ CGA GAA CCC ACA ATT CTT CAG TGA TGC 3‘
5‘ CCT TCA GTG CCT TGA CAG CCA CCA G 3‘

Y785F: Das für die Bindung der PLC-γ essentielle Tyr 785 wurde durch Phe ersetzt (Stephens et al., 1994). Dazu wurde ein PCR-Produkt über die KpnI-Schnittstelle in TrkA und die SalI-Schnittstelle von pBTM116 in pBTM116/TrkA einkloniert.

Primer: 5‘ CTT CAC CTA CGG CAA GCA GCC C 3‘
5‘ GTC GAC CCT AGC CCA GGA CAT CCA GGA AGA CAG GAG GTG CC 3‘

YY490/785FF: Das für die Mutante Y785F verwendete PCR-Produkt wurde wie dort beschrieben in die Mutante Y490F kloniert.

4.4.1.5.3 Bindungspartner

pACT2Shc (PTB und SH2-Domäne) wurde freundlicher Weise von Prof. T. Yamamoto, Universität von Tokyo, Japan, zur Verfügung gestellt.
Die übrigen Bindungspartner sind mit verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen gefischte Klone aus Hefe-Zwei-Hybrid-Screenings (Dissertation von Dr. H.Joos, Mancini, 2000, M. Stefan eingereicht bei J. Biol. Chem. und unveröffentlichte Daten). Es handelt sich um cDNA der oben beschriebenen Maus-Embryo-Genbank in pVP16 oder einer aus Rattenhirn hergestellten Genbank ebenfalls, im Vektor pVP16, die dem Labor von Dr. T. Südhoff, Dallas,USA zur Verfügung gestellt wurde.

PLC-γ: Klon Trk6 = N-terminale SH2-Domäne (bp 1772 - 2133 der Phospholipase C, Genbank Accession: J03806)
SH2-B: Klon T26 = SH2-Domäne (bp 1866 - 2188, Variante PSM/SH2-B Genbank Accession: AF020526)
c-Abl: Klon Trk18 = SH2- und ein Teil der SH3-Domäne (bp 512 - 907, c-Abl Typ IV aus Maus, Ben-Neriah et al., 1986)
KIAA0017: Klon Trk17 = bp 715 - 1027 des humanen Gens KIAA0017 (Genbank Accession: D13642)

4.4.2 Erzeugung von TrkA-Mutanten mit Hilfe der homologen Rekombination von *S. cerevisiae*

(Ma et al., 1987)

Aus einem Plasmid, in dem die Mutation eingeführt werden soll, wird in der Nähe dieser Stelle mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ein Stück DNA entfernt. Ein einziger Schnitt mit anschließender Dephosphorylierung ist allerdings auch schon ausreichend.
Ein PCR-Produkt wird so konstruiert, daß mit einem Primer die gewünschte Mutation eingeführt wird und die Sequenz mit dem entfernten DNA-Stück überlappt.
Das geschnittene Plasmid wird zusammen mit dem PCR-Produkt im Verhältnis 1 : 10 direkt vor der Transformation 5 min auf 95 °C denaturiert. Dann lagert sich die DNA 15 min lang bei 37 °C und 15 min bei RT zusammen.
Das DNA-Gemisch wird in einen geeigneten Hefestamm (z.B. YRN 974) transformiert wie unter 4.4.1.3.1 beschrieben und auf Selektionsplatten für das Plasmid ausgestrichen. Um auf diesen zu überleben, rekombiniert die Hefe das linearisierte Plasmid und das PCR-Produkt zu intakter Plasmid-DNA, die dann für den entsprechenden Selektionsmarker kodiert.

4.5 Zellkultur

4.5.1 Kultivierung und Passagieren der Zellen

Medien:

in mg/L	Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM)	RPMI 1640
pH	7,2	7,2
$CaCl_2$	200	
NaCl	6000	6400
Fe $(NO_3)_3$ x 9 H_2O	0,1	
KCl	400	400
$MgSO_4$ x 7 H_2O	200	100
NaH_2PO_4 x H_2O	125	
Na_2HPO_4 x H_2O		1512
$Ca(NO_3)_2$ x 4 H_2O		100
$NaHCO_3$	3700	2000
Glucose	4500	2000
Phenolrot	15	5
Natriumpyruvat	1100	
Glutathion, reduziert		1
L-Arginin x HCl	84	200
L-Asparagin		50
L-Aspartat		20
L-Cystein	48	50
L-Glutamin		300
L-Glutamat		20
Glycin	30	10
L-Histidin x HCl x H_2O	42	15
L-Hydroxyprolin		20
L-Isoleucin	105	50
L-Leucin	105	50
L-Lysin x HCl	146	40
L-Methionin	30	15
L-Phenylalanin	66	15
L-Prolin		20
L-Serin	42	30
L-Threonin	95	20
L-Tryptophan	16	5
L-Tyrosin	72	20
L-Valin	94	20
Biotin		0,2
D-Ca-Pantothenat	4	0,25
Cholinchlorid	4	3
Vitamin B_{12}		0,005
Folsäure	4	1
i-Inosit	7,2	35
Nicotinamid	4	1
p-Aminobenzoesäure		1
Pyridoxal x HCl	4	1
Riboflavin	0,4	0,2
Thiamin x HCl	4	1

Antibiotika (100x) : 6 mg/mL Penicilin G
5 mg/mL Streptomycin

Glutamin (100 x): 29,4 mg/mL

Alle Zellen werden bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank gehalten.

adherente Zellen:	Nährmedium	Passagieren
Phoenix Ampho	DMEM mit 10 % FCS	Trypsin/EDTA alle 2 - 3 Tage, 1 : 5
SC-1	DMEM mit 10 % FCS	Trypsin/EDTA alle 2 - 3 Tage, 1 : 5
HEK 293	DMEM mit 10 % FCS	alle 2 - 3 Tage, 1 : 5
NIH 3T3	DMEM mit 10 % FCS	Trypsin alle 2 - 3 Tage, 1 : 5
Schwimmzellen:		
PC12	RPMI mit 10 % Pferdeserum 5 % FCS	alle 3 - 4 Tage, 1 : 5 Resuspendieren mit Pipette
FDC-P1Mac11	DMEM mit 10% FCS 5% Il-3	alle 2 - 3 Tage, 1 : 10
K562	DMEM mit 10 % FCS	alle 2 - 3 Tage, 1 : 5

4.5.1.1 Passagieren von Schwimmzellen

Die Schwimmzellen werden durch Zentrifugation von verbrauchtem Nährmedium befreit: Eppendorfzentrifuge 5804 (R) / RT / 5 min / 1000 rpm.
Das Pellet wird in neuem Medium resuspendiert. Ein Bruchteil der Zellsuspension wird weiter kultiviert.
PC12-Zellen haben die Tendenz, sich an den Kulturgefäßen festzusetzen. Sie müssen bei den Passagen deshalb gründlich vom Boden des Kulturgefäßes herunter gespült werden.

4.5.1.2 Passagieren von adherenten Zellen

Adherente Zellen werden mit Hilfe von Trypsin oder Trypsin/EDTA-Lösungen vom Boden der Kulturgefäße abgelöst. Dazu wird das Medium entfernt. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen. Die Trypsinlsg. wirkt etwa 3 - 5 min ein, bevor das Enzym durch Zugabe von Nährmedium gestoppt wird. Die Zellen werden zentrifugiert wie bei Schwimmzellen beschrieben und in neuem Medium resuspendiert.
Bei HEK293 genügt wie bei den PC12 kräftiges Pipettieren, um sie zu lösen.

Trypsin-Lösung:	0,5	%	Trypsin in PBS
Trypsin/EDTA:	0,05	%	Trypsin
	0,02	%	EDTA
			in PBS

4.5.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zellen werden bei 37 °C im Wasserbad angetaut und sofort in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 mL Nährmedium gegeben. Anschließend wird die Suspension zentrifugiert: Eppendorfzentrifuge 5804 (R) / RT / 10 min / 1000 rpm.
Der Überstand wird abgenommen und das entstandene Zellpellet in 5 mL Nährmedium aufgenommen.
Zum Einfrieren wird bei Schwimmzellen das Nährmedium durch Einfriermedium ersetzt, bei adherenten Zellen geschieht dies nach dem Trypsinieren. Es ist auf ein langsames Herunterkühlen der Zellen bis -80 °C zu achten. Anschließend werden die gefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium:	90	%	FCS
	10	%	DMSO
Einfriermedium PC12:	10	%	DMSO
	20	%	FCS
	70	%	Nährmedium

4.5.2 Transfektion von NIH3T3 Zellen mit Lipofektin zur Herstellung einer stabilen Zellinie

Bei Lipofektin handelt es sich um eine Liposomen-Lösung aus DOTMA und DOPE, die mit DNA einen Komplex bildet, der sich von Zellen aufnehmen läßt. Das Expressionsplasmid wird zusammen mit dem Plasmid pSV2neo transfiziert, das eine Resistenz gegen Neomycin (G418) trägt. Seine Co-Transfektion dient der anschließenden Selektion der transfizierten Zellen.
Die zur Transfektion eingesetzten Empfängerzellen sollen zum Zeitpunkt der Behandlung 30-50 % konfluent gewachsen sein. Vier Stunden vor der Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel. Es werden folgende Lösungen angesetzt:

A)	5 - 10	µg	Expressionsplasmid
	1	µg	pSV2neo
auffüllen auf	100	µL	mit Wachstumsmedium ohne Antibiotika und Serum
B)	10	µL	Lipofektin
	90	µL	Wachstumsmedium ohne Antibiotika und Serum

Beide Lösungen werden miteinander gemischt und 15 min stehen gelassen. Dann wird die Lösung mit 1,8 mL Medium ohne Serum und Antibiotika versetzt und auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag werden die Zellen für wenige Sekunden (max. 30 s) mit 10 % DMSO in Wachstumsmedium versetzt. Anschließend werden sie mit frischem serumhaltigen Nährmedium versorgt.

4.5.2.1 Selektion

Zur Selektion der transfizierten Klone werden die Zellen etwa 30 h nach Beginn der Transfektion, wenn sie konfluent sind, 1 : 2 mit G418-(Neomycin)-Selektionsmedium passagiert. Die weitere Kultivierung erfolgt ebenfalls in G418-Medium, und nach 2 - 3 Wochen können die Kolonien einzelner Klone isoliert werden. Dazu werden die Kolonien von der Außenseite der Petrischale her mit einem Filzstift markiert und mit jeweils einem sterilen mit Trypsinlösung getränktem Whatman-3-MM-Papier (∅ 0,5 cm) bedeckt. Nach einer Einwirkzeit von 1 - 2 Minuten bei RT können die Whatman-Papiere in je 5 mL Nährmedium (Petrischale ∅ 5 cm) überführt werden. Bei der weiteren Kultivierung im Brutschrank mit 37 °C können die am Filter haftenden Zellen am Boden der Petrischale anwachsen und vermehrt werden.

G418 Selektionsmedium für NIH 3T3: 500 µg G418-Sulfat/mL Nährmedium bei einer mikrobiologischen Aktivität von 755 µg/mg

Trypsin-Lösung: 4.5.1.2. Passage von adherenten Zellen

Plasmide:
pSV2neo: Das Plasmid kodiert für die Neomycinresestenz. (Southern & Berg, 1982)

TrkA: Das Expressionsplasmid mit der cDNA des humanen TrkA wurde freundlicher Weise von Dr. M. Barbacid, Inst. of Mol. Biol., Madrid, Spanien, zur Verfügung gestellt.

4.5.3 Transiente Transfektion von PC12-Zellen

Die transienten Transfektionen mit Superfect, Effectene, Roti®-Fect, Gene Shuttle 20 und Lipofectin wurden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Plasmid: pEGFPC2 (Clontech) Das Plasmid kodiert für die GFP-Variante EGFP. Als Selektionsmarker in *E. coli* dient eine Kanamycinresistenz.

4.5.4 Transfektion mittels retroviraler Vektoren

Die Verwendung von retroviralen Vektoren zur Transfektion von eukaryotischen Zellen bietet die Möglichkeit, fremde DNA mit hoher Effizienz in Zellen einzubringen und Zellinien zu generieren, die über lange Zeiträume hinweg die rekombinanten Proteine exprimieren, da die Fremd-DNA stabil ins Genom integriert wird.
Das hier verwendete Verfahren basiert auf einer von von Laer et al. (1998) beschriebenen Methode, die für die Infektion hämatopoietischer Stammzellen optimiert wurde. Da dieses Verfahren teilweise die Sicherheitsstufe S2 nach dem Gentechnikgesetz erfordert, wurden die Transfektion der Verpackungszellinie und die Infektion der Zielzellen im Heinrich-Pette-Institut in Hamburg durchgeführt.

Verpackungszellinie PhoenixAmpho: Die Verpackungszellinie PhoenixAmpho basiert auf der humanen embryonalen Nierenzellinie HEK 293, da HEK 293-Zellen sich mit extrem hoher Effizient (50 - 100 %) transfizieren lassen. In diese Zellinie wurden über virale LTR-Sequenzen rekombinante Gene für die Virusproteine gag, pol und env stabil integriert, denen unter anderem die retrovirale Verpackungssequenz genommen wurde. (gag: retrovirales Core-Protein, pol: reverse Transkriptase, env: retrovirales Hüllenprotein)
Damit produziert diese Verpackungzellinie leere Virenhüllen, die zwar Zellen infizieren können, sich aber nicht vermehren und auch keine Erbinformation tragen. Allerdings sind die Zellen nach Transfektion mit entsprechenden Vektoren, die das rekombinante Zielgen mit einer Verpackungssequenz und LTRs versehen, in der Lage, dieses Zielgen in Virenpartikel zu verpacken und so in die Zielzellen zu transportieren (Abb. 4.3). Diese Fähigkeit besteht nicht länger als 3 Tage.
Die Infektiosität der hier generierten Viren ist nicht auf eine Spezies beschränkt (amphotrop).
Die PhoenixAmpho-Zellen enthalten außerdem eine temperatursensitive Variante des SV40 „large T"-Antigen, was bei Verwendung von Plasmiden mit dem SV40-Replikationsursprung die Infektionsrate um 2 Zehnerpotenzen erhöhen soll (Landau and Littman, 1992). Insgesamt lassen sich mit diesem System auch schwer zu infizierende Zelltypen wie hämatopoietische Vorläuferzellen erfolgreich infizieren. Es sollen Virentiter $>10^6$/mL erreichbar sein.

Pseudotypisieren mit VSV-G (Burns et al., 1993): Retrovieren docken an ihren Zielzellen mit Hilfe ihrer Hüllenproteine an teilweise sehr spezifischen Oberflächenproteinen der Zellen an. Dadurch kann die Fähigkeit zur Infektion verschiedener Zelltypen stark eingeschränkt sein. Das Glycoprotein VSV-G des vesikulären Stomatitis Virus dagegen bindet an Phosphatidylserin, ein Lipid, das in vielen eukaryotischen Zellen zu finden ist. Läßt man nun VSV-G in die Hülle des artifiziellen Virus einbauen, erweitert man die Bandbreite der Zielzellen und erhöht die Infektiosität.

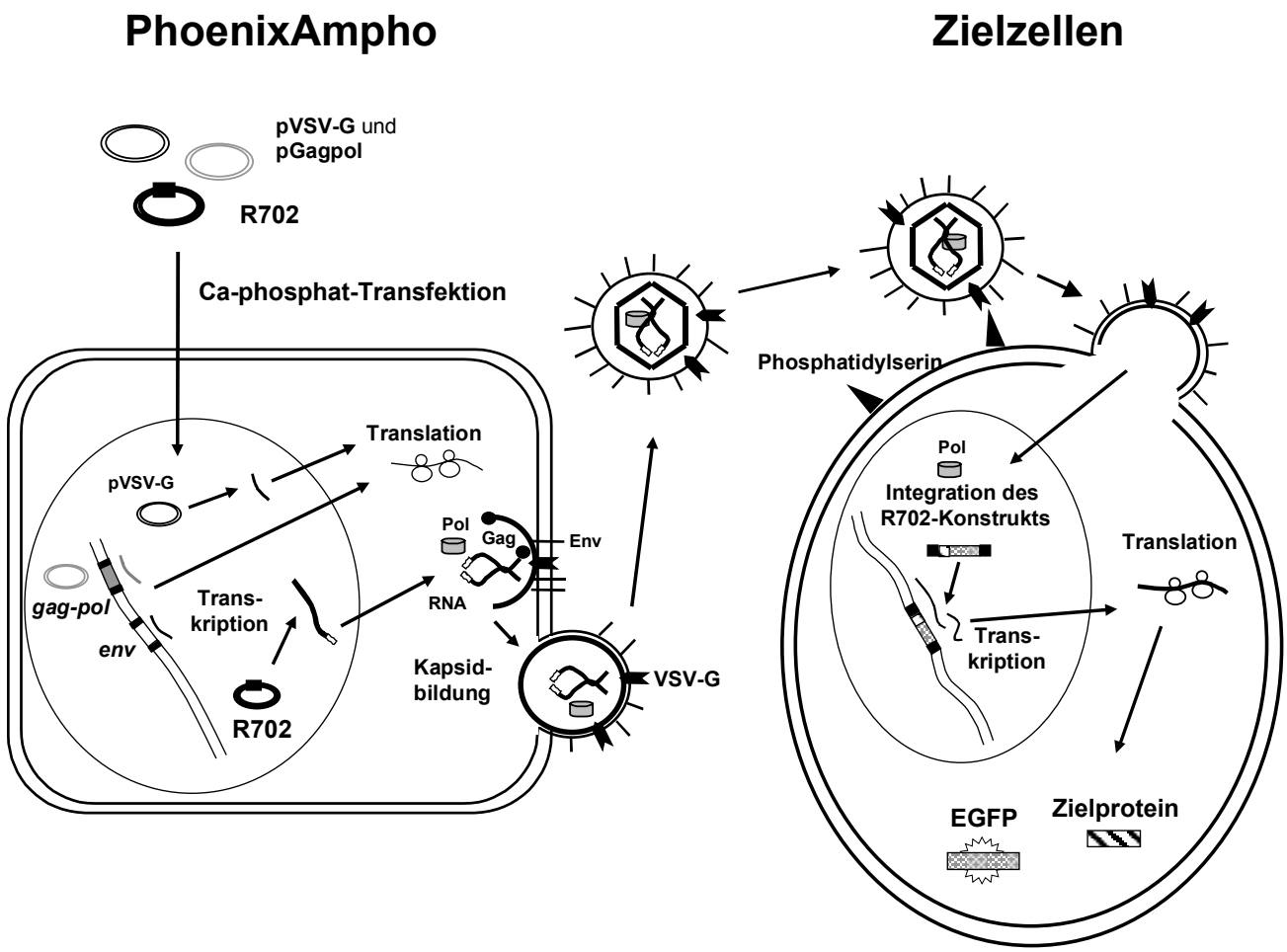

Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des retroviralen Transfektionssystems.
PhoenixAmpho-Zellen werden mit den drei Plasmiden pVSV-G, pGagpol und R702 transfiziert. pVSV-G, pGagpol und die Gene für gag, pol und env aus PhoenixAmpho werden transkibiert, translatiert und wirken an der Bildung des Viruspartikels mit. Die von R702 erhaltene RNA beinhaltet eine retrovirale Verpackungssequenz, so daß sie im Viruspartikel eingeschlossen wird. Infiziert das Virus die Zielzelle, wird die R702-RNA von der mitgelieferten reversen Transkriptase umgeschrieben und mit Hilfe der von R702 kodierten LTRs in das Wirtsgenom integriert, so daß die Wirtszelle schließlich das Zielprotein und den Reporter EGFP exprimieren kann.

Vektoren:
Die hier verwendeten Vektoren wurden freundlicher Weise von Prof. Ostertag, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg zur Verfügung gestellt.

	Schnittstellen zum Einfügen des Zielgens	*E. coli*	Selektionsmarker in eukaryotischen Zellen	virale Bestandteile
R511 (Eckert et al., 1998)	NotI, EcoRI, HindIII	Amp aus pUC	Neomycin	5‘ MeSV LTR 3‘ SFFV LTR Splice-Signal aus MPSV
R702 (Eckert et al., 1998)	NotI	Amp	EGFP (IRES)	CMV-Promoter 5‘ MeSV LTR 3‘ SFFV LTR
pVSV-G		Amp		VSV-G-Gen zum Pseudotypisieren SV 40-Promotor
pGagpol		Amp, ColE1		SV 40-Promotor SV40-Poly A gagpol

R702/Abl-SH2: SH2-Domäne, bp 630 - 917, Maus-Abl Typ IV (Ben-Neriah et al., 1986) über NotI in R702 kloniert
Primer: 5‘GCG GCC GCC ATG GCC TGG TAT CAT GGC CCT GTA TC 3‘
5‘ GCG GCC GCT AGG GAG CTG GGT AGT GGA GTG TGG 3‘

4.5.4.1 Transiente Transfektion der Verpackungszellinie Phoenix Ampho

10 – 12 h vor der Transfektion werden 10^7 Zellen in einer Zellkulturschale mit 15 cm Durchmesser ausgesät, so daß die Zellen bei der Transfektion etwa zu 70 - 80 % konfluent sind. Unmittelbar vor der Transfektion wird das Medium gegen 16 mL 25 µM Chloroquin enthaltendes Medium ausgetauscht. In einem Eppendorfgefäß werden

6 - 10µg des retroviralen Plasmidvektors,
20 µg pGagpol und
6 µg pVSV-G

gemischt und mit H_2O auf 876 µL aufgefüllt. Anschließend werden 124 µL einer 2,5 M $CaCl_2$-Lösung dazugegeben. Die DNA-Lösung wird nun tropfenweise in 1 mL 2 x HBS gegeben, wobei gleichzeitig durch das Blubbern mit einer Pasteurpipette im Puffer gemischt wird. Das so entstandene DNA-Präzipitat wird tropfenweise gleichmäßig auf den PhoenixAmpho-Zellen verteilt. Nach 6 - 12 h wird das Medium auf den Zellen gewechselt.

2 x HBS:	50	mM	Hepes, pH 7,05
	280	mM	NaCl
	10	mM	KCl
	12	mM	Glukose · 2 H_20
	1,5	mM	Na_2HPO_4

$CaCl_2$-Lösung: 2 M $CaCl_2$ in H_20

Chloroquin-Stammlösung: 25 mM Chloroquin in PBS

4.5.4.2 Ernten der Retroviren

Alle 8 -12 h wird das Viren enthaltende Medium (12 mL) von den Verpackungszellen abgesammelt und durch neues ersetzt. Das Sammeln erfolgt mit Hilfe einer sterilen Spritze. Zur Abtrennung mit abgenommener Verpackungszellen wird der Überstand filtriert (0,22 µm Filter). Die gesammelten Überstände sind bis zur direkt anschließenden Infektion der Zielzellen sofort bei 4 °C aufzubewahren oder für eine längere Lagerung einzufrieren (4.5.4.5). Das Ernten kann bis zu fünf mal wiederholt werden. 50 h nach der Transfektion sinkt der Virentiter dann unter ein brauchbares Niveau.
Bei Verwendung des Plasmids R702, das das EGFP-Gen enthält, kann der Erfolg der Transfektion in den PhoenixAmpho-Zellen leicht durch Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Für die weitere Infektion der Zielzellen sind ausreichende Virentiter zu erwarten, wenn die Transfektionseffizienz $\geq$ 70% beträgt.
Die höchsten Virentiter sollten bei der zweiten oder dritten Ernte erreicht werden. Von einem dieser Überstände wird eine Kontrollinfektion mit SC-1- oder NIH 3T3-Zellen durchgeführt. Ist der Titer besonders hoch, lohnt es, auch von den ersten und letzten Ernten eine Titerbestimmung anzufertigen und diese ggf. für separate Experimente zu verwenden.

4.5.4.3 Infektion der Zielzellen

Pro Ansatz werden etwa $4 \cdot 10^5$ Zielzellen ($3 \cdot 10^5$ im Falle der schnell proliferierenden FDCP-MAC11 und $1 \cdot 10^6$ für PC12) in jeweils 2 mL ihres Wachstumsmediums in 6-Well-Platten ausgesät. Es werden jeweils Doppelansätze infiziert. Zur Infektion werden die virenhaltigen Überstände der transfizierten PhoenixAmpho-Zellen mit 4 µg/mL Protamine (oder 7 µg/mL Polybrene bei PC12) versetzt auf die Zielzellen gegeben. Das virenhaltige Medium wird ggf. den Bedürfnissen der Zielzellen angepaßt (Zugabe von IL-3 im Falle der MAC11-Zellen). Die Virenüberstände werden aufzentrifugiert: Eppendorfzentrifuge 5804 (R) / Mikrotiterplattenrotor / 32 °C / 1h / 750 x g
Verklumpen Schwimmzellen dabei, wie im Fall von PC12, werden sie nach der Zentrifugation resuspendiert. Das virenhaltige Medium wird bis zur nächsten Infektion auf den Zielzellen belassen, solange diese es tolerieren. Inkubation der Zellen bei 32 °C erhöht die Lebensdauer der Viren erheblich.

1000 x Protamine: 4 mg/mL in H_2O oder PBS
1000 x Polybrene: 7 mg/mL in H_2O oder PBS

4.5.4.4 Einfrieren der Retroviren

Alternativ zur sofortigen Infektion der Zielzellen können die Virenüberstände gesammelt werden. Dazu werden die Viren in einer Ultrazentrifuge abzentrifugiert: 4 °C / 3 h / 15.000 x g.
Die Viren werden kräftig in Wachstumsmedium für die zu infizierenden Zellen resuspendiert, über Nacht (oder über Tag) bei 4 °C aufbewahrt und dann bei – 80°C aliquotiert eingefroren. Es empfiehlt sich dabei, ein 500 µL-Aliquot separat für die Bestimmung des Virentiters einzufrieren, da dieser durch den Einfriervorgang drastisch reduziert wird. Das Einfrieren sollte langsam (ähnlich wie beim Einfrieren von Zellen) vonstatten gehen. Beim Auftauen sollten die Virenüberstände nicht wärmer als 4 °C werden, bevor sie auf Zellen gegeben werden.

4.5.4.5 Bestimmung des Virentiters in SC-1 Zellen

Da von SC-1-Zellen bekannt ist, daß sie sich mit dem hier beschriebenen retroviralen System gut infizieren lassen, werden diese Zellen zur standardmäßigen Bestimmung des Virentiters verwendet.

4.5.4.5.1 Neomycinresistenz

Bei Plasmiden (R511), die eine Neomycinresistenz tragen, kann diese zur Titerbestimmung herangezogen werden. Hierfür werden am Vortag zur Infektion in einer 24-Well-Platte $5 \cdot 10^3$ Zellen pro Well ausgesät. Die Infektion wird nach dem unter 4.5.4.4 beschriebenen Verfahren durchgeführt, wobei Dreifachansätze einer Verdünnungsreihe in 1 : 5-Schritten von 1 : 5 bis 1 : 78.125 verwendet werden. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt und durch G418-haltiges ersetzt (700 µg/mL bei einer mikrobiologischen Aktivität von 708µg/mg). Das Medium wird alle 2 – 3 Tage gewechselt. Nach 10 Tagen sind die nicht infizierten Zellen abgestorben und aus infizierten Einzelzellen haben sich Kolonien gebildet, die ausgezählt werden können. Virentiter von 10^5 Viren/mL sind wünschenswert.

4.5.4.5.2 FACS-Analyse

Enthält das Plasmid wie R702 das EGFP-Gen, kann die Infektionsrate mit Hilfe der EGFP-Fluoreszenz durch ein FACS-Gerät ausgezählt werden. Dazu werden wie oben SC-1-Zellen ausgesät ($5 \cdot 10^4$/Well). Es werden verschiedene Volumina (10 – 300 µl) des Virenüberstandes bei einem Gesamtvolumen von 500 µL zur Infektion eingesetzt. Am 4. Tag nach der Infektion werden die Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung aus den Wells gelöst, in PBS aufgenommen ($5 \cdot 10^5$ Zellen /mL) und im FACS quantifiziert.
Eine solche Analyse kann natürlich auch mit den Zielzellen direkt durchgeführt werden.

4.5.4.6 Selektion der infizierten Zielzellen

4.5.4.6.1 Neomycinresistenz

Bei Verwendung des Plasmids R511, das eine Neomycinresitenz trägt, können die transfizierten adhärenten Zellen im Prinzip wie unter 4.5.2.1 Selektion beschrieben selektiert werden.
Da PC12-Zellen sich schlecht vereinzeln lassen, werden hier keine einzelnen Klone erzeugt. Die Zellen werden für 5 - 10 Tage ohne Selektion gehalten, bis sie sich ausreichend vermehrt haben. Dann erst wird G418-haltiges Medium dazugegeben.

G418 Selektionsmedium für PC12: 1 mg G418-Sulfat/mL Nährmedium bei einer mikrobiologischen Aktivität von 755µg/mg

4.5.4.6.2 Sortieren der Zellen mit Hilfe eines Durchflußzytometers

Bei Verwendung des Plasmids R702 ist eine Identifizierung der infizierten Zellen über ihre EGFP-Fluoreszenz möglich. Die Zellen werden herangezogen, bis größere Mengen vorhanden sind. Zum Sortieren werden $5 \cdot 10^6$ Zellen vom Wachstumsmedium befreit und in 2 mL sterilem PBS aufgenommen. Adherente Zellen werden dazu ggf. trypsiniert. Die Zellen werden in 1 mL Wachstumsmedium hinein sortiert. Das Sortieren erfolgt in einem Durchflußzytometer mit Sortiereinrichtung (MoFlow, Cytomation Inc. oder FACSCalibur, Becton-Dickinson). Über Vorwärts- und Seitwärtsstreuung werden lebendige Zellen von Zell-trümmern unterschieden. Der zu sortierende Bereich umfaßt lebendige Zellen, die grüne Fluoreszenz aufweisen. Der Anteil an infizierten Zellen wird vor und nach dem Sortieren wie unter 4.5.4.6.2 FACS-Analyse beschrieben mit dem FACSCalibur bestimmt.

4.5.5 Stimulation von PC12-Zellen

4.5.5.1 Beschichten von Kulturgefäßen mit Kollagen

PC12-Zellen werden gewöhnlich als Schwimmzellen kultiviert. Sie haften allerdings auf Kollagen und differenzieren besser bei NGF-Stimulation.
Zum Beschichten von Kulturschalen und Deckgläsern wird Kollagen S (3 mg/ml in H_2O, Boehringer/Roche, Mannheim) mit einem sterilen Gummischaber (bei kleinen Flächen kann eine umgeknickte Pipettenspitze verwendet werden) mit 1,7 µL/cm^2 gleichmäßig auf der zu beschichtenden Fläche verteilt. Die Lösung trocknet mind. 1 h bei RT. Das Kulturgefäß kann anschließend noch mit UV-Licht sterilisiert werden.

4.5.5.2 Differenzierung

PC12 Zellen bilden nach Stimulation mit NGF Neuriten aus und differenzieren zu nervenähnlichen Zellen.
Dazu werden die Zellen durch kräftiges Pipettieren vereinzelt und dünn in einem kollagenbeschichteten Kulturgefäß ausgesät. Die Zellen haften nach wenigen Stunden auf dem Kollagen. Zur Stimulation wird NGF 7S aus den Submaxillar-Drüsen der Maus von Boehringer/Roche, Mannheim, in einer Konzentration von 100 ng/ml in normalem Nährmedium verwendet. Das Medium wird alle 2 Tage erneuert. Die Stimulation wird über 6 - 10 Tage aufrecht erhalten.

4.5.5.3 Phosphorylierung und Mena-Induktion

$2{,}5 \cdot 10^8$ PC12-Zellen werden durch Zentrifugation vom normalen Wachstumsmedium befreit und einmal mit PBS gewaschen, dann in etwa einem Fünftel des ursprünglichen Volumens in RPMI mit 0,1 % Pferdeserum aufgenommen. Sie werden 4 h in diesem Medium inkubiert, bevor sie erneut pelletiert werden. Die Zellen werden in 4 mL des eben abzentrifugierten Mediums durch sehr kräftiges Pipettieren resuspendiert. Sie werden mit 200 ng/mL NGF bei 37 °C im Wasserbad oder CO_2-Inkubator stimuliert. Nach entsprechenden Zeiten werden Aliquote entnommen. Die Stimulation wird gestoppt, indem diese Aliquote in 1 mL eiskalte PBS-Lösung mit 400 µM Vanadat pipettiert werden. Die Zellen werden pelletiert: Heraeus Biofuge / 4 °C / 1 min / 2000 rpm.
Das Pellet wird entweder mit SDS-Auftragspuffer für eine SDS-PAGE vorbereitet oder mit 200 µL Lysepuffer mit 400 µM Vanadat lysiert. Aus diesen Lysaten wird Mena immunpräzipitiert (siehe 4.3.1 Immunpräzipitation). Die Präzipitate werden einer SDS-PAGE unterzogen, auf Nitrozellulose geblottet und mit α-Mena-Antikörpern detektiert.

4.5.6 Immunfluoreszenz

4.5.6.1 Beschichtung mit Kollagen/Polylysin für Immunfluoreszenz

Die Deckgläser werden wie beschrieben mit Kollagen beschichtet. Wenn sie getrocknet sind, wird die zu beschichtenden Oberfläche zuerst für 2 min in eine Polylysinlösung (0,6 mg/ml) gelegt, dann kurz in H_2O, um überschüssiges Polylysin zu entfernen. Das Deckglas trocknet an der Luft und wird mit UV-Licht sterilisiert.
Kulturgefäße wie Mehrkammer-Objektträger können auch mit einer sterilen 1:1 Mischung der Kollagen- und der Polylysinlösung bestrichen werden. Dabei werden 30 µL/cm^2 benutzt.
PC12-Zellen werden auf Kollagen/Polylysin beschichteten Deckgläsern oder Objektträgern kultiviert. Bei Fibroblasten ist keine Beschichtung erforderlich.

4.5.6.2 Fluoreszenzfärbung

Die Zellen werden mit PBS gewaschen, 20 min bei RT fixiert, wieder gewaschen, 1 min auf Eis permeabilisiert und zweimal gewaschen. Das Permeabilisieren wird unterlassen, wenn nur extrazelluläre Proteine betrachtet werden sollen. Unspezifische Bindungen werden durch dreimalige Behandlung mit Block-Lösung für 10 min bei RT abgesättigt. Der primäre Antikörper wird in Block-Lösung verdünnt. 100 µL der Antikörperlösung pro Deckglas (1,5 x 1,5 cm) oder 30 µL/Kammer bei 8-Kammerobjektträgern werden auf die Zellen pipettiert. Die Flüssigkeit wird durch das Auflegen eines zurecht geschnittenen Stücks Parafilm auf dem ganzen Glas verteilt. Die Inkubation mit Antikörpern findt 1 - 1,5 h in Feuchtkammern bei 37 °C statt. Als Feuchtkammer dient eine Petrischale, die wassergetränkte Papiertücher enthält.
Nach Entfernen des primären Antikörpers wird 3 mal mit Block-Lösung gewaschen, bevor der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper zugegeben wird. Diese Antikörperverdünnungen werden vor dem Gebrauch zentrifugiert: Tisch-Ultrazentrifuge / Rotor TLA / 4 °C / 10 min / 50.000 rpm.
Nach der Inkubation mit den sekundären Antikörpern wird wieder gewaschen. Dann wird das Präparat in 1 Tropfen Mowiol-Lösung auf einem Objektträger eingebettet. Die Mowiol-Lösung trocknet über Nacht bei RT.

Fixierlösung:	3	%	PFA
	0,9	mM	$CaCl_2$
	0,5	mM	$MgCl_2$
			in PBS, pH 7,4

3 g PFA werden bei 50 °C in 80 ml H_2O mit 100 µL 2 M NaOH gelöst. Es werden 10 mL 10 x PBS, 90 µL 1 M $CaCl_2$ und 50 µL 1M $MgCl_2$ zugefügt. Der pH-Wert wird kontrolliert und nötigenfalls mit HCl nachgestellt. Das Volumen wird mit H_2O auf 100 mL aufgefüllt.

Permeabilisierungs-Lsg.:	0,5	%	Triton X-100
			in PBS

Block-Lösung:	10	%	FCS
	200	mg/mL	Schaf IgG
			in PBS

Mowiol-Lösung: 6 g Glycerin und 2,4 g Mowiol werden zusammengegeben und 2 h stehen gelassen, dann werden 12 mL 0,2 M Tris/HCl pH 8,5 zugefügt. Die Mischung wird 10 min bei 50 °C gerührt und anschließend zentrifugiert: Eppendorfzentrifuge 5804 (R) / RT / 20 min / 5000 rpm.
Vor Gebrauch wird DABCO (25 mg/mL) zugefügt. Die Lösung wird bei -20°C gelagert.

primärer Antikörper:	α-Phosphotyrosin (4G10), monoklonal,	Verd.: 28 µg/mL
sekundärer Antikörper:	α-Maus IgG-FITC	Verd.: 1 : 50

5 Ergebnisse

Der Vorgang der neuronalen Differenzierung einer Vorläuferzelle nach NGF-Stimulation bedeutet u.a. eine tiefgreifende morphologische Veränderung der Zelle und läßt sich nur unter drastischer Umstrukturierung des Zytoskeletts bewältigen. NGF muß also in der Lage sein, in der Zelle ein entsprechendes Signal auszulösen. Dies geschieht über den NGF-Rezeptor TrkA,
der bekanntermaßen die Differenzierung von PC12-Zellen, sensorischen und sympatischen Neuronen, steuert. Auf welche Weise TrkA aber nun bestimmt, wo Neuriten gebildet werden und durch welche Signalproteinkaskade(n) solche lokalen Veränderungen am Zytoskelett hervorgerufen werden, ist weitgehend unbekannt.
Zu Beginn dieser Arbeit waren für TrkA, im Gegensatz zu anderen Rezeptortyrosinkinasen wie z.B. c-Fms, nur relativ wenig direkte Interaktionspartner bekannt. Die beiden am besten untersuchten Signalwege von TrkA sind nach wie vor die von Shc und PLCγ, die sich im Ras/MAP-Kinase- und PI-3'-Kinase-Weg forsetzen (Review: Kaplan & Miller, 1997). Allerdings kommen diese Signalwege in allen Zellsystemen vor und sind durchaus nicht spezifisch für das Verhalten von Nervenzellen. Es konnte also vermutet werden, daß neben den bereits bekannten Signaltransduktionskaskaden von TrkA neue, spezifischere existieren sollten, die möglicherweise eine Verbindung zwischen TrkA und dem Zytoskelett herstellen. Zur Auffindung neuer Interaktionsproteine von Rezeptortyrosinkinasen bietet sich die Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems an, welches in dieser Arbeit mit der zytoplasmatischen Domäne von TrkA als Köder eingesetzt wurde.

5.1 Genbank-Screening mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

5.1.1 Etablierung des LexA-TrkA-Hybridproteins als Köder für ein Genbank-Screening

Zum Durchsuchen einer Maus-Embryo-Genbank mit der zytoplasmatischen Domäne von humanem TrkA als Köder zur Isolation möglicher neuer Bindungspartner des Rezeptors wurde das in Abschnitt 4.4.1 beschriebene LexA-Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet. Das benötigte TrkA-Köderplasmid pBTM116/TrkA wurde freundlicherweise von Dr. M. Weidner, Roche Diagnostics (früher Boehringer), Mannheim, Deutschland zur Verfügung gestellt.
Die Fusion von TrkA an LexA sorgt dabei für die Dimerisierung und Aktivierung der Tyrosinkinase. Damit werden, analog zur Aktivierung der Kinase durch den Wachstumsfaktor NGF *in vivo*, phosphorylierte Bindungsstellen für Interaktionspartner des Rezeptors erzeugt.
Die Funktionalität des hier verwendeten LexA-TrkA-Fusionsproteins, also Dimerisierung, Kinaseaktivierung und Autophosphorylierung wurde im Westernblot überprüft (siehe auch 5.2.1.2 Herstellung der TrkA-Mutanten). Die spezifische Bindung bekannter Interaktionspartner an das LexA-TrkA-Hybrid wurde mit Hilfe des in unserem Labor entwickelten Hefe-Zwei-Hybrid-Potokolls mit GFP als Reporter getestet (Mancini et al., 1997; Tamura et al., 1999). Dazu wurde das TrkA-Köderplasmid zusammen mit dem jeweiligen potentiellen Bindungspartner (in den Plasmiden pVP16 oder pACT) in den Hefestamm YRN 974 transformiert. Es wurden jeweils vier unabhängige Klone einer Transformation

im Durchflußzytometer auf die Grünfluoreszenz des bei Interaktion der Bindungspartner exprimierten GFP untersucht. Von den vier Meßwerten wurden Durchschnitt und Standardabweichung berechnet. Als positiv wurden Interaktionen bezeichnet, deren Wert mindestens das Doppelte der Negativkontrolle erreichte. Als Kontrolle wurde Hefe auf einem Objektträger ausgestrichen und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Es wurden folgende Proteine getestet:

potentielle Bindungs-partner	Bindungsdomänen	Interaktion mit TrkA
pVP16		-
PLCγ	SH2 (N-term.)	+
Shc	PTB	+
SH2-B	SH2	+
PI-3'-Kinase	p85-Untereinheit	-
Crk	SH2	-
Grb2	SH2	-
Grb10	SH2	-
c-Src	SH2	-
GAB1	Met bindende Domäne	-
Ship-1	SH2	-
MUPP-1	10. PDZ	-

Tabelle 5.1: **Wechselwirkung verschiedener an Rezeptortyrosinkinasen bindende Proteine mit TrkA.**

Interaktionen mit TrkA konnten mit dieser Methode ausschließlich mit den bekannten TrkA-Bindungproteinen PLC-γ, Shc und SH2-B nachgewiesen werden (Tabelle 5.1). Das hier verwendete LexA-TrkA-Hybridprotein stellt somit eine funktionsfähige Tyrosinkinase dar und zeigt im Bezug auf Wechselwirkungen mit anderen Proteinen die gleiche Spezifität wie TrkA *in vivo*. Das entsprechende Plasmid wurde nun als Köder in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screening eingesetzt.

5.1.2 Identifizierung von c-Abl als potentiellen TrkA-Bindungspartner

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner des Nervenwachstumsfaktor-Rezeptors TrkA wurden wie unter 4.4.1 beschrieben zwei Screenings der Maus-Embryo-Genbank (Vojtek et al., 1993) mit pBTM116/TrkA im *Saccahromyces cerevisiae*-Stamm L40 durchgeführt. Für ein Screening wurden 380 µg der Genbank-DNA in erwiesenermaßen TrkA exprimierende Hefe transformiert. Es wurden auf diese Weise $9{,}7 \cdot 10^6$ und $6{,}5 \cdot 10^6$ Transformanten im 1. bzw. 2. Screening auf mögliche Interaktion mit TrkA selektiert. Beim ersten Screening wurden alle 22 über fünf Tage erscheinenden Kolonien von den Selektionsplatten isoliert und sequenziert. Im zweiten Screening wurden die Selektionsbedingungen durch die Reduktion des Aminotriazolgehaltes von 20 mM auf 10 mM variiert, um weitere, schwächere Interaktionen detektieren zu können.

Von den Klonen des zweiten Screenings wurden die am häufigsten vorkommenden cDNAs, kodierend für c-Abl und PLC-γ, mit Hilfe des Southern-Blot-Verfahrens identifiziert. Für die Herstellung der Sonden wurden dabei Klone des ersten Screenings ausgewählt: Trk18 für c-Abl und Trk21 für PLC-γ (Abb. 5.1) Nicht zu diesen beiden Spezies gehörende Klone wurden anschließend sequenziert.
Alle potentiellen Interaktionspartner wurden im Hefestamm YRN974 mit dem GFP-Reportersystem ein zweites Mal auf ihre Bindung an TrkA getestet. Klone, die in diesem System kein positives Signal lieferten, wurden als falsch positiv bewertet.
Die erhaltenen Proteine sind in Tabelle 5.2 aufgezählt.

	1. Screening (20 µM 3-AT)		**2. Screening (10 µM 3-AT)**		
Protein	**Anzahl**	**%**	**Anzahl**	**%**	**unabhängige Klone**
PLC-γ	5	23	13	25	3
SH2-B	0	0	3	6	1
c-Abl	14	64	26	50	8
KIAA0017	2	9	2	4	2
falsch Positive	1	4	8	15	
Gesamtzahl analysierte Klone	22 von 22		52 von 340		

Tabelle 5.2: Im Hefe-Zwei-Hybrid-Screening mit TrkA interagierende Proteine

In beiden Screenings wurde der bereits bekannte TrkA-Bindungspartner PLC-γ (Stephens et al., 1994) gefischt, ebenso wie SH2-B, dessen Interaktion mit TrkA während der Entstehung dieser Arbeit von Qian et al. (1998) beschrieben wurde. Daneben entfällt ein erstaunlich hoher Satz von 64 % bzw. 50 % der erhaltenen cDNAs auf die Nicht-Rezeptortyrosinkinase c-Abl. Außerdem wurden zwei unabhängige Klone des Maushomologs einer im Rahmen des menschlichen Genom-Projekts von Kazusa Institute, Japan klonierten DNA „KIAA0017“ gefischt.

5.1.3 Bindungsdomänen der potentiellen Interaktionspartner von TrkA

Da die Genbank durch Klonierung von Produkten eines nicht zielgerichteten Restriktionsverdaus der Mäuse-Embryo-cDNA generiert wurde, können verschiedene Sequenzen des gleichen Interaktionspartners im Screening erhalten werden, die aber in der TrkA-Bindungsdomäne überlappen.
Im Zusammenhang mit Rezeptortyrosinkinasen sind häufig Bindungsdomänen wie SH2- und PTB-Domäne zu finden, da diese eine Tyrosinphosphorylierung des Bindungspartners voraussetzen, was eine ideale Bedingung für eine sehr spezifische Regulation der folgenden Signalkaskaden darstellt. Die Wechselwirkung der SH2-Domäne der PLC-γ mit TrkA ist seit langem bekannt, ebenso wie die Bindung der Shc-PTB-Domäne an den Rezeptor. Für das Protein SH2-B wurde parallel zum Entstehen dieser Arbeit eine Bindung über seine SH2-Domäne an TrkA beschrieben (Qian et al., 1998). Angesichts dieser Tat-

sachen paßt es gut ins Bild, daß alle gefischten Klone von c-Abl für dessen SH2-Domäne kodierten (Abb. 5.1). Das Protein KIAA0017 dagegen enthält allerdings keine dieser Domänen.

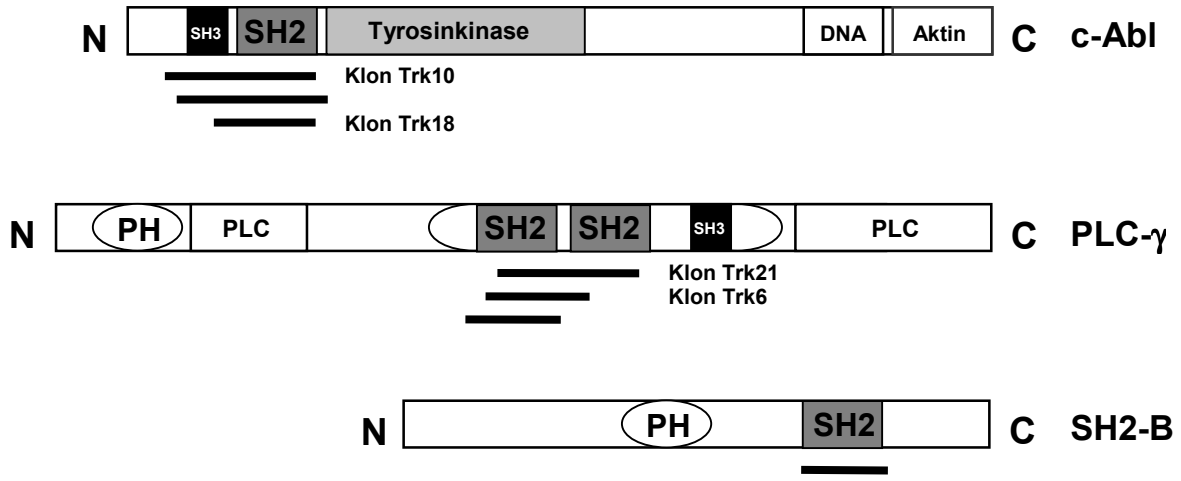

Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von c-Abl, PLC-γ und SH2-B.
Die verschiedenen Längen der im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen gefischten Klone sind als schwarze Balken dargestellt, was im Falle von c-Abl auf drei ausgewählte Klone beschränkt wurde. Die übrigen Sequenzen befinden sich innerhalb des gleichen Bereichs. Klone, die für Southern-Blots oder im GFP-Hefe-Zwei-Hybrid-System eingesetzt wurden, sind namentlich genannt. **SH3:** Src-Homologie3-Domäne; **SH2:** Src-Homologie2-Domäne; **DNA:** DNA-Bindungsdomäne; **Aktin:** Aktin-Bindungsdomäne; **PH:** Pleckstrin homologe Domäne; **PLC:** Phospholipase-Domäne.

5.1.4 Die Interaktion der neuen potentiellen TrkA-Bindungspartner mit dem Rezeptor sind abhängig von dessen Kinaseaktivität

Zur Untersuchung der für die Abl-SH2-Domäne erwarteten Abhängigkeit der Interaktion vom Phosphorylierungszustand des NGF-Rezeptors, wurden zwei Mutanten von TrkA hergestellt:
1) **TrkA K538M**: Die ATP-Bindungsstelle wurde zerstört, so daß eine inaktive Kinase resultiert (Ross et al., 1996).
2) **TrkA D668V**: In Mastozytomen findet sich eine Mutante der Rezeptortyrosinkinase c-Kit, deren Kinasefunktion durch Punktmutation eines Aspartatrestes (D816) zu Valin in einem konservierten Motiv der Aktivierungsschleife permanent aktiviert wurde (Kitayama et al., 1995). Im Hefe-Zwei-Hybrid-System hat dies eine verstärkte Autophosphorylierung gegenüber der Wildtyp-Kinase zur Folge (Mancini et al., 2000). Auch bei verschiedenen anderen Rezeptortyrosinkinasen wie c-Fms, c-Met und c-Ron bewirkt die Mutation D→V an der entsprechenden Stelle eine Aktivierung der Kinase (Morley et al., 1999; Jeffers et al., 1997; Santoro et al., 1998). In TrkA befindet sich das entsprechende Aspartat in Position 668. Durch die Einführung eines Valins an dieser Stelle sollte nun auch für TrkA eine entsprechende Veränderung der Kinaseaktivität erreicht werden.

TrkA, die kinase-inaktivierte Mutante (K538M) und die D668V-Mutante wurden mit den Bindungsdomänen von PLC-γ, Shc, SH2-B und c-Abl in YRN 974 transformiert.
Im Falle von c-Abl wurde der kürzeste im Hefe-Zwei-Hybrid-Screening erhaltene Klon (Trk18) verwendet, der die vollständige SH2-, aber nur einen Teil der SH3-Domäne enthält, so daß eine Wechselwirkung über diese ausgeschlossen sein sollte.

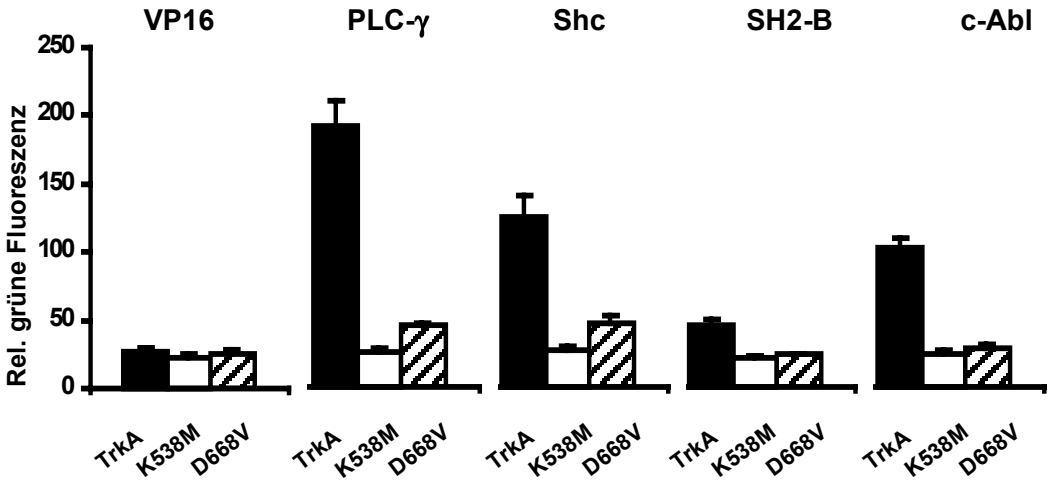

Abbildung 5.2: Sowohl die Mutation K538M als auch D668V verringern die Bindungsstärke von PLC-γ, Shc, SH2-B und c-Abl an TrkA im Hefe-Zwei-Hybrid-System.
Abb. 5.2 zeigt eine FACS-Analyse von **TrkA** (Wildtyp), der kinase-inaktiven Mutante **K538M** und **D668V** (Mutation des konservierten D in der Nähe der Aktivierungsschleife) mit den genannten TrkA-Wechselwirkungspartnern. Die Stärke der Interaktion ist bei der K538 wie auch bei der D668V-Mutante mit allen Bindungspartnern deutlich vermindert. VP16 repräsentiert die Eigenfluoreszenz der Hefe YRN 974. **Rel. grüne Fluoreszenz:** Relative grüne Fluoreszenz.

Abb. 5.2 zeigt für alle Interaktionspartner eine deutliche Reduktion der Bindung bei Ausschalten der Kinasefunktion von TrkA (K538M). (Die korrekte Expression dieser Mutante wurde im Westernblot, in Abschnitt 5.2.1.2 Herstelleung der TrkA- Mutanten bestätigt.) Damit ergibt sich eine klare Abhängigkeit aller Interaktionen von der Autophosphorylierung der Trk-Kinase. Diese Tatsache unterstützt im Fall von Abl die Hypothese, daß die Bindung über die SH2-Domäne erfolgt, da SH3-Domänen unabhängig von Tyrosinphosphorylierungen an prolinreiche Sequenzen binden, wohingegen die Phosphorylierung des Bindungsmotivs für eine Interaktion über SH2-Domänen notwendig ist.
Die D668V-Mutante zeigte nun interessanterweise ebenfalls eine erheblich geringere Wechselwirkung mit allen Bindungspartnern, die kaum über den mit der kinase-

inaktivierten Mutante erhaltenen Werten lagen. Eine Überprüfung dieses Ergebnisses mit dem Fluoreszenzmikroskop ergab entsprechend erheblich weniger grün leuchtende Hefen für die D668V-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Kinaseaktivität war durch die Mutation D668V also nicht vollständig verloren gegangen, sondern eher „herunter-reguliert“ worden, anstatt „herauf“, wie nach dem Beispiel von c-Kit zu erwarten gewesen wäre. Diese unerwartete Reaktion mag mit der speziellen Struktur der Aktivierungsschleife von TrkA zusammenhängen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Rezeptortyrosin-kinasen enthält TrkA drei phosphorylierbare Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife, die alle am Mechanismus der Kinase-Aktivierung und der anschließenden Stabilisierung der aktiven Konformation beteiligt sind (Cunningham & Greene, 1998). Möglicherweise greift die Mutation D668V in diesen Mechanismus ein.

5.1.5 Bindungsspezifität von c-Abl und KIAA0017

Die im Hefe-Zwei-Hybrid-Screening erhaltenen potentiellen TrkA-Bindungspartner c-Abl und KIAA0017 und verschiedene Kontrollen (Abb. 5.3) wurden zusammen mit den zytoplasmatischen Domänen verschiedener Rezeptortyrosinkinasen in YRN 974 mit dem GFP-Reportersystem transformiert, um die Spezifität der jeweiligen Interaktion zu charakterisieren.

Von PLC-γ, Shc, SH2-B und Crk ist das Bindungsverhalten an TrkA bekannt. So interagiert die PLC-γ mit allen untersuchten Rezeptoren außer c-Kit und dem Insulin-rezeptor (Abb. 5.3 B und D), wohingegen SH2-B, wie in der Literatur beschrieben, nur an den Insulinrezeptor und TrkA binden kann (Abb. 5.3 B und E, Riedel et al., 1997, Qian et al., 1998). Das Protein Crk wurde ausgewählt, weil es erwiesenermaßen einen Komplex mit TrkA bildet, ohne jedoch direkt mit dem Rezeptor zu interagieren (Abb. 5.3 E, Torres & Bogenmann, 1996). Das Verhalten der PI-3’-Kinase wurde lange Zeit konträr diskutiert, da TrkA tatsächlich die Konsensusequenz YXXM für die Bindung der SH2-Domäne der p85-Untereinheit besitzt. Dieses Motiv wird jedoch nicht phosphoryliert (Stephens et al., 1994; Guiton et al., 1994), und neuere Veröffentlichungen plazieren die PI-3’-Kinase in nachgeordneten Signalkaskaden des Trk-Rezeptors, die mit dem Shc-Signaltransduktions-weg in Verbindung stehen (Review: Kaplan & Miller, 2000). In Übereinstimmung mit diesen Daten, konnte auch im hier verwendeten Hefe-System keine Bindung der p85-Untereinheit der PI-3’-Kinase an TrkA beobachtet werden.

Die Nicht-Rezeptortyrosinkinase c-Abl zeigt in diesem Interaktionsassay eine ähnliche Spezifität wie die PLC-γ (Abb. 5.3) . Abl ist in der Lage mit den meisten Rezeptoren zu interagieren, nicht jedoch mit c-Kit. So findet sich c-Abl auch im Hefe-Zwei-Hybrid-Screening mit c-Fms. Allerdings wurde dort nur 1 Klon c-Abl neben 203 anderen gefischt (Dissertation Dr. A. Mancini), wogegen der Anteil bei Verwendung von TrkA bei 64 % bzw. 50 % lag. Entsprechend gering ist die Bindungsstärke von Abl an Fms im Vergleich zu der der PI-3’-Kinase mit 164 zu 795 rel. Fluoreszenzeinheiten. Die Bindungsstärke von Abl an TrkA ist dagegen durchaus vergleichbar mit der der übrigen Interaktionspartner.

Das Protein KIAA0017 schließlich bindet allein an TrkA und keinen anderen der getesteten Rezeptoren.

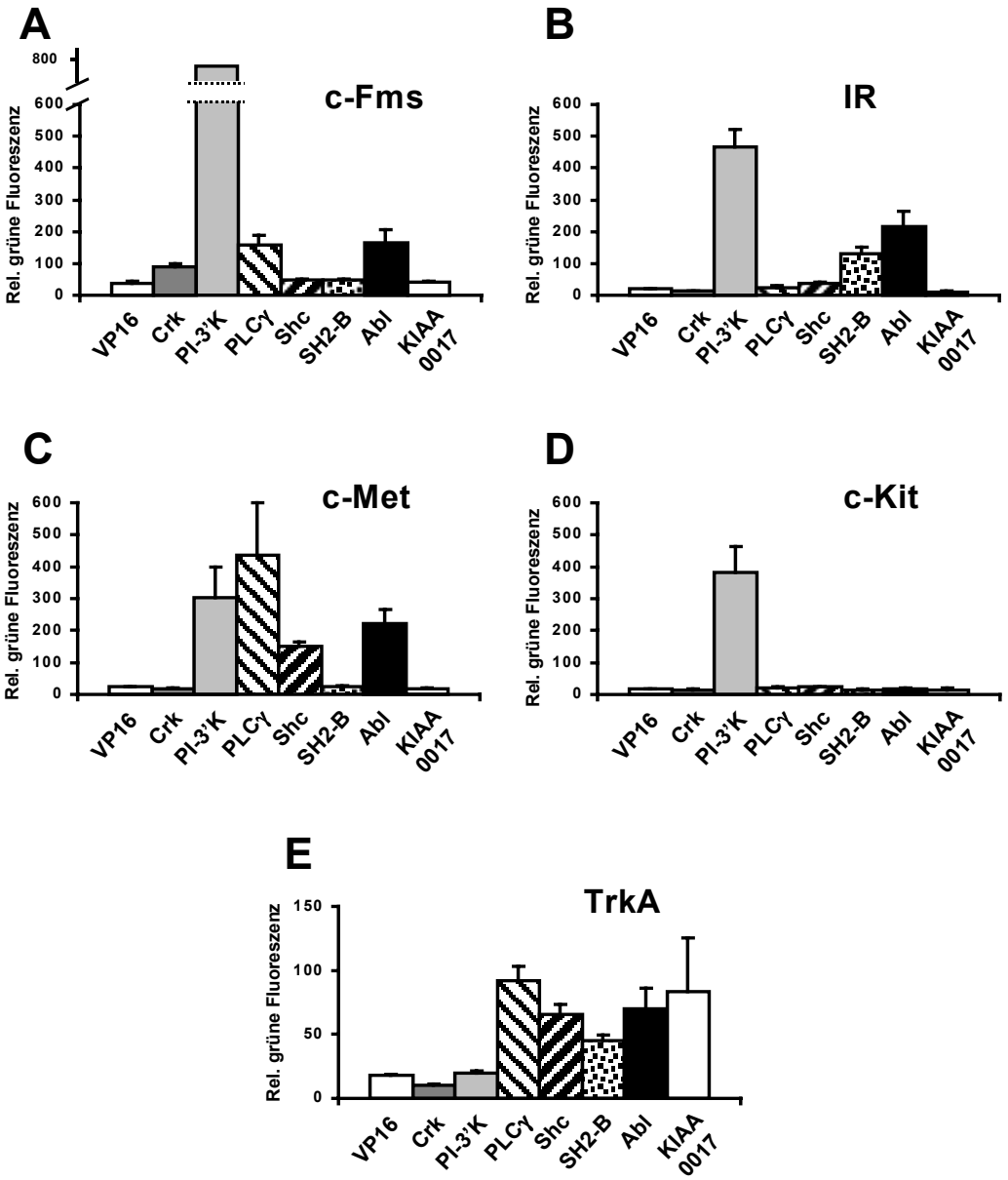

Abbildung 5.3: KIAA0017 bindet ausschließlich an TrkA; c-Abl zeigt eine ähnliche Bindungsspezifität wie PLC-γ.
Verschiedene bekannte und die beiden neu gefundenen Interaktionspartner von TrkA wurden in YRN 974 per FACS-Analyse auf ihre Interaktionsfähigkeit mit verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen (c-Fms, dem Insulinrezeptor, c-Met, und c-Kit) untersucht. Die hierzu verwendeten pBTM116-Plasmide kodierten jeweils für die zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren. Die Plasmide der Bindungspartner (pVP16, Mausembryo-oder Rattenhirn-Genbank und pACT/Shc) enthielten die SH2-Domänen von c-Crk (**Crk**), der p85-Untereinheit der PI-3'-Kinase (**PI-3'-K**), der **PLC-γ** (N-terminal), **SH2-B** und c-Abl (**Abl**), die PTB und SH2-Domäne von **Shc** und die TrkA-bindende Domäne von **KIAA0017**. **A:** Interaktionen mit c-Fms, **B:** dem Insulinrezeptor (IR), **C:** c-Met, **D:** c-Kit und **E:** TrkA; **Rel. grüne Fluoreszenz:** Relative grüne Fluoreszenz.

5.2 Identifizierung der Rezeptorbindungsstelle der neuen TrkA-Bindungspartner

5.2.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System: Interaktionen von TrkA-Mutanten mit Defekten in bekannten funktionellen Motiven

5.2.1.1 Mögliche Bindungsmotive

Im Gegensatz zu Rezeptortyrosinkinasen wie c-Fms und c-Kit verfügt TrkA nicht nur über relativ wenig bekannte direkte Bindungspartner, sondern auch über eine entsprechend geringe Anzahl von bekannten Bindungsstellen. Die zytoplasmatische Domäne von TrkA enthält insgesamt nicht mehr als 11 Tyrosinreste (Martin-Zanca et al., 1989), von denen fünf erwiesenermaßen phosphoryliert werden (Stephens et al., 1994) und Bindungsstellen für zytoplasmatische Proteine darstellen (Segal et al., 1996, Meakin et al., 1999; Ong et al., 2000): die Shc/FRS-2-Bindungsstelle, Y490, die PLC-γ-Bindungsstelle, Y785, sowie die Aktivierungsschleife und SH2-B-Bindungsregion, YYY670, 674, 675 (Qian, 1998).
Shc, PLC-γ und SH2-B binden über ihre PTB bzw. SH2-Domänen Phosphotyrosin enthaltende Motive, was auch für die SH2-Domäne von c-Abl erwartet werden konnte.
Darüber hinaus bevorzugt die SH2-Domäne von c-Abl nach Songyang et al. (1993, 1994) unter anderem ein Bindungsmotiv ähnlich dem in TrkA enthaltenen für die PLC-γ (Abb. 5.4). Die relative Präferenz von Abl für dieses Motiv sollte dabei kaum geringer sein als die der Phospholipase C.

		+1	+2	+3
Abl	pY	X	D (1,8)	V (2,2)
PLC-γ-1C	pY	L	D (2,0)	V (2,2)

Abbildung 5.4: Bevorzugte Bindungsmotive der SH2-Domänen von Abl und PLC-γ-1C nach Songyang et al. (1993, 1994).
pY: phosphoryliertes Tyrosin, **Werte in Klammern:** relative Präferenz

5.2.1.2 Herstellung der TrkA-Mutanten

Um nun die Bindungsstelle(n) der neuen Wechselwirkungspartner von TrkA zu lokalisieren, wurden die Tyrosinreste Y490 und/oder Y785 der Shc-, bzw. PLC-γ-Bindungsstelle im TrkA-Konstrukt in pBTM116 zu Phenylalanin mutiert: ‚Y490F', ‚Y785F' und ‚YY490/785FF'. Auf die Einführung von Mutationen in der Aktivierungsschleife wurde in diesem System verzichtet, da solche Mutationen die Kinaseaktivität und damit das Autophosphorylierungs- und Bindungsverhalten von TrkA beeinflussen (Cunningham et al., 1997), so daß zwischen einem Bindungsverlust durch die Zerstörung des spezifischen Tyrosin im Bindungsmotiv oder durch mangelnde Phosphorylierung an einer anderen Stelle effektiv nicht unterschieden werden könnte.
Expression und Autophosphorylierung dieser TrkA-Mutanten, sowie der unter 5.1.4 bereits verwendeten kinase-inaktiven Mutante K538M in Hefe wurden mit Westernblots überprüft (Abb. 5.5). Für alle Mutanten ist die Bande des LexA-Fusionsproteins deutlich erkennbar, und die Mutationen der Bindungsstellen beeinflussen die Kinaseaktivität von TrkA nicht.

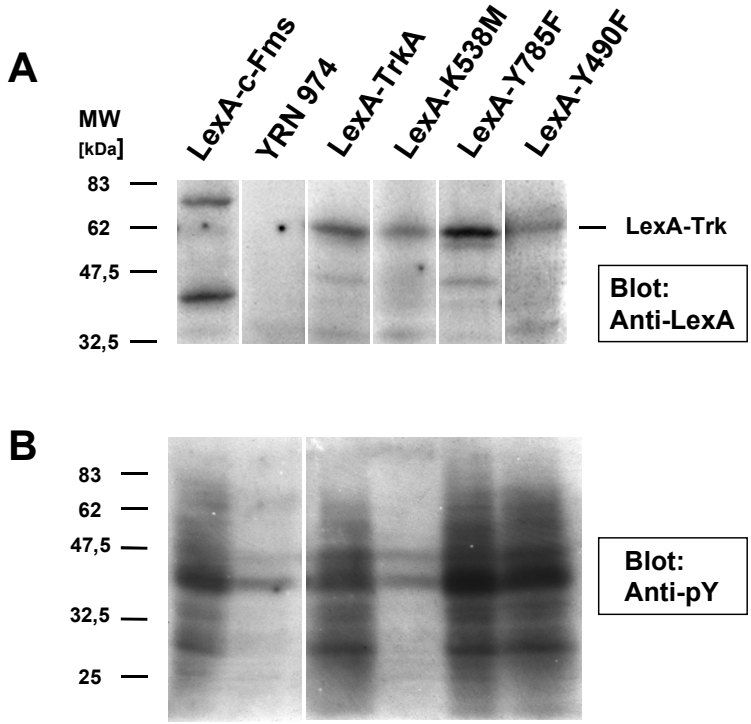

Abbildung 5.5: Expression und Funktionalität der Kinase der im Hefe-Zwei-Hybrid-System eingesetzten TrkA-Mutanten.
Die Hefe YRN 974 wurde mit den Trk-Mutanten in pBTM116 transformiert. Eine 2 mL-Kultur wurde mit Oxalytikase aufgeschlossen. Die Lysate wurden einer SDS-PAGE unterzogen und auf Nitrozellulose geblottet. Die geblotteten Proteine wurde mit α-LexA-Antikörpern (**A**) und α-Phosphotyrosin-Antikörpern (**B**) detektiert. **A:** Das Fusionsprotein aus LexA und der zytoplasmatischen Domäne von c-Fms (**LexA-c-Fms**), die nicht mutierte zytoplasmatische Domäne von TrkA (**LexA-TrkA**), die kinaseinaktive Mutante (**LexA-K538M**), die PLC-γ-Bindungsstellen-Mutante (**LexA-Y785F**) und die Shc-Bindungsstellen-Mutante (**LexAY490F**) wurden in YRN 974 exprimiert. Nicht transformierte Hefe (**YRN 974**) wurde als Negativkontrolle verwendet. **B:** Alle LexA-Fusionsproteine mit Ausnahme der kinaseinaktiven Mutante K538M phosphorylieren diverse Hefeproteine an Tyrosinresten. **Anti-pY:** Anti-Phosphotyrosin, **MW:** Molekulargewichtsmarker.

5.2.1.3 Interaktion der TrkA-Mutanten mit den potentiellen TrkA-Bindungspartnern

Die beschriebenen TrkA-Mutanten wurden mit den Bindungsdomänen von PLC-γ, Shc, SH2-B, c-Abl und KIAA0017 in YRN 974 transformiert. Wildtyp-TrkA und die kinaseinaktive Mutante K538M dienen dabei jeweils als Kontrolle.

Die an der Shc- und/oder PLC-γ-Bindungsstelle defekten Mutanten zeigen mit Shc und der PLC-γ das erwartete Bindungsverhalten. Die Meßwerte entsprechen denen der kinaseinaktiven Mutante (Abb. 5.6 B bzw. C). Bei SH2-B (Abb. 5.6 D) bleibt die Interaktion mit TrkA auch in der YY490/785FF-Doppelmutante bestehen. Dieses Ergebnis bestätigt die parallel zu dieser Arbeit von Qian et al. (1998) erhaltenen Daten, nach denen SH2-B selbst dann an ein Trk-Protein binden kann, wenn dessen gesamte Tyrsosinreste bis auf die in der Aktivierungsschleife entfernt wurden.

Die Mutation an Y 785 verhindert überraschender Weise nicht die Bindung von c-Abl (Abb. 5.6 E), ebensowenig wie die Mutation der Shc-Bindungsstelle oder gar die Doppelmutante. Das gleiche gilt für KIAA0017 (Abb. 5.6 F). Dieses Verhalten läßt darauf schließen, daß diese Stellen entweder keine oder nicht die einzigen Interaktionsorte dieser beiden Proteine sind, sondern ein anderer phosphorylierungsabhängiger Bindungsmechanismus benutzt wird.

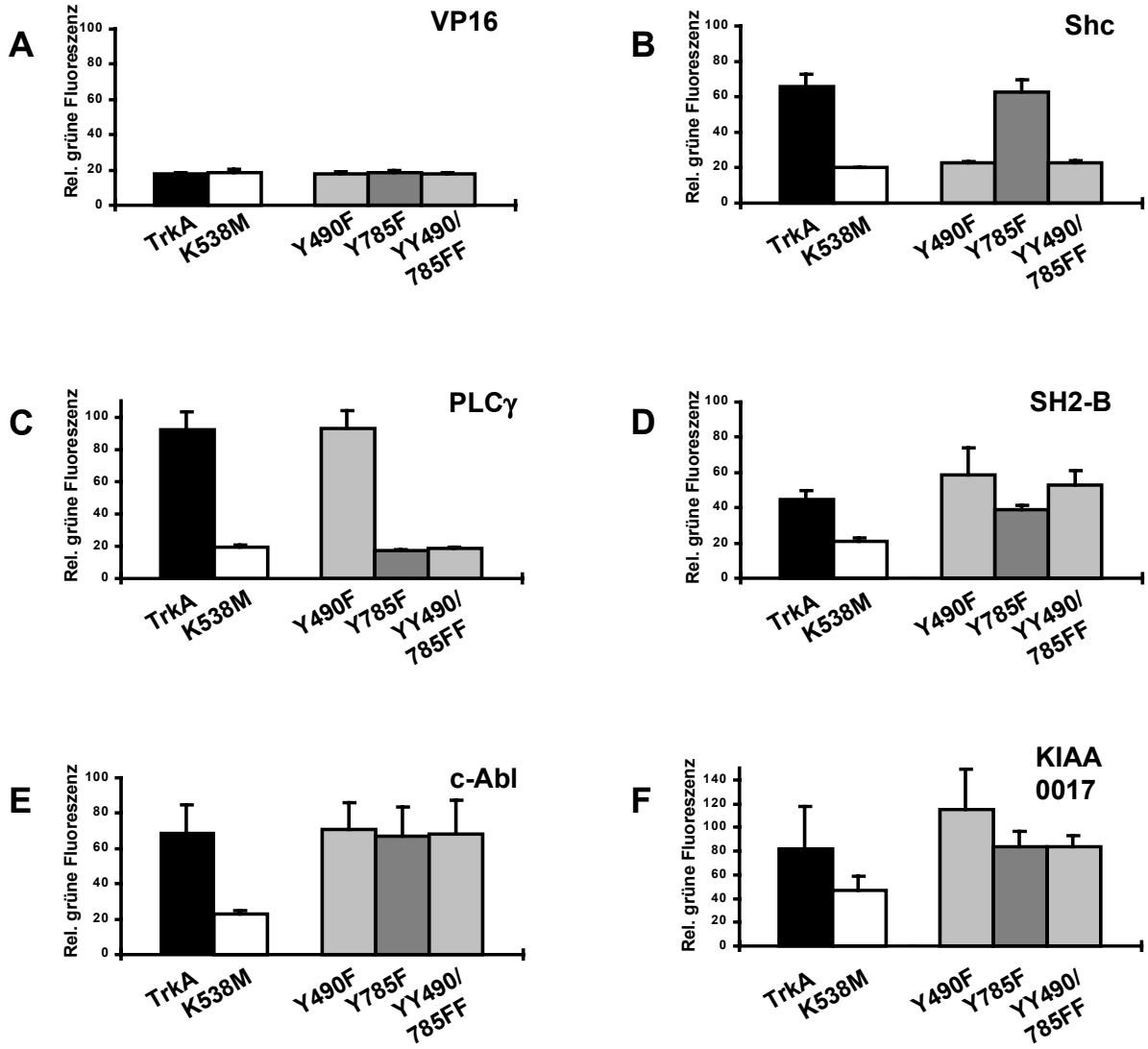

Abbildung 5.6: Abl und KIAA0017 interagieren mit TrkA durch einen neuen Bindungsmechanismus.
Die im Folgenden aufgezählten Formen von TrkA wurden mittels FACS-Analyse in YRN 974 auf ihre Interaktion mit Shc, der PLC-γ, SH2-B, c-Abl und KIAA0017 untersucht: **TrkA:** Wildtyp; **K538M**: kinaseinaktive Mutante; **Y490F:** Das Tyrosin Y490 der Shc-Bindungsstelle wurde durch Phenylalanin (F) ersetzt; **Y785F:** Mutation der PLC-γ-Bindungsstelle von Y785 zu F; **YY490/785FF:** Doppelmutante in Position 490 und 785.
A: Negativkontrolle mit VP16, Eigenfluoreszenz der Hefe. **B:** Die Bindung von Shc an TrkA wird durch Mutation des Shc-Bindungsmotivs an Position Y490 verhindert. **C:** Die Mutation in Position Y785 unterbindet die Interaktion von PLC-γ und TrkA. **D:** Die Wechselwirkung von SH2-B und TrkA findet nicht an den Bindungsstellen für Shc und PLC-γ statt. **E:** c-Abl bindet nicht (oder nicht ausschließlich) an Y490 und Y785. **F:** Durch die Inaktivierung der Kinasefunktion von TrkA wird dessen Bindung an KIAA0017 vermindert, nicht jedoch durch die Mutation der Shc- und PLC-γ-Bindungsstelle. **Rel. grüne Fluoreszenz:** relative grüne Fluoreszenz.

5.2.2 In vitro-Bindungs-Assays mit GST-Fusionsproteinen von Abl und TrkA

Mit Hife des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems konnte zwar die Rolle der Shc- und PLC-γ-Bindungsstellen des TrkA-Rezeptors bei seiner Interaktion mit c-Abl untersucht werden, nicht jedoch die der weiteren als Bindungsstellen in Frage kommenden Phosphotyrosine Y670, Y674 und Y675, da ein einfacher Austausch gegen Phenylalanin in diesen Positionen die Kinaseaktivität von TrkA beeinträchtigen würde. Aus diesem Grund wurde für die weitere Erforschung der TrkA/Abl-Interaktion ein anderes Assay-System herangezogen, das mit GST-Fusionsproteinen sowohl von c-Abl wie auch von TrkA arbeitet. Dafür mußte
1) phosphoryliertes TrkA in genügend großen Mengen produziert und 2) ein Bindungs-Assay etabliert werden, bevor 3) einzelne mögliche Bindungsstellen betrachtet werden konnten.

5.2.2.1 Etablierung der TrkA überexprimierenden Mausfibroblasten-Zellinie T15

Das am besten untersuchte Zellsystem für TrkA sind PC12-Zellen. Diese exprimieren den Rezeptor jedoch in relativ geringen Mengen, so daß *in vitro* Interaktionsstudien mit diesen Zellen nur schwer durchzuführen sind. Aus diesem Grund wurde aus Mausfibroblasten (NIH3T3) eine neue Zellinie, T15, hergestellt, die stabil humanes TrkA exprimiert. Die Zellen wurden mittels Lipofektin mit einem Plasmid transfiziert, das die DNA für humanes TrkA flankiert von „MSV long terminal repeats“ enthält, um das Trk-Gen in das Genom der Zellen zu integrieren. Transfizierte Zellen wurden über die Neomycinresistenz des co-transfizierten Plamids pSV2neo selektiert. Die Expression der funktionellen Rezeptor-tyrosinkinase wurde nach Immunpräzipitation durch ein *in vitro* Kinaseassay nachgewiesen (Abb.5.7).

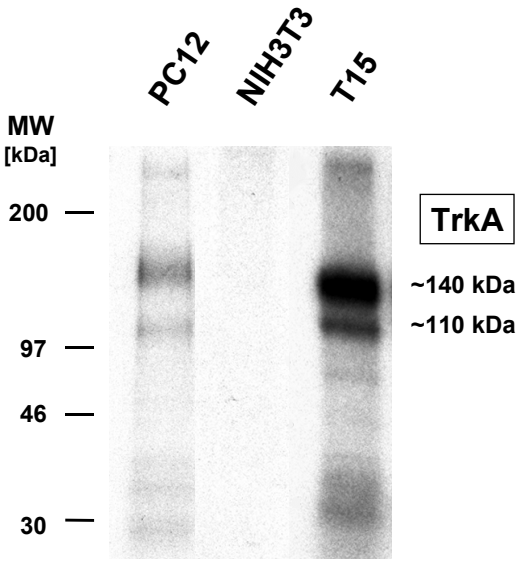

Abbildung 5.7: *In vitro* Kinase-Assay der TrkA überexprimierenden Mausfibroblastenzellinie T15.
Aus Lysaten von 2,3 · 10^7 PC12-Zellen und 8 · 10^6 NIH3T3- bzw. TrkA überexprimierenden NIH3T3 (T15) wurde TrkA mit einem polyklonalen α-Trk-Antikörper immunpräzipitiert und anschließend einem *in vitro* Kinase-Assay mit ^{32}P-γ-ATP unterzogen. Nach SDS-PAGE werden die radioaktiv markierten Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht. PC12-Zellen wurden hierbei als Positiv- und nicht transfizierte NIH3T3-Zellen als Negativkontrolle verwendet. Die TrkA-Banden der reifen 140 kDa-Form und des 110 kDa Vorläufers sind in PC12 und T15 deutlich erkennbar. Die Größenunterschiede der Banden sind auf Unterschiede in den Spezies zurückzuführen; PC12-Zellen stammen aus Ratten, T15 exprimieren humanes TrkA. **MW:** Molekulargewichtsmarker

5.2.2.2 GST-Abl bindet an phosphoryliertes TrkA

Zur Bestätigung der Interaktion von TrkA mit Abl, wie sie im Hefe-Zwei-Hybrid-System dargestellt werden konnte, wurde die SH2-Domäne von c-Abl als GST-Fusionsprotein hergestellt. TrkA aus TrkA überexprimierenden Mausfibroblasten (T15) wurde immunpräzipitiert, im *in vitro* Kinaseassay mit ^{32}P-γ-ATP autophosphoryliert, durch SDS wieder vom Antikörper freigesetzt und mit der an Glutathion-Sepharose gebundenen Abl-SH2-Domäne inkubiert. Die am Sepharose-Pellet gebundenen Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. TrkA wurde anschließend durch Autoradiographie detektiert.
GST-Abl ist klar in der Lage, den autophosphorylierten Rezeptor zu binden, ebenso wie die SH2-Domäne der PLC-γ □(Abb. 5.8 A). Die Tatsache, daß in diesem Assay gereinigte Proteine eingesetzt wurden, spricht außerdem dafür, daß Trk und Abl direkt miteinander interagieren können.

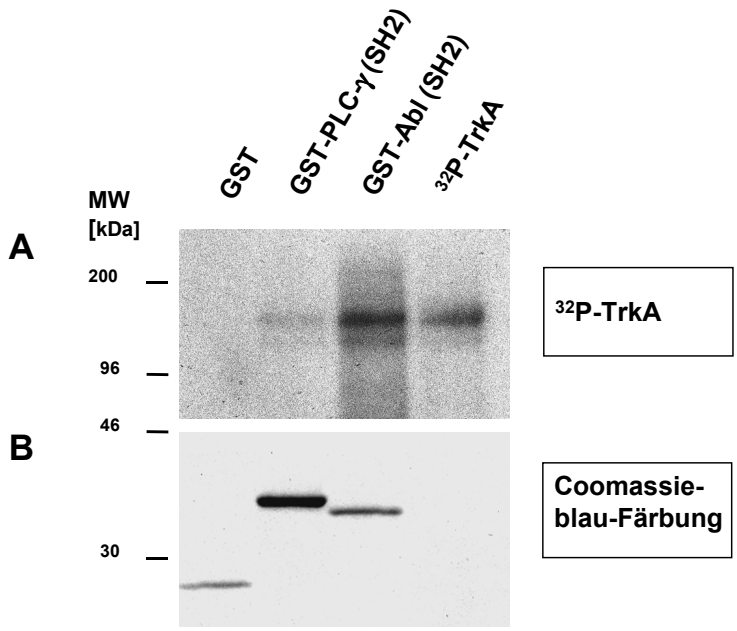

Abbildung 5.8: GST-Abl bindet direkt an den autophosphorylierten Rezeptor TrkA.
A: Immunpräzipitiertes und im *in vitro* Kinase-Assay radioaktiv phosphoryliertes TrkA aus der Fibroblastenzellinie T15 ließ sich mit der SH2-Domäne von Abl (**GST-Abl (SH2)**) ebenso fällen wie mit **GST-PLC-γ (SH2)**, nicht jedoch mit GST allein. Ein Aliquot aus dem Kinaseassay (**^{32}P-TrkA**) wurde zur Kontrolle mit auf das Polyacrylamid-Gel geladen. **B:** Aliquote der Bindungsassays wurde einer Coomassieblau-Färbung unterzogen, um die GST-Fusionsproteine darzustellen. **MW:** Molekulargewichtsmarker.

5.2.2.3 Abl interagiert mit den phosphorylierten Tyrosinresten der Aktivierungsschleife von TrkA

Da die Bindung von TrkA und Abl im Hefe-Zwei-Hybrid-System nicht von der Mutation der Shc- und PLC-γ-Bindungsstelle des Rezeptors unterbrochen werden konnte, muß mindestens eine weitere Bindungsstelle für diese Interaktion verantwortlich sein. Die Bindung ist abhängig von der Kinaseaktivität des Rezeptors und wird über die SH2-Domäne von Abl vermittelt, so daß man annehmen kann, daß es sich bei der gesuchten Stelle um ein phosphotyrosinhaltiges Motiv handelt. Es ist bekannt, daß in TrkA lediglich die Shc- und PLC-γ-Bindungsstelle und die drei Tyrosine der Aktivierungsschleife phosphoryliert werden können, nicht aber z.B. Y751, das vom Motiv her eine bevorzugte Bindungsstelle für die p85-Untereinheit der PI-3'-Kinase darstellen sollte (Stephens et al., 1994; Guiton et al., 1994). Da ein Austausch der Phosphotyrosinreste der sog. Aktivierungsschleife des Rezeptors aber die Regulation der Kinaseaktivität beeinflußt (Cunningham et al., 1997), wird es schwierig, an dieser Stelle Mutationen einzuführen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Aktivierungsschleife und der C-Terminus von TrkA als GST-Fusionsprotein (GST-TrkA YYY, bzw. GST-TrkA C-Term.) in *E. coli* exprimiert und in einem Bindungs-Assay mit der SH2-Domäne von c-Abl eingesetzt.
GST-TrkA YYY und GST-TrkA C-Term., wie auch GST allein wurden in *E. coli* TKX-1 in tyrosinphosphorylierter und in *E. coli* DH5α in nicht phosphorylierter Form exprimiert und an Glutathion-Sepharose gebunden. Mit Hilfe der *in vitro* Transkription/Translation wurde die ^{35}S-markierte SH2-Domäne von c-Abl hergestellt. Die GST-Fusionsproteine und c-Abl wurden in Bindungspuffer inkubiert. Die am Glutathion-Sepharose-Pellet gebundenen Proteine wurden dann mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurden die Bindung der PLC-γ aus PC12-Zellen an das C-terminale Phosphotyrosin Y785 benutzt (Abb. 5.9 B, Stephens et al., 1994).
Abb. 5.9 B zeigt die erwartete PLC-γ-Interaktion. c-Abl dagegen bindet ausschließlich an die phosphorylierte Aktivierungsschleife und nicht an die PLC-γ-Binungsstelle (Abb. 5.9 B), was die im Hefe-Zwei-Hybrid-System erhaltenen Daten bestätigt.

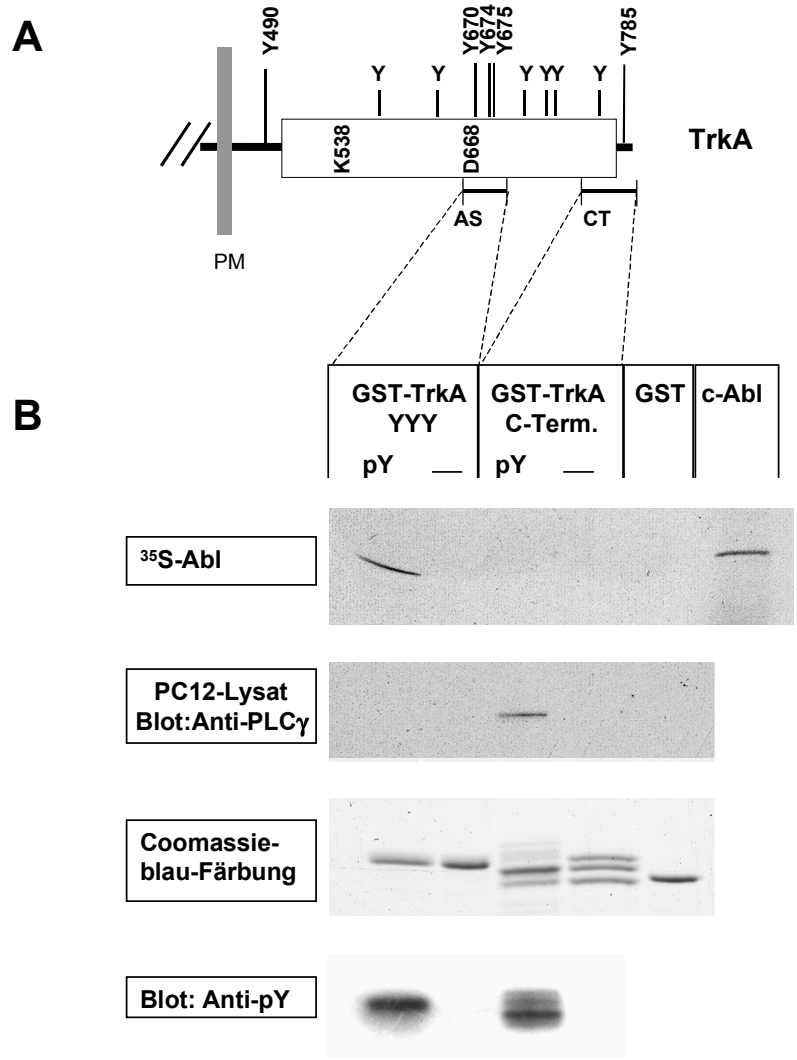

Abbildung 5.9: c-Abl bindet an Phosphotyrosinreste in der Aktivierungsschleife von TrkA.
A: Schematische Darstellung der zytoplasmatischen Domäne von TrkA. **PM:** Plasmamembran; A**S:** Aktivierungsschleife; **CT:** C-Terminus. Das weiße Rechteck stellt die Kinasedomäne dar. Phosphorylierbare Tyrosinreste sind numeriert (Y490, 670, 674, 675 und 785), ebenso wie die ATP-Bindungsstelle (K538) und das konservierte Aspartat in Position 668. Die als GST-Fusionsproteine exprimierten Partien des Rezeptors, die Aktivierungsschleife und der C-Terminus, sind als schwarze Balken unter dem Schema eingezeichnet. **B:** Phosphoryliertes **GST-TrkA YYY**, das die Aktivierungsschleife repräsentiert, bindet an c-Abl (**^{35}S-Abl**). *In vitro* transkribiertes/translatiertes Abl wurde als Kontrolle auf das Gel geladen (rechts). PLC-γ aus PC12-Lysat interagiert mit **GST-TrkA C-Term.**. Aliquote der entsprechenden Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen, um mit Färbung durch Coomassieblau die GST-Fusionsproteine und in einem Westernblot mit α-Phosphotyrosin-Antikörpern die Tyrosinphosphorylierung darzustellen. **pY:** phosphorylierte Form aus TKX-1, **— :** nicht phosphorylierte Form aus DH5α, **Anti-pY:** Anti-Phosphotyrosin.

5.2.2.4 Einzelne Punktmutationen der drei Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife von TrkA verringern die Bindung von Abl

Zur weiteren Untersuchung des Bindungsmechanismus der Abl-SH2-Domäne an die Aktivierungsschleife von TrkA wurden die drei dort vorhandenen Tyrosinreste einzeln zu Phenylalanin mutiert und wie im vorhergehenden Abschnitt als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Im Bindungs-Assay mit *in vitro* transkribiertem/translatiertem Abl zeigte sich, daß jede der einzelnen Punkmutationen bereits die Interaktion verringerte, keine jedoch die Bindung vollständig unterband (Abb. 5.10 A).
Die genaue Deutung dieses Ergebnisses ist schwer festzulegen. Es besteht die Möglichkeit, daß mehr als einer der Tyrosinreste jeweils eine schwache Bindungsstelle bietet.
Da die Aktivierungsschleife zur Regulation der Kinaseaktivität von TrkA ganz gezielt verschiedene genau definierte Konformationen einnehmen kann (Cunningham & Greene, 1998), spielen Änderungen der Konformation für Interaktionen in diesem Bereich des Rezeptors möglicherweise eine wichtige Rolle. Die aktive Konformation des Rezeptors wird durch die Wechselwirkung der Phosphotyrosinreste der Aktivierungsschleife mit Histidin- und Argininresten ihrer Umgebung stabilisiert. Drei der dafür verantwortlichen Argininreste sind in dem hier verwendeten GST-Fusionsprotein vorhanden, so daß davon auszugehen ist, daß das TrkA-Peptid tatsächlich eine bestimmte Konformation einnehmen kann. Verändert man diese Wechselwirkung durch die eingeführten Punktmutationen, bilden sich nun möglicherweise Strukturen aus, in denen die Tyrosinreste für die Kinase der TKX-Bakterien nicht mehr im gleichen Maße zugänglich sind wie im Wildtyp, so daß eine unvollständige Phosphorylierung resultiert. Weiterhin ist auch denkbar, daß die Abl-SH2-Domäne eine bestimmte Struktur für ihre Bindung an TrkA benötigt, die dann nach Mutation eines der konformationsgebenden Tyrosine nicht mehr in vollem Umfang vorhanden ist.

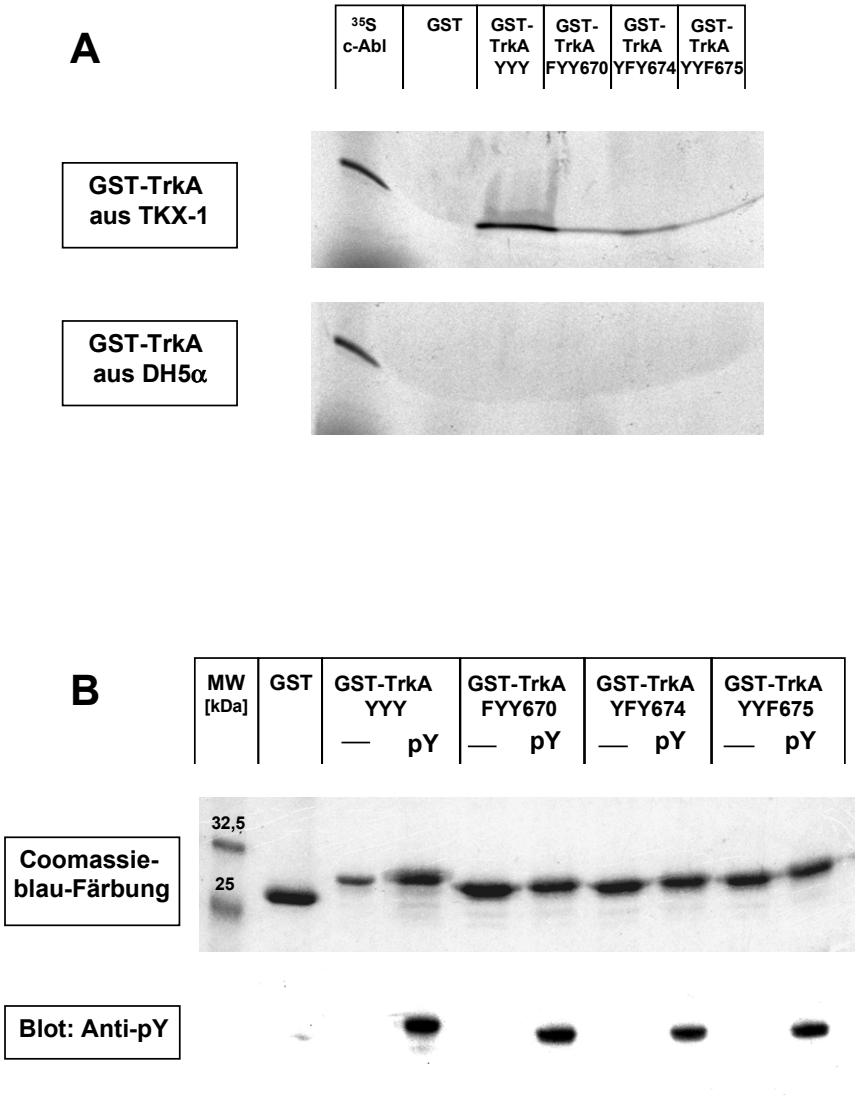

Abbildung 5.10: Punktmutation der einzelnen Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife von TrkA reduzieren die Bindung von c-Abl, verhindern sie aber nicht.
Analog zum in Abb. 5.9 gezeigten Bindungs-Assay wurde *in vitro* transkribiertes/translatiertes, ^{35}S-markiertes Abl mit GST-Fusionsproteinen der Aktivierungsschleife von TrkA inkubiert, die entweder in *E. coli* TKX-1 an ihren Tyrosinresten phosphoryliert oder in DH5α ohne Phosphorylierung exprimiert worden waren. **A:** ^{35}S-markiertes Abl (**^{35}S c-Abl**) wurde als Positivkontrolle, ein Bindungs-Assay mit GST alleine als Negativkontrolle aufgetragen. **GST-TrkA YYY** enthält die Aktivierungsschleife von TrkA von AS 667 - 686. GST-TrkA FYY670, YFY674 und YYF675 repräsentieren ebenfalls die Aktivierungsschleife von TrkA mit der Y→F-Mutation an der entsprechend numerierten Position. GST-TrkA YYY interagiert wie in Abb. 5.9 mit c-Abl. Die Bindung an die Mutanten ist dagegen deutlich geringer. **B:** Coomassieblau-Färbung der verwendeten GST-Fusionsproteine von TrkA und Tyrosinphosphorylierung der in TKX-1 exprimierten Proteine. **MW:** Molekulargewichtsmarker, **— :** nicht phosphorylierte Form, **pY:** phosphorylierte Form, **Anti-pY:** Anti-Phosphotyrosin.

5.3 c-Abl beeinflußt die Neuritenbildung in PC12-Zellen

5.3.1 PC12-Zellen differenzieren unter dem Einfluß von NGF zu Neuronen ähnlichen Zellen

PC12-Zellen stellen das am besten untersuchte Zellkultursystem zum Studium biologischer Vorgänge nach NGF-Induktion dar. Sie differenzieren auf NGF-Stimulation hin zu Zellen, die sympatischen Nerven ähnlich sind. Dabei entwickeln sie innerhalb von 2 - 3 Tagen nach Stimulation morphologische Veränderungen wie Hypertrophie des Zellkörpers und die Ausbildung von Neuriten. Für die Differenzierung ist es hilfreich, die eigentlich schwimmenden Zellen auf Kollagen zu plattieren, was sie veranlaßt, sich besser am Untergrund anzuheften, und das Auswachsen der Neuriten fördert. Nach 6 - 7 Tagen haben die Zellen ein Geflecht langer Neuriten entwickelt (Abb. 5.11). Solche differenzierten PC12-Zellen produzieren sogar Neurotransmitter und sind elektrisch erregbar (Greene & Tischler, 1976,1982).

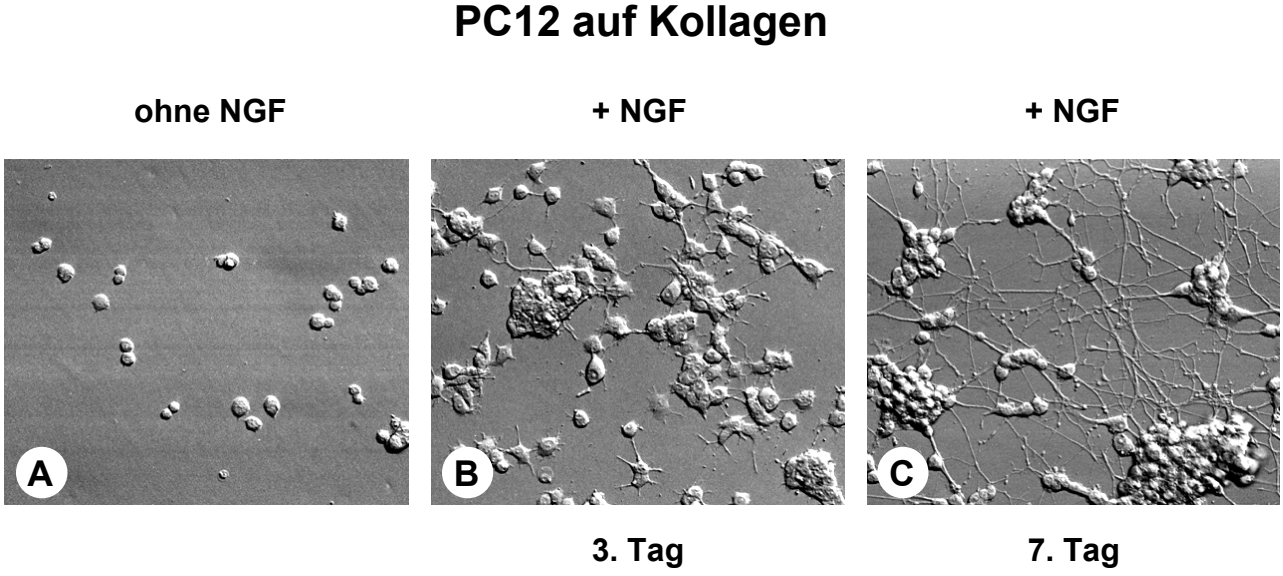

Abbildung 5.11: Differenzierung von PC12-Zellen nach Stimulation mit NGF.
A: PC12-Zellen wurden auf kollagen-beschichteten Petrischalen ausgesät. Die Zellen wurden dann mit 100 ng/mL NGF für 3 Tage (**B**) und 7 Tage (**C**) zur Neuritenbildung angeregt und lebend unter Verwendung des Hoffman'schen Modulationskontrast-Verfahrens fotografiert.

Überexpression oder Ausschalten eines Wechselwirkungspartners von TrkA sollte nun dieses Phänomen beeinflussen können, wenn der entsprechende Signaltransduktionsweg an der Neuritenbildung beteiligt ist. So bewirkt etwa die Überexpression von SH2-B in PC12-Zellen eine Verstärkung des Neuritenauswachsens, während die Expression einer Mutante mit defekter SH2-Domäne die Neuritenbildung behindert (Rui et al., 1999).

5.3.2 NGF induziert die Tyrosinphosphorylierung diverser Proteine in PC12-Zellen

Die Stimulation der Rezeptortyrosinkinase TrkA durch NGF, die sich bei PC12-Zellen makroskopisch in der Ausbildung eines neuronalen Phänotyps äußert, bewirkt auf molekularer Ebene eine Aktivierung der Kinasefunktion des Rezeptors und dadurch wiederum die Tyrosinphosphorylierung verschiedener intrazellulärer Zielproteine, die dann das NGF-Signal weitertragen (Kaplan et al., 1991; Maher, 1988).

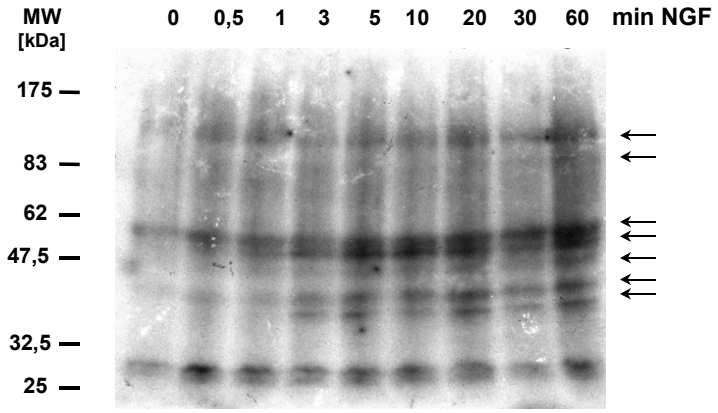

Abbildung 5.22: NGF stimuliert die Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine in PC12-Zellen.
PC12-Zellen wurden für 4 h in Medium mit 0,1 % Pferdeserum gehalten. Dann wurden 200 ng/mL NGF zugegeben. Nach den angegebenen Stimulationszeiten wurden Aliquote entnommen, und die Stimulation wurde in eiskaltem vanadathaltigen PBS gestoppt. Die Zellen wurden in SDS-Auftragspuffer lysiert, einer SDS-PAGE unterzogen, auf Nitrozellulose geblottet und mit α-Phosphotyrosin-Antikörpern behandelt. Im Verlauf einer Stunde kann das Auftreten diverser Tyrosinphosphorylierungen beobachtet werden. Bei den Banden von 42 und 44 kDa dürfte es sich dabei um aktivierte MAP-Kinase (Erk) handeln; die Banden im Bereich von 46 und 52 kDa könnten phosphoryliertes Shc repräsentieren. **MW:** Molekulargewichtsmarker.

5.3.3 Tyrosinphosphorylierte Proteine konzentrieren sich in den Spitzen auswachsender Neuriten in PC12-Zellen

Das Auswachsen von Neuriten und das dazu notwendige Navigieren der Wachstumskegel an ihren Spitzen durch Wachstumsfaktoren wie NGF beinhaltet phosphorylierungsabhängiges Signalisieren (Wu & Goldberg, 1993).
Zur Darstellung der Verteilung der phosphotyrosinhaltigen Proteine in PC12-Zellen wurden diese auf Kollagen/Polylysin-beschichteten Objekträgern ausplattiert, mit 100 ng/mL NGF zur Bildung von Neuriten angeregt, nach einem und drei Tagen mit PFA fixiert und mit α-Phosphotyrosin-Antikörpern und FITC-markierten sekundären Antikörpern angefärbt. Neben der Färbung im Zellkörper, besonders in der perinukleären Region, fallen Konzentrationen von phosphotyrosinhaltigen Proteinen an den Spitzen sich bildender Neuriten auf. Die Muster erinnern an die Verteilung von Proteinen aus Fokalkontakten wie FAK und Paxillin (Leventhal et al., 1997). Ein Kandidat für die Übertragung einer solchen Phosphorylierung ist sicher die Abl-Kinase, von der bereits bekannt ist, daß sie z.B. mit Paxillin assoziieren und dieses Protein auch phosphorylieren kann (Lewis & Schwartz, 1998).

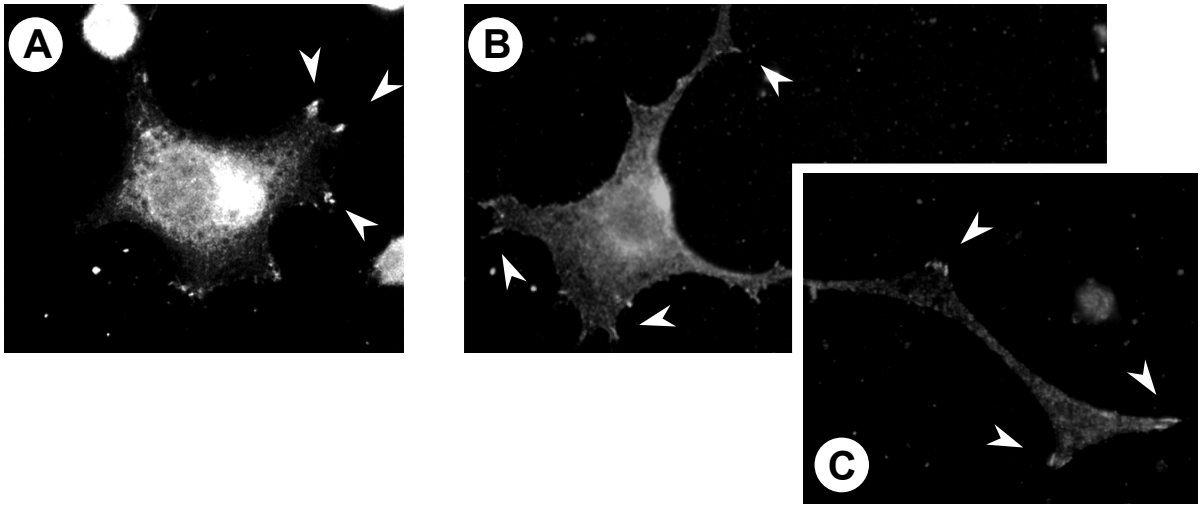

Abbildung 5.33: Tyrosinphosphorylierte Proteine konzentrieren sich an den Spitzen der auswachsenden Neuriten.
PC12-Zellen wurden auf Deckgläsern mit Kollagen/Polylysin-Beschichtung ausgesät und mit 100 ng/mL NGF stimuliert. Die Zellen wurden mit PFA fixiert, einer Immunfluoreszenzfärbung (FITC) mit monoklonalen α-Phosphotyrosin-Antikörpern unterzogen und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops fotografiert. **A:** PC12-Zelle nach 1 Tag Stimulation mit NGF (100ng/mL) und **B:** nach 3 Tagen. **C:** Vergrößerung des Neuriten aus B. Pfeile deuten auf Phosphotyrosin an den Spitzen der auswachsenden Neuriten.

5.3.4 Expression der Abl-SH2-Domäne in PC12-Zellen

5.3.4.1 Transfektion von PC12-Zellen

Um den Einfluß von c-Abl auf die Signaltransduktion von TrkA in einem Zellsystem zu untersuchen, sollte die SH2-Domäne von c-Abl als potentielle dominant negative Mutanten in PC12-Zellen transfiziert werden.

Zur Transfektion von PC12-Zellen wurden verschiedene chemische Transfektionsmethoden durch Einbringen des GFP-Vektors pEGFPC2 getestet. Mit dem Reagens TransFast™ von Promega wurden die besten Ergebnisse erzielt. Es konnten maximal 18 % der Zellen transfiziert werden. Mit Superfect, Effectene, Roti®-Fect und Lipofectin ließen sich die Zellen nicht (Lipofectin) oder nur zu 3 - 5 % transfizieren. Da alle genannten Transfektionsmethoden außerdem nur eine transiente Expression der eingebrachten Proteine erlauben, waren mehr als 10 % transfizierte Zellen lediglich an ein bis zwei Tagen zu finden, danach nahm ihre Anzahl rapide ab, so daß für eine effektive Untersuchung des Phänotyps nicht genügend transfizierte Zellen über den zur Differenzierung notwendigen Zeitraum von 6 - 7 Tagen zur Verfügung standen.

Aus diesem Grund wurde ein retrovirales System zur stabilen Transfektion von PC12-Zellen gewählt. Dieses System bietet zwei deutliche Vorteile:
1) Die Transfektion ist stabil. Die rekombinanten Proteine werden mindestens einige Monate lang exprimiert.
2) Es können Transfektionsraten von 30 bis 40 % erreicht werden (Escalante et al., 2000). Zudem wurden Vektoren verwendet, die mit einer IRES-Sequenz EGFP exprimieren, was ein Sortieren und Anreichern der transfizierten Zellen per Durchflußzytometer anhand der EGFP-Fluoreszenz ermöglicht.

5.3.4.2 Etablierung des retroviralen Transfektionssystems für PC12-Zellen

Die Arbeit mit amphotropen Retroviren, wie sie hier zum Einsatz kamen, unterliegt der Sicherheitsstufe 2 nach dem Gentechnikgesetz. Daher wurden diese Arbeiten im Labor von Prof. Ostertag im Heinrich-Pette-Institut, Hamburg durchgeführt.

Zur Etablierung des Systems wurde das EGFP enthaltende Plasmid R702 unter den im Labor von Prof. Ostertag üblichen Bedingungen in SC-1 Mausfibroblasten, FDC-P1Mac11-Zellen und in PC12-Zellen eingebracht. SC-1-Fibroblasten zeichnen sich allgemein durch gute Trans- und Infizierbarkeit aus, so daß sie als Standard zur Bestimmung der Virentiter einer Infektion herangezogen wurden. Die bipotente hämatopoietische Stammzellinie FDC-P1Mac11-Zellen ist allgemein schwer zu infizieren, was mit dem hier verwendeten System aber trotzdem möglich sein sollte, da es speziell für hämatopoietische Stammzellen optimiert wurde (von Laer et al., 1998). Daher wurde diese Zellinie benutzt, um den Versuchsablauf zu etablieren.

Das Plasmid R702 wurde wie in Abschnitt 4.5.4 beschrieben in PhoenixAmpho-Zellen transfiziert. Die virenhaltigen Überstände dieser Zellen wurden fünfmal abgenommen und sofort mit Protamine vermischt auf die Zielzellen gegeben und aufzentrifugiert. Die Zellen wurden bis zur nächsten Infektion in diesen Überständen belassen. Unter diesen

Bedingungen wurde ein Virentiter von $3 \cdot 10^4$ Infektionen/mL Virenüberstand auf SC-1-Zellen und in FDC-P1Mac11 eine Infektionsrate von 4,5 % erreicht. Mit einem Virentiter von $4{,}9 \cdot 10^4$ konnte in PC12 schließlich eine Infektionsrate von 10,5 % erzielt werden.

Das hier verwendete retrovirale Transfektions-System, wie es bei Prof. Ostertag angewendet wird, ist auf die Transfektion hämatopoietischer Stammzellen zugeschnitten. Daher wurden für eine Infektion von PC12-Zellen verschiedene Versuchsparameter variiert.
Die PC12-Zellen verklumpten beim Aufzentrifugieren der Viren stark. Für den Kontakt mit den Viren ist aber eine möglichst große Oberfläche der Zellen wünschenswert. Ein Auslassen des Zentrifugationsschritts brachte allerdings keine Verbesserung der Infektionseffizienz mit sich, ebenso wenig wie der Wechsel des virenhaltigen DMEM-Mediums nach 2 h Infektion zum üblichen Nährmedium der Zellen, RPMI. Des Weiteren zeigte sich, daß PC12-Zellen in Gegenwart von Protamine teilweise absterben. Daher wurde dieses Reagenz durch Polybrene ersetzt, was sich als für PC12-Zellen besser verträglich erwies. Dieser Austausch steigerte die Transfektionsrate um den Faktor 3.

5.3.4.3 Anreicherung EGFP-exprimierender Zellen im Durchflußzytometer

Infizierte FDC-P1Mac11-Zellen wurden zum Sortieren in PBS in 2 mL-Aliqoute mit $2{,}5 \cdot 10^6$ Zellen/mL verdünnt. Dann wurden mit Hilfe von Vorwärts- und Seitstreuung gesunde Zellen von Zelltrümmern unterschieden. Aus dem Pool gesunder Zellen wurden Zellen mit EGFP-Fluoreszenz aussortiert und in Nährmedium aufgefangen. Von $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden in einem Sortierschritt etwa 70.000 wiedergewonnen und in 24-Well-Platten wieder angezogen. Durch das Sortieren im Durchflußzytometer konnte in einem Sortierschritt eine Anreicherung der infizierten Zellen von 4,5 % auf 90 % erreicht werden (Abb.5.14).

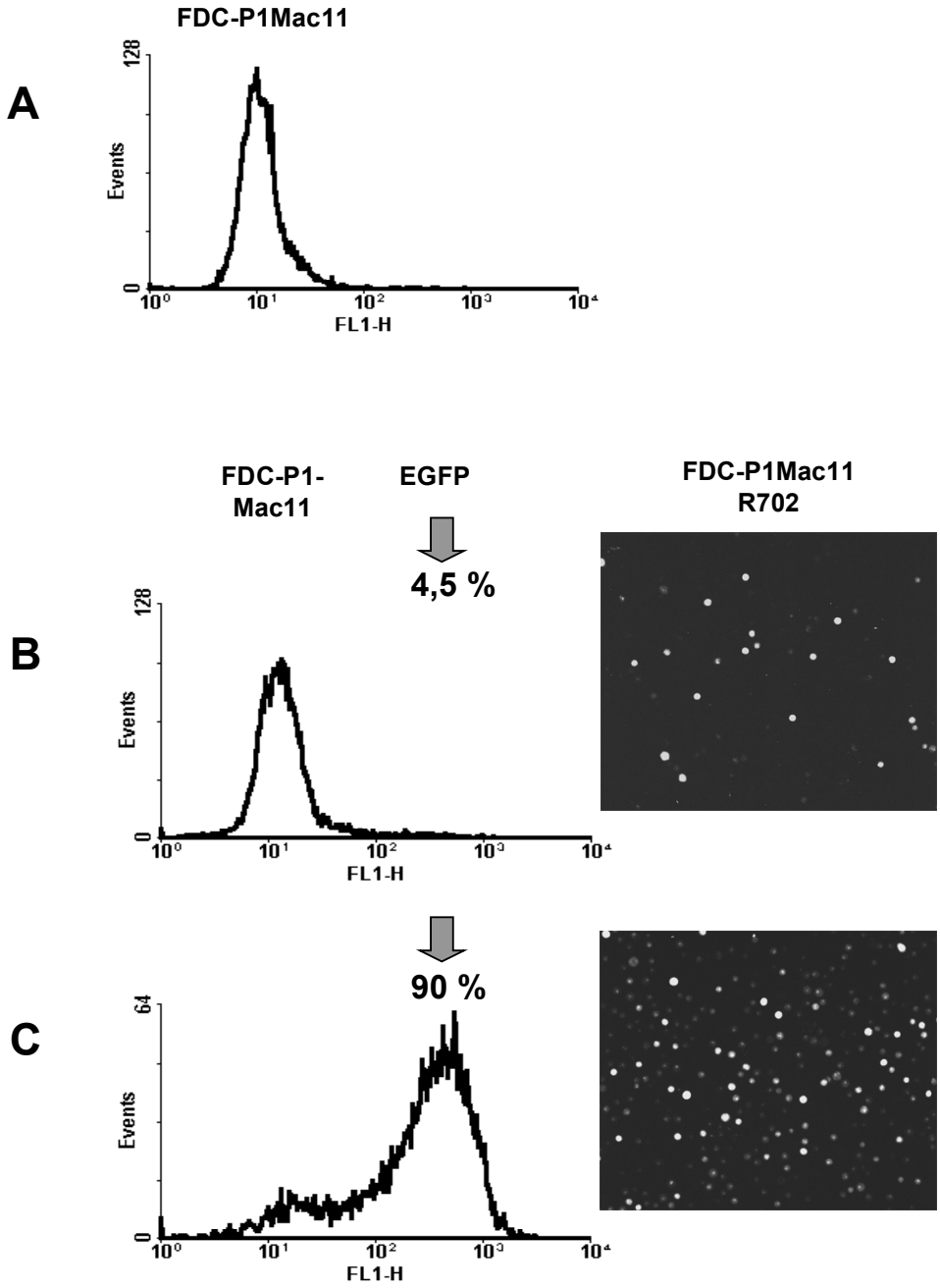

Abbildung 5.44: FACS-Daten einer Zell-Sortierung mit einem MoFlow-Durchfluß-zytometer.
$5 \cdot 10^6$ zuvor mit R702-haltigen Viren infizierte FDC-P1Mac11-Zellen wurden sortiert. Anschließend wurden die erhaltenen Zellen einer zweiten FACS-Messung zur Bestimmung der Anreicherung infizierter Zellen unterzogen. **A:** Histogramm-Plot einer FACS-Messung nicht infizierter FDC-P1Mac11. **B:** Histogramm-Plot der infizierten Zellen vor dem Sortieren. **FDC-P1Mac11** bezeichnet den Peak nicht infizierter Zellen, **EGFP** den der 4,5 % grün fluoresziernden. Unter „**FDC-P1Mac11 R702**“ ist eine floures-zenzmikroskopische Aufnahme (FITC-Filter) der Zellen abgebildet. **C:** Histogramm-Plot der sortierten FDC-P1Mac11 mit 90 % grün fluoreszierenden Zellen analog zu B. **Events:** Anzahl der analysierten Zellen, **FL1-H:** relative EGFP-Fluoreszenz.

5.3.4.4 Infektion der PC12-Zellen mit R702/Abl-SH2

PC12-Zellen wurden nun unter den ausgetesteten Bedingungen mit den Plasmiden R702/Abl-SH2 und R702 als Kontrolle infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen eine Woche lang angezogen, um sich zu erholen. Dann wurden sie auf kollagenbeschichteten Petrischalen ausgesät und mit 100 ng/mL NGF zur Ausbildung von Neuriten angeregt. Die Formation der Neuriten wurden 7 Tage lang täglich im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.
Die Abl-SH2-Domäne exprimierenden PC12-Zellen zeigten in ihrer Reaktion auf NGF wenig Unterschiede zur EGFP-Kontrolle (Abb. 5.15). Sie hafteten am Kollagen und begannen nach etwa einem Tag mit der Ausbildung von Neuriten, nach 4 Tagen waren deutliche, längere Neuriten zu erkennen. Allerdings schienen PC12-Zellen mit Abl-SH2-Domäne geringfügig weniger und auch etwas kürzere Neuriten auszubilden.

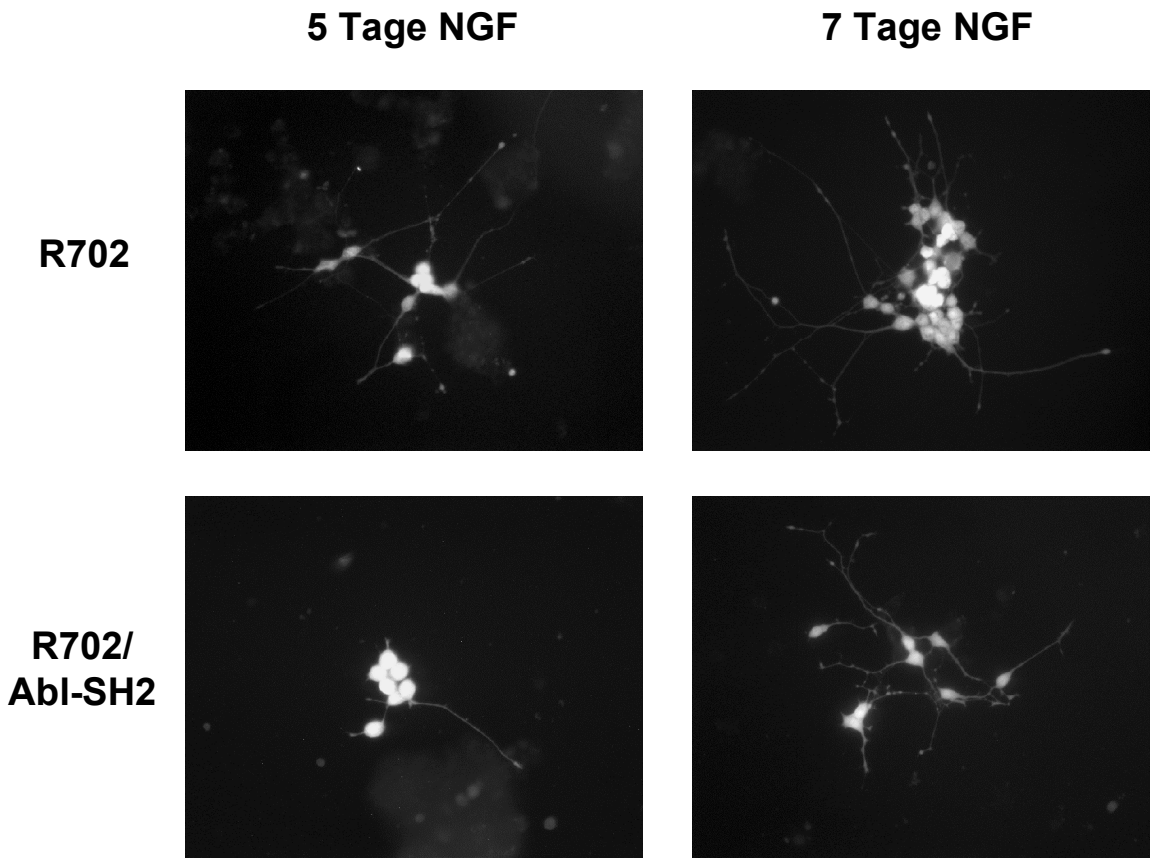

Abbildung 5.55: Expression der Abl-SH2-Domäne in PC12-Zellen.
Die SH2-Domäne von c-Abl wurde in den Vektor R702 kloniert und mit Hilfe des retroviralen Transfektionssystems in PC12 eingebracht, ebenso der unveränderte Vektor als Kontrolle. Infizierte Zellen lassen sich leicht im Fluoreszenzmikroskop ausmachen, da die Zellen mit Hilfe der IRES-Sequenz des R702-Vektors parallel zur Abl-SH2-Domäne EGFP produzieren. Die Zellen wurden für 7 Tage mit 100 ng/mL NGF stimuliert. Nach 5 und 7 Tagen wurden infizierte Zellen fotografiert.

5.3.4.5 Abl interagiert mit TrkA möglicherweise über mehrere Bindungsstellen

Die Expression der Abl-SH2-Domäne in PC12-Zellen führte nicht zu einer drastischen Änderung im Differenzierungsverhalten der Zellen. Die Interaktion von Abl und TrkA wird also *in vivo* möglicherweise nicht allein durch die Abl-SH2-Domäne vermittelt.
Um weitere Hinweise auf das Bindungsverhalten der beiden Proteine in einem Zellsystem zu erlangen, wurde nun eine Co-Immunpräzipitation von TrkA und BCR-Abl aus K562-Zellen durchgeführt. Diese Zellen wurden gewählt, weil sie sowohl TrkA als auch große Mengen des BCR-Abl-Onkoproteins exprimieren, das sich zudem leicht durch ein *in vitro*-Kinase-Assay nachweisen läßt. Es wurden $3 \cdot 10^7$ K562-Zellen für 5 min mit NGF (100 ng/mL) stimuliert. Lysate dieser Zellen, sowie einer gleich großen Menge unstimulierter Zellen wurden einer Immunpräzipitation mit α-BCR-Antikörper bzw. α-Trk-Antikörpern unterzogen. Zur Detektion von BCR-Abl und TrkA wurde ein *in vitro*-Kinase-Assay mit den Präzipitaten durchgeführt.
In Abb. 5.16 finden sich in den BCR-Präzipitaten neben der BCR-Abl-Bande bei 210 kDa zwei weitere Banden, die auf gleicher Höhe mit TrkA (110 und 140 kDa) laufen. Diese mit BCR-Abl kopräzipitierenden Trk-Banden sind sowohl in der stimulierten, wie auch in der unstimulierten Probe zu sehen. Bei einer Wechselwirkung, die ausschließlich auf der Bindung der Abl-SH2-Domäne an einen Phosphotyrosinrest von TrkA beruht, wäre eine Bindung nur nach Stimulation des Rezeptors zu erwarten gewesen. Das hier erhaltene Ergebnis läßt also darauf schließen, daß neben der SH2-Domäne noch andere Wechselwirkungsmechanismen an der Trk/BCR-Abl-Interaktion beteiligt sind, die nicht vom Phosphorylierungsstatus des Rezeptors beeinflußt werden. Möglicherweise spielt neben der SH2-Domäne die SH3-Domäne *in vivo* eine Rolle, die bei vielen im Hefe-Zwei-Hybrid-Screening gefischten Abl-Klonen enthalten war.

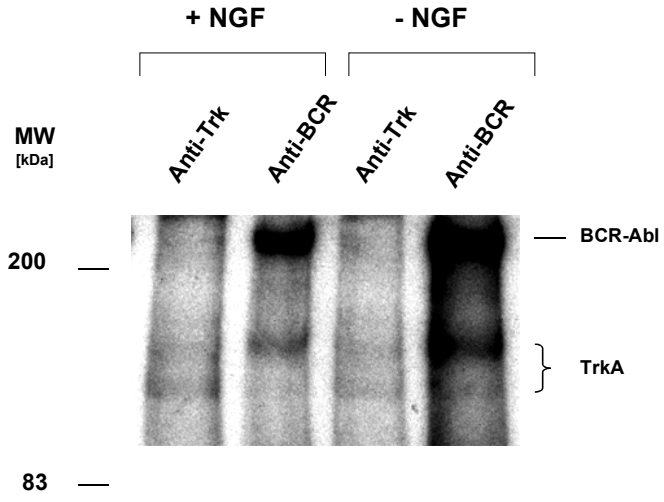

Abbildung 5.66: BCR-Abl interagiert mit TrkA unabhängig von dessen Stimulation durch NGF.
Mit NGF stimulierte (+NGF) und unstimulierte (-NGF) K562-Zellen wurden einer Immunpräzipitation mit α-BCR- und α-Trk-Antikörpern unterzogen. Die beiden Kinasen wurden anschließend durch *in vitro* Autophosphorylierung in Gegenwart von ^{32}P-γ-ATP radioaktiv markiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. In den TrkA-Präzipitaten erkennt man deutlich die beiden Banden für die 110 und 140 kDa-Form von TrkA, die sich neben der 210 kDa-Bande von BCR-Abl ebenfalls in den α-BCR-Präzipitaten finden lassen. **IP:** Immunpräzipitaion, **MW:** Molekulargewichtsmarker.

5.3.5 Der Abl-Inhibitor STI 571 beeinflußt die Neuritenbildung in PC12-Zellen

Nachdem die Überexpression der Abl-SH2-Domäne in PC12-Zellen nicht ausreichend war, um das Neuritenauswachsen zu unterbinden, und die NGF-unabhängige Co-Immunpräzipitation von BCR-Abl und TrkA die Beteiligung weiterer Abl-Domänen an der Interaktion der beiden Proteine vermuten ließ, sollte nun die Aufgabe der Abl-Kinasefunktion bei der Übermittlung des NGF-Signals untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Kinaseaktivität des endogenen c-Abl in PC12-Zellen während ihrer NGF-induzierten Differenzierung mit Hilfe des Abl-spezifischen Inhibitors STI 571 ausgeschaltet, der dem Labor freundlicherweise von der Firma Novartis zur Verfügung gestellt wurde. Bei STI 571 handelt es sich um eine chemische Substanz, die mit ATP um die ATP-Bindungstasche der Kinase konkurriert und selektiv in der Lage ist, die Abl-Tyrosinkinase *in vitro* und *in vivo* in submikromolaren Konzentrationen zu hemmen (Buchdunger et al., 1996). STI 571 wird heute bereits in der Therapie von Leukämien mit BCR-Abl-Beteiligung eingesetzt, da der Inhibitor BCR-Abl-exprimierende Zellen selektiv abtötet (Druker et al., 1999).

Für dieses Experiment wurden PC12-Zellen auf Kollagen ausgesät, und das Medium für diese Zellen wurde mit 10 µM STI 571 versetzt, was eine vollständige Hemmung der Abl-Tyrosinkinase bewirken soll (Buchdunger et al., 1996). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 100 ng/mL NGF zur Differenzierung angeregt. Die lebenden Zellen wurden täglich fotografiert.
BCR-Abl enthaltende Zellinien wie K562 oder Zellinien aus Lungenkarzinomen, die ihren transformierten Phänotyp der Rezeptortyrosinkinase c-Kit verdanken, die ebenfalls auf STI 571 anspricht, werden von dem Inhibitor bereits in Konzentrationen von 0,1 - 1 µM innerhalb von 48 h abgetötet (Wang et al., 2000). Ein derartiges Phänomen ist bei PC12-Zellen nicht zu erwarten, und erwartungsgemäß tolerierten sie die Behandlung mit 10 µM STI 571.
Allgemein fällt auf, daß die mit STI 571 behandelten PC12-Zellen größer und grober aussahen, als die mit DMSO behandelten. Die Ausbildung der Neuriten wurde durch STI 571 zwar nicht vollständig unterbrochen, verzögerte sich aber sehr deutlich (Abb. 5.17). Es wurden weniger Neuriten gebildet und die unter STI 571-Einfluß vorhandenen waren erheblich kürzer als die der DMSO-behandelten Kontrollzellen (Abb. 5.17 Tag 9). Die Ausschaltung der Abl-Kinase-Funktion reduzierte die Bildung von Neuriten in PC12-Zellen unverkennbar.

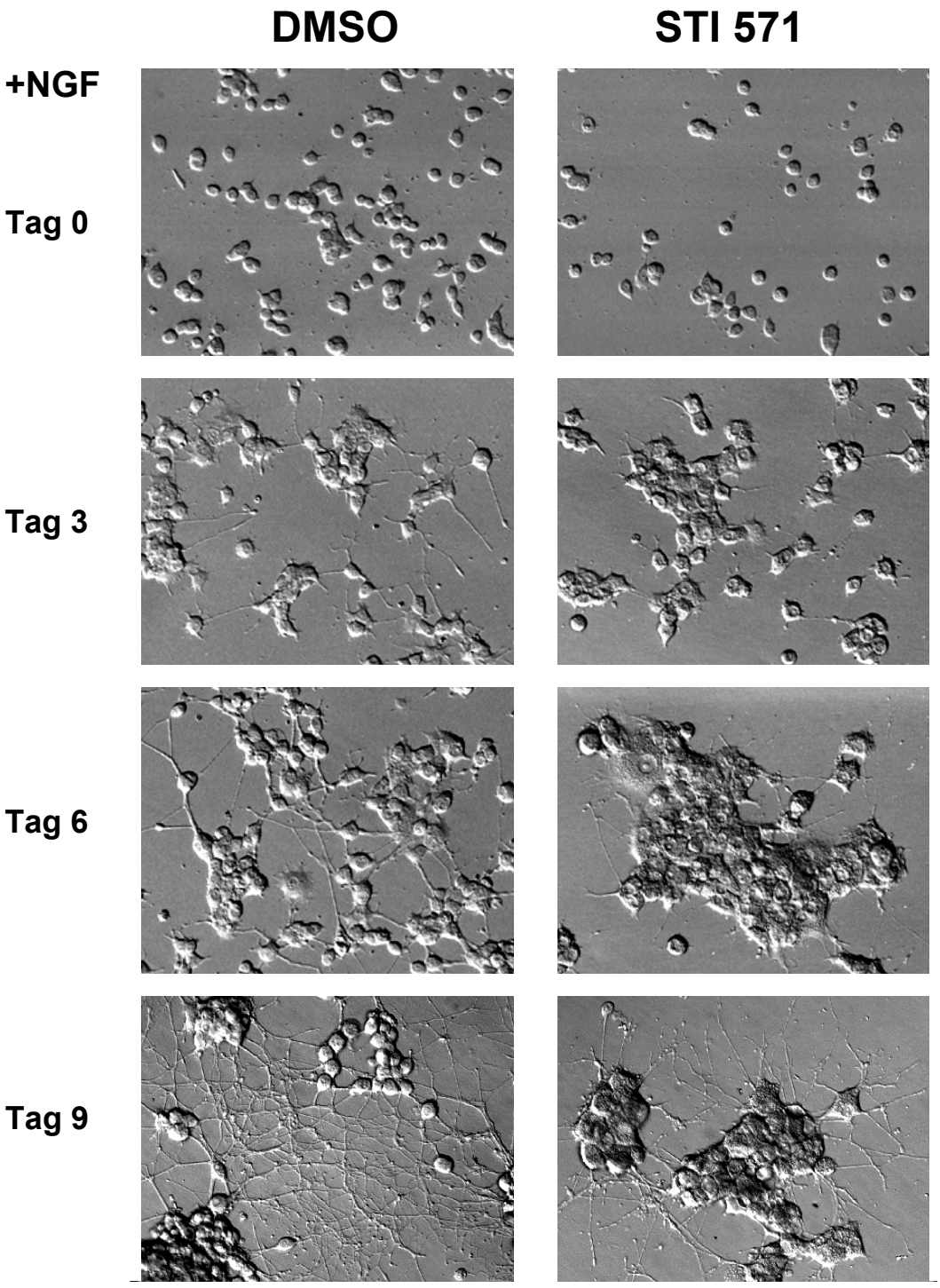

Abbildung 5.77: Der Abl-Inhibitor STI 571 (Novartis) unterdrückt die Neuritenbildung in PC12-Zellen.
PC12-Zellen wurden auf kollagen-beschichteten Petrischalen ausgesät und mit 10 µM STI 571 in DMSO versetzt, Kontrollzellen mit DMSO allein. Am nächsten Tag wurde die Neuritenbildung durch Zugabe von 100 ng/mL NGF angeregt. Die Zellen wurden über 11 Tage beobachtet und lebend unter Verwendung des Hoffman'schen Modulationskontrasts fotografiert. Abb. 5.17 zeigt die Neuritenentwicklung mit und ohne STI 571 zu exemplarisch ausgewählten Zeitpunkten: 1 Tag nach Beginn der NGF-Stimulation, 3, 6 und 9 Tage danach.

5.4 NGF steuert Veränderungen des Zytoskeletts über das zytoskelett-organisierende Protein Mena

Die Wirkung des Abl-Inhibitors STI 571 auf das Neuritenauswachsen in PC12-Zellen hat deutlich darauf hingewiesen, daß der Abl-Kinase beim Differenzierungsprozeß der Zellen eine wichtige Rolle zukommt.
Welche Proteine sind nun weiter an der Trk/Abl-Kaskade beteiligt?
Neben dem bereits bekannten Paxillin erscheint das bisher noch wenig erforschte Protein Mena als interessanter Kandidat für ein Zusammenwirken mit Abl. Mena stellt das Säugerhomolog zu Enabled (Ena) aus *Drosophila* dar. Ena fungiert in *Drosophila* als Substrat der Abl-Kinase und ist eins von mehreren Proteinen, die zusammen mit D-Abl an der korrekten Ausbildung des Nervensystems beteiligt sind (Review: Lanier & Gertler,2000). Über Mena und dessen Regulation ist weit weniger bekannt. Auch Mena kommt allerdings eine Rolle bei der Ausbildung des Nervensystems zu, besonders bei dynamischen Vorgängen in den neuronalen Wachstumszonen (Lanier et al., 1999).

5.4.1 Mena wird in PC12-Zellen exprimiert

Nach Lanier et al. (1999) wird das Protein Mena im Mäuse-Embryo u.a. in sensorischen Zellen des Spinalganglions exprimiert, die auch TrkA enthalten. Wenn Mena im Trk/Abl-Signalweg eine Rolle spielt, sollte es auch in anderen Trk-exprimierenden Zellen zu finden sein, z.B. in PC12-Zellen. Deshalb wurden Lysate verschiedener Zellinien auf die Expression des Proteins Mena getestet: SW13 (Positivkontrolle von Transduction Lab. für den α-Mena-Antikörper), NIH3T3 (T15), PC12, HEK293, MDCK, K562, FDC-P1-Mac11, HMC-1
Die Zellen wurden in normalem Wachstumsmedium angezogen und mit SDS-Auftragspuffer für den Westernblot vorbereitet. Mena wurde auf der Membran anschließend mit α-Mena-Antikörpern detektiert. Es zeigte sich, daß außer SW13, PC12 und HEK293 keine der genannten Zellinien unter diesen Wachstumsbedingungen Mena in sichtbaren Mengen exprimiert (Abb. 5.18). In PC12 und HEK293 finden sich dagegen deutliche Banden aller von Gertler et al. (1996) beschriebenen Mena-Formen, einschließlich der „neuronenspezifischen“ 140 kDa-Form Mena (+). Die leichten Unterschiede in den Molekulargewichten der einzelnen Formen sind dabei wahrscheinlich auf speziesspezifische Unterschiede (PC12: Ratte, HEK293: Mensch) der Proteine zurückzuführen.

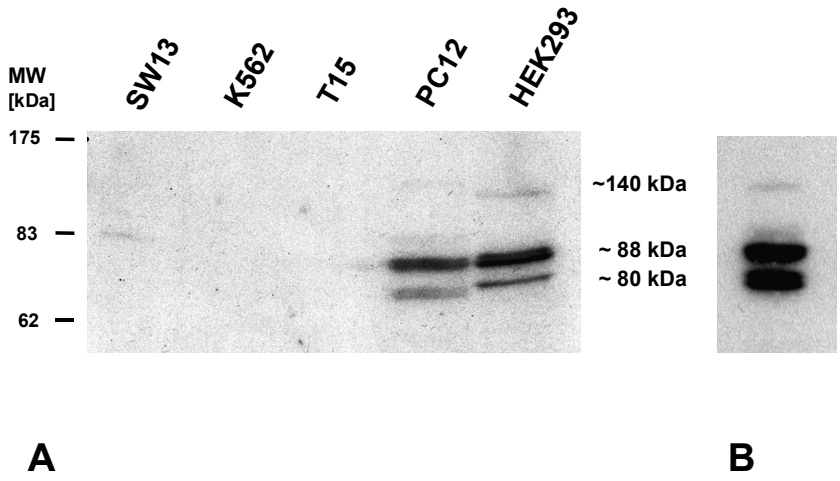

Abbildung 5.88: PC12 und HEK293-Zellen exprimieren Mena, das Säugerhomolog des Abl-Substrats „Enabled" aus *Drosophila*.
A: Ein Westernblot von Zelllysate der Zellinien SW13, K562, T15, PC12 und HEK293 wurde mit einem α-Mena-Antikörper behandelt. Das Protein wird in deutlichen Mengen in PC12 und HEK293 exprimiert, nicht jedoch in K562 und T15. Die Molekulargewichte ~140 kDa, ~ 88 kDa und ~80 kDa bezeichnen die von Gertler et al., 1996 beschriebenen Mena-Formen. **B:** Anti-Mena-Immunpräzipitation aus PC12-Zellen. Die 140 kDa-Bande ist deutlich zu erkennen. **MW:** Molekulargewichtsmarker

5.4.2 Mena wird durch NGF induziert

PC12-Zellen exprimieren, wie in Abschnitt 5.4.1 gezeigt, relativ große Mengen des Proteins Mena, darunter auch die „neuronenspezifische" 140 kDa-Form, die als einzige Mena-Form *in vivo* tyrosinphosphoryliert vorkommt (Gertler et al., 1996). In Übertragung der Vorgänge in *Drosophila* auf Säuger-Signalkaskaden sollte untersucht werden, ob Mena als Abl-Substrat möglicherweise auf NGF-Stimulierung hin phosphoryliert wird. Dazu wurden $2{,}5 \cdot 10^8$ PC12-Zellen für 4 h in Medium mit 0,1 % Pferdeserum gehalten. Die Zellen wurden anschließend wie für die Induktion der Phosphorylierung (Abschnitt 5.3.2) mit 200 ng/mL NGF über verschiedene Zeiträume stimuliert. Die Aliqoute wurden lysiert und mit α-Mena-Antikörpern immunpräzipitiert. Es wurden zwei Aliquote je eines Zeitwertes geblottet und einmal mit α-Mena-Antikörpern, das zweite Mal mit α-Phosphotyrosin-Antikörpern inkubiert. Die Signale des α-Mena-Blots wurden mit Hilfe des Bioimagers quantifiziert.
Interessanterweise zeigte sich, daß die Zellen nach dem Entzug des Serums keine nachweisbaren Mengen an Mena mehr enthalten. Erst etwa 30 min nach Stimulation mit NGF sind die 80 und 88 kDa-Banden des Proteins wieder auszumachen. Die Intensität des Mena-Signals erhöht sich dann zum 60-Minuten-Wert hin um den Faktor 11. Hier erreicht die Proteinmenge ein Maximum, und die Expression bleibt über einige Stunden hinweg bestehen (Abb. 5.19 A).
Eine Tyrosinphosphorylierung auf NGF-Stimulation hin konnte allerdings bei keiner Form von Mena festgestellt werden.

5.4.3 Die Induktion von Mena durch NGF läßt sich durch den Abl-Inhibitor STI 571 unterbrechen

Knockout-Studien in *Drosophila* zeigen für Ena und Abl, daß beide zumindest einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg unterhalten. Dabei ist indessen nicht ganz klar, wie der molekulare Mechanismus abläuft, über den sie zusammenwirken (Lanier & Gertler, 2000). Direkte Phosphorylierung von Ena durch Abl ist in *Drosophila* eine, jedoch nicht die einzige Möglichkeit, die in Säugern ohnehin auf die 140 kDa Mena-Form beschränkt bleibt. Gerade diese scheint von NGF allerdings nicht beeinflußt zu werden (Abb. 5.19 A), so daß es hier möglicherweise andere Mechanismen gibt, über die die Wege von c-Abl und Mena miteinander verbunden sind.
Parallel zur in Abb. 5.19 A gezeigten Induktion von Mena durch NGF wurde der gleiche Versuch in Gegenwart des Abl-Inhibitors STI 571 durchgeführt. Nach 40 min ist auf Höhe der 88 kDa-Bande von Mena eine Proteinbande zu erkennen. Das drastische Ansteigen der Proteinmenge der 80 und 88 kDa-Form zwischen 40 und 60 min NGF-Stimulation bleibt unter dem Einfluß von STI 571 allerdings aus (Abb. 5.19 B). Das Ausschalten der Abl-Kinaseaktivität beeinflußt offenbar die NGF-induzierte Änderung der Proteinmenge des zytoskelett-organisierenden Proteins Mena in PC12-Zellen.

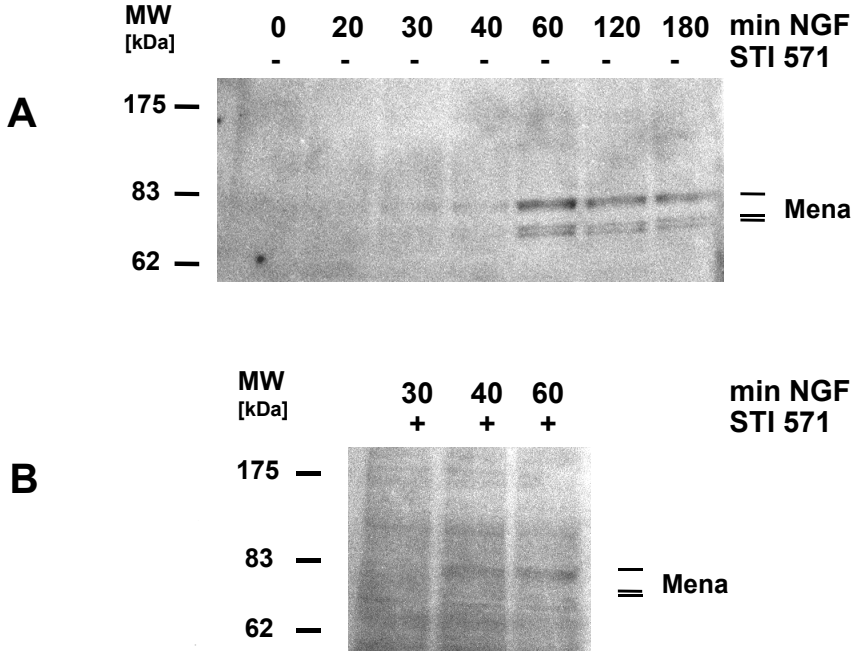

Abbildung 5.99: NGF induziert das Protein Mena.
PC12-Zellen wurden 4 h auf serumreduziertem Medium gehalten, bevor sie mit 200 ng/mL NGF stimuliert wurden. Aliquote wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen, in eiskaltem PBS abgestoppt, lysiert, mit α-Mena-Antikörpern immunpräzipitiert, geblottet und mit α-Mena-Antikörpern detektiert. **A:** Nach kurzzeitiger Stimulation mit NGF läßt sich das Protein Mena nicht in den PC12-Zellen nachweisen. Nach 30 min erscheinen schwache, der 80 und 88 kDa-Form entsprechende Banden. Nach 60 min Induktion ist Mena deutlich auszumachen. **B:** Für die Zeitwerte 30, 40 und 60 min wurden Aliquote der Zellsuspension 90 min mit STI 571 vorinkubiert, bevor sie mit NGF wie in A stimuliert wurden. Die Induktion von Mena ist in Gegenwart von STI 571 deutlich vermindert. **MW:** Molekulargewichtsmarker.

5.4.4 Die Mena-Induktion erfolgt nicht auf der Transkriptionsebene

$2{,}5 \cdot 10^8$ PC12-Zellen wurden 4 h auf serumreduziertem Medium gehalten und für 0, 30, 60 und 180 min mit 200 ng/mL NGF stimuliert wie in den beiden vorangegangenen Abschnitten. Dann wurde die RNA präpariert, geblottet und mit Sonden gegen *mena*, *c-fos* und *aktin* behandelt.

Bei Auftragung gleicher Mengen an Gesamt-RNA zeigte sich für *c-fos* die erwartete transiente Induktion des Transkripts (Peng et al., 1995; Loeb et al., 1993) mit einem Maximum bei 60 min. Interessanter Weise nehmen die Signale von Aktin unter dem Einfluß von NGF ab. Für Mena ist dagegen keine drastische Änderung der RNA-Menge zwischen 30 und 60 min NGF-Stimulation zu erkennen, die der Änderung der Proteinmenge vergleichbar wäre.

Von Mena existieren bekanntermaßen mindestens vier verschiedene Spliceformen (Gertler et al., 1996). Das Auftreten diverser schwacher *mena*-Signale auf dem Northernblot repräsentiert daher vermutlich zahlreiche Transkripte verschiedener Größe. Diese große Anzahl an Transkripten ist wahrscheinlich der Grund, warum in der Literatur bisher alle Studien ausschließlich mit Hilfe von Westernblots auf der Proteinebene durchgeführt wurden.

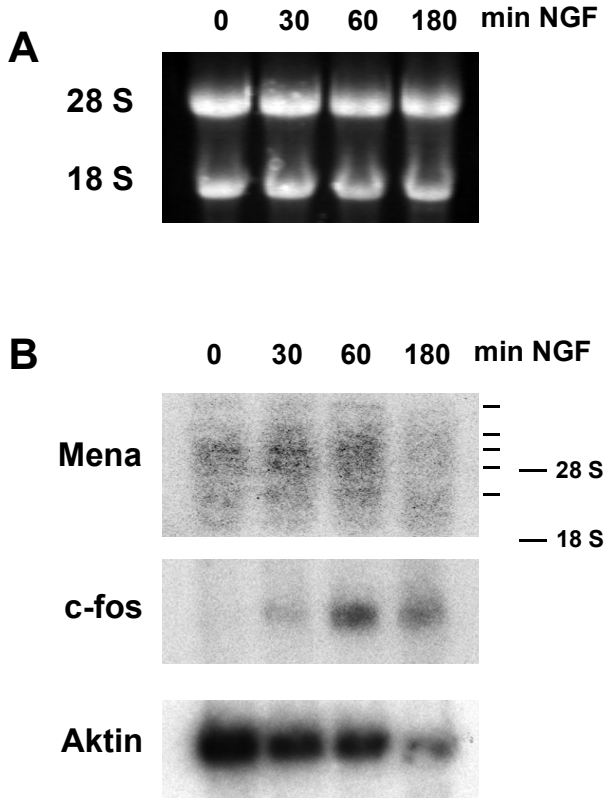

Abbildung 5.20: Northernblot-Analyse von NGF-stimulierten PC12-Zellen.
Die PC12-Zellen wurden für 0, 30, 60 und 180 min mit NGF stimuliert wie bei der Westernblotanalyse in Abb. 5.19. **A:** Ethidiumbromidfärbung der aufgetragene RNA-Präparationen (je 5µg, bei Mena 20 µg). **B:** Die *mena*-Sonde markiert, wie rechts durch Striche angedeutet, mehrere schwache Banden. *c-fos* wird von NGF induziert. Die mRNA-Menge der Aktin-mRNA verringert sich deutlich.

Die Induktion des Proteins Mena durch NGF und der Einfluß des Abl-Inhibitors STI 571 auf diesen Prozeß lassen vermuten, daß die Rezeptortyrosinkinase TrkA und ihr Interaktionspartner c-Abl, über das Aktin-organisierende Protein Mena einen neuen Signaltransduktionsweg zum Zytoskelett eröffnen, der in PC12-Zellen so möglicherweise die für das Neuritenauswachsen notwendigen Veränderungen des Zytoskeletts steuert.

6 Diskussion

Neurotrophine steuern das Überleben und die Differenzierung neuronaler Zellen während der Embryogenese. Dazu binden sie an spezifische Oberflächenrezeptoren, die zu bestimmten Zeitpunkten auf bestimmten Zelltypen exprimiert werden. Bei der Trk-Familie der Neurotrophinrezeptoren handelt es sich um Rezeptortyrosinkinasen, deren Kinaseaktivität durch Bindung ihres extrazellulären Liganden stimuliert wird. Anschließend rekrutieren sie intrazelluläre Signalproteine über spezifische Phosphorylierungsstellen ihrer zytoplasmatischen Domänen. Die Wechselwirkung mit einem phosphotyrosinbindenden Protein stellt somit den ersten Schritt in der intrazellulären Signalkaskade eines solchen Rezeptors dar. Im Fall der Differenzierung von Nervenzellen endet diese Kaskade in den Spitzen der sich bildenden Neuriten, in denen bei diesem Prozeß massive Änderungen der Zytoskelettstruktur vorgenommen werden müssen. Zu den TrkA-Signalen gehören solche über die PLC-γ und den Ras-Signalweg, die von allen Rezeptortyrosinkinasen vermittelt werden können. So aktiviert auch eine Stimulation des EGF-Rezeptors den MAP-kinase-Signalweg in PC12-Zellen, ohne jedoch eine Differenzierung auszulösen, wie der Nervenwachstumsfaktor NGF dies tut (Marshall, 1995).
Diese Arbeit beschreibt nun die direkte Interaktion der zytoplasmatischen Tyrosinkinase c-Abl mit dem NGF-Rezeptor, TrkA, über einen Wechselwirkungsmechanismus, der eine Beteiligung der Aktivierungsschleife der Trk-Kinase und der SH2-Domäne von c-Abl beinhaltet. Durch Einsatz des Abl-spezifischen Inhibitors STI 571 (Novartis) in PC12-Zellen als Modellsystem für die neuronale Differenzierung konnte die grundsätzliche Bedeutung der Abl-Kinase für die Neuritenbildung im Differenzierungsprozeß aufgezeigt werden. Eine weitere Erforschung dieses Signalwegs führte zu der Entdeckung, daß die Menge des in PC12-Zellen enthaltenen Proteins Mena drastisch von NGF erhöht wird, was sich durch Zugabe des Abl-Inhibitors STI 571 wiederum unterbinden ließ. Das Protein Mena wird mit der Organisation des Aktinzytoskeletts in Verbindung gebracht.
Nimmt man diese Punkte zusammen, ergibt sich eine bisher unbekannte Signaltransduktionskaskade, in der die für die NGF-induzierte Neuritenbildung notwendigen und von Mena gesteuerten Umbauprozesse des Zytoskeletts von der Abl-Kinase reguliert werden. Dieser Signalweg soll nun in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

6.1 Die Abl-SH2-Domäne ist an der Interaktion mit TrkA beteiligt

In dieser Arbeit wurde die Nicht-Rezeptortyrosinkinase c-Abl mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems als neuer Interaktionspartner des Nervenwachstumsfaktorrezeptors TrkA identifiziert. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System interagierte die SH2-Domäne von c-Abl phosphorylierungsabhängig mit dem Trk-Rezeptor. Diese Bindung konnte unter Verwendung eines GST-Fusionsproteins der Abl-SH2-Domäne in einem *in vitro*-Bindungs-Assay bestätigt werden.
Obwohl auf diese Weise *in vitro* zweifelsfrei die Abl-SH2-Domäne als Interaktionspartner von TrkA identifiziert werden konnte, hatte die Expression dieser Abl-Domäne zur möglichen Unterbrechung des Trk-Abl-Signalwegs in PC12-Zellen keinen einschneidenden Effekt auf die NGF-induzierte Neuritenbildung. Durch Co-Immunpräzipitation von BCR-Abl und TrkA aus K562-Zellen konnte anschließend zudem gezeigt werden, daß die Interaktion von Trk mit BCR-Abl *in vivo* nicht von der Aktivierung des Rezeptors durch NGF-Stimulation abhängig war. Dieses Verhalten demonstriert, daß neben der *in vitro* dargestellten Interaktion *in vivo* zusätzlich andere Bindungsmechanismen existieren müssen. Ein solcher von der Phosphorylierung unabhängiger Mechanismus könnte z.B. durch die im Hefe-Zwei-Hybrid-Screening in vielen Abl-Klonen vorhandene SH3-Domäne vermittelt werden.
In dieselbe Richtung weisen die Untersuchungen von Yano et al. (2000), die ebenfalls mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationsstudien in Trk und Abl überexprimierenden Zellen die Beteiligung anderer Abl-Domänen als der SH2-Domäne an der Bindung mit TrkA aufzeigen. Yano et al. finden eine Interaktion zwischen Trk und Abl trotz der Entfernung praktisch jeder funktionellen Abl-Domäne, die zudem auch hier nicht von der Aktivierung der Trk-Kinase abhängig ist. In dieser Studien scheint die Abl-Kinase-Domäne einen Hauptanteil an der Wechselwirkung mit TrkA zu haben. Eine genaue Charakterisierung des Bindungsmodus gelingt allerdings auch Yano et al. nicht, was in diesem Artikel Anlaß gibt, eine indirekte Interaktion der beiden Proteine in Betracht zu ziehen mit einem Verweis auf unveröffentlichte Daten aus Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten. In diesen Experimenten sei die Trk- und Abl-Interaktion vorhanden, falle aber schwächer aus als die mit Shc.
Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Hefe-Zwei-Hybrid-Daten zeigen dagegen eine Interaktion von Trk und Abl, die durchaus im Bereich der bekannten Bindungspartner SH2-B, Shc und PLC-γ liegt. Im *in vitro*-Bindungs-Assay entwickelte die Abl-SH2-Domäne sogar eine wesentlich deutlichere Bindung an TrkA als die SH2-Domäne der PLC-γ. Alle erhaltenen Ergebnisse sprechen gleichwohl dafür, daß die Abl-Bindung nicht ausschließlich über die SH2-Domäne vermittelt wird, und da Abl über eine ganze Reihe von verschiedenen Motiven verfügt, die an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind, kann neben der direkten Interaktion auch die Gegenwart von Adaptorproteinen bei der Bildung eines Trk/Abl-Komplexes in Zellsystemen nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Einen ähnlichen multivalenten Bindungsmechanismus, wie er sich für Abl und TrkA darzustellen scheint, fanden auch Yu et al. (2000) für die Interaktion von c-Abl mit dem Rezeptor EphB2, bei dem gleichzeitig eine direkte phosphorylierungsabhängige Wechselwirkung über die SH2-Domäne, eine nicht von der Phosphorylierung abhängige direkte und parallel dazu noch eine indirekte, durch Adaptorproteine vermittelte Interaktion beschrieben wird.

6.2 TrkA interagiert mit der Nichtrezeptor-Tyrosinkinase c-Abl über seine Aktivierungsschleife

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ermöglichte weiterhin Hinweise auf die Abl-Bindungsstelle im Trk-Rezeptor, da die Interaktion von TrkA und Abl sich nicht durch Mutation der Tyrosinreste der beiden bekannten Bindungsmotive an Y785 und Y490 für die PLC-γ bzw. Shc unterbrechen ließ. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte schließlich in einem Bindungs-Assay mit GST-Fusionsproteinen des Trk-Rezeptors eine Interaktion von Abl mit der autophosphorylierten Aktivierungsschleife von TrkA demonstriert werden. Die genaue Festlegung des für diese Interaktion verantwortlichen Tyrosinrestes von den drei in der Aktivierungsschleife enthaltenen erwies sich allerdings als schwierig, da die Punktmutation jedes einzelnen der betreffenden drei Tyrosinreste bereits die Bindung von Abl an TrkA reduzierte.
Ist eine Interaktion über die Aktivierungsschleife einer Tyrosinkinase überhaupt möglich? Eine solche Bindung, die nicht das klassische für SH2-Domänen beschriebene Bindungsmotiv „pY X X hydrophobe AS“ zu benutzen scheint, war zu Beginn dieser Arbeit bereits für den Insulinrezeptor und die SH2-Domäne der Phosphatase SHP-2 (Kharitonenkov et al., 1995), das Protein Grb-IR (Frantz et al., 1997), sowie die PTB-Domäne des Insulinrezeptor-Substrats (IRS)2 (Sawaka-Verhellen et al., 1996) berichtet worden. Parallel zum Entstehen dieser Arbeit beschrieben dann auch Qian et al. (1998) das Adaptorprotein SH2-B und ein homologes Protein, APS, als neue Substrate des Trk-Rezeptors, deren SH2-Domänen ebenfalls mit den drei Phosphotyrosinen der Aktivierungsschleife interagieren. Eine eben solche Interaktion veröffentlichten auch Kotani et al. (1998) für SH2-B und den Insulinrezeptor.
Es mehren sich also die Hinweise, daß diese Art der Bindung von SH2-Domänen bei den beiden Rezeptortyrosinkinasen TrkA und Insulinrezeptor eine ganz entscheidende Rolle spielt.

Ähnlich wie bei der hier beschriebenen Interaktion von TrkA und c-Abl ließ sich durch Einführung einzelner Punktmutationen der Kerntyrosine in der Aktivierungsschleife des Rezeptors auch bei der Bindung von SH2-B (Kotani et al., 1998) oder IRS2 (Sawaka-Verhellen et al., 1996) an den Insulinrezeptor das eigentlich verantwortliche Tyrosin nicht identifizieren. Möglicher Weise stellt hierbei also tatsächlich jedes einzelne Tyrosin eine schwache Bindungstelle dar, oder es spielen Strukturelemente der Aktivierungsschleife eine Rolle bei der Wechselwirkung mit anderen Proteinen.

Die Aufgabe der Konformation in der katalytischen Domäne des Insulinrezeptors und ebenso des NGF-Rezeptors, TrkA, dessen katalytische und Aktivierungsschleife eine sehr hohe Ähnlichkeit mit denen des Insulinrezeptors aufweisen, ist inzwischen gut charakterisiert. Röntgenstrukturanalysen der aktiven und inaktiven Form des Insulinrezeptors (Hubbard et al., 1994; Hubbard, 1997) machten klar, daß die Kinaseaktivität dieses Rezeptors durch drastische Konformationsänderungen im Bereich der Aktivierungsschleife definiert wird. Cunningham & Greene (1998) konnten mit Hilfe dieser Grundlage durch Mutationsstudien in TrkA demonstrieren, daß die Aktivierungsschleife nicht nur der Blockierung des aktiven Zentrums im inaktiven Zustand der Kinase dient, sondern die Phosphorylierung der drei Kerntyrosine über Wechselwirkungen mit positiv geladenen Aminosäuren ihrer näheren Umgebung einen ganz wesentlichen Anteil zur Stabilisierung der aktiven Konformation leistet (Abb. 6.1). Die Konformation der Aktivierungsschleife ist also zu jeder Zeit exakt definiert. Mutation eines dieser Kerntyrosine verändert dabei die notwendigen stabilisierenden Wechselwirkungen und damit die Konformation.

Möglicherweise ändert dies entweder die Zugänglichkeit der Aktivierungsschleife für eine Phosphorylierung, oder die Interaktion einer SH2- oder PTB-Domäne mit der Aktivierungsschleife verlangt selbst eine bestimmte Struktur um das zu bindende Phosphotyrosin.
Die Bindung eines Effektors an einer solchen regulatorisch bedeutsamen Stelle suggeriert neben der direkten Vermittlung einer nachfolgenden Signalproteinkaskade eine mögliche Funktion des Effektors bei der Regulation der Kinaseaktivität des Rezeptors, ganz besonders, wenn es sich bei dem Effektor, wie im Fall von c-Abl, selbst um eine Tyrosinkinase handelt.

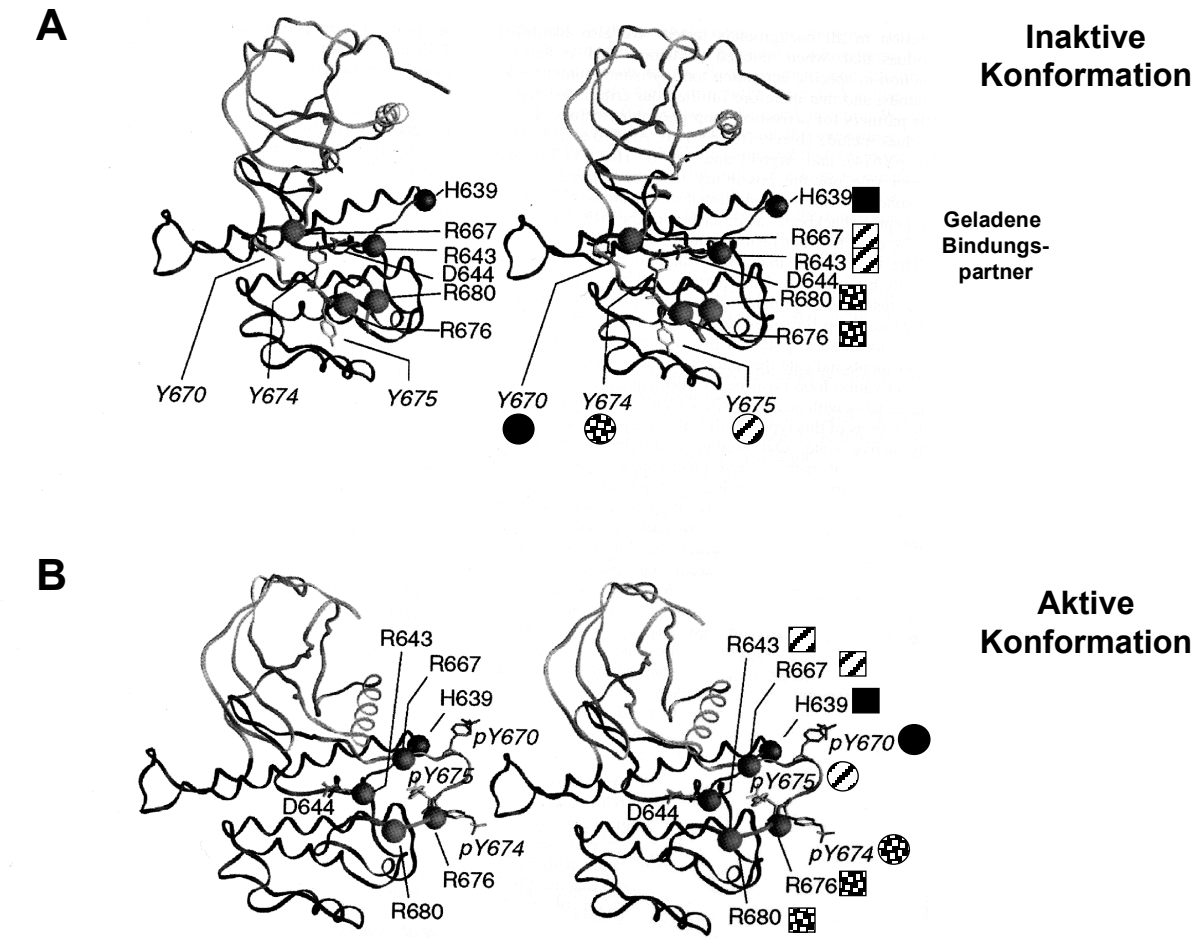

Abbildung 6.1: Strukturmodell des Rezeptors TrkA nach Cunningham & Greene (1998) basierend auf den Röntgenstrukturdaten des Insulinrezeptors.
Die drei Kerntyrosinreste der Aktivierungsschleife sind mit den hTrkA entsprechenden Nummern versehen und runden Symbolen markiert. Ihre Wechselwirkungspartner sind ebenfalls numeriert und tragen ein entsprechendes quadratisches Symbol. **A:** inaktive Konformation, **B:** aktive Konformation

6.3 Die Regulation der Trk-Kinase unterscheidet sich von der anderer Rezeptoren

PC12-Zellen enthalten verschiedene Rezeptortyrosinkinasen, deren Signale jedoch nicht alle zur selben Antwort führen. So bewirkt der EGF-Rezeptor mitogene Signale (Marshall, 1995), nicht aber eine Differenzierung wie der NGF-Rezeptor TrkA. Was unterscheidet nun die Trk-Signale von denen anderer Rezeptoren?
Wie auch in dieser Arbeit gesehen wurde, verursacht die Stimulierung von TrkA zelluläre Antworten z.B. in Form der Induktion des „immediate-early genes“ *c-fos*. Die hier beobachtete *fos*-Induktion durch NGF in PC12-Zellen durchlief ein Maximum bei etwa 60 Minuten und war auch nach 3 Stunden noch nachweisbar. Induktion von *c-fos* durch die Kinase c-Met oder die allgemeine Induktion durch Serum sind bereits nach 30 Minuten maximal und nach 1 Stunde schon wieder abgeklungen (Boccaccio et al., 1994; Boudewijn et al., 1991). Auch im direkten Vergleich mit dem EGF-Rezeptor in PC12-Zellen zeigt sich, daß die Induktion von *c-fos* durch TrkA relativ langsam vonstatten geht, dafür aber länger anhält (Greenberg et al., 1985).

Die Ursache dieser besonderen Reaktion des Trk-Rezeptors mag bereits in dem speziellen Aktivierungsmechanismus dieser Kinase liegen. In diese Richtung weisen auch die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse mit einer TrkA-Mutante, D668V, bei der das unter verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen konservierte Aspartat in der Aktivierungsschleife (Abb. 6.2) zu Valin getauscht wurde, um die Abhängigkeit der Bindung der Abl-Kinase an den Trk-Rezeptor von dessen Phosphorylierungsstatus im Hefe-Zwei-Hybrid-System zu untersuchen. Diese Mutation resultiert in anderen Rezeptortyrosinkinasen wie c-Kit, c-Fms, c-Met und c-Ron in konstitutiv aktiven Enzymen (Kitayama et al., 1995; Morley et al., 1999; Jeffers et al., 1997; Santoro et al., 1998), was sich in Hefe im Fall von c-Kit in stärkerer Autophosphorylierung und einer größeren Bandbreite von Interaktionen äußert (Mancini et al., 2000).
In TrkA jedoch führte diese Mutation überraschenderweise zu einem Absinken der Kinasefunktion im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Alle getesteten Bindungspartner, Shc, PLC-γ, SH2-B und c-Abl, interagierten schwächer mit der D668V-Mutante.
Beide Beobachtungen, die langsame *c-fos*-Induktion, wie auch die unerwartete Reaktion von TrkA auf den Austausch des D668, sind wahrscheinlich von den Besonderheiten des Aktivierungsmechanismus des Trk-Rezeptors geprägt.

Die Aktivierung von Kinasen ist ein Prozeß, der über verschiedene Stufen abläuft und für Nicht-Rezeptortyrosinkinasen gut charakterisiert ist. Bei allen Kinasen existieren konservierte Aminosäuresequenzen, die die grundlegenden Funktionen der Kinase definieren (Abb. 6.2).
Eine besondere Rolle spielt vor allem bei TrkA die Phosphorylierung von Tyrosinresten in der Aktivierungsschleife. Im Gegensatz zu vielen anderen Kinasen besitzt TrkA drei solche Kerntyrosine in seiner Aktivierungsschleife, die während des Aktivierungsprozesses sequenziell phosphoryliert werden (Segal et al., 1996). Wie auch beim Insulinrezeptor entspricht der zweite Tyrosinrest der Aktivierungsschleife (Y674 bei TrkA, Y1162 beim Insulinrezeptor) dem Kerntyrosin anderer Tyrosinkinasen, dessen Phosphorylierung den initialen Schritt zur Auslösung der Kinaseaktivierung darstellt. Dieser Tyrosinrest blockiert bei TrkA und dem Insulinrezeptor, wie im vergangenen Abschnitt bereits erwähnt, als Pseudosubstrat den Zugang zum aktiven Zentrum, solange die Kinase sich im inaktiven Zustand befindet, und gibt diesen erst nach Phosphorylierung des Tyrosinrestes schließlich frei (Hubbard et al., 1994; Hubbard, 1997; Cunningham & Greene, 1998).

Dieser Mechanismus scheint jedoch keineswegs allgemeingültig zu sein. So geschieht die Regulation der FGF-Rezeptorkinase im Gegensatz zu TrkA und dem Insulinrezeptor nicht einmal durch die Kerntyrosine der Aktivierungsschleife.(Mohammadi et al., 1996).
Gryz & Meakin (2000) gelang es, durch Mutation der Tyrosinreste 674 und 675 zu Aspartat und/oder Glutamat eine NGF-unabhängige Aktivierung bei TrkA hervorzurufen. Eine Übertragung dieser Mutationen auf den Insulinrezeptor führt bei diesem allerdings durchaus nicht zum gleichen Ergebnis (Zhang, 1991). Trotz all der eben ausgeführten Gemeinsamkeiten benutzen also auch TrkA und der Insulinrezeptor nur teilweise vergleichbare Regulationsmechanismen.

	katalytische Schleife	**Aktivierungsschleife**		
h TRKA	HFVHR$^{\text{katal.}}$D LATRNCLVGQGLVV	KIGDFGMSR ^{668}**D**I **Y**STD **YY**RVGGR	**D668V**	-
h IR	KFVHR$^{\text{katal.}}$DLAARNCMVAHDFTV	KIGDFGMTR ^{1156}**D**I **Y**ETD **YY**RKGGK	**nb**	
m MET	KFVHR$^{\text{katal.}}$DLAARNCMLDEKFTV	KVADFGLAR$^{1\ 228}$**D**M**Y**DKE**YY**SVHNK	**D1228N**	+
h RON	KFVHR$^{\text{katal.}}$DLAARNCMLDESFTV	KVADFGLAR ^{1232}**D**I LDRE **YY**SVQQR	**D1232V**	+
m FMS	NCIHR$^{\text{katal.}}$DVAARNVLLTSGHVA	KIG DFGLAR ^{800}**D**I MNDSN**Y**VVKGN	**D800V**	+
h KIT	NCIHR$^{\text{katal.}}$DLAARNI LLT H GRIT	KICDFGLAR ^{816}**D**I KNDSN**Y**VVKGN	**D816V**	+
m ALK	HFIHR$^{\text{katal.}}$DIAA RNCLLTCPGAGRIA	KIGDFGMAR^{1279} **D**I **Y**RAS **YY**RKGCA	**D1279V**	-

Abbildung 6.2: Sequenzen der katalytischen und der Aktivierungsschleifen der Rezeptortyrosinkinasen TrkA, Insulinrezeptor, c-Met, c-Ron, c-Fms, c-Kit und ALK. Konservierte Motive sind einfach unterstrichen. Fett und numeriert dargestellt ist der dem D668 in TrkA homologe Aspartatrest. Ist die Auswirkung der Mutation zu Valin bekannt, wird eine Aktivierung mit +, eine Verminderung der Kinaseaktivität mit - angegeben. Die Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife sind fett gedruckt und doppelt unterstrichen. **h:** human; **m:** murin; $^{\text{katal.}}$**D:** für die Katalyse wichtiges Aspartat; **nb:** nicht bekannt

Der oben beschriebene Aktivierungsmechanismus von TrkA mit Y674 als Pseudosubstrat bedingt eine genau geregelte sequenzielle Phosphorylierung aller Tyrosinreste des Rezeptors. Die Phosphorylierung der Kerntyrosine muß der Phosphorylierung der übrigen Tyrosinreste wie z.B. der Shc-Bindungsstelle, Y490, vorausgehen, um eine Aktivierung der Kinase zu gewährleisten. Sie ist zudem transienter Natur (Segal et al., 1996), ganz im Gegensatz zu der Phosphorylierung von Y490, die über mehr als eine Stunde bestehen bleibt. Diese transiente Phosphorylierung der Aktivierungsschleife könnte nun möglicherweise eine ebenso transiente Bindung der hier andockenden Interaktionspartner zur Folge haben. Dagegen mag die lange Phosphorylierung der Shc-Bindungsstelle, wie auch die lange Induktion von *c-fos* eine der Besonderheiten des Trk-Rezeptors darstellen, die für die spezifische zelluläre Antwort auf eine NGF-Stimulation verantwortlich sind.

Vermutlich ist dieser exakt regulierte Aktivierungsmechanismus auch für das Verhalten von TrkA bei Mutation des D668 ausschlaggebend. D668 befindet sich mitten in der hochflexiblen Struktur der Aktivierungsschleife, direkt zwischen R667, das in der aktiven Konformation des Trk-Rezeptors mit pY675 wechselwirkt, und pY670, das wiederum mit anderen Argininresten interagiert. Der Austausch einer negativen Ladung (D) gegen eine ungeladene Gruppe (V) behindert dabei möglicher Weise die für die Aktivierung notwendige Bewegung der Aktivierungsschleife weg von der Substratbindungsstelle oder stört die Aufrechterhaltung der aktiven Konformation der Kinase. In jedem Fall resultiert eine Abschwächung der Kinaseaktivität und somit eine schlechtere Interaktion mit den Bindungspartnern. Eine solche Abschwächung der Interaktion kann allerdings auch zwischen MUPP-1 und der aktivierten Kit-Mutante D816V im Gegensatz zum Wildtyp, c-Kit, beobachtet werden (Mancini et al., 2000). In diesem Fall bindet MUPP-1 die inaktive Kinase und wird nach deren Aktivierung freigesetzt. Dieser Mechanismus ist bei TrkA allerdings auszuschließen. Die Bindung von TrkA, Shc und PLC-γ ist gut charakterisiert. Diese Moleküle binden TrkA nur in phosphoryliertem Zustand. Eine Reduzierung der Phosphorylierung reduziert auch die Interaktion mit diesen Proteinen (Cunningham et al., 1997), so daß davon auszugehen ist, daß die schwachen Interaktionen mit der TrkA-D668V-Mutante tatsächlich auf eine Reduzierung der Kinaseaktivität und damit der Autophosphorylierung zurückzuführen sind. Ein ähnliches Verhalten zeigt auch die Kinase ALK, deren Aktivität bei Einführung der beschriebenen Mutation in Hefe vollständig verschwand (T. Yamamoto, unveröffentlichte Daten).
Diese Besonderheiten des Rezeptors TrkA, die drei Kerntyrosine und der mit ihnen verbundene sequenzielle Aktivierungsmechanismus mit den so unterschiedlichen Phosphorylierungszeiten der einzelnen Tyrosine der verschiedenen Bindungsstellen, sind möglicherweise für das Signalverhalten von TrkA verantwortlich. Es ist denkbar, daß TrkA im Gegensatz zu anderen Rezeptortyrosinkinasen eine weniger starke Kinaseaktivität besitzt, wie sich allgemein auch im Hefe-Zwei-Hybrid-System zeigt, dafür aber überträgt der Rezeptor Signale über längere Zeiträume.

6.4 Abl-Inhibitor STI 571: Abl beeinflußt die Neuritenbildung in PC12-Zellen

In dieser Arbeit wurde der Abl-Inhibitor STI 571 in PC12-Zellen verwendet, um die generelle Bedeutung der Abl-Kinase bei der NGF-induzierten Differenzierung der Zellen aufzuzeigen. In Anwesenheit von STI 571 bildeten die Zellen erheblich weniger und kürzere Neuriten als die Kontrollzellen. Vollständig unterbunden wurde die Neuritenbildung jedoch nicht.
Wie spezifisch ist nun ein solcher chemischer Inhibitor?
Unterschiede in der Struktur der Kinasen, trotz der grundsätzlich gleichen Mechanismen für die Katalyse, ermöglichten es, chemische Substanzen zu entwickeln, die die Kinaseaktivität spezifisch hemmen können. Diese Substanzen stellen kompetetive Inhibitoren dar, die mit ATP um die Bindungstasche im aktiven Zentrum der Kinase konkurrieren. Eine Röntgenstrukturanalyse des FGF-Rezeptors mit einem solchen Inhibitor zeigte, daß dieser neben allgemeinen hydrophoben, auch sehr spezifische Wechselwirkungen mit Aminosäuren der ATP-Bindungstasche ausbildet (Mohammadi et al., 1997). Systematische Mutationen der ATP-Bindungsstellen zur Charakterisierung der Wechselwirkungen bestimmter Kinase-Klassen mit verschiedenen Inhibitoren unterstreichen das Prinzip der spezifischen Hemmung aufgrund unterschiedlich geformter ATP-Bindungstaschen (Bishop et al., 2000).

Der Abl-Inhibitor STI 571 (Novartis) gehört zur Klasse der 2-Phenylaminopyrimidine. Er hemmt selektiv alle Formen der Abl-Tyrosinkinase, den Kit-Rezeptor und den PDGF-Rezeptor, nicht jedoch die zellulären Antworten auf verschiedene andere Kinasen wie z.B. den EGF-, den FGF-Rezeptor oder Src (Buchdunger et al., 1996). Da STI 571 durch konstitutiv aktivierte Abl- oder Kit-Kinasen transformierte Zellen selektiv abtötet, verspricht man sich eine Anwendung in der Therapie Abl- und Kit-abhängiger Krebsformen. STI 571 wird bei Patienten mit Abl-abhängigen Leukämien auch bereits erfolgreich eingesetzt (Druker et al., 1999).

Da die Neuritenbildung in PC12-Zellen nur durch NGF oder FGF ausgelöst werden kann, und der PDGF-Rezeptor und c-Kit keine Rolle dabei spielen, ist davon auszugehen, daß der beobachtete Effekt auf die Neuritenbildung tatsächlich von der Abl-Kinase abhängt.
Daß keine vollständige Hemmung der Neuritenbildung erreicht werden konnte, kann verschiedene Gründe haben:
Einmal kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß eine Restaktivität der Abl-Kinase im Zellsystem erhalten bleibt. Möglicherweise sind aber auch andere zytosolische Kinasen in der Lage, die Aufgabe von Abl wenigstens teilweise zu übernehmen, wie es z.B. in Abl-Knockout-Tieren vermutet wird (Koleske et al., 1998).
Zum anderen spielen die übrigen von Trk über Shc, die PLC-γ und SH2-B vermittelten Signale ebenfalls eine Rolle bei der Neuritenbildung in PC12-Zellen (Stephens et al., 1994; Inagaki et al., 1995; Rui et al., 1999), welche von STI 571 nicht beeinträchtigt werden sollten. Sie übertragen daher auch in Anwesenheit von STI 571 weiter ihre Differenzierungssignale. Wahrscheinlich gehen hier, wie auch beim NGF-vermittelten Überlebenssignal, verschiedene sich ergänzende Signalkaskaden Hand in Hand, um eine optimale Steuerung des Differenzierungsprozesses zu gewährleisten.

6.5 Abl in der neuronalen Entwicklung

Die in dieser Arbeit beschriebene Wechselwirkung von TrkA und c-Abl und die durch den Abl-Inhibitor STI 571 aufgezeigte Bedeutung der Abl-Kinase beim Neuritenauswachsen in PC12-Zellen lassen eine Schlüsselposition für dieses Protein in der neuronalen Entwicklung bei Säugern erwarten.
In *Drosophila* konnte die Beteiligung von Abl an der Ausbildung des Nervensystems mit Hilfe einer Vielzahl von Mutationsstudien bereits eindrucksvoll dargelegt werden. Hier reguliert das Zusammenspiel der zytoplasmatischen Tyrosinkinase D-Abl mit verschiedenen Proteinen des Zytoskeletts und der Phosphatase Dlar ganz unverkennbar die korrekte Wegfindung bestimmter Axone (Lanier & Gertler, 2000).
Doch auch in Säugern mehren sich inzwischen die Hinweise für eine Beteiligung der Abl-Kinase bei der neuronalen Differenzierung, besonders anhand von Funktionen, die mit Zytoskelettveränderungen in Zusammenhang stehen (in Abb. 6.4 schematisch zusammengefaßt).

Abl wird in Fibroblasten durch Integrin vermittelte Signale aus dem Kern in die Fokalkontakte der Zellen rekrutiert und transient aktiviert (Lewis et al., 1996). Daneben läßt sich der membranständige Abl-Pool einer Zelle direkt von Wachstumsfaktorrezeptoren beeinflussen (Plattner et al., 1999). Die Signalwege sowohl der Wachstumsfaktoren wie auch der Integrine treffen sich in den Fokalkontakten. Dort bildet sich neben Ansammlungen von Zytoskelettproteinen wie Aktin ein Signalkomplex, in dem das Protein Crk eine zentrale Rolle spielt (Review: Buday, 1999). Crk rekrutiert u.a. Paxillin, $p130^{CAS}$, FAK

(„focal adhesion kinase"), C3G, c-Cbl und DOCK180. DOCK180 wiederum interagiert mit Rac, das an der Elongation von Neuriten mitwirkt (Lamoureux et al., 1997). Crk und $p130^{CAS}$ beeinflussen die Formation von Streßfasern (Nakashima et al., 1999) und die Zellmigration (Cheresh et al., 1999; Klemke et al., 1998) in nicht-neuronalen Zellen. Für neuronale Zellen wurde ein Crk-Komplex bereits von Torres & Bogenmann (1996) mit dem TrkA-Signaltransduktionsweg in Verbindung gebracht.

Abl bindet nun Aktin und wirkt so möglicherweise lokal an Modifikationen des Zytoskeletts mit. Wichtiger aber ist wahrscheinlich seine Fähigkeit, mit den eben genannten zytoskelett-organisierenden Proteinen zu interagieren. Abl bindet und phosphoryliert Paxillin (Lewis, 1998) und Crk (Feller et al., 1994). Das Onkoprotein BCR-Abl aktiviert FAK (Gotoh et al., 1995), interagiert mit Cbl (Andoniou et al., 1994) und beeinflußt die Tyrosinphosphorylierung von C3G (de Jong et al., 1998). Escalante et al. (2000) beschrieben schließlich einen Wechselwirkungsmechanismus zwischen Abl, Crk und Paxillin, der die bereits bekannte Funktion von Crk in der NGF-induzierten Neuritenbildung kontrolliert. All diese Interaktionen unterstreichen eine Funktion von Abl bei Umbauprozessen des Zytoskeletts, wie sie zur Neurotrophin vermittelten Differenzierung von Zellen notwendig sind.
Eine direkte Beteiligung der Abl-Kinase an der Entwicklung des Nervensystems in Säugern konnte schließlich durch Ausschaltung der Gene für Abl selbst und der nah verwandten Kinase Arg entdeckt werden (Koleske et al., 1998).

6.6 Das zytoskelett-organisierende Protein Mena wird durch Abl reguliert

Wie im vergangenen Abschnitt gezeigt, weisen immer mehr Einzelbeobachtungen darauf hin, daß c-Abl durch die Regulation von Zytoskelettveränderungen an der neuronalen Entwicklung Teil hat. Welche Signalmoleküle folgen nun der Abl-Kinase?
Die bei weitem interessanteste Entdeckung dieser Arbeit beschreibt die Beteiligung des Proteins Mena, eines Säugerhomologs von Enabled aus *Drosophila*, an der NGF-induzierten Signalübertragung. In PC12-Zellen bewirkt die Stimulation mit NGF innerhalb von 60 min eine Erhöhung der Proteinmenge von Mena um mehr als das Zehnfache. Diese NGF-induzierte Mena-Regulation findet offenbar auf der Proteinebene statt, denn die mRNA-Menge ändert sich nicht. Wird nun die gleiche Stimulation in Anwesenheit des Abl-Inhibitors STI 571 durchgeführt, bleibt die Induktion von Mena aus. Mena folgt Abl also offenbar in der NGF-induzierten Signalkaskade des Trk-Rezeptors.
Welche Funktion hat nun dieses Protein?

Besser erforscht als Mena ist das homologe *Drosophila*-Protein Enabled (Ena). Beide sind Angehörige der sog. Ena/VASP-Familie. Ena/VASP-Proteine zeichnen sich durch eine konservierte Domänenstruktur aus (Abb. 6.3, Review: Lanier & Gertler, 2000): eine N-terminale EVH (Ena/VASP-Homologie)1-Domäne, die für die Lokalisation des Proteins in Fokalkontakte sorgt. Eine zentral gelegene prolinreiche Domäne vermittelt Wechselwirkungen zu den SH3-Domänen von Abl, Src, dem Aktin-Monomere bindenden Profilin, das bei der Ausbildung von Axonen ebenfalls eine Rolle spielt, wie auch zu der WW-Domäne des neuronalen Proteins FE65. Die C-terminale EVH2-Domäne schließlich bindet F-Aktin und fördert dessen Polymerisation.

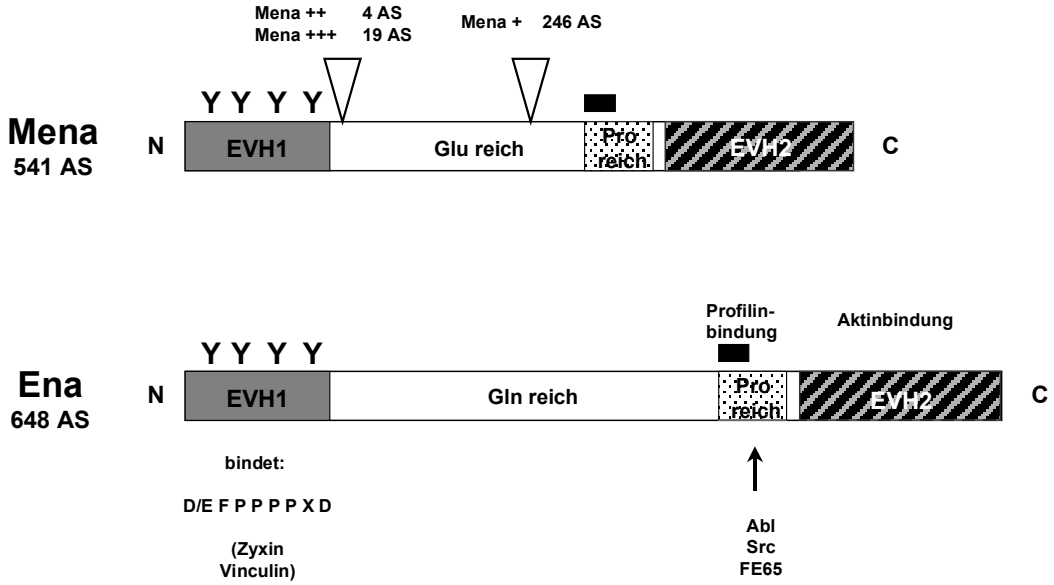

Abbildung 6.3: Schematische Struktur der homologen Proteine Mena und Ena.
Für das Protein Mena ist die 80 kDa-Form abgebildet. In den Spliceformen Mena +, ++ und +++ zusätzlich enthaltene Sequenzen sind durch Keile an den entsprechenden Stellen angedeutet. Die Profilin-Bindungsstelle ist als schwarzer Balken dargestellt. **Y:** Tyrosinreste, die in der EVH1-Domäne konserviert sind, **AS:** Aminosäuren, **EVH1:** Ena/VASP-Homologie1-Domäne. Ihr bevorzugtes Bindungsmotiv ist im Einbuchstabenkode angegeben. **Glu reich:** glutamatreiche Sequenz; **Gln reich:** glutaminreiche Sequenz; **Pro reich:** prolinreiche Domäne, Bindungsstelle für SH3- und WW-Domänen; **EVH2:** Ena/VASP-Homologie2-Domäne.

Ena wurde ursprünglich durch Mutationsstudien in *Drosophila* entdeckt, weil die Ausschaltung des *ena*-Gens neuronale Defekte mildern kann, die im Zusammenhang mit der Ausschaltung von *D-abl* beobachtet werden (Review: Lanier & Gertler, 2000). Ena steht bei der Regulation des Axonwachstums in *Drosophila* ganz eindeutig mit D-Abl und der Phosphatase Dlar in Wechselbeziehung.

In Säugern wurde vor kurzem das homologe Protein, Mena („mammalian Ena“) nachgewiesen, dem mit Hilfe von Deletionsmutanten des *mena*-Gens in Mäusen eine Funktion bei der Regulation der Motilität von neuronalen Wachstumskegeln und bei der Wegfindung bestimmter Axone zugeschrieben werden konnte (Lanier et al., 1999). Auch in nichtneuronalen Zellen scheint Mena die Motilität zu beeinflussen (Bear et al., 2000). Interessanter Weise entwickelt die Doppelmutante Profilin$^{+/-}$ Mena$^{-/-}$ in Mäusen ähnliche Neurulationsdefekte, wie sie auch bei Abl$^{-/-}$ Arg$^{-/-}$-Mäusen vorkommen. Mena findet sich in den Spitzen von Wachstumskegel-Filopodien und scheint dort in PC12-Zellen mit dem Arp2/3-Komplex an der Polymerisation von Aktin beteiligt zu sein (Goldberg et al., 2000).

Über die Regulation von Mena in diesen Prozessen ist jedoch nicht viel bekannt. In *Drosophila* fungiert Ena als Substrat der Abl-Kinase. Allerdings scheint eine Tyrosinphosphorylierung wenig Auswirkungen auf die Funktion zu haben (Lanier & Gertler, 2000). Für das Säugerhomolog Mena wurde dagegen keine generelle Tyrosinphosphorylierung beschrieben, obwohl die Tyrosinkinasen Src und Abl *in vitro* selektiv an Mena binden. Nur für die hauptsächlich in neuronalen Zellen exprimierte Spliceform Mena+ konnte Tyrosinphosphorylierung gezeigt werden (Gertler et al., 1996). Möglicherweise existieren also andere Regulationsmechanismen, die die Funktion von Mena in neuronalen Zellen steuern.

Eine solche Möglichkeit der Regulation, die durch NGF und c-Abl gesteuerte Beeinflussung der Proteinmenge, wird in dieser Arbeit aufgezeigt. Möglicherweise reguliert Abl dabei die Halbwertzeit des Mena-Proteins. Eine Tyrosinphosphorylierung von Mena nach NGF-Stimulation konnte dagegen unter den hier beschriebenen Bedingungen nicht nachgewiesen werden, auch nicht für die hauptsächlich in neuronalen Geweben vorkommende 140 kDa-Form Mena + (Lanier et al., 1999). Interessanterweise wird diese Form in den hier verwendeten PC12-Zellen zwar exprimiert, aber nicht von NGF reguliert wie die 80 und 88 kDa-Form.

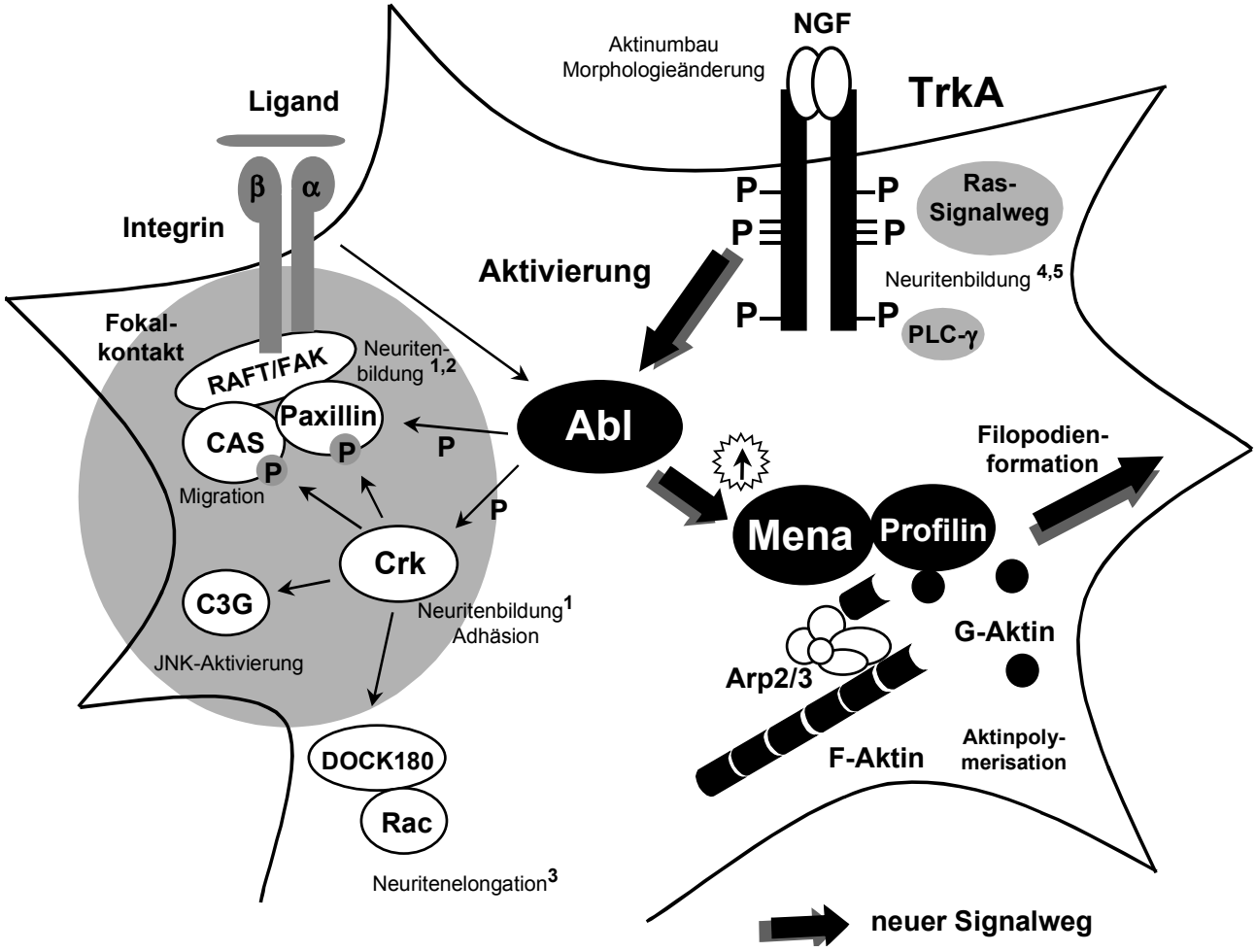

Abbildung 6.4: Schematische Darstellung selektiver Signalwege der Abl-Kinase im Wachstumskegel, die mit Umbauprozessen des Zytoskeletts in Verbindung gebracht werden.
Zwei extrazelluläre Signale aktivieren c-Abl und wirken auf das Zytoskelett: links: das Integrinsignal in den Fokalkontakten: rechts: das NGF-Signal. In den Fokalkontakten bildet sich ein Signalkomplex (grau unterlegt) um das Protein Crk, der neben Crk u.a. FAK/RAFTK („related adhesion focal tyrosine kinase"), Paxillin, $p130^{CAS}$ (CAS), C3G und DOCK180 beinhaltet. Dabei reguliert Abl die Phosphorylierung (P über einem Pfeil) und damit die Interaktion von Paxillin und Crk (Escalante, 2000). Auf der anderen Seite erhöht Abl die Proteinmenge von Mena (Sternform), das zusammen mit Profilin und dem Arp2/3-Komplex die Aktinpolymerisation unterstützt. **P:** Phosphotyrosin; **Literatur** zur Beteiligung der genannten Proteine an der Neuritenbildung: **1**: Escalante, 2000; **2**: Park et al., 2000; **3**: Lamoureux, 1997; **4**: Stephens et al., 1994; **5**: Inagaki et al., 1995.

Insgesamt gesehen stellt damit das zytoskelett-organisierende Protein Mena einen idealen Kandidaten für eine Verknüpfung von Abl und dem Zytoskelett dar. Der mögliche Mechanismus dieses Signalwegs ist schematisch in Abb. 6.4 dargestellt: Auf das NGF-Signal hin wird Abl vom Trk-Rezeptor aktiviert, sorgt für eine Erhöhung der Mena-Menge in den Zellen, und Mena fördert dann die Bildung von Aktinfilamenten in den Filopodien des Wachstumskegels und damit die allgemeine Neuritenbildung. Mena kann dies direkt durch seine EVH2-Domäne bewerkstelligen, wie auch indem es mit Profilin, das Aktin-monomere rekrutiert, und dem Arp2/3-Komplex zusammenarbeitet, der Aktindimere stabilisiert und die Nukleation der ersten Aktinmoleküle eines Filaments unterstützt.
Auf diese Weise fungiert die Abl-Tyrosinkinase möglicherweise als Mittler zwischen den extrazellulären Signalen sowohl des NGF-Rezeptors, TrkA, wie auch der extrazellulären Matrix, die beide die dynamischen Prozesse der Wachstumskegel in Neuronen steuern.

Natürlich kann die vorliegende Arbeit nur einen ersten Schritt zur Charakterisierung der Aufgaben von Abl und Mena in der neuronalen Entwicklung darstellen. Sie trägt jedoch einen weiteren wichtigen Baustein zu dem sich in der letzten Zeit herauskristallisierenden Bild von Abl als Modulator des Zytoskeletts und seiner Verbindung zu Wachstumsfaktor-rezeptoren bei, einem Aspekt dieses vielseitigen Signalproteins, der bisher neben seiner Funktion im Zellkern, bei der Zellzyklusregulation, der DNA-Reparatur und der Apop-tosevermittlung, zurücktreten mußte.

7 Literatur

Agami R., Blandino G., Oren M., and Shaul Y. **(1999)** Interaction of c-Abl and p75α and their collaboration to onduce apoptosis; **Nature 399:**809-13

Aletta J.M., and Greene L.A. **(1988)** Growth cone configuration and advance: a time-lapse studx using video-enhanced differential interferece contrast microscopy; **J. Neurosci 8:**1425-35

Andoniou C.E., Thien C.B.F., and Langdon W.Y. **(1994)** Tumour induction by activated abl involves tyrosine phosphorylation of the product of the cbl oncogene; **EMBO J. 13**:4515-23

Auger K.R., Serunian L.A., Soltoff S.P., Libby P., and Cantley L.C. **(1989)** PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells; **Cell 57**:167-75

Barbacid M. **(1994)** The Trk family of neurotrophin receptors; **J Neurobiol. 25 (11):**1386-1403

Barbacid M. **(1995)** Neurotrophins and their receptors; **Curr. Opin. Cell Biol. 7:**148-55

Barilá D., and Superti-Furga G. **(1998)** An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity; **Nat. Genet. 18:**280-82

Barker P.P., and Shooter E.M. **(1994)** Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor $p75^{LNTR}$ reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells; **Neuron 13:**203-15

Bartel, P. & Fields, S. **(1995)** Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system;.**Methods in Enzymology 245:** 241-263

Bartel, P.L., Chien, C.-T., Sternglanz, R. & Fields, S. **(1993)** IN "CELLULAR INTERACTION IN DEVELOPMENT A PRACTICAL APPROACH" (D. A. Hartley, ed.) p153 Oxford University Press, Oxford

Bear J.E., Loureiro J.j., Libova I., Fässler R., Wehland J., and Gertler F.B. **(2000)** Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins; **Cell 101**:717-28

Ben-Neriah Y, Bernards A., Paskind M., Daley G.Q. and Baltimore D **(1986)**; Alternative 5'Exons in c-Abl mRNA, **Cell 44:**577-586

Bibel M., Hoppe E., and Barde Y.-A. **(1999)** Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR; **EMBO J. 18**:616-22

Birnboim, H.C. & Doly, J. **(1979)** A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA; **Nucleic Acids Res.**, **7:** 1513

Bishop A.C., Ubersa J.A., Petsch D.T., Matheos D.P., Gray N.S., Blethrow J., Shimizu E., tsien J.Z., Schultz P.G., Rose MD., Wood J.L., Morgan D.O., and Shokat K.M. **(2000)** A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protin kinase; **Nature 407**:395-401

Blaikie P., Immanuel D., Wu J., Li N., Yajnik V., and Margolis B. **(1994)** A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors; **J. Biol. Chem. 269**:32031-34

Boccaccio C., Gaudino G., Gambarotta G., Galimi F., and Comoglio P.M **(1994)** Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF; **J. Biol. Chem. 269 (17)**: 12846-51

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. & Falkow, S. **(1977)** Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system; **Gene 2:** 95-113

Bono F.; Lamarche I., Bornia J., Savi P., Della Valle G., Herbert J.-M. **(1999)** Nerve growth factor (NGF) exerts its pro-apoptotic effect via the $p75^{NTR}$ feceptor in a cell cycle-dependent manner; **FEBS 457**:93-97

Booker, G.W., Breeze, A.L., Downing, A.K., Panayotou, G. & Gout, I. **(1992)** Structure of an SH2 Domain of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase*;* **Nature 358:** 684-687

Bossmeyer D. **(1995)** Proteinkinase-structure and function; **FEBS Letters 369**:57-61

Boudewijn M., Burgering Th., Medema R.H., Maassen J.A., van de Wetering M., van der Eb A., McCormick F., and Bos J.L. **(1991)** Insulin stimulation of gene expression mediated by p21ras activation; **EMBO J. 10 (5):**1103-09

Boyer, H.W. & Roulland-Dussoix, D. **(1969)** A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli; **J. Mol. Biol. 41:** 459-472

Brenman J.E., Chao D.S., Gee S.H., McGee A.W., Craven S.E., Santillano D.R., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M.F., Forscher S.C., and Bredt D.S. **(1996)** Interaction of stem cell factor and its receptor c-kit mediates lodgment and acute expansion of hematopoitic cells in the murine spleen; **Blood 88**:75-81

Buchdunger E., Zimmermann J., Mett H., Meyer T., Müller M., Druker B.J. and Lydon N. B. **(1996)** Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase *in vitro* and *in vivo* by a 2-Phenylaminopyrimidine derivative**; Cancer Research 56:**100-104

Buday L. **(1999)** Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins; **Biochim. Biophys. Acta 1422**:187-204

Burns J.C., Friedmann T., Driever W. Burrascano M. and Yee J.-K. **(1993)** Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian an nonmammalian cells; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90**: 8033-37

Cai, H., Szeberenyi., J. & Cooper, G.M. **(1990)** Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on mitogenic signal transduction in NIH3T3 cells*;* **Mol. Cell. Biol. 10:** 5314-5323

Cambier J.C. **(1995)** Antigen and Fc receptor signaling. The awsom power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM); **J. Immunol. 155 (7):**3281-85

Campbell S.L., Khosravi-Far R., Rossman K.L., Clark G.J., and Der C.J. **(1998)** Increasing complexity of Ras signaling; **Oncogene 17**:1395-1413

Carpenter C.L., and Cantley L.C. **(1996)** Phosphoinositide kinase; **Curr. Opin. Cell Biol. 8:**153-58

Casaccia-Bonnefil P., Kong H., and Chao M.V**. (1998)** Neurotrophins: the biologicsl paradox of survival factors eliciting apoptosis; **Cell death Differ. 5**:357-64

Caudy M., and Bentley D. **(1986)** Pioneer growth cone steering along a series of neuronal and non-neuronal cues of different affinities; **J. Neurosci. 6**:1781-95

Chen P., Murphy-Ullrich J.E., and Wells A. **(1996)** A role for gelsolin in actuating epidermal growth factor receptor-mediated cell motility; **J.Cell Biol. 134**:689-98

Chen W.S., Lazar C.S., Poenie M., Tsien R.Y., Gill G.N., and Rosenfeld M.G. **(1987)** Requirement for intrinsic protein-tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor; **Nature 328**:820-23

Cheng K., and Koland J.G. **(1998)** Nucleotide-binding properties of kinase-deficient epidermal-growth-factor-receptor mutants; **Biochem. J. 330**:353-59

Cheresh D.A., Leng J., and Klemke R.L. **(1999)** Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells; **J. Cell Biol.146**:1107-16

Cho K.O., Hunt C.A., and Kennedy M.B. **(1992)** The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of *Drosophila* disc-large tumor supressor protein; **Neuron 9**:929-42

Chou C.K., Dull T.J., Russel D.S., Gherzi R., Lebwohl D., Ullrich A., and Rosen O.M. **(1987)** Human insulin receptor mutated at the ATP binding site lacks protein tyrosine kinase activity and fails to mediate postreceptor effect of insulin; **J. Biol.Chem. 262**:1842-47

Chou T.T, Trojanowski J.Q., and Lee Y. M.-Y. **(2000)** A novel apoptotic pathway induced by nerve growth factor-mediated TrkA activation in Medulloblastoma; **J. Biol. Chem 275 (1):**565-70

Cohen A.W., Carbajal J.M., and Schaeffer R.C. Jr. (1999) VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction. Am. J. Physiol. 277:2038-49

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. **(1972)** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:** 2110-2114

Cormack B.P., Betram G., Egerton M., Gow N.A.R., Falkow S., and Brown A.J.P. **(1997)** Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*; **Microbiology 143:**303-11

Cormack B.P., Valdivia R.H., and Falkow S. **(1996)** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP); **Gene 173:**33-38

Crews C.M., Alessandrini A., and Erikson R.L. **(1992)** The primary structure of Mek, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product; **Science 258**:478-80

Crews C.M., and Erikson R.L. **(1993**) Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all; **Cell 74**:215-17

Cunningham M.E. and Greene L.A. **(1998)** A function-structure model for NGF-activated TRK; **EMBO J. 17(24):**7282-93

Cunningham M.E., Stephens R.M., Kaplan D.R. and Greene L.A. **(1997)** Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor; **J. Biol.Chem. 272 (16):**10957-67

Curran T., Peters G., Van Beveren C., Teich N.M. and Verma I.M. **(1982)** FBJ murine osteosarcoma virus: Identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA; **J. Virol. 44:**674-82

Daley G.Q., Van Etten R.A., Jackson P.K., Bernards A., and Baltimore D. **(1992)** Non-myristylated Abl proteins transform a factor-dependent hematopoietic cell line; **Mol. Cell Biol. 12**:1864-71

Davies A.M. **(1992)** Cell death and the trophic requirements of developing sensory neurons; In: Sensory neurons: Diversity, Development, and Plasticity S.Scott Ed. (Oxford: Oxford University Press):194-214

Davis B.J. **(1964)** Disc electrophoresis II. methods and application to human serum protein; **Ann. NY Acad. Sci. 121:**404-27

De Clue J.E., Sadowski I., Martin G.S., and Pawson T. **(1987)** A conserved domain regulates interactions of v-fps protein-tyrosine kinase with the host cell; **Natl. Acad. Sci. USA 84**:9064-68

de Jong R., van Wijk A., Heisterkamp N., and Groffen J. **(1998)** C3G is tyrosine-phosphorylated after integrin-mediated cell adhesion in normal but not in Bcr/Abl expressing cells**; Oncogene 17**:2805-10

Diamond J., Holmes M., and Coughlin M. **(1992)** Endogenous NGF and nnerve impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat; **J. Neurosci. 12**:1454-66

Dirks W., Wirth M. and Hauser H. **(1993)** Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells; **Gene 128**:247-49

Doyle D.A., Lee A., Lewis J., Kim E., Sheng M., and MacKinnon R. **(1996)** Crystal structure of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ; **Cell 85:**1067-76

Druker B.J., Talpaz M., Resta D., Peng B., Buchdunger E., Ford J. and Sawyers C. **(1999) Blood 94**:368a

Eck M.J., Dhe-Paganon S., Trub T., Nolte R.T., and Shoelson S.E. **(1996)** Structure of IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor; **Cell 85:**695-705

Eckert H.G., Stockschläger M., Just U. Hegewisch-Becker S., Grez M., Uhde A., Zander A., Ostertag W. and Baum C. **(1996)** High-dose multidrug in primary human hematopoietic progenitor cells transduced with optimized retroviral vectors; **Blood 88**:3407-15

Egan S.E., Giddings B.W., Brooks M.W., Buday L., Sizeland A.M., and Weinberg R.A. **(1993)** Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase sognal transduction and transformation; **Nature 363:**45-51

Eide F.F, Lowenstein D.H., and Reichardt L.F. **(1993)** Neurotrophins and their receptor-current concepts and implications for neurological disease; **Exp. Neurol. 121:**200-214

Elkins T., Zinn K., MacAllister L., Hoffmann F.M., and Goodman C.S. **(1990)** Genetic analysis of *Drosophila* neural cell adhesion molecule: interaction of fasciclin I and Abelson tyrosine kinase mutations; **Cell 60:**565-75

Escalante M., Courtney J., Chin W.G., Teng K.K., Kim J.-I., Fajardo J.E., Mayer B.J., Hempstead B.L. and Birge R.B. **(2000)** Phosphorylation of c-Crk II an the negative regulatory Tyr222 mediates nerve growth factor-induced cell spreading and morphogenesis **J. Biol. Chem. 275 (32):**24787-97

Feller S.M., Knudsen B., and Hanafusa H. **(1994)** c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk; **EMBO J. 13**:2341-51

Fields, S. & Song, O. **(1989)** A novel genetic system to detect protein-protein interactions; **Nature 340:** 245-246

Fincham V.J., Unlu M., Brunton V.G., Pitts J.D., Wyke J.A., and Frame M.C. **(1996)** Translocation of Src kinase to the cell periphery is mediated by the actin cyytoskeleton under the control of the Rho family of small G proteins; **J. Cell Biol. 135**:1551-64

FinchamV.J., and Frame M.C. **(1998)** The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesion but controls the turnover of these structures during cell motility; **EMBO J. 17**:81-92

Forsbeck K., Nilsson K., Hansson A., Skoglund G., and Ingelman-Sundberg M. **(1985)** Phorbol ester-induced alteration of differentiation and proliferation in human hematopoietic tumor cell lines: relationship to the presence and subcellular distribution of protein kinase C; **Cancer Res. 45**:6194-99

Forscher P., and Smith S.J. **(1988)** Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone; **J. Cell Biol. 107:**1505-16

Franke T.F., Kaplan D.R., Cantley L.C., and Toker A. **(1997**) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate; **Science 275:**665-68

Frantz J.D., Giorgetti-Peraldi S., Ottinger E. A., and Shoelson S. E. **(1997)** Human Grb-IRβ/Grb10; **J .Biol. Chem. 272 (5):**2659-67

Geenberg M.E., Greene L.A., and Ziff E.B. **(1985)** Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells; **J. Biol. Chem. 260:**14101-10

Gertler F.B., Bennett R.L., Clark M.J., Hoffmann F.M. **(1989)** *Drosophila* abl tyrosine kinase in embryonic CNS axons: a role in axonogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with disabled; **Cell 58:**103-13

Gertler F.B., Hill K.K., Clark M.J., Hoffmann F.M. **(1993)** Dosage-sensitive modifiers of *Drosophila* abl tyrosine kinase function: prospero, a redulator of axonal outgrowth, and disabled, a novel tyrosine kinase substrate; **Genes Dev. 7**:441-53

Gertler F.B., Niebuhr K., Reinhard M., Wehland J., and Soriano P. **(1996)** Mena, a relative of yasp and drosophila enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics; **Cell 87:**227-39

Giniger E. **(1998)** A role for Abl in Notch signaling; **Neuron 20**:667-81

Gliniak, B.C. & Rohrschneider, L.R. **(1990)** Expression of the M-CSF receptor is controlled posttranscriptionally by the dominant actions of the GM-CSF or multi-CSF; **Cell 63:** 1073-1083

Goffinet A.M. **(1997)** Developmental neurobiology: unscrambling a disabled brain; **Nature 389**:668-69

Goldberg D.J., and Burmeister D.W. **(1986)** Stages in axon formation: observations of growth of *Aplysia* axons in culture using video-enhanced contrast microscopy; **J. Cell Biol. 103**:1921-31

Goldberg D.J., Foley M.S., Tang D., and Grabham P.W. **(2000)** Recruitment of the Arp2/3 complex and mena for the stimulation of actin polymerization in growth cones by nerve growth factor**; J. Neurosci. Res. 60**:458-67

Goldschmidt-Clermont P.J., Kim J.W., Machesky L.M., Rhee S.G., and Pollard T.D. **(1991)** Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosin phosphorylation; **Science 251**:1231-33

Gotoh A., Miyazawa K., Ohyashiki K., Tauchi T., Boswell H.S., Broxmeyer H.E., and Toyama K. **(1995)** Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125 FAK) by BCR-ABL oncoprotein; **Exp. Hematol 23:**1153-59

Grabham P.W., and Goldberg D.J**. (1997)** Nerve groth factor stimulates accumulation of beta 1 integrin in the tips of filopodia in the growth cones of sxmpathetic neurons; **J. Neurosci. 17 (14):**5455-65

Greene L.A and Tischler A. **(1976)** Establishment of a nonadrenergic clonal line of rat adreanal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor; **Proc. Natl. Acad, Sci. USA 73:**2424-28

Greene L.A. and Tischler A.S. **(1982)** PC12 pheochromocytoma cells in neurobiological research; **Adv. Cell Neurobiol. 3:**373-414

Greenlund A.C., Morales M.O., Viviano B.L., Yan H., Krolewski J., and Schreiber R.D. **(1995**) Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process; **Immunity 2:**677-87

Gryz E.A., and Meakin S.O. **(2000)** Acidic substitutions of the activation loop tyrosines in TrkA supports nerve growth factor-independent cell survival and neuronal differentiation. **Oncogene 19**:417-30

Guiton M., Gunn-Moore F.J., Stitt T.N., Yancopoulos G.D. and Tavaré J. **(1994)** Identification of *in vivo* brain-derived neurotrophic factor-stimulated autophosphorylation sites on the TrkB receptor tyrosine kinase by site-directed mutagenesis; **J. Biol. Chem. 269:**30370-77

Gundersen R.W., and Barrett J.N. **(1979)** Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth facto; **Science 206**:1079-80

Hammarback J.A., and Letourneau P.C. **(1986)** Neurite extension across regions of low cell-substratum adhesivity: implications for the guidepost hypothesis of axonal pathfinding; **Dev. Biol. 117**:655-62

Hantzopoulos P.A., Suri C., Glass D.J., Goldfarb M.P., and Yancopoulos G.D**. (1994)** The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins; **Neuron 13:**187-201

Helling R.B., Doodman H.M., and Boyer H.W. **(1974)** Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis; **J.Virol. 14 (5):**1235-44

Hempstead B.D., Martin-Zanca D., Kaplan D.R., Parada L.F., and Chao M.V. **(1991)** High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor; **Nature 350**:678-83

Henderson C.E., Camu W., Mettling C., Gouin A., Poulsen K., Karihaloo M., Rullamas J., Evans T., McMahon S.B., Armanini M.P., Berkemeier L., Phillips H.S., and Rosenthal A**. (1993)** Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud; **Nature 363**:266-70

Herbst R., Munemitsu S., and Ullrich A. **(1995)** Oncogenic activation of v-kit involves deletion of a putative tyrosine-substrate interaction site; **Oncogene 10**:369-79

Honegger A., Dull T.J., Szapary D., Komoriya A., Kris R., Ullrich A., and Schlessinger J. **(1988)** Kinetic parameters of the protein-tyrosine kinase activity of EGF receptor mutants with individually altered autophosphorylation sites; **EMBO J. 7:**3053-60

Honegger A.M., Dull T.J., Felder S., Van Obberghen E., Bellot F., Szapary D., Schmidt A., Ullrich A., and Schlessinger J. **(1987)** Point mutaionat the ATP binding site of EGF receptor abolishes protein-tyrosine kinase activity and alters cellular routing; **Cell 51:** 199-209

Hubbard S.R. **(1997)** Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog; **EMBO J. 16 (18):**5572-81

Hubbard S.R., Wei L., Ellis L., and Hendrickson W.A. **(1994)** Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor; **Nature 372:**746-54

Inagaki N., Thoenen H., and Lindholm D. **(1995)** TrkA tyrosine residues involved in NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells; **Eur. J. Neurosci. 7:**1125-33

Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Kitani-Yasuda T., and Tsukita S. **(1993)** The 220.kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tigh junction-associated in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron mycroscopy; **J. Cell Biol. 121:**491-502

Jackson P., and Baltimore D. **(1989)** N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristylated form of c-abl; **EMBO J. 8**:449-56

Jainchill, J.L., Aaronson, S.A. & Todaro, G.J. **(1969)** Murine sarcoma and leukemia viruses assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells; **J. Virol. 4:** 549-553

Jeffers M., Schmidt L., Nakaigawa N., Webb C.P., Weirich G., Kishida T., Zbar B., and Vande Woude G.F. **(1997)** Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (21)**:11445-50

Jin Z., and Strittmatter S.M. **(1997)** Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse; **J. Neurosci. 17:**6256-63

Jing S., Tapley P., and Barbacid M. **(1992)** Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors; **Neuron 9:**1067-79

Johnson L.N., Noble M.E.M., and Owen D.J. **(1996)** Active and inactive protein tyrosine kinase: structural bases for regulation; **Cell 85:**149-58

Johnson L.N., Noble M.E.M., and Owen D.J. **(1996)** Active and inactive protein kinases: Structural basis for ragulation; **Cell 85**:149-58

Johnson, A.D. & Grossman, L.I. **(1977)** Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double and single-stranded DNAs; **Biochemistry 16:** 4217-4224

Kadlec L, and Pendergast A.M. **(1997)** The amphiphysin-like protein 1 (ALP1) interacts functionally with the cABL tyrosine kinase and may play a role in cytoskeletal regulation; **Proc. Natl. Acad. Sci. 94:**12390-95

Kaplan D.R, and Miller F. **(2000)** Neurotrophin signal transduction in the nervous system; **Curr. Opin. Neurobiol. 10:**381-91

Kaplan D.R., and Miller F. **(1997)** Signal transduction by the neurotrophin receptors; **Current Opinion Cell Biology 9**:213-21

Kaplan D.R., Martin-Zanca D. and Parada L.F. **(1991)** Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF; **Nature (London) 350**:158-60

Kaufmann N., Wills Z.P., Van Vactor D. **(1998)** Drosophila Rac1 controls motor axon guidance; **Development 125:**453-61

Kavanaugh W.M., and Williams L.T. **(1994)** An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins; **Science 266:**1862-65

Kessler, S.W. **(1976)** Cell membrane antigen isolation with staphylococcal protein A-antibody adsorbent; ***J.* Immun. 117:** 1482-1490

Kharitonenkov A., Schnekenburger J., Chen Z., Knyazev P., Ali S., Zwick E., White M., and Ullrich A. **(1995)** Adapter function of protein-tyrosine phosphatase 1D in insulin receptor/insulin receptor substrate-1 interaction J. **Biol. Chem. 270 (49):**29189-93

Khazaie D., Dull T.J., Graf T., Schlessinger J., Ullrich A., Beug H., and Vennström B. **(1988)** Truncation of the EGF receptor leads to differential transforming potential in primary avian fibroblasts and erythroblasts; **EMBO J. 7:**3061-71

Khyse-Anderson J. **(1984)** Electroblotting of multiple gels in a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of protein from polyacrylamide to nitrocellulose; **J. Biophys. Methods 10**:203-9

Kitayama H., Kanakura Y., Furitsu T., Tsuijmura T., Oritani K., Ikeda H., Sugahara H., Mitsui H., Kanayama Y., et al. **(1995)** Constitutively activating mutations of the c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumoigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines; **Blood 85(3):**790-98

Klemke R.L., Leng J., Molander R., Brooks P.C., Vuori K., and Cheresh D.A. **(1998)** Cas/Crk coupling serves as a „mlecular switch“ for induction of cell migration; **J. Cell. Biol. 140:** 961-72

Klippel A., Kavanaugh W.M., Pot D., and Williams L.T. **(1997)** A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the proein kinase Akt through its pleckstrin homology domain; **Mol. Cell Biol. 117:**338-44

Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C. & Pawson, T. **(1991)** SH2 and SH3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins*;* **Science 252:** 668-674

Koleske A.J., Gifford A.M., Scott M.L., Nee M., Bronson R.T., Miczek K.A., and Baltimore D. **(1998)** Essential roles for the abl and arg tyrosine kinase in neurolation; **Neuron 21:**1259-72

Korsching S. **(1993)** The neurotrophic factor concept: a reexamination; **J. Neurosci. 13:**2739-48

Kotani K., Wilden P. and Pillay T.S. **(1998)** SH2-B α is an insulin-receptor adapter protein and substrate that interacts with the activation loop of the insulin-receptor kinase; **Biochem. J. 335**:103-109

Kouhara H., Hadari Y.R., Spivak-Kroizman T., Schilling J., Bar-Sagi D., Lax I., and Schlessinger J. **(1997)** A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway; **Cell 89:**693-702

Kruh G.D., King C.R., Kraus M.H., Popescu N.C., Amsbaugh S.C., McBride W.O., and Aaronson S.A. **(1989)** A novel human gene closely related to the abl proto-oncogene; **Science 234:**1545-48

Kuhn T.B., Brown M.D., and Bamburg J.R. **(1998)** Rac-1 dependent actin filament orgaization in growth cones is necessary for β1-integrin-mediated advance but not for growth on poly-D-lysin; **J. Neurobiol. 37**:524-40

Kuhn T.B., Brown M.D., Wilcox C.L., Raper J.A., Bamburg J.R. **(1999)** Myelin and collapsin-1 induced motor neuron growth cone collapse throughdifferent pathways: inhibition of collapse by opposing mutants of rac1; **J. Neurosci. 19:**1965-75

Laemmli U.K. **(1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; **Nature 227**:680-85

Lamoureux P., Altun-Gultekin Z.F., Lin C., Wagner J.A., and Heidemann S.R. **(1997)** Rac is required for growth cone function but not neurite assembly; **J. Cell Sci. 110**:635-41

Landau N.R. and Littman D.R. **(1992)** Packaging system for rapid generation of murine leukemia virus vectors with variable tropism; **J. Virol. 66**: 5110-13

Lanier L.M., Gates M.A, Witke W., Menzies A.S., Wehman A.M., Macklis J.D., Kwiatkowski D., Soriano P. and Gertler F.B **(1999)** Mena is required for neurulation and commisure formation; **Neuron 22**:313-25

Leaman D.W., Leung S., Li X., and Stark G.R. **(1996)** Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines; **FASEB J. 10**:1578-88

Leevers, S.J., Paterson, H.F. & Marshall, C.J. **(1994)** Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane*;* **Nature 369:** 411-414

Letourneau P.C. **(1978)** Chemotactic response of nerve fiber elongation to nerve growth factor; **Dev. Biol. 66:**183-96

Letourneau P.C., and Ressler A.H. **(1983)** Differences in the organization of actin in the growth cones compared with the neurites of cultured neurons from chick embryos; **J. Cell Biol. 97**:963-73

Leventhal P.S., Shelden E.A., Kim B., and Feldman E.L. **(1997)** Tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase during insulin like growth factor-I-stimulated lamellipodial advance; **J. Biol. Chem. 272 (8):**5214-18

Levi-Montalcinci R., and Calissano P. **(1979)** The nerve growth factor; **Sci Am. 240 (6):**68-77

Lewis A.K., and Bridgman P.C. **(1992**) Nerve growth cone lammelopodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity; **J. Cell Biol. 119**:1219-43

Lewis J.M., and Schwartz M.A. **(1998)** Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl; **J. Biol. Chem. 273 (23):**14225-30

Lewis J.M., Baskaran R., Taagepera S., Schwartz M.A., and Wang Y.J. **(1996)** Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93**: 15174-79

Liu Y.-Z., Boxer L.M., and Latchman D.S. **(1999)** Activation of the Bcl-2 promotor by nerve growth factor is mediated by the p42/44 MAPK cascade; **Nucleic Acids Res. 27**:2086-90

Loeb D.M., and Greene L.A. **(1993)** Transfection with trk restores "slow" NGF binding, efficient NGF uptake, and multiple NGF response to NGF-non-responsive PC12 mutants; **J. Neurosci 13:**2919-29

Longley B.J. Jr.; Metcalf D.D., Tharp M., Wang X., Tyrell L., Lu S.Z., Heitjan D., and Ma Y. **(1999)** Activating and dominant inactivating c-Kit catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis**; Proc.Natl. Acad. Sci. USA 96:**1609-14

Loureiro J., and Pfeifer M. (1998) Roles of Armadillo, a *Drosophila* catenin, during central nervous system development; **Curr. Biol. 8**:622-32

Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D. & Schlessinger, J. **(1992)** The SH2 and SH3 domain-containing protein Grb2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling; **Cell 70:** 431-442

Ma H., Kunes S., Schatz P.J. and Botstein D. **(1987)** plasmid construction by homologous recombination in yeast; **Gene 58:**201 -16

Macias M.J., Hyvonen M., Baraldi E., Schultz, J., Sudol M., Saraste M., and Oschkinat H. **(1996)** Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide; **Nature 382**:646-49

Maffei L., Berardi N., Domenici L., Parisi V., and Pizzorusso T. **(1992)** Nerve growth factor (NGF) prevents the shift in ocular dominance distribution of visual cortical neurons in monoocularly deprived rats**; J. Neurosci. 12:**4651-62

Maher P.A. **(1988)** Nerve growth factor induces protein-tyrosine phosphorylation; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:**6788-91

Mancini A., Koch A., Stefan M., Niemann H., and Tamura T. **(2000**) The direct association of the multiple PDZ domain containing proteins (MUPP-1) with the human c-Kit C-terminus is regulated by tyrosine kinase activity; **FEBS letters 482**:54-58

Mancini, A., Niedenthal, R., Joos, H., Koch, A., Trouliaris, S., Niemann, H. and Tamura, T. **(1997)** Identification of a second Grb2 binding site in the v-Fms tyrosine kinase; **Oncogene 15:** 1565-1572

Maniatis, T., Fristch, E.F. & Sambrook, J. **(1982) Molecular Cloning** Cold Spring Habor Laboratory Press, New York.

Marais R., Wynne J., and Treisman R. **(1993)** The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain; **Cell 73**:381-93

Marshall C.J. **(1995)** Specifity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation; **Cell 80**:179-85

Martin-Zanca D., Oskam R., Mitra G., Copeland T. and Barbacid M. **(1989)** Molecular and biochemical characterization of the human *trk* proto-oncogene; **Mol. Cell. Biol. 9(1)**:24-33

Mayer B.J., Jackson P.K., Van Etten R.A., and Baltimore D. **(1992)** Point mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding *in vitro* and transforming activity *in vivo*; **Mol. Cell Biol. 12**:609-18

Mayer, B.J., Hamaguchi, M. & Hanafusa, H. **(1988)** A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C; **Nature 332:** 272-275

McKnight, J., Kristie, T. & Roizman, B. **(1987)** Binding of the virion protein mediating alpha gene induction in herpes simplex virus 1-infected cells to its cis site requires cellular proteins; ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:** 7061-7065

Meakin S.O., MacDonald J.I.S., Gryz E.a., Kubu C.J., and Verdi J.M. **(1999)** The Signaling Adaptor FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA; **J. Biol. Chem. 274**:9861-70

Melo J.V. **(1996)** The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype; **Blood 88:**2375-84

Ming G.I., Lohof A.M., and Zheng J.Q. **(1997)** Acute morphogenic and chemotropic effects of neurotrophins an cultured embryonic Xenopus spinal neurons; **J. Neurosci. 17**:7860-71

Mohammadi M., Froum S., Hamby J.M., Schroeder M.C., Panek R.L., Le G.H., Eliseenkova A.V., Green D., Schlessinger J., and Hubbard S.R. **(1998)** Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain; **EMBO J. 17 (29):**5896-5904

Mohammadi M., Schlessinger J., and Hubbard S.R. **(1996**) Structure of th FGF receptor tyrosine kinase domain reveales a novel autoinhibitory mechanism; **Cell 86**, 577-87

Morley G.M., Uden M., Gullick W.J., and Dibb N.J. **(1999)** Cell specific transformation by c-fms activating loop mutations is attributable to constitutive receptor degradation; **Oncogene 18 (20):**3076-84

Morrison D.K., and Cutler R.E. **(1997)** The complexity of Raf-1 regulation**; Curr. Opin. Cell Biol. 9:**174-79

Mueller B.K. **(1999)** Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding**; Annu. Rev. Neurosci. 22:**351-88

Munshi N., Groopman J.E., Gil P.S., and Ganju R.K. **(2000)** C-Src mediates mitogenic signals and associates with cytoskeletal proteins upon vascular endothelial growth factor stimulation in Kaposi's Sarcoma cells; **J. Immunol. 164:**1169-74

Muragaki Y., Chou T.T., Kaplan D.R., Trojanowski J.Q., and Lee V.M.-Y. **(1997**)Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express trkA receptors; **J. Neurosci. 17**:530-42

Nakashima N., Rose D.W., Xiao S., Egawa K., Martin S.S., Haruta T., Saltiel A.R., and Olefsky J.M. **(1999)** The functional role of CrkII in actin cytoskeleton organization and mitogenesis; **J. Biol. Chem 274**:3001-8

Ong S.H., Guy G.R., Hadari Y.R., Laks S., Gotoh N., Schlessinger J., Lax I **(2000)** FRS2 Proteins recruit intacellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptor; **Mol. Cell Biol. 20 (3):**979-89

Overduin, M., Rios, C.B., Baltimore, D. & Cowburn, D. **(1992)** The three-dimensional solution structure of the SH2 domain of c-Abl*; **Cell* 70:** 697-704

Park S-Y., Avraham H., and Avraham S. **(2000)** Characterization of the tyrosine kinase RAFTK/Pyk2 and FAK in nerve growth factor-induced neuronal differentiation; **J. Biol. Chem. 275 (26):**19768-77

Pawson T**. (1995)** Protein modules and signaling network; **Nature 373**:573-80

Pellegrini S., and Dusanter-Fourt I. **(1997)** The structure, regulation and function of the Janus kinases(JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs); **Eur. J. Biochem. 248**:615-33

Peng X., Greene L.A., Kaplan D.R. and Stephens R.M. **(1995)** Deletion of a conserved Juxtamembrane sequence in Trk abolishes NGF-promoted neuritogenesis; **Neuron 15:** 395-406

Plattner R., Kadlec L., DeMali K.A., Kazlauskas A., and Pendergast A.M. **(1999)** c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF; **Genes and Development 13**:2400-11

Porter A.C., and Vaillancourt R.R. **(1998)** Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis; **Oncogene 17**:1343-52

Qian X., Riccio A., Zhang Y. and Ginty D. **(1998)** Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons; **Neuron 21**:1017-29

Ren, R., Mayer, B.J., Cichetti, P. & Baltimore, D. **(1993)** Identification of a ten amino acid proline-rich SH3 binding site*; **Science* 259:** 1157-1161

Renshaw M.W., Lea-Chou E., Wang J.Y.J **(1996)** Rac is required for v-Abl tyrosine kinase to activate mitogenesis; **Curr. Biol. 6**:76-83

Riedel H., Wng J., Hansen H. and Yousa N. **(1997)** PSM, an insulin-dependent, pro-rich, PH, SH2 domain containing partner of the insulin receptor; **J. Biochem. 122**:1105-13

Rivas R.J., Burmeister D.W., and Goldberg D.J. **(1992)** Rapid effects of laminin on the growth cone; **Neuron 8**:107-115

Rodriguez-Tebar A., Dechant G., Gotz R., and Barde Y. **(1992)** Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interaction with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor; **EMBO J. 11**:917-22

Rodriguez-Viciana P., Warne P.H., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry M.J., Waterfield M.D., and Downward J. **(1994)** Phosphatidylinositol 3-kinase activation as a direct target of Ras; **Nature 370**:527-32

Ross A.H., Daou M.-C., McKinnon C.A., Condon P.J., Lachyankar M.B., Stephens R.M., Kaplan D.R. and Wolf D.E. **(1996)** The neurotrophin receptor, gp75, forms a complex with the receptor tyrosine kinase TrkA; **J. Cell Biol. 132(5)**: 945-53

Roussel M.F., Downing J.R., Rettmier C.W., and Sherr C.J. **(1988)** A point mutation in the extracellular domain of the human CSF-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) activates its transforming potential; **Cell 55**:979-88

Roussel, M.F., Dull, T.J., Rettenmier, C.W., Ralph, P.R., Ullrich, A. & Sherr, C.J. **(1987)** Transforming potential of the c-fms proto-oncogene(CSF-1 receptor); **Nature 325:** 549-552

Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T. & Bowtell, D., **(1993)** The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1.**Nature 363:** 83-85

Rui L., Herrington J. and Carter-Su C. **(1999)** SH2-B is required for nerve growth factor-induced neuronal differentiation; **J. Biol. Chem. 274 (15):**10590-94

Saglia R., Li J.-L., Ewaniuk D.S., Pear W., Pisick E., Burky S.A., Ernst T., Sattler M., Chen L.B., Griffin J.D. **(1998)** BCR/Abl induces multiple abnormalities of cytoskeletal function; **J. Clin. Invest. 100**:46-57

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel B., Scharf S., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. **(1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostabile DNA polymerase; **Science 239**:487-91

Sanger F., Niklen S., Coulson A.R. **(1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:**5463-67

Sanger, F. **(1981)** Determination of nucleotide sequences in DNA*;* **Science 214:** 1205-1210

Santoro M.M., Penengo L., Minetto M., Orecchia S., Cilli M., and Gaudino G. **(1998)** Point mutations in the tyrosine kinases domain releases the oncogenic and metastatic potential of the Ron receptor; **Oncogene 17 (6):**741-49

Sawaka-Verhellen D., Tartare-Deckert S., White M.F. and Van Obberghen E. **(1996)** Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786; **J. Biol. Chem. 271 (11):**5980-83

Schaffhausen B **(1995**) SH2 domain structure and function; **Biochi. Biophys. Acta 1242:**61-75

Schlessinger J., and Ullrich A. **(1992)** Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases; **Neuron 9**:383-91

Schnell L., Schneider R., Kolbeck R. Barde Y.-A., and Schwab M.E. **(1994)** Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during the development and after adult spinal cord lesion; **Nature 367:**170-73

Seeley P.J., and Greene L.A. **(1983)** Short latency actions of nerve growth factor at the growth cone; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80**:2789.93

Segal R.A., Bhattacharyya A., Rua L.A., Alberta J.A., Stephens R.M., Kaplan D.R. and Stiles C.D. **(1996)** Differential utilization of Trk autophosphorylation sites; **J. Biol. Chem. 271 (33):** 20175-81

Skorski T., Nieborowska-Skorska M., Wlodarski P., Wasik M., Trotta M., Kanakaraj P., Salomoni P., Antonyak M., Martinez R., Majewski M., Wong A., Perussia B., and Calabretta B. **(1998)** The SH3 domain contributes to BCR/Abl-dependent leukemogenesis in vivo: Rols in adhesion, invasion and homing; **Blood 91**:406-418

Smith, D.B. & Johnson, K.S. **(1988)** Single-step purification of polypeptides expressed in Escvherichia coli as fusions with glutathione S-transferase; **Gene 67:** 31-40

Smith, M.R., Degudicibus, S.J. & Stacey, D.W. **(1986)** Requirement for c-Ras protein during viral oncogene transformation*;* **Nature 320:** 540-543

Snider W.D. and Johnson E.M. Jr. **(1989)** Neurotrophic molecules; **Ann Neurol. 26**:489-506

Snider W.D. **(1988)** Nerve growth factor enhances dendritic arborization of symathetic ganglion neurons in developing mammals; **J. Neurosci. 8**:2628-34

Snider W.D. **(1994)** Functions of neurotrophins during nervous system development: What Knockouts are teaching us; **Cell 77**:627-38

Songyang Z., Shoelson S.E., McGlade J., Olivier P., Pawson T., Bustelo X.R., Barbacid M., Sabe H., Hanafusa H., Yi T., et al. **(1994)** Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps, Fes, Grb2, HCP, SHC, Syc and Vav; **Mol. Cell Biol. 14 (4):**2777-85

Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnowski, S., Lechleider, R.J., Neel, B.G., Birge, R.B., Fajardo, J.E., Chou, M.M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B. & Cantley, L.C. **(1993)** SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences; **Cell 72:** 767-778

Southern, E.M. **(1975)** Detection of specific sequenzes among DNA fragments separated by gel electrophoresis; **J. Mol. Bio. 98:** 503-517

Southern, P.J. & Berg, P. **(1982)** Transformation of mammalian cells to antibody resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter*;* **J. Mol. Appl. Genet. 1:** 327-341

Stahl, M.L., Ferenz, C.R., Kelleher, K.L., Kriz, R.W. & Knopf, J.L. **(1988)** SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences*;* **Nature 332:** 269-272

Stephens R.M., Loeb D.M., Copeland T.D., Pawson T., Greene L.A. and Kaplan D.R. **(1994)** Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving Shc and PLC-γ 1 to mediate NGF response; **Neuron 12**: 691-705

Stevens C.F. **(1998)** Neuronal diversity: too many cell types for comfort?; **Curr. Biol. 8**:708-10

Stokoe D., Stephens L.R., Copeland T., Gaffney P.R., Reese C.B., Painter G.F., Holmes A.B., McCormick, F., and Hawkins P.T. **(1997)** Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B; **Science 277:**567-70

Swift S., Lorens J., Achacoso P., and Nolan G.P. **(1999)** Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems; **Current Protocols in Immunology Unit 10.28,** Suppl. 31

Tamura T., Mancini A., Joos H., Koch A., Hakim C., Dumanski J., Weidner K.M., and Niemann H. **(1999)** FMIP, a novel Fms-interacting protein, affects granulocyte/macrophage differentiation; **Oncogene 18**:6488-95

Tessier-Lavigne M., and Goodman C.S. **(1996)** The molecular biology of axon guidance; **Science 274**:1123-33

Tokunaga K., Taniguchi H., Yoda K., Shimizu M., and Sakiyama S **(1986)** Nucleotide sequence of a full-length cDNA for mouse cytoskeletal β-actin mRNA; **Nucl. Acids Res. 14**:2829

Torres M. and Bogenmann E. **(1996)** Nerve growth factor induces a multimeric TrkA receptor complex in neuronal cells that includes Crk, SHC and PLC-γ1 but excludes $p130^{CAS}$; **Oncogene 12**:77-86

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. **(1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets Procedure and some applications; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:** 4350-4354

Traverse S., Cohen P., Paterson H., Marshall C., Rapp U., and Grand R.J. **(1993)** Specific association of activated MAP kinase kinase kinase (Raf) with the plasma membranes of ras-transformed retinal cells; **Oncogene 8**:3175-81

Tzivion G., Luoz Z., and Avruch J. **(1998)** A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for raf kinase activity; **Nature 394:**88-92

Unkeless J.C., and Jin J. **(1997)** Inhibitory receptors, ITIM sequences and phsphatases**; Curr. Opin. Immunol. 9**:338-43

Vaillant A.R., Mazzoni I., Tudan C., Boudreau M., Kaplan D. R., and Miller F.D. **(1999)** Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neurite survival; **J. Cell Biol. 146**:955-66

Van der Geer P.S., Wiley V.K., Lai K.M., Stephens R., Kaplan D., Shoelson S. ans Pawson D. **(1995)** A conserved amino-terminal SHC domain binds to activated growth factor receptors and phosphotyrosine-containing peptides; **Curr. Biol 5:**404-12

Van der Geer, P., Lindberg, R.A. & Hunter, T. **(1994)** Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways; **Ann. Rev. Cell Biol. 10:** 251-257

Verdi J.M., Birren S.J., Ibanez C.F., Persson H., Kaplan D.R., Benedetti M., Chao M.V., and Anderson D.J. (1994) $p75^{LNGFR}$ regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells; Neuron 12:733-45

Vignais M.L., Sadowski H.B., Watling D., Rogers N.C., and Gilman M. **(1996)** Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and sTAT proteins; **Mol. Cell Biol. 16**:1759-69

Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. & Cooper, J.A. **(1993)** Mammalian ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf.**Cell 74:** 205-214

von Laer D., Thomsen S., Vogt B., Donath A. M., Kruppa J., Rein A., Ostertag W. and Stocking C. **(1998)** Entry of Amphotropic and 10A1 pseudotyped murine retroviruses is restricted in hematopoietic stem cell lines; **J. Virol. 72 (2):**1424-30

Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S.C., Pant, N., Baltimore, D., Birge, R.B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B.J., Overduin, M., Resh, M.D., Rios, C.B., Silverman, L. & Kurian, J. **(1992)** Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-Src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides; **Nature 358:** 646-653

Wang W.-L., Healy M.E., Sattler M., Verma S., Lin J., Maulik G., Stiles C.D., Griffin J.D., Johnson B.E. and Salgia R. **(2000)** Growth inhibition and modulation of kinase pathways of small cell lung cancer by novel tyrosine kinase inhibitor STI 571; **Oncogene 19**:3521-28

Wen S.-T., Jackson P. K., and van Etten R.A. **(1996)** the cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products; **EMBO J. 15 (7):**1583-95

Williams L.T. **(1989)** Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor; **Science 243:**1564-70

Wills Z., Bateman J., Korey C.A, Comer A, and Van Vactor D. **(1999a)** The tyrosine kinase Abl and its substrate enabled collaborate with the receptor phosphatase Dlar to control motor axon guidance; **Neuron 22**:301-12

Wills Z., Marr L., Zinn K., Goodman C.S., VanVactor D. **(1999)** Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the Drosophila embryo; **Neuron 22**:291-99

Woods D.F, and Bryant P.J. **(1991)** The disc-large tumor supressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localised at septate junctions; **Cell 66**:451-64

Wu D.-Y. and Goldberg D.J. **(1993)** Regulated tyrosine phosphorylation at the tips of growth cone filopodia; **J. Cell Biol. 123 (3):**653-64

Yamashita H., Avraham S., Jiang S., Dikic I., and Avraham H. **(1999)** The Csk homologous kinase associates with TrkA receptors and is involved in neurite outgrowth of PC12 cells; **J. Biol. Chem 274:**15059-65

Yano H., Cong F., Birge R.B., Goff S.P., and Chao M.V. **(2000)** Association of the Abl tyrosine kinase with the Trk nerve growth factor receptor; **J. Neurosci. Res. 59**:356-64

Yasukawa T., Kanei-Ishii C., Maekawa T., Fujimoto J., Yamamoto T., Ishii S. **(1995)** Increase of solubility of foreign proteins in Escherichia coli coproduction of the bacterial thioredoxin, **J. Biol. Chem. 270 (43):** 25328-31

Yokouchi M., Suzuki R., Masuhara M., Komiya S., Inoue A., and Yoshimura A. **(1997)** Cloning and characterization of APS an adaptor molecule containing PH and SH2 domains that is tyrosine phosphorylated upon B-cell receptor stimulation; **Oncogene 15**:7-15

Yu H.-H., Zisch A.H., Dodelet V.C., and Pasquale E.B. **(2000)** Multivalent signaling interaction of Abl and Arg kinases with the EphB2 receptor; Meeting on Tyrosine Phosphorylation and Cell Signaling, The Salk Institute La Jolla, USA, Aug. 9-13,2000, p.35

Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. & Schreiber , SL **(1994)** -Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains; **Cell 76:** 933-945

Yuan Z.-M., Shioya H., Ishiko T., Sun X., Gu J., Huang Y.Y., Lu H., Kharbanda S., Weichselbaum R., and Kufe D. **(1999)** p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage**; Nature (London) 399:** 814-17

Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J., and Korsmeyer S.J. **(1996)** Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X; **Cell 87:**619-28

Zhang B., Tavare J.M., Ellis L., and Roth R.A. **(1991)** The regulatory role of known tyrosine autophosphorylation sites of the insulin receptor kinase domain. An assesment by replacement with neutral and negatively charged amino acids; **J. Biol. Chem. 266**:990-96

Zhang Z., Tarone G., and Turner D.C. **(1993)** Expression of integrin alpha 1 beta 1 is regulated by nerve growth factor and dexamethasone in PC12 cells. Functional consequences for adhesion and neurite outgrowth; **J. Biol. Chem. 168:**5557-65

Zhou M.M., Huang B., Olejniczak E.T., Meadows R.P. Shuker S.B., Miyazaki M., Trub T. Shoelson S.E., and Fesik S.W. **(1996)** Struktural basis for IL-4 receptor phosphopeptide recognition by the IRS-1 PTB domain; **Nat. Struct. Biol. 3:**388-393

Zhou M.M., Margolis B., Chaudhuri M., Shoelson S.E., and Cantley L.C. **(1995)** The phosphotyrosine interaction domain of Shc recognizes tyrosine-phosphorylated NPXY motif; **J. Biol. Chem. 270:**14863-66

Teile dieser Arbeit wurden aus Prioritätsgründen bereits zuvor veröffentlicht:

Koch A., Mancini A., Stefan M., Niedenthal R., Niemann H. and Tamura T. **(2000)** Direct Interaction of nerve growth factor receptor, TrkA, with non-receptor tyrosine kinase c-Abl, through the activation loop; FEBS Letters, **469 (1)**, 72-76

8 Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

TABELLE 2.1: NEUROTROPHINREZEPTOREN UND IHRE LIGANDEN NACH KAPLAN & MILLER (1997)..... 4
TABELLE 2.2: FUNKTIONEN VON NGF/TRKA IN NEURONALEN ZELLEN (SNIDER, 1994)..... 5
TABELLE 5.1: WECHSELWIRKUNG VERSCHIEDENER AN REZEPTORTYROSINKINASEN BINDENDE PROTEINE MIT TRKA. 76
TABELLE 5.2: IM HEFE-ZWEI-HYBRID-SCREENING MIT TRKA INTERAGIERENDE PROTEINE 77

8.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 2.1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER TRK-FAMILIE 7
ABBILDUNG 2.2: AMINOSÄURESEQUENZ DER KATALYTISCHEN SCHLEIFE UND DER AKTIVIERUNGSSCHLEIFE VON HUMANEM TRKA (EIN-BUCHSTABEN-CODE)..... 8
ABBILDUNG 2.3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINIGER ZIELPROTEINE VON REZEPTORTYROSINKINASEN MIT IHREN PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONSDOMÄNEN. ... 9
ABBILDUNG 2.4: ALLGEMEIN BENUTZE SIGNALWEGE VON REZEPTORTYROSINKINASEN (VARIIERT NACH PORTER & VAILLANCOURT, 1998). 11
ABBILDUNG 2.5: WICHTIGSTE SIGNALTRANSUKTIONSWEGE DER REZEPTORTYROSINKINASE TRKA 14
ABBILDUNG 2.6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER FUNKTIONELLEN DOMÄNEN DES MURINEN C-ABL NACH VAN ETTEN (1999). 15
ABBILDUNG 2.7: AUSWACHSENDER NEURIT EINER PC12-ZELLE IN EINER DREIDIMENSIONALEN KOLLAGENMATRIX. 19
ABBILDUNG 4.1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES HEFE-ZWEI-HYBRID-SYSTEMS..... 54
ABBILDUNG 4.2: PLASMIDE DES HEFE-ZWEI-HYBRID-SYSTEMS (NACH BARTEL & FIELDS, 1995)..... 55
ABBILDUNG 4.3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES RETROVIRALEN TRANSFEKTIONSSYSTEMS..... 68
ABBILDUNG 5.1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DOMÄNENSTRUKTUR VON C-ABL, PLC-γ UND SH2-B. 78
ABBILDUNG 5.2: SOWOHL DIE MUTATION K538M ALS AUCH D668V VERRINGERN DIE BINDUNGSSTÄRKE VON PLC-γ, SHC, SH2-B UND C-ABL AN TRKA IM HEFE-ZWEI-HYBRID-SYSTEM. 79
ABBILDUNG 5.3: KIAA0017 BINDET AUSSCHLIEßLICH AN TRKA; C-ABL ZEIGT EINE ÄHNLICHE BINDUNGSSPEZIFITÄT WIE PLC-γ. 81
ABBILDUNG 5.4: BEVORZUGTE BINDUNGSMOTIVE DER SH2-DOMÄNEN VON ABL UND PLC-γ-1C NACH SONGYANG ET AL. (1993, 1994). 82
ABBILDUNG 5.5: EXPRESSION UND FUNKTIONALITÄT DER KINASE DER IM HEFE-ZWEI-HYBRID-SYSTEM EINGESETZTEN TRKA-MUTANTEN..... 83
ABBILDUNG 5.6: ABL UND KIAA0017 INTERAGIEREN MIT TRKA DURCH EINEN NEUEN BINDUNGSMECHANISMUS..... 85
ABBILDUNG 5.7: *IN VITRO* KINASE-ASSAY DER TRKA ÜBEREXPRIMIERENDEN MAUSFIBROBLASTENZELLINIE T15. 87
ABBILDUNG 5.8: GST-ABL BINDET DIREKT AN DEN AUTOPHOSPHORYLIERTEN REZEPTOR TRKA. 88

ABBILDUNG 5.9: C-ABL BINDET AN PHOSPHOTYROSINRESTE IN DER AKTIVIERUNGSSCHLEIFE VON TRKA. 90
ABBILDUNG 5.10: PUNKTMUTATION DER EINZELNEN TYROSINRESTE IN DER AKTIVIERUNGSSCHLEIFE VON TRKA REDUZIEREN DIE BINDUNG VON C-ABL, VERHINDERN SIE ABER NICHT. 92
ABBILDUNG 5.11: DIFFERENZIERUNG VON PC12-ZELLEN NACH STIMULATION MIT NGF... 93
ABBILDUNG 5.12: NGF STIMULIERT DIE TYROSINPHOSPHORYLIERUNG VERSCHIEDENER PROTEINE IN PC12-ZELLEN. 94
ABBILDUNG 5.13: TYROSINPHOSPHORYLIERTE PROTEINE KONZENTRIEREN SICH AN DEN SPITZEN DER AUSWACHSENDEN NEURITEN. 95
ABBILDUNG 5.14: FACS-DATEN EINER ZELL-SORTIERUNG MIT EINEM MOFLOW-DURCHFLUßZYTOMETER. 98
ABBILDUNG 5.15: EXPRESSION DER ABL-SH2-DOMÄNE IN PC12-ZELLEN. 99
ABBILDUNG 5.16: BCR-ABL INTERAGIERT MIT TRKA UNABHÄNGIG VON DESSEN STIMULATION DURCH NGF. 100
ABBILDUNG 5.17: DER ABL-INHIBITOR STI 571 (NOVARTIS) UNTERDRÜCKT DIE NEURITENBILDUNG IN PC12-ZELLEN. 102
ABBILDUNG 5.18: PC12 UND HEK293-ZELLEN EXPRIMIEREN MENA, DAS SÄUGERHOMOLOG DES ABL-SUBSTRATS „ENABLED“ AUS *DROSOPHILA*. 104
ABBILDUNG 5.19: NGF INDUZIERT DAS PROTEIN MENA. 105
ABBILDUNG 5.20: NORTHERNBLOT-ANALYSE VON NGF-STIMULIERTEN PC12-ZELLEN... 106
ABBILDUNG 6.1: STRUKTURMODELL DES REZEPTORS TRKA NACH CUNNINGHAM & GREENE (1998) BASIEREND AUF DEN RÖNTGENSTRUKTURDATEN DES INSULINREZEPTORS. 111
ABBILDUNG 6.2: SEQUENZEN DER KATALYTISCHEN UND DER AKTIVIERUNGSSCHLEIFEN DER REZEPTORTYROSINKINASEN TRKA, INSULINREZEPTOR, C-MET, C-RON, C-FMS, C-KIT UND ALK. 113
ABBILDUNG 6.3: SCHEMATISCHE STRUKTUR DER HOMOLOGEN PROTEINE MENA UND ENA. 117
ABBILDUNG 6.4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG SELEKTIVER SIGNALWEGE DER ABL-KINASE IM WACHSTUMSKEGEL, DIE MIT UMBAUPROZESSEN DES ZYTOSKELETTS IN VERBINDUNG GEBRACHT WERDEN. 119

8.3 Lebenslauf

Name:	Koch	
Vorname:	Alexandra	
wohnhaft:	Ellernstr.14	
	30175 Hannover	
geboren am:	02.03.1972	
in:	Rheydt, heute Mönchengladbach	
Familienstand:	ledig	
Eltern:	Vater:	Karl-Peter Koch, Beamter a.D.
	Mutter:	Ingrid Koch, geb. Gosdek, Hausfrau

Schulbildung:	14.08.1978 - 14.07.1982	Besuch der Ev. Grundschule Morr in Mönchengladbach
	Okt. 1982 - 28.06.1991	Besuch des städtischen Gym. a. d. Gartenstraße in Mönchengladbach
	28.06.1991	Abitur
Studium:	seit Okt. 1991	Studium der Biochemie an der Universität Hannover
	Mai 1996 - 04.11.1996	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie in Hannover bei PD Dr. J. Adamski zum Thema: "Expression der zwei N-terminalen Domänen der Hydratase-Dehydrogenase-Epimerase aus Candida Tropicalis“
	04.11.1996	Diplom mit der Gesamtnote sehr gut bestanden

Beruflicher Werdegang:

15.04. - 30.06.1994	Studentische Hilfskraft: Chemisches Praktikum für Studenten der Allgemein- und Zahnmedizin, Abteilung Medizinische Chemie der MHH
01.10. - 31.12.1995	Biochemisches Praktikum für Studenten der Allgemein- und Zahnmedizin, Zentrum Biochemie der MHH
seit 01.01.1997	Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physikalische Chemie, OE 4310, der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH), Carl-Neuberg-Str. 1, D-30625 Hannover, in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Teruko Tamura-Niemann zum Zwecke der Promotion

Veröffentlichungen:

Identification of a second Grb2 binding site in the v-Fms tyrosine kinase. Mancini A, Niedenthal R, Joos H, Koch A, Trouliaris S, Niemann H, Tamura T. (1997) Oncogene, **15**, 1565-1572

FMIP, a novel Fms-interacting protein, affects granulocyte/macrophage differentiation. Tamura T, Mancini A, Joos H, Koch A, Hakim C, Dumanski J, Weidner KM, Niemann H. (1999) Oncogene, **18**, 6488-6495.

Direct Interaction of nerve growth factor receptor, TrkA, with non-receptor tyrosine kinase c-Abl, through the activation loop. Koch A, Mancini A, Stefan M, Niedenthal R, Niemann H and Tamura T. (2000) FEBS Letters, **469 (1)**, 72-76

The direct association of the multiple PDZ domain containing proteins (MUPP-1) with the human c-Kit C-terminus is regulated by tyrosine kinase activity. Mancini A., Koch A., Stefan M., Niemann H. and Tamura T. (2000) FEBS Letters **482**, 54-58