

MARTA BAKSALERSKA-PAZERA i GRAŻYNA NIEWIADOMSKA

Zakład Neurofizjologii

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: gwn@nencki.gov.pl

NGF NA SZLAKU, CZYLI PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU TROFICZNEGO W NEURONIE

WSTĘP

Neurotrofiny to grupa spokrewnionych białek syntetyzowanych w komórkach tkanek unerwianych poprzez neurony czuciowe i współczulne obwodowego układu nerwowego oraz w neuronach niektórych struktur mózgu. W skład rodziny klasycznych neurotrofin wchodzi: czynnik wzrostu nerwów (ang. nerve growth factor, NGF), czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor, BDNF), neurotrofina-3 (ang. neurotrophin-3, NT-3), neurotrofina-4 (ang. neurotrophin-4, NT-4), neurotrofina-6 (ang. neurotrophin-6, NT-6) i neurotrofina-7 (ang. neurotrophin-7, NT-7). Słabo poznana jest rola neurotrofiny-6 i neurotrofiny-7 w układzie nerwowym ssaków. Pierwszą substancją odkrytą i scharakteryzowaną jako związek o działaniu neurotroficznym był czynnik wzrostu nerwów. NGF, tak jak inne neurotrofiny, działa jako substancja sygnałowa pomiędzy komórkami, które go syntetyzują i komórkami, które nań odpowiadają. Od kilku lat substancjom tym poświęca się bardzo wiele uwagi, albowiem troficzne właściwości neurotrofin mogą być wykorzystane w próbach naprawy uszkodzonego układu nerwowego lub w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (NIEWIADOMSKA i MAŁECKI 1998).

Jedną z najlepiej poznanych neurotrofin jest NGF. Jego rola troficzna w stosunku do obwodowych neuronów współczulnych i czuciowych jest bardzo dobrze udokumentowana (THOENEN i współaut. 1987, VANTINI i SKAPER 1992). NGF wywiera podobne działanie także w ośrodkowym układzie nerwowym. Spośród różnych tkanek organizmu najwyższy poziom syntezy NGF-mRNA oraz białka NGF obserwowano w mózgu (MAISONPIERRE i współaut. 1990), szczególnie w nowej korze, hipokampie oraz

jądrach części przedniej mózgu (KORSCHING 1986, THOENEN i współaut. 1987). Na podstawie wielu obserwacji uznaje się, że populacją neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym szczególnie wrażliwą na NGF są neurony cholinergiczne okolicy podstawnej mózgu. Wydaje się, że obecność NGF jest niezbędna, nie tylko do prawidłowego rozwoju układu cholinergicznego, ale także do jego funkcjonowania w czasie dorosłego życia. Układ cholinergiczny jest ściśle związany z procesami uczenia się i pamięci. Ponieważ zaburzenia pamięci u pacjentów z chorobą Alzheimera skorelowane są z obniżeniem poziomu markerów cholinergicznym w korze mózgu (MESULAM i GEULA 1988, 1991; PASQUAL i współaut. 1991; PARASURAMAN i współaut. 1992; BLUSZTAJN i BERSE 2000) strategię polegającą na polepszeniu przewodnictwa cholinergicznego budzą nadzieję na skuteczną terapię (THAL 1994, SMITH i współaut. 1999). Wyniki uzyskane w modelach zwierzęcych zachęcają do wykorzystania neurotrofin w próbach leczenia pacjentów z chorobą Alzheimera. W badaniach tych wykazano, że egzogenne infuzje NGF chronią neurony cholinergiczne przed atrofią, zwiększają syntezę acetylocholinę oraz powodują poprawę pamięci w testach behawioralnych (FISHER i współaut. 1987, MARKOWSKA i współaut. 1994, NIEWIADOMSKA i współaut. 2000). Zakłada się, że długotrwałe domózgowe podawanie egzogennej NGF mogłoby stanowić element terapii u pacjentów z chorobą Alzheimera. Rośnie liczba doniesień uzasadniających racjonalność użycia NGF w postępowaniu klinicznym (OLSON i współaut. 1992, 1994; SMITH i współaut. 1999). Również pozostałe neurotrofiny mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu uszkodzeń w układzie ruchowym (TUSZYŃSKI i współaut. 1996, WANG i współaut.

1996) i układzie słuchowym (STAECKER i współaut. 1996).

W układzie nerwowym istnieje pozytywne sprzężenie zwrotne pomiędzy neuronami cholinergicznymi a neuronami docelowymi ich projekcji w korze i w hipokampie (SOFRONIEW i MOBLEY 1993). Neurotrofiny pochodzące z miejsc docelowych projekcji regulują funkcje cholinergiczne neuronów okolicy podstawnej, powodując zwiększenie syntezy acetylotransferazy cholinowej oraz hipertrofię tych neuronów. Wzrost aktywności cholinergicznej jest z kolei sygnałem zwrotnym, podnoszącym poziom syntezy neurotrofin w miejscach docelowych projekcji. Zatem przekazanie *in vivo* sygnału przez neurotrofiny zależy od mechanizmów transportu aksonalnego. Być może, nie tyle niedobór neurotrofin, co zaburzenia tych mechanizmów, są podłożem zmian patologicznych obserwowanych w czasie starzenia się lub w stanach chorobowych. U starych zwierząt obserwowano zmniejszoną zdolność neuronów cholinergicznymi do pobierania i transportowania NGF, co z kolei prowadziło do atroficznymi zmian w tych neuronach. Dane eksperymentalne pokazały, że u pacjentów z chorobą Alzheimer'a poziom NGF jest nie obniżony, a nawet nieco wyższy niż w normie (JETTE i współaut. 1994, SCOTT i współaut. 1995). Jednocześnie udowodniono, że wsteczny transport NGF przez neurony cholinergiczne z miejsc docelowych ich projekcji jest upośledzony w chorobie Alzheimer'a (SOBREVIELA i współaut. 1994, MUFSON i współaut. 1997). Założono zatem, że jeżeli nawet nie zmienia się poziom NGF, to pewne wewnątrzkomórkowe zaburzenia w neuronach cholinergicznymi powodują niezdolność do wykorzystania osłaniającego działania neurotrofin. Przypuszcza się, że przyczyną zaniku cholinergicznego fenotypu neuronów okolicy podstawnej mogą być zaburzenia w aparacie tubu-

larnym transportu aksonalnego związane ze starzeniem się. To z kolei może prowadzić do zaniku dokorowej projekcji cholinergicznymi i dalszych zmian neurodegeneracyjnych.

Wobec tych faktów, poznanie mechanizmów przekazywania sygnału indukowanego przez neurotrofiny *in vivo* ma ogromne znaczenie. Zdarzenia towarzyszące przekazywaniu sygnału troficznego w układzie nerwowym można podzielić na kilka etapów: uwolnienie neurotrofin przez błonę postsynaptyczną, kierowanie uwolnionej neurotrofiny do błony presynaptycznej, w której znajdują się jej receptory, połączenie się neurotrofiny z receptorem, internalizacja kompleksu neurotrofina-receptor, transport kompleksu ligand-receptor wzdłuż aksonu, przekazanie sygnału neurotroficznego do jądra, degradacja sygnału neurotroficznego.

W przypadku NGF, większość danych dotyczących zdarzeń molekularnych zachodzących w komórce po jego związaniu z receptorami pochodzi z badań *in vitro* i w zasadzie dotyczy końcowego etapu w łańcuchu zdarzeń, czyli przekazania sygnału od błony komórkowej poprzez cytoplazmę do jądra. Jednak specyficzną cechą układu nerwowego w warunkach *in vivo* jest to, iż sygnał troficzny przenoszony jest z końca aksonu do wnętrza komórki. W przypadku neuronów w obwodowym układzie nerwowym droga ta często przekracza jeden metr. Do niedawna znano niewiele faktów dotyczących mechanizmów przenoszenia sygnału wzdłuż aksonu. Dopiero publikacje ostatnich kilku lat przynoszą informacje na ten temat. Wydaje się, że w uzupełnieniu do wcześniejszych publikacji (SKUP 1997, NIEWIADOMSKA i MAŁECKI 1999), dotyczących losów sygnału troficznego w cytoplazmie komórki, warto przedstawić także zdarzenia, jakie mają miejsce w czasie wędrówki sygnału z końca aksonu do ciała neuronu.

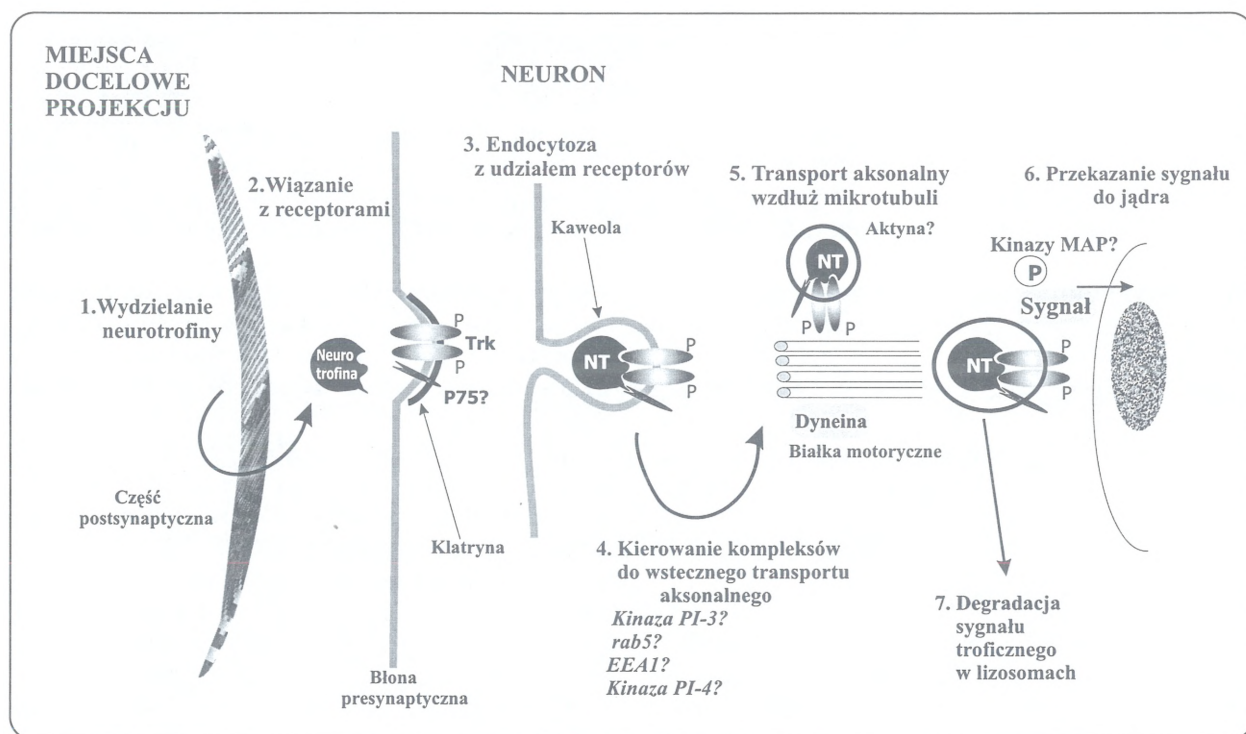
PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU TROFICZNEGO W UKŁADZIE NERWOWYM

W komórkach nieneuronalnych droga przekazywania sygnału jest krótka i prosta. Poprzez kaskadę zdarzeń biochemicznych, wywołanych połączeniem substancji czynnej z jej receptorem, informacja przenosi się z błony komórkowej do jądra. Neurony, z racji swojej budowy, mają szczególne problemy w komunikowaniu się ze sobą. Długość komórki nerwowej, często przekraczająca kilka lub kilkadziesiąt centymetrów, stanowi poważne wyzwanie dla aparatu biochemicznego przenoszącego sygnały z zakończeń aksonalnych do jądra. Od 1970 r., kiedy odkryto wsteczny transport aksonalny,

jest oczywiste, że większość substancji sygnałowych w układzie nerwowym wywiera swoje działanie wykorzystując ten mechanizm. Podobnie rzecz ma się z neurotrofinami. Przekazywanie sygnału troficznego drogą wstecznego transportu aksonalnego jest złożonym procesem, którego kolejne etapy zostaną omówione w tym artykule (Ryc. 1).

UWALNIANIE NEUROTROFIN

Każda neurotrofina jest syntetyzowana z białek prekursorowych, które pod wpływem



Ryc. 1. Kolejne etapy wstecznego transportu sygnału troficznego w komórkach nerwowych *in vivo*.

Tkanki docelowe projekcji nerwowej wydzielają neurotrofiny (NT), które wiążą się ze specyficznymi dla nich receptorami o wysokim powinowactwie (Trk) i ze wspólnymi dla wszystkich neurotrofin receptorami o niskim powinowactwie (p75), usytuowanymi w błonie cytoplazmatycznej zakończeń aksonalnych (błona presynaptyczna). Częsteczki neurotrofiny w kompleksie z receptorami są internalizowane na drodze endocytozy zależnej od receptorów i zamykane w pęcherzykach opłaszczonych klatryną, bądź w kaweolach lub endosomach. Pęcherzyki są sortowane i kierowane do wstecznego transportu aksonalnego przy udziale kinazy tri — (PI-3) i tetrafosfatydyloinozytolu (PI-4) oraz białek rab5 i EEA1. Wsteczny transport aksonalny opłaszczonych kompleksów NT-receptor odbywa się po mikrotubulach dzięki aparatowi motorycznemu dyneiny cytoplazmatycznej. Po dotarciu do cytoplazmy perykarionu sygnał troficzny zostaje przekazany do jądra z udziałem kinaz MAP, a NT jest transportowana do lizosomów, gdzie ulega degradacji

procesów wewnątrzkomórkowych ulegają zmianie w dojrzałą formę białka. W układzie nerwowym neurotrofiny mogą pochodzić z tych samych komórek, na które oddziałują (tzw. działanie autokrynne, autoregulujące czynność troficzną komórki) lub z komórek sąsiadujących z tymi, na które oddziałują (tzw. działanie parakrynne). Jednak NGF jest najczęściej uwalniany przez komórki leżące w odległych miejscach od neuronów, od których otrzymują one unerwienie (Ryc. 1).

Do uwalniania NGF nie jest konieczna ani glikolizacja końca N cząsteczki, ani jej proteoliza. Wydzielanie NGF zależy natomiast od aktywności bioelektrycznej neuronu i zachodzi pod warunkiem depolaryzacji błony i dostępności jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych zasobów (HEYMACH i współaut. 1996).

Uwalnianie NGF z komórek mięśni gładkich naczyń, w których główne unerwienie stanowią neurony współczulne jest możliwe dzięki obecności podwyższonego stężenia wazopresyny i angiotensyny II oraz aktywacji receptora α -

adrenergicznego. Obecność hormonów oraz wydzielanie neurotransmitera przez neurony współczulne powoduje skurcz mięśniówki naczyni, co z kolei prowadzi do uwalniania NGF przez komórki mięśniowe (TUTTLE i współaut. 1993).

Wiele badań koncentruje się na wydzielaniu neurotrofin w neuronach CNS w odpowiedzi na sygnał z neuronu presynaptycznego. W skrawkach hipokampa szczura i w pierwszorzędnym kulturach neuronów hipokampalnych uwalnianie NGF zależy od aktywności bioelektrycznej błony i zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Na. Wpływ na uwalnianie NGF mają także wewnątrzkomórkowe zasoby Ca^{2+} , natomiast poziom poza komórkowych jonów wapnia nie odgrywa istotnej roli w procesie wydzielania NGF (BLOCHL i THOENEN 1995).

Ostatnio okazało się, że egzogenne podanie neurotrofin indukuje wydzielanie endogennych neurotrofin i to z części presynaptycznej. Neurotrofiny posiadają zatem zdolność do regulacji procesu uwalniania neurotrofin. W badaniach

na neuronach hipokampalnych i komórkach linii PC12 traktowanych egzogennym czynnikiem troficznym stwierdzono, że podanie czynnika troficznego spowodowało indukcję wydzielania neurotrofin przez wymienione neurony i komórki (CANOSSA i współaut. 1997). Podobnie jak uzależnione od aktywności, tak i zależne od indukcji neurotroficznego wydzielania neurotrofin wymaga dostępności jonów wapnia z jego wewnątrzkomórkowej puli. Uwalnianie neurotrofin indukowane przez neurotrofiny odbywa się na zasadzie pozytywnego sprzężenia zwrotnego. Wydzielone tą drogą neurotrofiny wiążą się z receptorami Trk obecnymi w błonie presynaptycznej, co prowadzi do wzmocnienia i stabilizacji połączeń synaptycznych (THOENEN 1995).

PRZYŁĄCZANIE SIĘ NEUROTROFIN DO RECEPTORA

Wszystkie klasyczne neurotrofiny posiadają zdolność do wiązania się i aktywowania specyficznych dla siebie receptorów z rodziny kinaz tyrozynowych Trk. NGF aktywuje receptor TrkA, BDNF i NT-4 mogą aktywować receptor TrkB, natomiast NT-3 preferuje aktywację TrkC, ale wykazuje również zdolność do aktywacji receptora TrkA i TrkB. Wszystkie sklonowane receptory neurotrofin są jednołańcuchowe, zbudowane z podjednostek i składają się z trzech domen: zewnątrzkomórkowej, która zawiera miejsca wiążące neurotrofinę; transbłonowej, która kotwaczy receptor w błonie komórkowej i domeny wewnątrzkomórkowej (cytoplazmatycznej) (SKUP 1997).

Na podstawie badań kinetyki reakcji wiązania liganda z receptorem stwierdzono dwa typy receptorów NGF: receptory TrkA i $p75^{NTR}$, z których każdy ma zdolność wiązania NGF. Receptor $p75^{NTR}$ ma masę cząsteczkową 75kD i niskie powinowactwo do NGF. Receptor NGF o wysokim powinowactwie do liganda to białko enzymatyczne, kinaza tyrozyny (TrkA lub gp^{140trk}) o masie cząsteczkowej 140kD. TrkA jest produktem protoonkogenu *trk* i ma zdolność wiązania NGF zarówno sam, jak i w kompleksie z receptorem $p75^{NTR}$ (CHAO i HEMPSTEAD 1995). Aktywacja jednego lub drugiego receptora przez NGF powoduje odmienne skutki. Sygnał troficzny, powodujący różnicowanie i przeżywanie komórek przenoszony jest przez receptor TrkA. Pobudzenie wyłącznie receptorów $p75^{NTR}$ może wywoływać efekty troficzne, takie jak pobudzenie migracji i różnicowania neuronów, ale może również prowadzić, podobnie jak stymulacja innych receptorów cytokin z rodziny TNF, do hydrolizy sfingolipidów, produkcji ceramidu i w konsekwencji do programowanej

śmierci komórek, czyli apoptozy. Nie wiadomo, w jaki sposób receptor $p75^{NTR}$ raz działa jako czynnik neuroprotektyny, a innym razem jako czynnik promujący apoptozę (FEINSTEIN i współaut. 1995, NIEWIADOMSKA i MAŁECKI 1999).

Rola, jaką odgrywa receptor $p75^{NTR}$ w przyłączaniu neurotrofin, nie jest jasna. Istnieje kilka hipotez próbujących wyjaśnić to zjawisko. Najnowsze dane (BIBEL i współaut. 1999, BRENNAN i współaut. 1999) sugerują, że receptor $p75^{NTR}$ moduluje aktywność receptora TrkA tworząc z nim kompleksy. Sygnał troficzny przenoszony przez receptory TrkA ulega wzmocnieniu dzięki współdziałaniu z receptorem $p75^{NTR}$. Ponadto wysoka aktywność receptorów TrkA hamuje syntezę ceramidu i blokuje sygnał uruchamiający proces apoptozy przekazywany przez receptor $p75^{NTR}$.

Pierwszym etapem transmisji sygnału troficznego jest związanie się NGF z TrkA (Ryc. 1). Związanie NGF z receptorem prowadzi do agregacji sąsiadujących receptorów i tworzenia homodimerów NGF-TrkA. Możliwe, że dochodzi także do oligomeryzacji receptorów i tworzenia klasterów podobnie, jak ma to miejsce dla innych receptorów typu kinazy tyrozyny (VANT HOF i współaut. 1989). Prawdopodobnym jest, że tworzenie klasterów NGF-TrkA zależy od udziału cytoszkieletu aktywnego, którego udział udowodniono w przypadku naskórkowego czynnika wzrostu EGF (VAN BELZEN i współaut. 1990). Oligomeryzacja powoduje wzrost powinowactwa receptora do liganda. Indukuje także zmiany konformacyjne w części zewnątrzkomórkowej receptora, co prowadzi do pobudzenia części cytoplazmatycznej, do autofosforylacji reszt tyrozynowych i do wzrostu aktywności kinazy tyrozynowej.

ENDOCYTOZA KOMPLEKSU NEUROTROFINA-RECEPTOR

NGF po związaniu się z receptorem ulega tzw. sekwestracji. Następuje ograniczenie dostępności powstałego kompleksu dla czynników zewnątrzkomórkowych, a następnie internalizacja kompleksu do wnętrza aksonu. Wykazano, że w tym procesie biorą udział zarówno receptory TrkA, jak i $p75^{NTR}$ i że zależy on od wzajemnej interakcji zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych domen obu receptorów NGF (GARGANO i współaut. 1997).

Internalizacja kompleksu NGF-receptor zachodzi dzięki endocytozie zależnej od receptorów (Ryc. 1). Dane eksperymentalne wskazują, że cała pula NGF może ulegać endocytozie trzema różnymi drogami. Pierwszą z nich jest pobieranie NGF z udziałem pęcherzyków opłaszczonych klatryną i α -adaptyną. Drugą jest nie-

zależny od klatryny proces endocytozy, w którym pośredniczy aktywna, a trzecią, odkrytą w ciągu ostatnich kilku lat, jest endocytoza kompleksów NGF-TrkA zamkniętych w małych organellach zwanych kaweolami.

KAWEOLE

GRIMES i współaut. (1996, 1997) stwierdzili w swoich badaniach, że 10% związanego NGF znajduje się w małych pęcherzykach, które nie były pęcherzykami otoczonymi klatryną, były różne od pęcherzyków synaptycznych i wczesnych pęcherzyków endocytarnych. Te małe pęcherzyki są ważnymi organellami, które mogą zapewniać sortowanie i transport sygnału neurotroficznego wzdłuż aksonu do wnętrza komórki. Takimi pęcherzykami są kaweole.

W 1955 r. YAMADA, który w swoich badaniach zaobserwował, że komórki nabłonka woreczka żółciowego tworzą „małe pęcherzyki, jamki, wgłębienia, wnęki lub kieszonki komunikujące się z otoczeniem”, zaproponował, aby nazwać je *caveolae intracellularis* (małe jamki wewnątrzkomórkowe). Nazwa kaweole przyjęła się, a ponadto okazało się, że kaweole występują powszechnie w komórkach organizmu. Najnowsze badania wskazują, że kaweole nie są jedynie tworami strukturalnymi, ale zawierają bardzo złożony aparat molekularny, służący do transdukcji sygnału i stanowiący jeden z elementów systemu kompartmentalizacji przekazywania sygnału w komórce (ANDERSON 1998).

Kaweole zbudowane są z białek, kaweolin, będących jednymi z białek błonowych. Kaweoliny są produktem 4 multigenów: *kaweoliny-1 α* , *kaweoliny-1 β* , *kaweoliny-2* i *kaweoliny-3*. Kaweolina-1 i -3 są bogate w cysteinę. Ekspresja kaweoliny-1 w komórkach jest skorelowana z pojawianiem się kaweoli. Jednak w niektórych typach kaweoli nie stwierdzono obecności kaweoliny-1, co może sugerować, że nie jest to białko odpowiedzialne za mechaniczne formowanie kształtu błon, a raczej białko sygnałowe. Kaweoliny mogą asocjować białka G, Ras, Src, receptory kinazy tyrozynowej, izoformy syntazy tlenu azotu oraz kinazy białkowej C poprzez bezpośrednią interakcję białko-białko (WU i współaut. 1997). Obecność w kaweolach dużej liczby substancji związanych z transdukcją sygnału świadczy o tym, że są one zaangażowane nie tylko w transport, ale także w integrację i przetwarzanie informacji w błonie cytoplazmatycznej (ANDERSON 1998, MASSERINI i współaut. 1999).

Mimo, że w komórkach nerwowych obserwowano struktury podobne do kaweoli, to początkowe badania nie wykazywały obecności

kaweolin, uważanych za główny czynnik identyfikacji kaweoli, w tkance nerwowej. Jednak doniesienia ostatnich kilku lat pokazują, że białka te występują w błonie komórek nerwowych kory mózgu i mózdzku (CAMERON i współaut. 1997, WU i współaut. 1997), a także neuronów czuciowych zwojów korzeni grzbietowych (GALBIATI i współaut. 1998). Ponadto, używając różnych metod, takich jak immunoprecypitacja, immunoblotting i immunocytochemia wykazano, że w komórkach różnorodnych tkanek, większość aktywowanych receptorów kinazy tyrozynowej jest zlokalizowana właśnie w kaweolach (ANDERSON 1998). Powyższe fakty wskazują, że kaweole mogą brać udział w przekazywaniu sygnału troficznego w układzie nerwowym.

W komórkach linii PC12, a także w neuronach zwojowych korzeni grzbietowych ekspresja kaweoliny-1 ulega zwiększeniu po dodaniu do hodowli NGF. Wskutek mechanicznego uszkodzenia różnicujących komórek PC12 wzrasta także ekspresja kaweoliny-2, przy czym wzrost ten jest ściśle zależny od dostępności NGF (GALBIATI i współaut. 1998). W badaniach z wykorzystaniem ilościowych metod immunocytochemicznych wykazano, że zarówno receptory TrkA, jak i p75^{NTR} są obecne w kaweolach, a ich stężenie w tych strukturach jest odpowiednio 25 i 13 razy wyższe niż w pozostałych frakcjach błon. Jeżeli komórki PC12 poddano działaniu NGF, to niemal wszystkie ufosforylowane receptory TrkA zlokalizowane były w kaweolach (HUANG i współaut. 1999). Ponadto, wraz z aktywnymi receptorami TrkA w kaweolach obecne są białka związane z kaskadą przekazywania sygnału przez receptory kinazy tyrozynowej, takie jak kinaza trifosfatydyloinozytolu (PI-3K), fosfolipaza C- (PLC-), białka Shc, Grb2, SOS-1, Ras, Raf-1 oraz MAP-kinazy, w tym kinaza ERK2 (NIEWIADOMSKA i MAŁECKI 1999, PEIRO i współaut. 2000, BILDERBACK i współaut. 2001).

Wspomniano wcześniej w tym artykule o dwuznacznej roli receptora p75^{NTR}, który z jednej strony współuczestniczy w przekazywaniu sygnału troficznego, ale może również inicjować proces apoptozy. Rodzaj generowanego sygnału zależy od interakcji pomiędzy receptorami TrkA i p75^{NTR}. Okazuje się, że wzajemna regulacja aktywności obu receptorów NGF zachodzi także w kaweolach. W zmodyfikowanych fibroblastach oraz komórkach PC12 NGF wiąże się z receptorem p75^{NTR}, co prowadzi do hydrolizy sfingomieliny. Produktem tej reakcji jest ceramid, sfingolipid, związany z aktywacją apoptozy. Wykazano (BILDERBACK i współaut. 1997), że NGF indukuje hydrolizę sfingomieliny tylko we frakcji błon bogatej w kaweole, i że proces ten zależy od stężenia kaweoliny-1. Dalsze badania

pokazały, że kaweolina nie reguluje hydrolizy sfingomieliny bezpośrednio, ale poprzez blokadę fosforylacji receptora TrkA (BILDERBACK i współaut. 1999). Interakcja kaweoliny z receptorem TrkA uniemożliwia mu regulację aktywności receptora p75^{NTR}, co prowadzi do syntezy ceramidu i uruchomienia apoptozy. Najnowsze dane pokazują, iż wzajemne oddziaływanie receptorów TrkA i p75^{NTR} oraz blokowanie drogi przekazywania sygnału do śmierci komórkowej poprzez sfingolipidy regulowane jest przez kinazę PI-3K i że proces ten ma miejsce w kaweolach (BILDERBACK i współaut. 2001).

KIEROWANIE KOMPLEKSÓW NEUROTROFINA-RECEPTOR DO WSTECZNEGO TRANSPORTU AKSONALNEGO

W błonie presynaptycznej znajduje się zawsze duża liczba pęcherzyków różnego typu, które podlegają bezustannie endo- i egzocytozie. Tak więc, musi istnieć w błonie synaptycznej mechanizm zdolny do porządkowania pęcherzyków i kierowania ich na właściwą im drogę metaboliczną. Pęcherzyki zawierające kompleks neurotrofina-receptor Trk są kierowane do wstecznego transportu aksonalnego. Nie wiadomo jednak, jaki mechanizm to powoduje. Kaweole odgrywają rolę jedynie w początkowych etapach integracji i przekazywania sygnału troficznego, zachodzących w pobliżu błony presynaptycznej. Dalszym etapem przekazania sygnału jest przypuszczalnie połączenie pierwotnych pęcherzyków zawierających kompleks NGF-receptor z endosomami, które z kolei są transportowane aparatem mikrotubularnym aksonu (Ryc. 1). Przemawiają za tym niektóre dane doświadczalne, z których wynika, że transport NGF zależy od aktywności kinazy PI-3K, odpowiedzialnej między innymi za formowanie cytoszkieletu komórkowego, od kinazy PI-4K zaangażowanej w polimeryzację filamentów aktynowych, od związanego z błonami endosomów białka EEA1, które umożliwia fuzję homotypowych endosomów oraz od białka Rab5, o którym wiadomo, iż reguluje proces endocytozy (REYNOLDS i współaut. 2000).

WSTECZNY TRANSPORT AKSONALNY NEUROTROFIN

Transport w komórce nerwowej odbywa się w znacznej mierze po szlakach wyznaczonych przebiegiem mikrotubul. W aksonie transport odbywa się w dwu kierunkach. Postępujący transport (ang. anterograde transport) aksonalny powoduje przemieszczenie się mitochondriów, komponentów błony cytoplazmatycznej, pęcherzyków synaptycznych (neurotransmitery), białek funkcjonalnych (enzymy, neuropep-

tydy), fosfolipidów błonowych i gangliozydów z wnętrza komórki do zakończeń nerwowych. Wsteczny transport (ang. retrograde transport) aksonalny przebiega z zakończeń nerwowych do wnętrza perykarionu i przenosi pęcherzyki zawierające głównie materiał egzogeny pobrany drogą endocytozy. Jest on niezmiernie ważnym mechanizmem pozwalającym komórkom nerwowym otrzymywać informacji o zmianach zachodzących w środowisku otaczającym zakończenia nerwowe. Elementy komórkowe są transportowane po mikrotubulach przez białka motoryczne należące do dwu nadrodzin: kinezyn i dynein, które wykazują odmienną preferencję kierunku ruchu. Kinezyne wędrują na ogół w kierunku zakończeń aksonalnych, a dyneiny w kierunku od końca aksonu do ciała perykarionu. Transport w kierunku do wnętrza komórki nerwowej odbywa się dzięki dużemu białku, dyneinie cytoplazmatycznej (VALLEE i współaut. 1989, VALLEE i BLOOM 1991). Białko to wiąże się z mikrotubulami przez domenę motoryczną utworzoną z ciężkich łańcuchów dyneiny i przez białko p150 (część kompleksu dynaktyny współuczestniczącej w transporcie), a z receptorami w błonie transportowanych pęcherzyków poprzez dwa inne białka, spektrynę i anikrynę.

NGF był pierwszym czynnikiem troficznym, którego wsteczny transport aksonalny pokazano *in vivo*. Przeprowadzono wiele badań, w których udowodniono, że kompleks NGF-receptor jest wstecznie transportowany w aksonach i przy udziale aparatu mikrotubularnego dociera w formie aktywnej do jądra neuronu (HENDRY i współaut. 1974, STOCKEL i współaut. 1976). Wykazano, że egzogeny, znakowany jodem ¹²⁵I-NGF jest transportowany wstecznie przez neurony współczulne z prędkością 2-5 mm/h, a przez neurony czuciowe w tempie 10-13 mm/h (HENDRY i współaut. 1974, RICCIO i współaut. 1997). Transport ¹²⁵I-NGF *in vivo* można całkowicie zablokować podając kolchicynę, która uszkadza proces polimeryzacji mikrotubuli (HENDRY i współaut. 1974). Ta obserwacja pozwala sądzić, że wsteczny transport aksonalny neurotrofin jest wysoce uzależniony od systemu mikrotubularnego. Udowodniono także związek pomiędzy aktywnością dyneiny a transportem NGF (REYNOLDS i współaut. 1998). Dyneina, podobnie jak inne białka motoryczne, jest ATP-azą. Zahamowanie jej aktywności ATP-azowej w neuronach współczulnych i czuciowych *in vivo* powoduje zredukowanie wstecznego transportu aksonalnego ¹²⁵I-NGF. Najnowsze badania pokazały, że transportowany kompleks NGF-TrkA wiąże się z dyneiną cytoplazmatyczną poprzez połączenie między lek-

kim łańcuchem 14 kDa dyneiny a dystalnym fragmentem domeny przybłonowej receptora TrkA (YANO i współaut. 2001). W testach immunochemicznych *in vivo* wykazano, że receptor TrkA wytrąca się wspólnie z lekkim — 14 kDa i średnim — 74 kDa łańcuchem dyneiny, z którymi tworzy kompleks. Związek receptora TrkA z komponentami cząsteczki dyneiny świadczy o tym, że wsteczny transport pęcherzyków plazmalemmalnych, zawierających neurotrofinę i jej receptor odbywa się po mikrotubulach z wykorzystaniem motorycznego aparatu dyneiny.

Obecnie jest oczywistym, że aktywowane przez neurotrofinę receptory Trk służą jako przenośniki sygnału troficznego do wnętrza komórki. Jednak do niedawna nie wiadomo było czy wsteczna propagacja sygnału troficznego zachodzi dzięki przeniesieniu aktywnych receptorów z neurytów do wnętrza perykarionu, czy też dzięki sekwencyjnej aktywacji zlokalizowanych wzdłuż aksonu receptorów Trk, poprzez przenoszenie grup fosforanowych z jednej cząsteczki receptora na drugą. Używając metod fluorescencyjnych do znakowania aktywności biologicznej tkanki wykazano, że aktywowane na końcu aksonu cząsteczki receptorów Trk są szybko przenoszone do wnętrza komórki nerwowej. Ten szybki transport zachodzi tylko pod warunkiem powiązania receptora z neurotrofiną, pobudzenia domeny kinazy tyrozynowej receptora Trk oraz nienaruszenia integralności systemu mikrotubularnego aksonu (WATSON i współaut. 1999). Wiadomo, że po dotarciu do wnętrza neuronu, aktywny receptor Trk nadal tworzy kompleks z neurotrofiną zamknięty w pęcherzyku plazmalemmalnym. Ponadto, w bardzo eleganckich doświadczeniach RICCIO i współaut. (1997) udowodnili, że po to, aby sygnał troficzny został przekazany do jądra komórkowego, gdzie aktywuje czynnik transkrypcyjny CREB, konieczna jest aktywacja receptorów Trk przez neurotrofinę w zakończeniach aksonalnych oraz przeniesienie aktywnego kompleksu drogą wstecznego transportu z zakończeń nerwowych do ciała komórki.

DOTARCIE SYGNAŁU DO JADRA

Z założenia, przedmiotem tego artykułu miały być losy sygnału troficznego w drodze od zakończeń aksonalnych do wnętrza komórki.

Kaskada zdarzeń transdukcji sygnału poprzez cytoplazmę do jądra jest dobrze poznana (por. art. przegląd. FREDMAN i GREENE 1999, NIEWIADOMSKA i MAŁECKI 1999, HETMAN i XIA 2000, KAPLAN i MILLER 2000), a zgromadzone na ten temat informacje stanowią zawartość obszernego, oddzielnego artykułu przeglądowego. Zasygnalizujmy jedynie, że po stymulacji komórek przez NGF dochodzi do interakcji jego receptora z licznymi białkami, które są następnie fosforylowane przez receptorową kinazę tyrozynową. Te białka to wtórne przekaźniki (np. PLC, kinaza PI-3K, białko adaptorowe Shc, serynowo/treoninowa kinaza Raf), które uczestniczą w aktywacji kinazy białkowej C i podwyższaniu stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. Raf jest kinazą serynowo/treoninową uruchamiającą kaskadę kinaz MAP (ang. mitogen activated protein kinases). Kaskada ta polega na aktywacji przez fosforylację kolejnych kinaz białkowych należących do rodziny MAP. Kinazy MAP nie działają wyłącznie w sąsiedztwie błony komórkowej, ale przemieszczają się do jądra komórkowego. W ten sposób sygnał neurotroficzny ulega przeniesieniu do jądra komórkowego. Aktywowane kinazy MAP fosforylują i aktywują szereg czynników transkrypcyjnych, w tym CREB i cFos, co prowadzi do indukcji genów wczesnej i późnej odpowiedzi komórkowej oraz syntezy nowych białek (KAMINSKA 1997).

DEGRADACJA SYGNAŁU NEUROTROFICZNEGO

Neurotrofina, która aktywuje receptor i podróżuje z nim do wnętrza komórki otoczona pęcherzykiem plazmalemmalnym odbywa tę drogę tylko raz. Po dotarciu do cytoplazmy perykarionu następuje transdukcja sygnału do jądra, po czym neurotrofina ulega degradacji. Badania ultrastrukturalne sugerują, że wstecznie przetransportowany NGF jest ostatecznie wcielany do drugorzędowych lizosomów i utylizowany (SCHWAB i THOENEN 1977). Rozkład neurotrofiny wewnątrz lizosomów oznacza „wyłączenie” sygnału indukowanego przez neurotrofinę. NGF może być rozkładany również w tubulach gładkiego retikulum endoplazmatycznego (IBANEZ 2000, XIE i LONGO 2000). Jednak proces degradacji sygnału troficznego jest bardzo słabo poznany w porównaniu z procesami jego transdukcji.

PODSUMOWANIE

Neurotrofiny regulują przeżywalność, różnicowanie, tworzenie połączeń synaptycznych, fe-

notyp neurotransmiterowy oraz prawidłową funkcję wielu populacji neuronów. Po uwolnie-

niu neurotrofin w miejscu docelowym projekcji nerwowej substancje te wiążą się ze specyficznymi dla nich receptorami. Kompleksy neurotrofina-receptor są internalizowane do wnętrza zakończeń nerwowych na drodze endocytozy i zamykane w pęcherzykach plazmalemmalnych. Pęcherzyki są sortowane i kierowane do wstępnego transportu aksonalnego. Procesy te zależą od aktywności kinazy PI-3K. Tak wyselekcjonowane pęcherzyki są transportowane po mikrotubulach do wnętrza neuronu z wykorzystaniem aparatu motorycznego dyneiny cytoplazmatycznej. Kompleks neurotrofina-receptor pozostaje aktywny w czasie transportu i po

dotarciu do cytoplazmy perykarionu sygnał zostaje przekazany do jądra komórki. Poznanie mechanizmów ważnych w przenoszeniu neurotrofin drogą transportu aksonalnego, mechanizmów wzajemnego oddziaływania ich receptorów o wysokim i niskim powinowactwie oraz mechanizmów przekazywania sygnału w komórce może mieć bardzo duże znaczenie w zrozumieniu roli neurotrofin w takich stanach patologicznych, jak choroby neurodegeneracyjne, w regeneracji i naprawie uszkodzeń w układzie nerwowym oraz w zapobieganiu skutkom procesu starzenia się organizmu.

NGF ON TRACK — TRANSDUCTION OF TROPHIC SIGNAL IN THE NEURON

Summary

Target-derived neurotrophins evoke diverse responses in presynaptic neurons, including effects on survival, neurite outgrowth, and synaptic modulation. Some of these effects are local in nature, whereas other responses require that neurotrophins, presented in nerve terminals, initiate an intracellular signal that travels through the axon to the remote cell body. Trafficking of neurotrophins is believed to be required not only for cell survival but also for modulatory effects on neuronal activity and synaptic function. Each neurotrophin is able to bind to the p75NTR receptor and a specific Trk tyrosine kinase receptor. Binding of neurotrophins to Trk receptors results in receptor autophosphorylation and association with adaptor protein. These interactions give rise to downstream phosphorylation cascades involving phosphoinositide lipid phosphorylation and activation of GTPases. Despite extensive information regarding the generation of intracellular signals by neurotrophin receptors, relatively little is known about the

mechanisms or regulation of transport of neurotrophins and their receptors. Both Trk and p75NTR receptors undergo retrograde transport. The NGF-Trk complex could be found in clathrin-coated vesicles, caveolae, and endosomes associated with tyrosine kinase substrates, such as phospholipase C or kinase PI-3. Several tyrosine-phosphorylated proteins are associated with the TrkA receptor during transport, suggesting that signaling by neurotrophins persists after internalization of their receptors. For example, activation of the nuclear transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) in sympathetic neurons depends on transport of the neurotrophin-Trk complex. Activated receptors in complex with neurotrophin are distributed throughout the axon using the dynein motor machinery. After reaching the cytoplasm neurotrophins propagate second messengers signaling cascade to the nucleus, where they can influence gene transcription.

LITERATURA

- ANDERSON R. G. W., 1998. *The caveolae membrane system*. Annu. Rev. Biochem. 67, 199-225.
- BIBEL M., HOPPE E., BARDE Y. A., 1999. *Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75(NTR)*. EMBO J. 18, 616-622.
- BILDERBACK T. R., GRIGSBY R. J., DOBROWSKY R. T., 1997. *Association of p75NTR with caveolin and localization of neurotrophin-induced sphingomyelin hydrolysis to caveolae*. J. Biol. Chem. 272, 10922-10927.
- BILDERBACK T. R., GAZULA V. R., LISTANTI M. P., DOBROWSKY R. T., 1999. *Caveolin interacts with Trk A and p75(NTR) and regulates neurotrophins signalling pathways*. J. Biol. Chem. 274, 257-263.
- BILDERBACK T. R., GAZULA V. R., DOBROWSKY R. T., 2001. *Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between TrkA tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways*. J. Neurochem. 76, 1540-1551.
- BLOCHL A., THOENEN H., 1995. *Characterization of Nerve Growth Factor (NGF) release from hippocampal neurons: Evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway*. Eur. J. Neurosci. 7, 1220-1228.
- BLUSZTAJN J. K., BERSE B., 2000. *The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimers disease*. Metab. Brain Dis. 15, 45-64.
- BRENNAN C., RIVAS-PATA K., LANDIS S. C., 1999. *The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons in vivo*. Nat. Neurosci. 2, 699-705.
- CAMERON P. L., RUFFIN J. W., BOLLAG R., RASMUSSEN H., CAMERON R. S., 1997. *Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain*. J. Neurosci. 17, 9520-9535.
- CANOSSA M., GRIESBECK O., BERNINGER B., CAMPANA G., KOLBECK R., THOENEN H., 1997. *Neurotrophin release by neurotrophins: Implications for activity-dependent neuronal plasticity*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 13279-13286.
- CHAO M. V., HEMPSTEAD B. L., 1995. *p75 and Trk: a two-receptor system*. Trends Neurosci. 18, 321-326.
- FEINSTEIN E., KIMCHI A., WALLACH D., BOLDIN M., VARFOLOMEEV E., 1995. *The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions [letter]*. Trends Biochem. Sci. 20, 342-344.
- FISCHER W., WICTORIN K., BJORKLUND A., WILLIAMS L. R., VARON S., GAGE F. H., 1987. *Amelioration of cholinergic neurons atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor*. Nature 329, 65-68.
- FRIEDMAN W. J., GREENE L. A., 1999. *Neurotrophin signaling via Trks and p75*. Exp. Cell Res. 253, 131-142.
- GALBIATI F., VOLONTE D., GIL O., ZANAZZI G., SALZER J.L., SARGIACOMO M., SCHERER P. E., ENGELMAN J. A., SCHLEGEL A., PARENTI M., OKAMOTO T., LISANTI M. P., 1998. *Express-*

- ion of caveolin-1 and -2 in differentiating PC12 cells and dorsal root ganglion neurons: caveolin-2 is up-regulated in response to cell injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10257-10262.
- GARGANO N., LEVI A., ALEMA S., 1997. Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA receptors. *J. Neurosci. Res.* 50, 1-12.
- GRIMES M. L., ZHOU J., BEATTIE E. C., YUEN E. C., HALL D. E., VALLETTA J. S., TOPP K. S., LAVAIL J. H., BUNNET N. W., MOBLEY W. C., 1996. Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signalling endosomes. *J. Neurosci.* 16, 7950-7964.
- GRIMES M. L., BEATTIE E. C., MOBLEY W. C., 1997. A signalling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9909-9914.
- HENDRY I., STOCKEL K., THOENEN H., IVERSEN L., 1974. The retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain Res.* 68, 103-121.
- HETMAN M., XIA Z., 2000. Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins. *Acta Neurobiol. Exp.* 60, 531-545.
- HEYMACH J. V., KRUTTGEN A., SUTER U., SHOTER E. M., 1996. The regulated secretion and vectorial targeting of neurotrophins in neuroendocrine and epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 271, 25430-25437.
- HUANG E. J., WILKINSON G. A., FARINAS I., BACKUS C., ZANG K., WONG S.L., REICHARDT L. F., 1999. Expression of Trk receptors in the developing mouse trigeminal ganglion: in vivo evidence for NT-3 activation of TrkA and TrkB in addition to TrkC. *Development* 126, 2191-2203.
- IBANEZ C. F., 2000. Neurotrophic factors: versatile signals for cell-cell communication in the nervous system. *Results Probl. Cell Differ.* 30, 163-188.
- JETTE N., COLE M.S., FAHNESTOCK M., 1994. NGF mRNA is not decreased in frontal cortex from Alzheimer's disease patients. *Mol. Brain Res.* 25, 242-250.
- KAMINSKA B., 1997. Regulacja odpowiedzi genomowej komórek układu nerwowego przez cytokiny i czynniki neurotroficzne. *Neur. Neurochir. Pol.* 31 (Supl. 1.) 53-65.
- KAPLAN D. R., MILLER F. D., 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 381-391.
- KORSCHING S., 1986. The role of nerve growth factor in the CNS. *TINS* 11/12, 570-573.
- MAISONPIERRE P. C., BELLUSCIO L., SQUINTO S., IP N. Y., FURTH M. E., LINDSEY R. M., YANCOPOULOS G. D., 1990. Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247, 1446-1451.
- MARKOWSKA A. L., KOLATSOS V., PRICE D., OLTON D. S., 1994. Behavioral effects of nerve growth factor (NGF) in young and aged rats. *J. Neurosci.* 14, 4815-4824.
- MASSERINI M., PALESTINI P., PITTO M., 1999. Glycolipid-ENRICHED caveole and caveole-like domains in nervous system. *J. Neurochem.* 73, 1-11.
- MESULAM M. M., GEULA C., 1988. Acetylcholinesterase-rich pyramidal neurons in the human neocortex and hippocampus: Absence at birth, development during lifespan and dissolution in Alzheimers disease. *Ann. Neurol.* 24, 765-773.
- MESULAM M. M., GEULA C., 1991. Acetylcholinesterase-rich neurons of human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 306, 193-220.
- MUFSON E. J., LAVINE N., JAFFAR S., KORDOWER J. H., QUIRION R., SARAGOV H. U., 1997. Reduction in p140-TrkA receptor protein within the nucleus basalis and cortex in Alzheimers disease. *Exp. Neurol.* 146, 91-103.
- NIEWIADOMSKA G., MAŁECKI M., 1998. Neurotrofina — narzędzie w próbach naprawy uszkodzonego układu nerwowego. *Kosmos* 47, 21-32.
- NIEWIADOMSKA G., MAŁECKI M., 1999. Drogi przekazywania sygnału przez czynnik wzrostu nerwów (NGF) i jego receptory TrkA i p75^{NTR}. *Postępy Biochem.* 45, 21-31.
- NIEWIADOMSKA G., WYRZYKOWSKA J., CHECHLA CZ M., 2000. Does senile impairment of cholinergic system in rats concern only disturbances in cholinergic phenotype or the progressive degeneration of neuronal cell bodies? *Acta Biochim. Polon.* 47, 313-330.
- OLSON L., NORDBERG A., VONHOLST H., BACKMAN L., EBELDAL T., 1992. Nerve growth factor affects 11C-nicotine binding, blood flow, EEG, and verbal episodic memory in an Alzheimer patient. *J. Neural. Trans.* 4, 79-95.
- OLSON L., BACKMAN L., EBELDAL T., ERIKSDOTTER-JONHAGEN M., HOFFER B., HUMPEL C., FREDMAN R., GIACOBINI A., MEYERSON B., NORDBERG A., 1994. Role of growth factors in degeneration and regeneration in the central nervous system; clinical experience with NGF in Parkinsons and Alzheimers diseases. *J. Neurobiol.* 242, 12-15.
- PASQUAL J., FONTAN A., ZARRANZ J. J., BERCIANO J., FLOREZ J., PAZOS A., 1991. High-affinity choline uptake carrier in Alzheimer's disease: implications for the cholinergic hypothesis of dementia. *Brain Res.* 552, 170-174.
- PARASURAMAN R., GREENWOOD P., HAXBY J. V., GRADY C. L., 1992. Visuospatial attention in dementia of the Alzheimer type. *Brain* 115, 711-733.
- PEIRO S., COMELLA J. X., ENRICH C., MARTIN-ZANCA D., ROCAMORA N., 2000. PC12 cells have caveolae that contain TrkA. *J. Biol. Chem.* 275, 37846-37852.
- REYNOLDS A. J., BARTLETT S. E., HENDRY I. A., 1998. Signalling events regulating the retrograde axonal transport of 125I-Nerve Growth Factor in vivo. *Brain Res.* 798, 67-74.
- REYNOLDS A. J., BARTLETT S. E., HENDRY I. A., 2000. Molecular mechanisms regulating the retrograde axonal transport of neurotrophins. *Brain Res.* 33, 169-178.
- RICCIO A., PIERCHALA B. A., CIARALLO C. L., GINTY D. D., 1997. An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. *Science* 277, 1097-1100.
- SCHWAB M., THOENEN H., 1977. Selective trans-synaptic migration of tetanus toxin after retrograde axonal transport in peripheral sympathetic nerves: a comparison with nerve growth factor. *Brain Res.* 122, 459-474.
- SCOTT S. A., MUFSON E. J., WEINGHARTNER J. A., SKAU K. A., CRUTCHER K. A., 1995. Nerve growth factor in Alzheimer's disease: increased levels throughout the brain coupled with declines in nucleus basalis. *J. Neurosci.* 15, 6213-6221.
- SKUP M., 1997. Przetwarzanie sygnałów generowanych przez neurotrofiny: receptory białkowe Trk i p75(NTR). *Neur. Neurochir. Pol.* 31 (Supl. 1), 29-46.
- SMITH D. E., ROBERTS J., GAGE F. H., TUSZYNSKI M. H., 1999. Age-associated neuronal atrophy occurred in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10893-10898.
- SOBREVIOLA T., CLARY D. O., REICHARDT L.F., BRANDABUR M. M., KORDOWER J. H., MUFSON E. J., 1994. TrkA-immunoreactive profiles in the central nervous system: colocalization with neurons containing p75 NGF receptor, choline acetyltransferase, and serotonin. *J. Comp. Neurol.* 350, 587-611.
- SOFRONIEW M. V., MOBLEY W. C., 1993. On the possibility of positive-feedback in trophic interactions between afferent and target neurons. *Sem. Neurosci.* 5, 309-312.
- STEACKER H., GALINOVIC-SCHWARTZ V., LIN W., LEFEBRE P., KOPKE R., MALGRANGE B., MOONEN G., VAN-DE-WALTER T. R., 1996. The role of the neurotrophins in maturation and maintenance of postulated auditory innervation. *Am. J. Otol.* 17, 486-492.
- STOCKEL K., GUROFF G., SCHWAB M., THOENEN H., 1976. The significance of retrograde axonal transport for the accumulation of systemically administered nerve growth

- factor (NGF) in the rat superior cervical ganglion. *Brain Res.* 109, 271–284.
- THAL L. J., 1994. *Clinical trials in Alzheimers disease*. [W:] *Alzheimers disease*. TERRY R. D. (red.). New York, Raven 145–178.
- THOENEN H., BANDTLOW C., HEUMANN B., 1987. *The physiological function of nerve growth factor in central nervous system: comparison with periphery*. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 109, 145–178.
- THOENEN H., 1995. *Neurotrophins and neuronal plasticity*. *Science* 270, 593–597.
- TUSZYNSKI M. H., GABRIEL K., GAGE F. H., SUHR S., MEYER S., ROSETTI A., 1996. *Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, motor, and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury*. *Exp. Neurol.* 137, 157–173.
- TUTTLE J. B., ETHERIDGE R., CREEDON D. J., 1993. *Receptor-mediated stimulation and inhibition of nerve growth factor secretion by vascular smooth muscle*. *Exp. Cell Res.* 208, 350–361.
- VALLEE R. B., SHPENTER H. S., PASCHAL B. M., 1989. *The role of dynein in retrograde axonal transport*. *Trends Neurosci.* 12, 66–70.
- VALLEE R. B., BLOOM G. S., 1991. *Mechanisms of fast and slow axonal transport*. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 59–92.
- VAN BELZEN N., SPAARGAREN M., VERKLEIJ A. J., BOONSTRA J., 1990. *Interaction of epidermal growth factor receptors with the cytoskeleton is related to receptor clustering*. *J. Cell Physiol.* 145, 365–375.
- VAN T HOF R. J., DEFIZE L. H., NUIJDENS R., de BRABANDER B. M., VERKLEIJ A. J., BOONSTRA J., 1989. *Dynamics of epidermal growth factor receptor internalization studied by Nanovid light microscopy and electron microscopy in combination with immunogold labeling*. *Eur. J. Cell Biol.* 48, 5–13.
- VANTINI G., SKAPER S. D., 1992. *Neurotrophic factors: from physiology to pharmacology*. *Pharmacological Res.* 26, 1–15.
- WANG Z. H., WALTER G. F., GERHARD L., 1996. *The expression of nerve growth factor receptors on Schwann cells and the effect of these cells on the regeneration of axons in traumatically injured human spinal cord*. *Acta Neuropathol.* 91, 180–184.
- WATSON F. L., HEERSSEN H. M., MOHEBAN D. B., LIN M. Z., SAUVAGEOT C. M., BHATTACHARYA P., POMEROY S. L., SEGAL R. A., 1999. *Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex*. *J. Neurosci.* 19, 7889–78900.
- WU C., BUTZ S., YING Y., ANDERSON R. G. W., 1997. *Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membranes*. *J. Biol. Chem.* 272, 3554–3559.
- XIE Y., LONGO F. M., 2000. *Neurotrophin small-molecule mimetics*. *Prog. Brain Res.* 128, 333–347.
- YAMADA E., 1955. *The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 445–458.
- YANO H., LEE F. S., KONF H., CHUANG J. Z., AREVALO J. C., PEREZ P., SUNG C. H., CHAO M. V., 2001. *Association of Trk neurotrophin receptors with components of the cytoplasmic dynein motor*. *J. Neurosci.* 21, RC125.