

温度感受性 SV40T 抗原で不死化した副腎髄質細胞株 tsAM5D の神経栄養因子応答性

村田 富保

Neurotrophic Factor Responsiveness of Adrenal Medullary Cell Line tsAM5D Immortalized with Temperature-Sensitive SV40 T-Antigen

Tomiyasu MURATA

*Department of Analytical Neurobiology, Faculty of Pharmacy, Meijo University,
150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya 468-8503, Japan*

(Received February 8, 2006)

We established adrenal medullary cell lines from transgenic mice expressing an oncogene, the temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen, under the control of the tyrosine hydroxylase promoter. A clonal cell line, named tsAM5D, conditionally grew at a permissive temperature of 33°C and exhibited the dopaminergic chromaffin cell phenotype as exemplified by the expression pattern of mRNA for catecholamine synthesizing-enzymes and secretory vesicle-associated proteins. tsAM5D cells proliferated at the permissive temperature in response to glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF). At a nonpermissive temperature of 39°C, GDNF and CNTF acted synergistically to differentiate tsAM5D cells into neuron-like cells. In addition, tsAM5D cells caused to differentiate by GDNF plus CNTF at 39°C became dependent solely on nerve growth factor for their survival and showed markedly enhanced neurite outgrowth. In the presence of GDNF plus CNTF, the morphological change induced by the temperature shift was associated with up-regulated expression of neuronal marker genes including microtubule-associated protein 2, neuron-specific enolase, neurofilament, and growth-associated protein-43, indicating that the cells underwent neuronal differentiation. Thus, we demonstrated that tsAM5D cells could proliferate at permissive 33°C, and also had the capacity to terminally differentiate into neuron-like cells in response to GDNF plus CNTF when the oncogene was inactivated by shifting the temperature to nonpermissive 39°C. These results suggest that tsAM5D cells should be a good tool to allow a detailed study of mechanisms regulating neuronal differentiation.

Key words—adrenal chromaffin cells; temperature-sensitive SV40 T-antigen; immortalization; tsAM5D cells; neurotrophic factor; neuronal differentiation

1. はじめに

通常、細胞の初代培養を行う場合、細胞自体に制限があり、均一な細胞を多量に使用することは困難である。このような問題を解決するために、細胞培養の実験系ではクローン化された細胞株が頻りに用いられている。これまでに、SV40 large T-antigen, c-myc, adenovirus E1A などの癌遺伝子が導入された哺乳類動物細胞株が数多く樹立されており、その利用度は膨大なものである。しかしながら、癌遺伝子が導入された細胞株では細胞周期が増殖期にある

ために、その細胞が本来有している分化形質が減衰あるいは消失していることがしばしば認められる。そこで、SV40 large T-antigen の温度感受性変異株 (tsSV40T) が導入された細胞株が注目されており、その細胞株では、tsSV40T の発現許容温度である 33°C で培養すると細胞は増殖し、一方、発現非許容温度である 39°C で培養すると増殖が停止して分化誘導が起こることが知られている。¹⁻³⁾ 特に、神経生物学の研究分野では、tsSV40T が導入された神経細胞株⁴⁻⁹⁾は、39°C 条件下において神経特異的な分化形質を保持した状態で培養することができるので、その利用価値は高いものと考えられている。

生体内では、主として副腎髄質、中脳黒質、嗅球糸球核及び延髄青斑核などにカテコールアミン産生細胞が存在している。筆者は、カテコールアミン産

名城大学薬学部生体機能分析学教室 (〒468-8503 名古屋市天白区八事山 150)

e-mail: tomiyasu@ccmfs.meijo-u.ac.jp

本総説は、平成 17 年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

生細胞の生物学的特性を解析することを目的として、tsSV40T が導入されたカテコールアミン産生細胞の株化を目指した研究を進めてきた。今回、カテコールアミン産生細胞に特異的に発現している tyrosine hydroxylase (TH) 遺伝子のプロモーター領域の下流に tsSV40T 遺伝子を連結させ、導入遺伝子を用いてトランスジェニックマウスを作製し、組織特異的に tsSV40T を発現させることに成功した。作製したトランスジェニックマウスにおいて生後数ヵ月後にカテコールアミン産生組織である副腎髄質が腫瘍化することが認められた。これまでに副腎髄質細胞は種々の神経栄養因子に応答して神経細胞様に分化することが報告されていたので、筆者は、tsSV40T が導入された副腎髄質細胞株を樹立すれば、tsSV40T の温度感受性を利用して神経栄養因子による神経分化誘導を温度制御することができると考えた。そこで、腫瘍化した副腎髄質組織から細胞株の樹立を試みたところ、温度感受性の副腎髄質細胞株の樹立に成功したので、その知見について報告する。

2. 温度感受性副腎髄質細胞株 tsAM5D の単離

TH はカテコールアミン合成経路の第 1 律速酵素であり、ヒト TH 遺伝子のプロモーター領域の下流に tsSV40T 遺伝子を連結させた導入遺伝子 (Fig. 1) を用いて、トランスジェニックマウスを作製したところ、TH の主要な発現部位の 1 つである副腎髄質に腫瘍が高頻度で発生することが明らかになった。そこで、腫瘍化した副腎髄質からパラフィン切片を作製し、抗 TH 抗体又は抗 tsSV40T 抗体を用いた免疫組織化学染色を行ったところ、TH の発現と一致して、髄質部分に tsSV40T が発現していた

(Fig. 2)。そして、この腫瘍化した副腎髄質から細胞の株化を試みたところ、tsSV40T が発現している TH 陽性細胞を数クローン単離することができ、その中から増殖能が良好なクローンを 1 つ選定し、tsAM5D 細胞と命名した。

tsAM5D 細胞の培養条件を検討したところ、10% fetal bovine serum (FBS) と特定の細胞増殖因子 (G5 サプリメント: Invitrogen 社) を含むメディウムを用いることで、33°C にて継代培養が可能となった。この時、TH と tsSV40T の発現を免疫蛍光染色で調べたところ、核内蛋白質である tsSV40T は核に、TH は細胞質に発現していた (Fig. 3) ので、継代培養条件下における細胞の増殖は tsSV40T の発現に基づくものと思われた。また、副腎髄質は代表的なカテコールアミン産生組織として知られていることから、tsAM5D 細胞のカテコールアミン含量を調べたところ、ドパミン (167 ± 20 pmol/mg protein) のみが検出され、ノルエピネフリンやエピネフリンなど他のカテコールアミンは検出されなかった。Figure 4 に示すように、RT-PCR 法により、tsAM5D 細胞ではカテコールアミン合成酵素のうち、チロシンからドパミンが合成される際に必要となる TH と aromatic L-amino acid decarboxylase が高発現していたのに対し、ドパミンをノルエピネフリンに変換する dopamine β -hydroxylase の発現はごくわずかで、ノルエピネフリンをエピネフリンに変換する phenylethanolamine N-methyltransferase の発現は認められなかった。カテコールアミン合成酵素の発現様式に基づいてドパミンのみが検出されたと思われる。さらに、副腎髄質組織の大部分

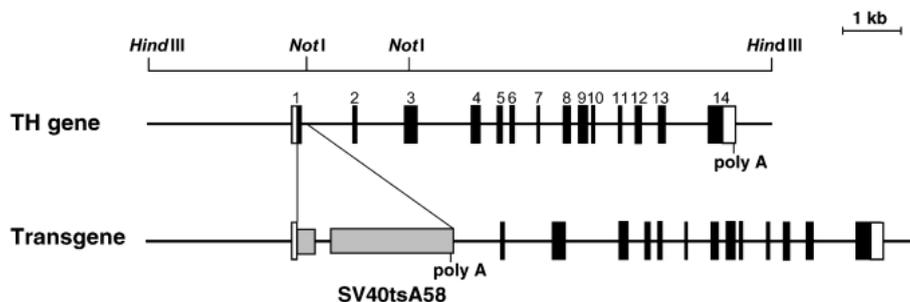


Fig. 1. Structure of Transgene for Production of Transgenic Mice Carrying the tsSV40T Gene under the Control of the Human Tyrosine Hydroxylase Promoter

A 2.7-kb part of tsSV40T genomic DNA was fused at its 5' end with 2.5 kb of hTH 5'-flanking sequence containing the non-coding region of exon 1, and at its 3' end with a 8.2-kb *NotI*-*HindIII* fragment of hTH genomic sequence containing the exon-intron structure from a *NotI* site of intron 1 to exon 14 and the 3'-flanking region. The resulting 13.35 kb-fusion gene was used to generate transgenic mice.

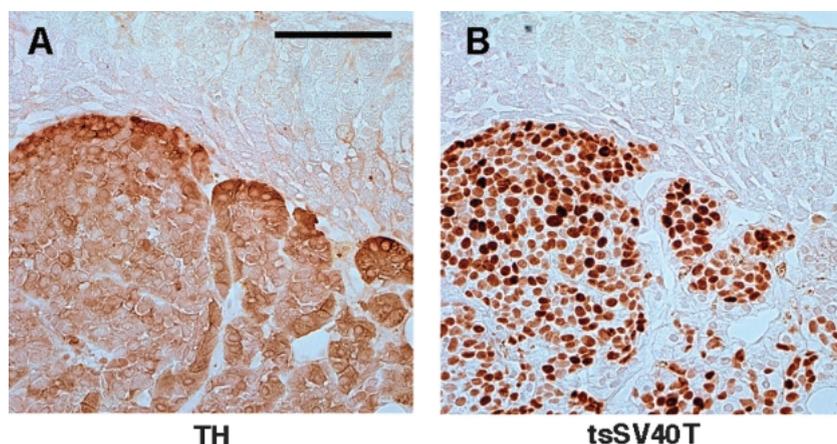


Fig. 2. Immunohistochemical Analysis of the Adrenal Gland of Transgenic Mice Carrying the TH-tsSV40T Transgene

Serial sections were prepared from an adrenal tumor of a 9-month-old transgenic mouse. The immunostaining for TH (A) and tsSV40T (B) was performed by the peroxidase-avidin/biotinylated enzyme complex method. Bars: 50 μ m.

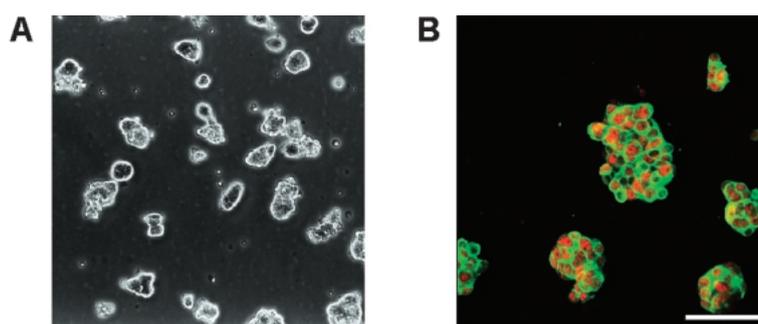


Fig. 3. Morphological and Immunocytochemical Characteristics of Immortalized Adrenal Medullary Cell Line tsAM5D

tsAM5D cells were cultured at 33°C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% FBS and G5 supplement and then processed for morphological and immunocytochemical analyses. Panel A: cell morphology under growth conditions, as observed by phase-contrast microscopy. Original magnification: $\times 100$. Panel B: double-immunofluorescence staining for tsSV40T (red) and TH (green) in tsAM5D cells maintained under growth conditions. Cells were double-stained with TH polyclonal and SV40T monoclonal antibodies followed by fluorescein-conjugated donkey anti-rabbit IgG and Texas Red-conjugated sheep anti-mouse IgG, and inspected by confocal fluorescence microscopy. Bar: 50 μ m.

がクロム親和性細胞であるため、RT-PCR 法によって副腎髄質クロム親和性細胞のマーカー分子の発現を調べたところ、副腎髄質クロム親和性細胞で特異的に発現することが知られる chromogranin A,¹⁰⁾ chromogranin B,¹⁰⁾ secretogranin II¹⁰⁾ 及び vesicular monoamine transporter 1¹¹⁻¹³⁾ が tsAM5D 細胞に発現していた (Fig. 4)。このことから、tsAM5D 細胞が副腎髄質クロム親和性細胞由来の細胞株であると考えられた。

3. tsAM5D 細胞の神経栄養因子応答性

副腎髄質クロム親和性細胞は、basic fibroblast growth factor (bFGF),¹⁴⁾ ciliary neurotrophic factor (CNTF),^{15,16)} glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF),¹⁷⁾ nerve growth factor (NGF),^{18,19)} neurotrophin-4²⁰⁾ など多くの神経栄養因子に応答し

て、神経細胞様に分化することが知られている。そこで、tsAM5D 細胞の神経栄養因子に対する応答性について検討したところ、bFGF, CNTF, GDNF に対して強い応答性が認められたので、その知見について紹介する。まず初めに、tsSV40T の発現許容温度である 33°C において、細胞数の変化を指標にして神経栄養因子に対する応答性を調べた (Fig. 5 (A))。なお、細胞数の測定には、生細胞数を比色定量することのできる MTS 試薬 (プロメガ社) を用いた。まず、10% FBS のみを含むコントロールメディウムでは、細胞増殖は認められなかった。このとき、10% FBS を含むメディウムに bFGF, CNTF あるいは GDNF を単独添加すると、経時的な細胞増殖が認められた。さらに、GDNF に対して bFGF や CNTF を併用した場合には、GDNF 単

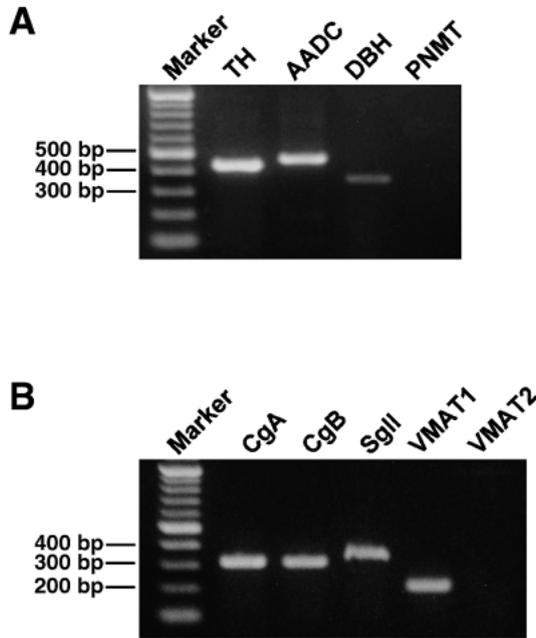


Fig. 4. Expression of the Chromaffin Cell Marker mRNAs in tsAM5D Cells

Total RNA was extracted from tsAM5D cells maintained in defined growth medium. A: expression of catecholamine synthesizing-enzyme. The presence of mRNAs for tyrosine hydroxylase (TH), aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC), dopamine β -hydroxylase (DBH), and phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) was examined by RT-PCR. B: expression of secretory vesicle-associated proteins. The presence of mRNAs for chromogranin A (CgA), chromogranin B (CgB), secretogranin II (SgII), vesicular monoamine transporter 1 (VMAT1), and vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) was examined by RT-PCR. The amplified products were visualized on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. The expected size of RT-PCR products for TH, AADC, DBH, PNMT, CgA, CgB, SgII, VMAT1, and VMAT2 are 446, 485, 372, 359, 322, 323, 351, 215, and 408 bp, respectively. Marker: 100-bp DNA ladder.

独の場合に比べて、細胞増殖がわずかに増大した。これらのことから、33°C 条件下では、bFGF, CNTF あるいは GDNF の単独処理によって十分な細胞増殖が見られ、それぞれの因子の栄養効果によって tsSV40T の細胞増殖シグナルが増強されることが示唆された。また、bFGF,¹⁴⁾ CNTF^{15,16)} 及び GDNF¹⁷⁾ は、初代培養した副腎髄質細胞に対して、突起伸長を伴った分化誘導活性を示すことが知られているが、tsSV40T が発現する 33°C ではいずれの神経栄養因子を添加しても、突起形成などの形態的变化は認められなかった (Fig. 5 (B))。この理由としては、33°C では tsSV40T の発現によって細胞は増殖ステージにあり、神経栄養因子の分化誘導活性が抑制され、その結果として突起形成などの分化形質が現れなかったと考えられる。

次に、tsSV40T の発現非許容温度である 39°C において、tsAM5D 細胞の神経栄養因子に対する応答

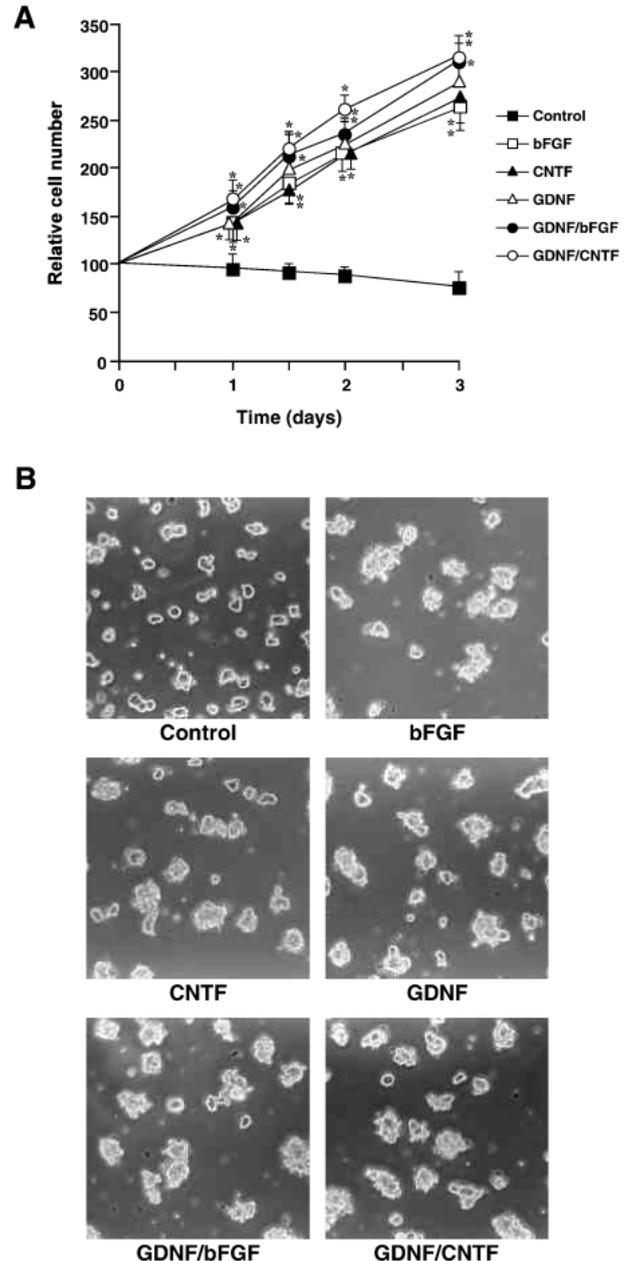


Fig. 5. Effect of Neurotrophic Factors on tsAM5D Cell Growth and Morphology under the Permissive Condition

A: growth rate determination. The cells were grown on 96-well plates coated with collagen type IV in defined growth medium at 33°C for 1 day. After the cells had been washed with DMEM containing 10% FBS (day 0), the medium was changed to 10% FBS-containing DMEM supplemented with various neurotrophic factor (s) (50 ng/ml). Control experiment was performed without neurotrophic factor. After the indicated period of culture at 33°C, the number of viable cells was estimated by using CellTiter 96 Aqueous reagent (Promega). The cell number at the indicated time points is expressed as a percentage of the cell number on day 0. All values represent the means \pm S.E. of 3 independent experiments, in which measurements in each were made in triplicate. *: $p < 0.05$ compared with control. B: cell morphology. Cells were treated with various neurotrophic factors (50 ng/ml) in DMEM containing 10% FBS at 33°C for 3 days and then viewed by phase-contrast microscopy. Original magnification: $\times 200$.

性を調べた (Figs. 6(A), (B)). その結果, 10% FBSのみを含むコントロールメディウムでは細胞数が急激に減少し, 3日以内にすべての細胞が死滅した. また, 10% FBSを含むメディウムに bFGF,

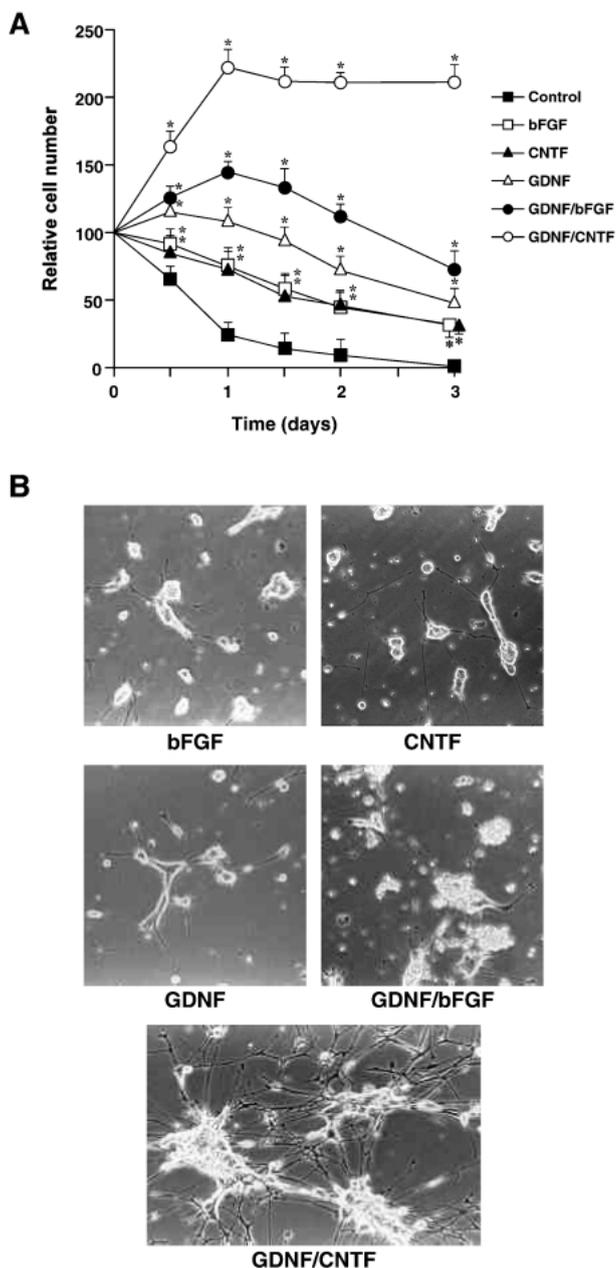


Fig. 6. Effect of Neurotrophic Factors on tsAM5D Cell Growth and Morphology under the Nonpermissive Condition

A: growth rate determination. The cell number was determined as described in the legend of Fig. 5(A) except that treatment of cells with the neurotrophic factor(s) was carried out at 39°C. All values represent the means \pm S.E. of 3 independent experiments, in which measurements in each were made in triplicate. *: $p < 0.05$ compared with control. B: cell morphology. Cells were treated with various neurotrophic factors (50 ng/ml) in DMEM containing 10% FBS at 39°C for 3 days and then viewed by phase-contrast microscopy. Original magnification: $\times 200$.

CNTFあるいはGDNFを単独添加した場合やGDNFとbFGFを併用した場合は, コントロールに比べて細胞数の減少が抑制されたものの, 経時的に細胞が死滅し, 3日後に残存していた細胞はごくわずかな突起しか形成していなかった. しかし, GDNFとCNTFを併用した場合は, 細胞は著しく突起を形成して神経細胞様に分化し, 安定に生存した. つまり, GDNFとCNTFを併用することで, 培養温度を33°Cから39°Cへシフトすることにより, 安定した神経分化を誘導することができたことになる.

4. GDNF/CNTF 処理した tsAM5D 細胞の特性

33°C及び39°Cで3日間, GDNF/CNTF処理した細胞におけるTHとtsSV40Tの発現を免疫蛍光染色により調べたところ, 33°CではTHが細胞質に, tsSV40Tが核に発現していたのに対して, 39°CではTHの発現は細胞質や突起上に認められたものの, 核におけるtsSV40Tの発現は全く認められなかった (Fig. 7). これらの結果から, 33°CではtsSV40Tの発現によって細胞は増殖ステージにあり, 一方, 39°CではtsSV40Tの発現低下に伴って, 細胞周期が増殖期から分化期に入り, GDNFとCNTFが相乗的に神経分化を誘導したと考えられる.

近年, 神経細胞に作用する神経栄養因子が相次いで報告されており, ニューロトロフィンファミリーに属するNGF, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3)は神経細胞の分化・生存維持・再生修復に必須となる代表的な神経栄養因子である.²¹⁻²³⁾今回, GDNF/CNTF存在下で, 33°Cで増殖した細胞と39°Cで神経分化した細胞を用いて, 39°C条件下でニューロトロフィンに対する応答性を検討した (Fig. 8). その結果, 33°CでGDNF/CNTFによって増殖した細胞を, 39°C条件下でGDNF/CNTFに作用させた場合は神経分化が誘導されたものの, ニューロトロフィンに作用させた場合は細胞死が認められた. 一方, 39°CでGDNF/CNTFによって神経細胞様に分化した細胞を, 39°C条件下でニューロトロフィンに作用させたところ, 分化した細胞はNGFに反応してさらに突起を伸長したが, BDNFとNT-3には反応せず死滅した. このことから, GDNF/CNTFによって神経分化が起こる際には, NGF応答性が誘導

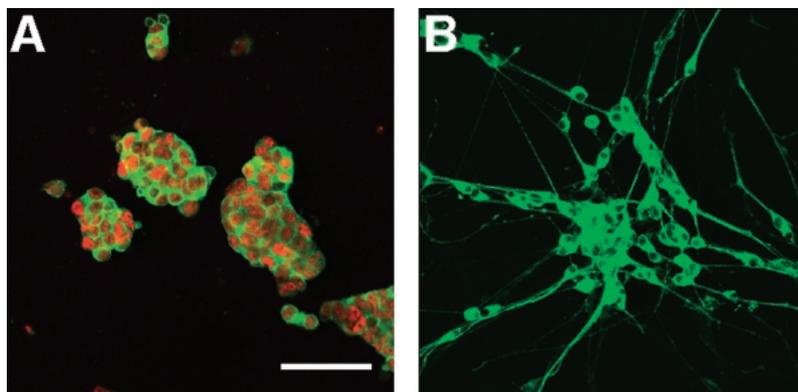


Fig. 7. Immunocytochemical Analysis of GDNF/CNTF-treated tsAM5D Cells Grown at the Permissive and Nonpermissive Temperatures

tsAM5D cells were treated with a combination of GDNF and CNTF (50 ng/ml each) in 10% FBS-containing DMEM for 3 days at either 33 (A) or 39 (B)°C and then processed for immunocytochemical analysis. Panels A and B show double-immunofluorescence staining for tsSV40T (red) and TH (green). Cells were stained with the appropriate first and second antibodies as described in the legend of Fig. 3 and inspected by confocal fluorescence microscopy. Bars: 50 μ m.

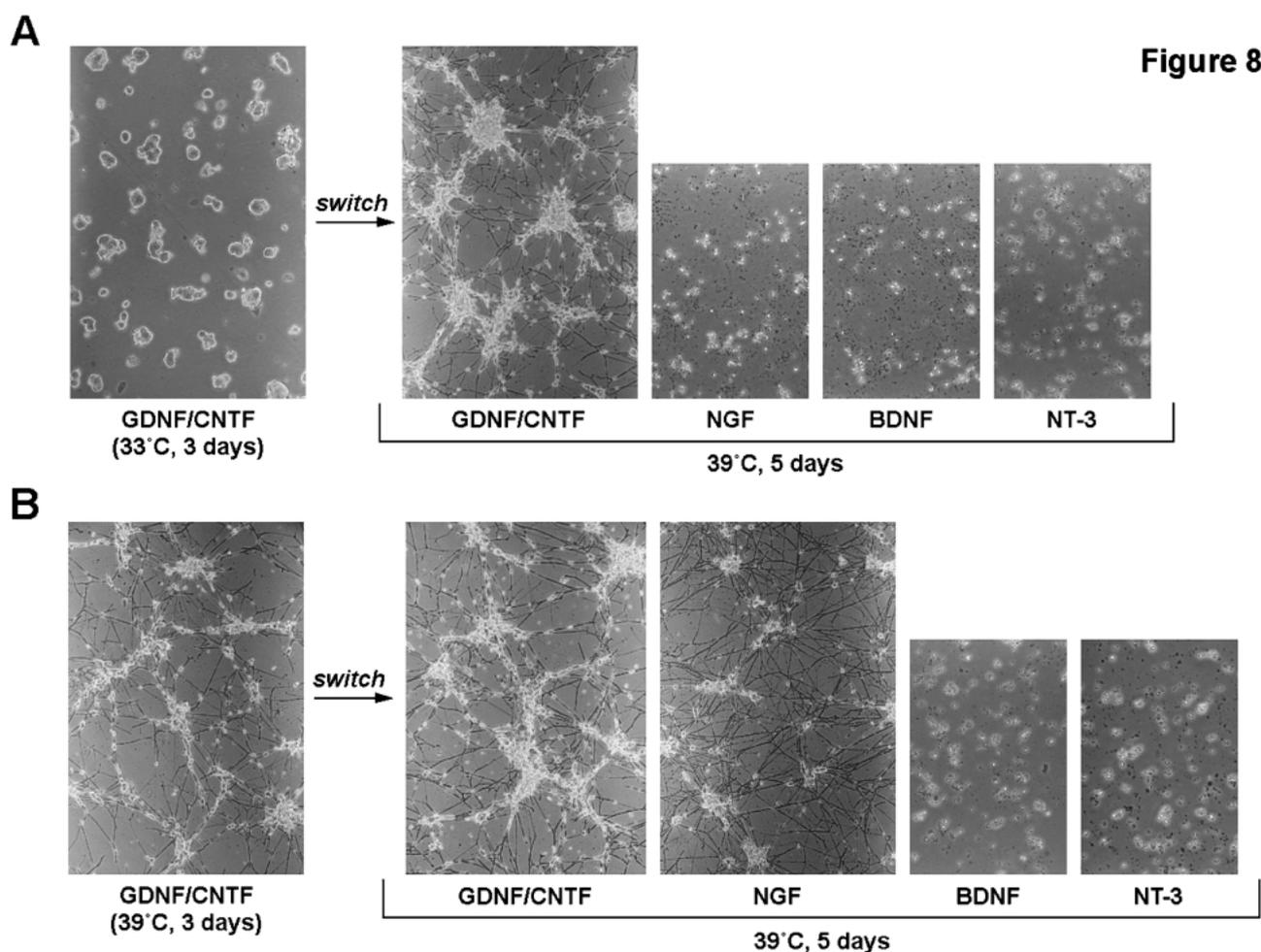


Figure 8

Fig. 8. NGF Responsiveness of tsAM5D Cells after Differentiation to Neuron-like Cells with GDNF/CNTF

tsAM5D cells were treated with a combination of GDNF and CNTF (50 ng/ml each) in 10% FBS-containing DMEM for 3 days at either 33 (A) or 39 (B)°C. After the medium had been switched to serum-containing medium supplemented with either GDNF/CNTF, NGF, BDNF or NT-3 (50 ng/ml each), the cells were cultured at 39°C for 5 days. Original magnification: $\times 100$.

されることが判明した。

GDNF/CNTF 存在下で 33°C 又は 39°C で培養した細胞から mRNA を抽出し、神経特異的遺伝子の発現量をリアルタイム定量 RT-PCR 法により定量し、両温度間における発現量を比較検討した (Table 1)。その結果、突起形成を伴った分化誘導が起こる 39°C では、増殖期にある 33°C に比べて、神経細胞骨格マーカーである microtubule-associated protein 2 や neurofilament, 神経特異的酵素である neuron-specific enolase, 神経成長円錐に発現する growth-associated protein-43 などの神経マーカー遺伝子の発現量が顕著に増加していた。この知見は、温度シフトによって神経分化形質が誘導されたことを裏付ける結果である。また、NGF のレセプターとして、高親和性レセプターである trkA と低親和性レセプターである p75 が知られている²⁴⁾が、39°C の神経分化時に両レセプターの発現量が著しく増加した。Figure 8 において、GDNF/CNTF によって神経細胞様に分化した細胞が NGF に応答するようになることを示したが、その理由として、trkA と p75 の発現上昇によるシグナル伝達の増強が考えられた。

5. tsAM5D の基礎的研究への応用

現在、神経特異的な分化メカニズムを解明するために、神経分化を制御する因子を同定することが国内外で精力的に行われている。そこで、GDNF/

CNTF 存在下にて、tsAM5D 細胞は 33°C で増殖し、39°C では神経細胞様に分化する特性を有している。温度シフトに伴って発現量の変化する分子を differential display 法、RNA subtraction 法、プロテオーム解析などで網羅的に解析することで、突起形成を制御する分子や細胞周期をスイッチする分子など神経分化に関与する因子を探索することができると考えられる。現在、この方法を用いて、神経分化制御因子を遺伝子・蛋白質レベルで解析している。特に、プロテオーム解析については、GDNF/CNTF 存在下にて 33°C で増殖した細胞と 39°C で神経細胞様に分化した細胞から cell lysate を調製し、2次元泳動を行い、スポットの発現強度を増殖期と神経分化期で比較し、発現量の変化する蛋白質分子を MALDI-TOF MS などの質量分析法を駆使して同定している。同定された蛋白質分子のなかには、神経分化に関与することが知られている分子がいくつか認められ、tsAM5D 細胞の特性を利用したプロテオーム解析は有用であると思われる。現在、神経分化との関連性が明らかにされていない分子について機能解析を進めており、神経分化制御因子となり得る候補分子を新たにいくつか見出している。

39°C において tsAM5D 細胞は神経分化誘導活性を有する GDNF や CNTF に応答して神経細胞様に分化することから、この特性を利用して GDNF や CNTF と類似する生理活性を持つ化合物や新規神経栄養因子のスクリーニング系を構築することも可能になると考えられる。現在、天然資源から単離した化合物を 39°C にて tsAM5D 細胞に作用させ、神経分化が誘導されるか否かを調べ、神経分化誘導活性を有するリード化合物を探索している。

6. おわりに

以上の研究によって、発生工学的な手法を用いて、副腎髄質細胞に tsSV40T を発現させた不死化細胞株 tsAM5D の樹立に成功した。さらに、GDNF/CNTF による tsAM5D 細胞の神経分化誘導を温度制御することができたことから、tsAM5D 細胞は神経分化誘導機序を解析するうえで有用なモデル細胞になると考えられる。そこで、tsAM5D 細胞の細胞生物学的な特性を利用して、今後、「神経分化を制御する分子の探索」や「神経分化誘導作用を有する化合物や生体内因子のスクリーニング」を目的とした基礎的研究を実施することができるものと思われる。

Table 1. Change in Expression of Neuronal Marker Genes in GDNF/CNTF-treated tsAM5D Cells by the Temperature Shift

Neuronal marker	mRNA level (copies/ng total RNA)		39°C/33°C -fold increase
	33°C	39°C	
MAP2	3.28±0.71	511±12	156*
NSE	15.5±1.4	743±58	47.9*
NF160K	7510±290	41200±2800	5.49*
GAP-43	23500±1600	60100±1900	2.56*
TrkA	6.52±0.23	61.1±1.8	9.38*
p75NTR	147±5.4	1640±63	11.2*

tsAM5D cells were treated with a combination of GDNF and CNTF (50 ng/ml each) in 10% FBS-containing DMEM for 3 days at either 33 or 39°C. The total RNAs were extracted and processed for real-time RT-PCR analysis. All values represent the means±S.D. of 3 independent experiments, in which measurements in each were made in triplicate. *: Significantly increased by the temperature shift from 33°C to 39°C ($p<0.05$). MAP2: microtubule-associated protein 2, NSE: neuron-specific enolase, NF160K: 160-kDa neurofilament, GAP-43: growth-associated protein-43, p75NTR: p75 neurotrophin receptor.

る。

謝辞 本研究の遂行に際し、終始、ご指導ご助言を賜りました名城大学薬学部金田典雄教授に心より感謝申し上げます。また、本研究は名城大学薬学部生体機能分析学研究室において行われたものであり、多大なご協力をいただきました疋田清美助手、坪井 優修士、森田典義修士、後藤伸公修士、吉野友美修士に深謝致します。この研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金（奨励研究）により実施されたことを付記いたします。

REFERENCES

- 1) Tegtmeier P., Ozer H. L., *J. Virol.*, **8**, 516–524 (1971).
- 2) Jat P. S., Sharp P. A., *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 1672–1681 (1989).
- 3) Chou J. Y., *Mol. Endocrinol.*, **3**, 1511–1514 (1989).
- 4) Eves E. M., Tucker M. S., Roback J. D., Downen M., Rosner M. R., Wainer B. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 4373–4377 (1992).
- 5) Whittemore S. R., White L. A., *Brain Res.*, **615**, 27–40 (1993).
- 6) White L. A., Eaton M. J., Castro M. C., Klose K. J., Globus M. Y.-T., Shaw G., Whittemore S. R., *J. Neurosci.*, **14**, 6744–6753 (1994).
- 7) McManus M. F., Chen L.-C., Vallejo I., Vallejo M., *J. Neurosci.*, **19**, 9004–9015 (1999).
- 8) Son J. H., Chun H. S., Joh T. H., Cho S., Conti B., Lee J. W., *J. Neurosci.*, **19**, 10–20 (1999).
- 9) Barber R. D., Jaworsky D. E., Yau K.-W., Ronnett G. V., *J. Neurosci.*, **20**, 3695–3704 (2000).
- 10) Steiner H.-J., Schmid K. W., Fischer-Colbrie R., Sperk G., Winkler H., *Histochemistry*, **91**, 473–477 (1989).
- 11) Mahata S. K., Mahata M., Fischer-Colbrie R., Winkler H., *Neurosci. Lett.*, **156**, 70–72 (1993).
- 12) Laslop A., Mahata S. K., Wolkersdorfer M., Mahata M., Srivastava M., Seidah N. G., Fischer-Colbrie R., Winkler H., *J. Neurochem.*, **62**, 2448–2456 (1994).
- 13) Peter D., Liu, Y., Sternini C., de Giorgio R., Brecha N., Edwards R. H., *J. Neurosci.*, **15**, 6179–6188 (1995).
- 14) Stemple D. L., Mahanthappa N. K., Anderson D. J., *Neuron*, **1**, 517–525 (1988).
- 15) Unsicker K., Skaper S. D., Varon S., *Dev. Biol.*, **111**, 425–433 (1985).
- 16) Unsicker K., Skaper S. D., Varon S., *Brain Res.*, **349**, 117–129 (1985).
- 17) Forander P., Broberger C., Stromberg I., *Cell Tissue Res.*, **305**, 43–51 (2001).
- 18) Unsicker K., Krisch B., Otten U., Thoenen H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 3498–3502 (1978).
- 19) Anderson D. J., Axel R., *Cell*, **47**, 1079–1090 (1986).
- 20) Forander P., Hoffer B., Stromberg I., *Cell Tissue Res.*, **292**, 503–512 (1998).
- 21) Barbacid M., *J. Neurobiol.*, **25**, 1386–1403 (1994).
- 22) Patapoutian A., Reichardt L. F., *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**, 272–280 (2001).
- 23) Lessmann V., Gottmann K., Malsangio M., *Prog. Neurobiol.*, **69**, 341–374 (2003).
- 24) Chao M. V., Hempstead B. L., *Trends Neurosci.*, **18**, 321–326 (1995).