
2 Einleitung

Jeder Organismus besteht aus einer Vielzahl hoch spezialisierter Zellen, die im koordinierten Zusammenspiel in Geweben und Organen die Erfüllung aller lebenswichtigen Funktionen ermöglichen (Wehner and Gehring, 1995). Ein System miteinander vernetzter Signalkaskaden in den Zellen sowie ihrer extrazellulären Liganden vermitteln Informationen zu Position, Funktion und Typ einer Zelle innerhalb des Gesamtorganismus. Die zelluläre Kommunikation kontrolliert sowohl Induktions- und Differenzierungsprozesse in der Embryogenese als auch physiologische Abläufe im adulten Organismus. Eine Deregulierung einzelner Komponenten innerhalb dieses komplexen Signalverarbeitungsnetzwerks führt in der embryonalen Entwicklung oft zu Fehlfunktionen von Geweben und Organen und kann im adulten Organismus zur Tumorentstehung beitragen (Hanahan and Weinberg, 2000). Die biochemische und genetische Charakterisierung der Signalkaskaden und ihres Zusammenspiels hat zu einem tieferen Verständnis der molekularen Grundlagen biologischer Prozesse geführt. Die fortschreitende Kenntnis solcher physiologischen Abläufe eröffnet ständig neue medizinische Interventionsmöglichkeiten in der Tumorentstehung, sowie bei Stoffwechselerkrankungen und anderen Fehlfunktionen, und bildet die Grundlage zur Erarbeitung neuer Therapiekonzepte.

In Eukaryonten kodiert eine große Anzahl von Genen für Membrandurchspannende Rezeptor-Proteine auf der Zelloberfläche (Adams et al., 2000; 1998; Venter et al., 2001), die extrazelluläre Signale aufnehmen und ins Innere der Zelle weitergeben. Aufgrund ihrer primären Struktur, der Erkennung verschiedener Liganden und aufgrund unterschiedlicher biologischer Reaktionen werden sie in distinkte Familien eingeteilt. Die Rezeptoren der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), haben eine intrinsische Protein-Tyrosinkinase Aktivität auf ihrer intrazellulären Domäne, während die extrazelluläre Domäne stark divergiert (Blume-Jensen and Hunter, 2001). RTK erfüllen wichtige Aufgaben bei der Kontrolle fundamentaler zellulärer Prozesse. Die Regulation des Zellzyklus und der Migration von Zellen sowie die Ausführung metabolischer Aufgaben sind ebenso wichtige Ziele von RTK, wie die Unterdrückung von Apoptose und die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Sie sind wichtige Regulatoren der interzellulären Kommunikation und spielen eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung und dem Ablauf physiologischer Prozesse im adulten Organismus (Birchmeier et al., 2003; Frisen et al.,

1999; Paulson and Bernstein, 1995; Shilo, 1992). RTK binden nach ihrer Aktivierung durch spezifische extrazelluläre Liganden verschiedene intrazelluläre Adaptor-Proteine, die das empfangene Signal innerhalb der Zelle weiterleiten. Adaptor-Proteine liefern einen entscheidenden Beitrag zur korrekten Verarbeitung des Signals in dem entsprechenden zellulären Kontext: sie können die subzelluläre Lokalisation der Rezeptoren sowie deren spezifische Vernetzung mit einer oder mehreren Signalkaskaden regulieren (Birchmeier et al., 2003; Kolch, 2003; Pawson and Scott, 1997).

2.1 Die Scaffold-Adaptor-Proteine der Shank-Familie

Die Shank-Protein-Familie besteht aus drei Mitgliedern, Shank1-3, und wurde 1999 von verschiedenen Gruppen unabhängig von einander als Shank, Synamon CortBP1 oder ProSAP-Proteine beschrieben (Boeckers et al., 1999a; Boeckers et al., 1999b; Du et al., 1998; Lim et al., 1999; Naisbitt et al., 1999; Sheng and Kim, 2000; Yao et al., 1999; Zitzer et al., 1999). Die zyttoplasmatischen Proteine haben mehrere Protein-Protein-Interaktionsdomänen, wie Ankyrin-Repeats, SH3-, PDZ- und SAM-Domänen sowie eine Prolin-reiche Region (Abb. 1), die sich zum Teil in der Namensgebung niederschlagen (Shank: *SH3* und *Ankyrin repeat domain*; ProSAP: *Prolin rich synapse associated protein*).

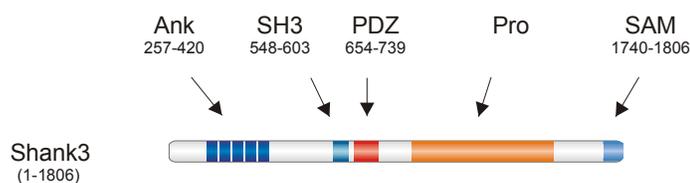


Abb. 1 – Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Shank3. Die Anzahl der Aminosäuren ist in Klammern angegeben. (Abkürzungen: Ank: „Ankyrin repeat“ Domäne; SH3: *Src Homologie 3*-Domäne, PDZ: *PSD95-Disc Large-ZO-1*-Domäne, Pro: *Prolin-reiche Region*, SAM: *Sterile Alpha Motif*),

Shank-Proteine lokalisieren in neuronalen Zellen in dichten Proteinstrukturen in der postsynaptischen Zellmembran, den „post synaptic densities (PSD)“ in so genannten „dendritic spines“ (Boeckers et al., 1999a; Sheng and Kim, 2000). Sie interagieren dort mit mehreren anderen Gerüst-Proteinen und Teilen des kortikalen Zytoskeletts. Shank bindet

zum Beispiel den GKAP/PSD95 (guanylate kinase anchoring protein/post synaptic density p95)-Komplex, sowie das Gerüst-Protein GRIP (glutamate receptor interAKting protein) und kann dadurch Neurotransmitter-Rezeptoren in der Zellmembran in einem Komplex halten (Boeckers et al., 1999b; Naisbitt et al., 1999; Sheng and Kim, 2000; Tu et al., 1999; Yao et al., 1999). Die Bindung von α -Fodrin an Shank stellt eine dynamische Verbindung zum Zytoskelett her; durch Anheben des intrazellulären Ca^{2+} -Levels kann diese Interaktion gestört und Shank aus der festen Verankerung gelöst werden (Bockers et al., 2001). Außerdem binden Shank-Proteine den GDP/GTP Austauschfaktor PIX (PAK interAKting exchange factor) und die Aktin-Modulatoren IRSp53 (insuline receptor substrate p53), Cortactin und Abp1 (Aktin binding protein 1) (Bockmann et al., 2002; Naisbitt et al., 1999; Park et al., 2003; Qualmann et al., 2004; Soltau et al., 2002). PIX ist ein Regulator der Aktivität der GTPasen Rac und Cdc42 (Manser et al., 1998), IRSp53 kann in Abhängigkeit von Cdc42 die Aktin-Polymerisation, sowie die Komplexierung von Shank mit PSD95 beeinflussen (Krugmann et al., 2001; Miki et al., 2000; Soltau et al., 2004) und Cortactin moduliert die Aktin-Polymerisation in Abhängigkeit von Phosphorylierung durch Kinasen der Src Familie (Huang et al., 1997). Hierdurch besteht eine direkte Verbindung zur Zytoskelett-Dynamik. Abp1 kann zudem in Abhängigkeit der synaptischen Aktivität in „dendritic spines“ relokalisiert werden, was Shank-Proteinen die Rolle eines Zytoskelett-Ankers in „dendritic spines“ zuordnet (Qualmann et al., 2004). Des Weiteren interagiert Shank mit dem Scaffold-Protein Homer, das metabotrophische Glutamat-Rezeptoren an intrazelluläre IP3 (inositol-1,4,5-trisphosphate)-Rezeptoren koppelt und so eine Verbindung zu Ca^{2+} als intrazellulärem Botenstoff herstellt (Tu et al., 1999). Die Shank-vermittelte Gruppierung von Glutamat- und IP3-Rezeptoren beeinflusst die Morphologie der post-synaptischen Dichte (Sala et al., 2001).

Im Gegensatz zu den detaillierten Erkenntnissen in Neuronen sind Shank-Proteine außerhalb des neuronalen Systems kaum charakterisiert. Lediglich die Expression von Shank2/ProSAP1 in einigen epithelialen Geweben, wie den epithelialen Kanälen der Lunge, des Pancreas und der Niere, sowie in den sogenannten „hepatic bile ducts“ der Leber, konnte gezeigt werden (Redecker et al., 2001). Eine Funktion der Shank-Proteine in nicht-neuronalen Zellen ist bislang nicht bekannt. Die bekannten Interaktionspartner der drei Shank-Proteine legen eine Rolle dieser Scaffold-Adaptoren in der dynamischen Integ-

ration von Rezeptoren in das Zytoskelett nahe, geben jedoch keinen Hinweis auf eine aktive Funktion der Proteine in der Signalweiterleitung in den Zellkern.

2.2 Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen umfasst mindestens 58 Mitglieder in 20 Subfamilien (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Die RTK haben kaum Gemeinsamkeiten in ihren extrazellulären Domänen, besitzen aber alle eine konservierte intrazelluläre Tyrosinkinase Domäne, die den Transfer der γ -Phosphatgruppe von ATP auf die Hydroxygruppe eines Tyrosin Restes auf einem Substratprotein katalysiert (Schlessinger, 2000). Alle RTK haben eine extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne, die durch eine Transmembrandomäne mit der zytoplasmatischen Domäne verbunden ist. Die intrazelluläre Domäne trägt außer der Kinasedomäne wichtige regulatorische Sequenzen, die Ziele von Autophosphorylierung sowie Phosphorylierung durch heterologe Proteine, zum Beispiel Kinasen der Src-Familie, sind.

Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die Aktivierung von RTK beginnt mit der Bindung eines Liganden an die Liganden-Bindungsstelle. Eine Vielzahl von Liganden, angefangen von kleinen organischen Molekülen über Lipide, Kohlenhydrate und Peptide bis hin zu Proteinen können an Zelloberflächen-Rezeptoren binden und diese aktivieren. RTK werden in der Regel durch kleine sekretierte Proteine, so genannte Wachstumsfaktoren, aktiviert, wie zum Beispiel Epidermal Growth Factor (EGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF) oder Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF). Diese Faktoren können die entsprechenden RTK, den EGF-Rezeptor, den VEGF-Rezeptor bzw. Met parakrin (auf einer anderen Zelle) oder autokrin (auf derselben Zelle) stimulieren. Verschiedene RTK werden jedoch auch, oder ausschließlich durch membrangebundene Liganden stimuliert. Neuregulin, ein Ligand für ErbB3 und ErbB4 kann zum Beispiel sezerniert werden, oder als Transmembranmolekül vorliegen (Garratt et al., 2000). Ephrine, Liganden der Eph-Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie können mittels eines Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers oder durch eine

Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert sein (Kullander and Klein, 2002). Für eine Stimulation ist dann ein direkter Kontakt zwischen zwei Zellen notwendig.

Mit Ausnahme des Insulin-Rezeptors sind alle RTK Monomere in der Zellmembran (Schlessinger, 2000). Die Ligandenbindung bewirkt die Homodimerisierung von Rezeptormolekülen in der Zellmembran und führt zur Stabilisierung einer aktiven Konformation des Rezeptordimers. Durch die nun folgende Transphosphorylierung der Rezeptoren werden die Kinasedomänen in ihren aktiven Konformationen gehalten und können regulatorische Tyrosin-Reste der zytoplasmatischen Domänen phosphorylieren (Mohammadi et al., 1996). Es gibt Beispiele, in denen Heterodimere zwischen verschiedenen Familienmitgliedern einer RTK-Subfamilie, oder zwischen gänzlich verschiedenen Rezeptoren gebildet werden. ErbB2 beispielsweise bildet Heterodimere mit ErbB3 und ErbB4, Letzteres ist selbst katalytisch inaktiv (Garratt et al., 2000). Die RTK Trk kann Heterodimere mit p75^{NTR} bilden, um das Signal weiterzuleiten. Hierdurch werden vermutlich Affinität und Spezifität der Liganden reguliert (Bibel et al., 1999; Zaccaro et al., 2001). Die phosphorylierten Tyrosin-Reste der zytoplasmatischen Domäne werden dann von intrazellulären Signalproteinen erkannt, die konservierte SH2- (*Src Homologie 2*) oder PTB (*Phosphotyrosin Binde*)-Domänen enthalten. Nach Bindung an den aktiven Rezeptor können diese Moleküle weitere Signalproteine rekrutieren, sodass ein spezifischer Signal-Komplex an der Innenseite der Zellmembran zusammengesetzt wird. Dies wiederum führt zur Aktivierung distinkter Signalwege in der Zelle und löst eine spezifische Reaktion auf den äußeren Stimulus aus (Pawson and Scott, 1997).

Signalwege unterhalb von Rezeptor-Tyrosinkinase

Durch die Kombination von Daten aus verschiedensten experimentellen Ansätzen konnten in den letzten 15 Jahren große Fortschritte im Verständnis der intrazellulären Signaltransduktion erzielt werden (Hunter, 2000). In biochemischen Studien wurden Schlüsselkomponenten verschiedener Signalwege aus Zellen isoliert, kloniert und analysiert. Homologe Komponenten wurden parallel dazu durch genetische Screens in *C. elegans* und *Drosophila* isoliert. In vielen Fällen wurden darüber hinaus dieselben Signalproteine als Produkte mutierter Gene in verschiedenen Krankheiten wie Immundefekte, neurologischen Fehlfunktionen und Krebs gefunden.

Ein zentraler Signalweg, der von den meisten RTK moduliert werden kann, ist der Ras-MAPK (mitogen activated protein kinase)-Signalweg (Porter and Vaillancourt, 1998). In der Literatur wurde dieser Signalweg unter anderem unterhalb des EGF-Receptors, des FGF-Receptors, unterhalb von Met, Ret, des VEGF- und des PDGF-Receptors, sowie für Trk, den Insulin-Receptor und die Eph-Rezeptoren beschrieben (Alberti et al., 1998; Besset et al., 2000; Birchmeier et al., 2003; Elowe et al., 2001; Kroll and Waltenberger, 1997; Marra et al., 1995; Ohiwa et al., 1997; Qui and Green, 1992; Skolnik et al., 1993; Sundaram and Han, 1996; Vincent et al., 1998; Weidner et al., 1996; Williams et al., 1993). Biochemische und genetische Studien konnten zeigen, dass das Adaptormolekül Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2) über seine SH2-Domäne an die aktivierte RTK bindet und den GDP/GTP-Austauschfaktor Sos zur Plasmamembran rekrutiert.

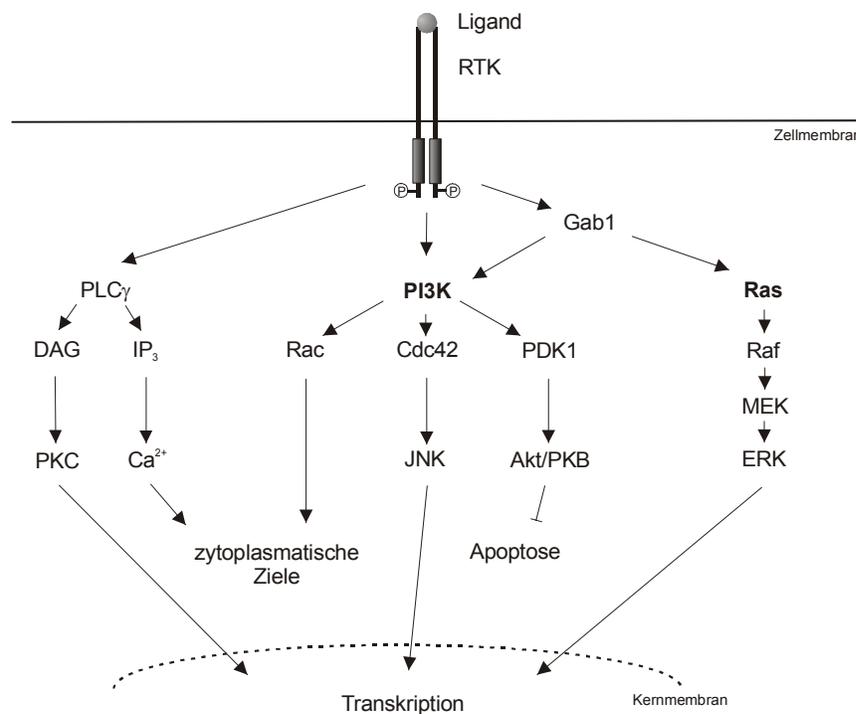


Abb. 2 – Signalwege unterhalb von RTK. Unterhalb von RTK können, je nach zellulärem Kontext, verschiedene Signalwege aktiviert werden. Exemplarisch ist hier der Erk-MAPK-Signalweg, sowie der PI3K-Signalweg und der PLC γ -Signalweg mit weiteren Effektoren dargestellt. Die Stimulation der Signalkaskaden führt zur Aktivierung zytoplasmatischer Effektoren, oder, nach Translokation entsprechender Signalproteine in den Zellkern, zur Initiation der Transkription von Zielgenen.

Sos wird so in die räumliche Nähe zu der kleinen GTPase Ras gebracht, die ebenfalls an der Plasmamembran lokalisiert ist, und katalysiert dort den Austausch von GDP zu GTP, wodurch Ras in einem aktiven Zustand gehalten wird (Buday and Downward, 1993). GTP-Ras interagiert wiederum mit verschiedenen Effektormolekülen (Malumbres and Pellicer, 1998) und initiiert unter anderem eine Phosphorylierungs-Kaskade dreier hintereinander geschalteter Kinasen, die sogenannte MAP-Kinase-Kaskade (Abb. 2). Zunächst wird die MAP-Kinase-Kinase-Kinase Raf aktiviert, die dann die MAP-Kinase-Kinase MEK durch Phosphorylierung zweier spezifischer Serin-Reste in den aktiven Zustand versetzt, welche dann wiederum die MAP-Kinase Erk (*extra cellular stimulus regulated kinase*) phosphoryliert und aktiviert (Marshall, 1994; Robinson and Cobb, 1997). Die Kinase Erk hat eine Reihe zytoplasmatischer Substrate und transloziert nach Phosphorylierung auch in den Zellkern, wo sie zur Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren beiträgt (Seger and Krebs, 1995). MAPK-Aktivität kann je nach Art der Stimulation zu Proliferation oder Differenzierung der Zellen führen. Das Signalmodul MAPKKK-MAPKK-MAPK ist evolutionär hoch konserviert und mehrere solcher Module existieren in Hefe, Invertebraten und Vertebraten (Widmann et al., 1999).

Ein weiterer konservierter und elementarer Signalweg unterhalb von RTK ist der PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase)-Signalweg (Kinashi et al., 1995; Okkenhaug and Vanhaesebroeck, 2003). Die regulatorische Untereinheit der PI3K, p85, kann über ihre SH2-Domäne direkt oder indirekt an aktive RTK binden, wodurch die katalytische Untereinheit, p110, aktiviert wird (Hiles et al., 1992; Holt et al., 1994). PI3K katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (PtdIns)-Lipiden zu PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃ (Vanhaesebroeck et al., 2001). 3-Phosphoinositol-Lipide können eine Reihe verschiedener Signalproteine mit entsprechenden 3-Phosphoinositol-Bindemodulen, wie FYVE-Domänen und Plekstrin-Homologie (PH) Domänen an die Zellmembran rekrutieren (Leevers et al., 1999). Dazu gehören unter anderem PDK1 (3-Phosphoinositide dependent protein kinase-1), Akt/PKB (Protein-Kinase B), PLC γ (Phospholipase C γ), und das Docking-Protein Gab1 (Grb2 associated binder-1), die so in die Nähe ihrer Substratproteine bzw. weiterer Interaktionspartner gebracht werden, diese aktivieren und verschiedene zelluläre Prozesse in Gang setzen (Abb. 2) (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Die Aktivierung von Akt/PKB blockiert unter anderem die Apoptose und lässt die Zellen überleben (Datta et al., 1999), die Aktivierung von PLC γ führt zur Hydrolyse von

PtdIns(4,5)P₂ in die beiden „Second messenger“ Diacylglycerol und Ins(1,4,5)P₃ (IP₃), welche zur Aktivierung von PKC bzw. der Ausschüttung von Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Retikulum führt (Mikoshiba and Hattori, 2000). Durch PtdIns(3,4,5)P₃ können auch Aktivatoren der Rho-GTPase-Familie zur Plasmamembran rekrutiert werden, unterhalb derer weitere Signalwege, sowie die Reorganisation des Zytoskeletts beeinflusst werden können (Hilpela et al., 2004).

In vielen Fällen werden der Erk-MAPK-Signalweg und der PI3K-Signalweg konzertiert aktiviert, um eine biologische Reaktion auszulösen. Ein Beispiel ist die durch HGF/SF und Met induzierte Migration von MDCK-Epithelzellen *in vitro*: zunächst wird der PI3K-Signalweg angesprochen, der zu einer Umordnung des Zytoskeletts führt. Die Zellen werden größer und flacher. Anschließend wird der Erk-MAPK-Signalweg aktiviert, um die eigentliche Migration auszulösen. Blockiert man nur den Erk-MAPK-Weg mit spezifischen Inhibitoren, flachen die Zellen ab, migrieren jedoch nicht. Blockiert man dagegen die PI3K, zeigen die Zellen keine Reaktion auf den Stimulus (Potempa and Ridley, 1998). Es ist hier ein Zusammenspiel beider Signalwege unterhalb der RTK Met notwendig, um eine Differenzierungsreaktion der Zellen auszulösen.

2.3 Die Rezeptor-Tyrosinkinase Ret

Ret (*re*arranged during *t*ransfection) wurde ursprünglich in einem Transformationsassay mit Lymphom-DNA in NIH3T3 Zellen entdeckt (Takahashi et al., 1985). Später wurde eine onkogene Form von Ret auch aus Tumoren von Schilddrüsenkrebs-Patienten isoliert (Santoro et al., 1990). 1993 konnten aktivierende Punktmutationen im *ret*-Gen aus Patienten isoliert werden (Mulligan et al., 1993), die im Laufe der Zeit mit verschiedenen erblichen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wurden. Kurz darauf wurde durch gezielte Inaktivierung des *ret*-Gens in der Maus gezeigt, dass Ret essentiell für die Entwicklung des enterischen Nervensystems und der Niere ist (Romeo et al., 1994; Schuchardt et al., 1994; Smith et al., 1994). Mäuse, denen Ret fehlt, oder bei denen die Ret-Kinasedomäne inaktiviert wurde, zeigen eine unvollständige Innervierung des Darms, ein Phänotyp, der beim Menschen als Hirschsprungsche Krankheit bekannt ist (Schuchardt et al., 1995). Die Nierenentwicklung in diesen Mäusen stoppt in einem sehr frühen Stadium

noch bevor sich die typischen Verzweigungen des Sammelrohrs auszubilden beginnen (Schuchardt et al., 1996). Erst 1996 konnten Durbec et al. und Trupp et al. unabhängig von einander einen Liganden für Ret isolieren. Unter Verwendung von *Xenopus* Bioassays und der Analyse einer Motor-Neuron-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass Ret ein funktioneller Rezeptor für GDNF (glia cell line *d*erived *n*eurotrophic *f*actor) ist (Durbec et al., 1996; Trupp et al., 1996). Die gezielte Inaktivierung von GDNF in der Maus zeigt einen sehr ähnlichen Phänotyp wie die Inaktivierung von Ret (Sanchez et al., 1996; Vainio and Lin, 2002). Kurze Zeit später wurde der Ko-Rezeptor GFR α als essentieller Bestandteil des aktiven Ret-GDNF Komplexes isoliert (Baloh et al., 2000; Enomoto et al., 1998). In jüngerer Zeit wurde von verschiedenen Laboren gezeigt, dass Ret in mehreren Splice-Varianten exprimiert wird (Ivanchuk et al., 1997; Ivanchuk et al., 1998; Lorenzo et al., 1995; Myers et al., 1995). Es sind vier 5' Spliceformen mit verkürzten N-Termini, sowie drei 3' Spliceformen mit alternativen C-Termini von Ret bekannt (Ivanchuk et al., 1998; Myers et al., 1995).

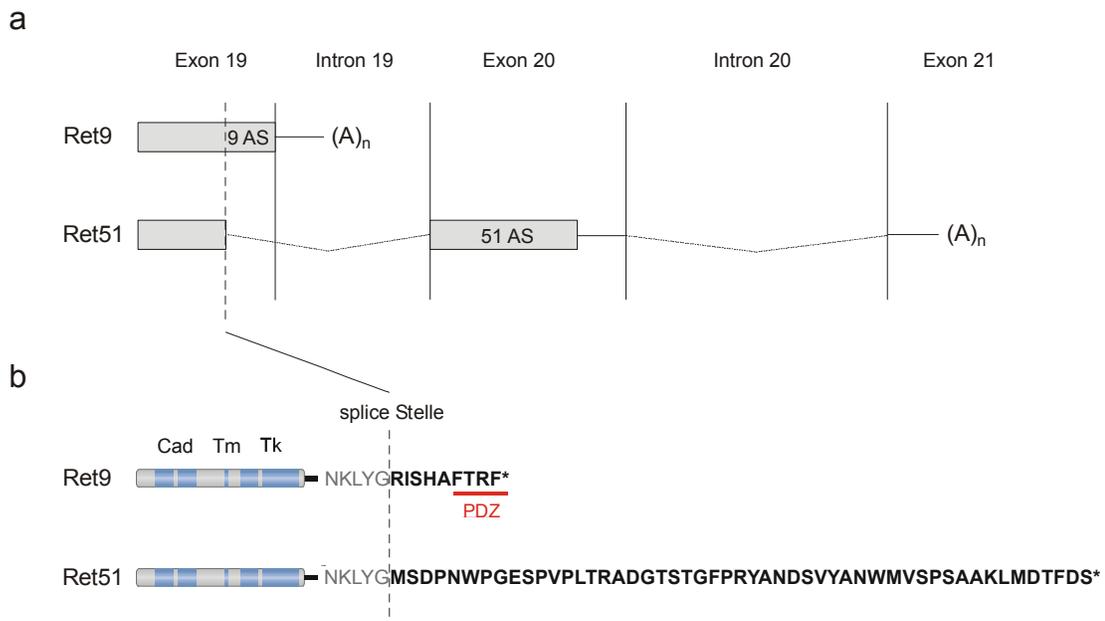


Abb. 3 – Die Ret9- und Ret51- Splice-Form von Ret. (a) Schematische Organisation der 3' Region der Transkripte von Ret9 und Ret51. (b) Resultierende Proteine von Ret9 und Ret51; die C-Terminalen 9 bzw. 51 Aminosäuren sind fett gedruckt, die Splice-Stelle und das PDZ-Bindemotif in Ret9 sind gekennzeichnet. (AS, Aminosäure; (A)_n, Poly-A; Cad, Cadherin-Domänen; Tm, Transmembran-Domäne; Tk, Tyrosinkinase-Domänen).

Die beiden prominentesten Isoformen sind zwei 3'-Splicevarianten, Ret9 und Ret51 (Abb. 3). Durch das alternative Splicing wird ein Teil des letzten Exons in Ret9, Exon 19, mit Exon 20 verbunden, wobei die 9 C-terminalen Aminosäuren von Ret9 gegen 51 vollkommen verschiedene Aminosäuren in Ret51 ausgetauscht werden. Die beiden Isoformen unterscheiden sich signifikant in ihrem biologischen Verhalten in der Entwicklung von Niere und enterischem Nervensystem, was auf ein kompliziertes Ret-Signalsystem schließen lässt (de Graaff et al., 2001; Srinivas et al., 1999) (siehe Kapitel 2.4). Ein molekularer Mechanismus, der diesen Unterschied erklären kann, ist nicht bekannt. Anderen Ret-Spliceformen konnte bislang keine Funktion zugeordnet werden.

Aktivierung von Ret

Durch Arbeiten verschiedener Gruppen konnten bis heute vier Ret-Liganden isoliert werden, die zur „glia cell line derived neurotrophic factor family“ (GFL) zusammengefasst wurden. Zu der Ligandenfamilie gehören neben GDNF auch Neurturin (NTN), Persephin (PSP) und Artemin (ARTN) (Airaksinen et al., 1999). Die Liganden binden nicht direkt an Ret sondern an einen von vier Ko-Rezeptoren, die sogenannten „GDNF family receptors“ (GFR α). Die Ko-Rezeptoren GFR α 1-4 sind über einen GPI-Anker in der Plasmamembran fixiert (Abb. 4). Jeder Ligand hat eine eindeutige Spezifität für einen Ko-Rezeptor, durch

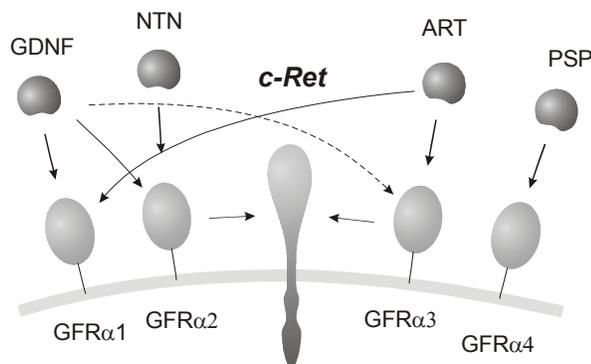


Abb. 4 – Das Signalsystem Ret. Einer der vier neurotrophischen Faktoren GDNF, NTN, ART oder PSP bindet bevorzugt an einen der Ko-Rezeptoren GFR α 1-4, die daraufhin einen Komplex mit Ret bilden und zur Aktivierung von dessen Tyrosinkinase-Aktivität führen. Die Liganden können mit abnehmenden Affinitäten, dargestellt durch dicke, dünne und gestrichelte Linien, auch mit anderen Ko-Rezeptoren wechselwirken und Ret aktivieren. (Abkürzungen siehe Text; modifiziert nach (Airaksinen et al., 1999))

fette Pfeile in Abb. 4 dargestellt. In Abwesenheit von Ret kann ein Ligand nur seinen Ko-Rezeptor spezifisch binden, während in Gegenwart von Ret ein Ligand mit unterschiedlicher Spezifität an verschiedene Ko-Rezeptoren binden kann, dargestellt durch dünne Pfeile in Abb. 4 (Airaksinen et al., 1999). Ret dient also als gemeinsame Komponente in diesem Signalsystem. Die verschiedenen Signalkomponenten sind zum Teil in unterschiedlichen Geweben exprimiert (Homma et al., 2000; Schober et al., 2000; Stover et al., 2000; Utsumi et al., 2000) und verleihen der Signaltransduktion von Ret eine große Komplexität schon auf der Ebene der Rezeptor Stimulation.

Nach Bindung eines GFL-Dimers an den entsprechenden Ko-Rezeptor dimerisiert dieser und führt nachfolgend wie bei allen RTK zur Dimerisierung von Ret und dessen Autophosphorylierung (Airaksinen et al., 1999; Cik et al., 2000; Yu et al., 1998). In der zytoplasmatischen Domäne befinden sich mehrere Tyrosin-Reste, die nach der Aktivierung der Ret-Kinase phosphoryliert werden (van Weering and Bos, 1998). Die Tyrosine liegen in unterschiedlichen Erkennungssequenzen und werden nach ihrer Phosphorylierung von verschiedenen Adaptorproteinen erkannt. Y905 wurde als Bindungsstelle für die SH2-Domänen der Adaptorproteine Grb7 und Grb10 identifiziert (Pandey et al., 1995; Pandey et al., 1996). Y1015 innerhalb der Kinasedomäne von Ret ist die Bindungsstelle für PLC γ , welche mit der onkogenen Transformation durch Ret-Mutanten in Verbindung gebracht wurde (Borrello et al., 1996). Die Funktion dieser drei Ret-Interaktionspartner in der Ret-Signaltransduktion ist bislang nicht geklärt. Die am besten charakterisierte Bindungsstelle für Adaptorproteine ist Y1062. Hier binden das LIM-Domänen-Protein Enigma (Durick et al., 1996), das Adaptorprotein FRS-2 (FGF Receptor Substrate-2) (Kurokawa et al., 2001), die SH2- und die PTB-Domäne des Adaptorproteins Shc (Src homology 2 domain containing) (Arighi et al., 1997) sowie die Docking Proteine Dok1-6 (Downstream of Tyrosine Kinase), wie unter anderem unser Labor zeigen konnte (Crowder et al., 2004; Grimm et al., 2001). Y1062 ist essentiell für die volle onkogene Aktivität von Ret MEN2A- und 2B-Mutanten (Asai et al., 1996; Segouffin-Cariou and Billaud, 2000). Die beschriebenen Bindepartner können alle mit der Ret9 und der Ret51-Isoform interagieren. Auf der von Exon 20 kodierten Sequenz in Ret51 liegt ein weiteres Tyrosin, Y1096, das in Ret9 nicht vorhanden ist (vgl. Abb. 3). Y1096 liegt in einer Konsensus-Bindestelle für das Adaptorprotein Grb2, das dort nach Phosphorylierung zusätzlich binden kann (Lorenzo et al., 1997).

Bekannte Signalwege unterhalb von Ret

Nach der Aktivierung von Ret können über die Rekrutierung unterschiedlicher Adaptormoleküle verschiedene Signalwege stimuliert werden. In der Literatur sind die Stimulation des Erk-MAPK-, des p38-MAPK- und des ERK5-MAPK-Signalwegs, des JNK- und des PI3K-Signalwegs, sowie die Aktivierung von NF- κ B und CREB unterhalb von Erk und PI3K beschrieben (Hayashi et al., 2000; Hayashi et al., 2001; Kurokawa et al., 2003). Außerdem können die GTPasen der Rho Familie, Rho, Rac und Cdc42, durch Ret aktiviert werden (Fukuda et al., 2002). Das Hauptaugenmerk liegt auf dem Erk-MAPK- und dem PI3K-Signalweg, da diese Proliferation und Differenzierung einleiten, sowie das Überleben der Zellen sichern und in der Zellmigration eine wichtige Rolle spielen. Diese beiden

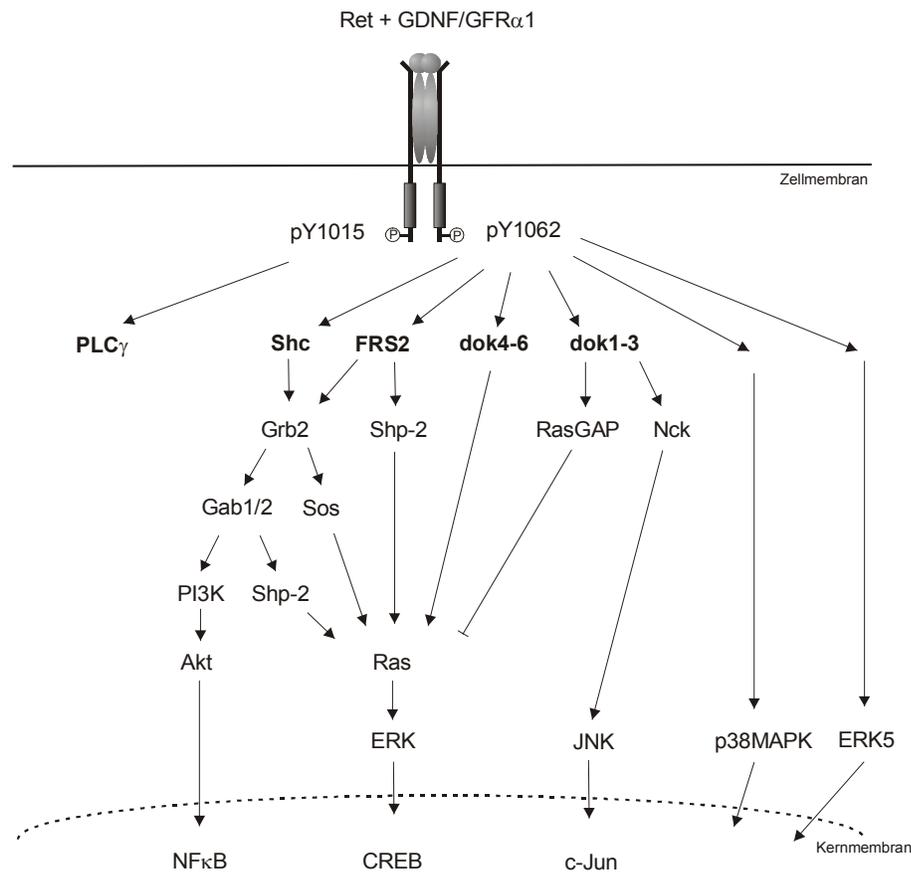


Abb. 5 - Bekannte Signaltransduktionswege unterhalb der RTK Ret. Die Adaptorproteine, die direkt an die phosphorylierten Tyrosine 1015 bzw. 1062 in Ret binden sind fett gedruckt. Abkürzungen siehe Text.

Signalwege sind auch die Entscheidenden in der Transformation von Zellen mit onkogenen Formen von Ret (Asai et al., 1996; Kurokawa et al., 2003; Segouffin-Cariou and Billaud, 2000).

Die Mitglieder der Dok-Adaptorprotein-Familie können durch Rekrutierung unterschiedlicher Signal-Proteine entweder inhibierend (Dok1-3), oder aktivierend (Dok4-6) auf den MAPK-Signalweg wirken (Crowder et al., 2004; Grimm et al., 2001; Jones and Dumont, 1999; Suzu et al., 2000). Dok1-3 interagieren mit RasGAP und führen daher zu einer schnellen Inaktivierung des Ras-MAPK-Weges; dies ist über Dok4, 5 und 6 nicht möglich, da diese die entsprechende Bindestelle nicht besitzen (Abb. 5).

Das Adaptorprotein FRS-2 rekrutiert den Grb2-Sos-Komplex an die Plasmamembran und aktiviert dort über Ras die Erk-MAPK-Kaskade (Kurokawa et al., 2001; Melillo et al., 2001). Kurokawa et al. konnten außerdem zeigen, dass FRS2 mit der Protein-Tyrosinphosphatase SHP-2 interagiert. SHP-2 ist ebenfalls in die Aktivierung der Erk-MAPK-Kaskade involviert, wenngleich der Mechanismus nicht vollständig verstanden ist. Es wird angenommen, dass SHP-2 oberhalb von Ras wirkt und durch seine Phosphatase-Aktivität die Rekrutierung von RasGAP-Proteinen an die Plasmamembran verlangsamt, die Ras andernfalls schnell inaktivieren und somit die Stimulation des Ras-MAPK Signalweges beenden würden (Agazie and Hayman, 2003).

Auch über Shc kann der Grb2-Sos-Komplex zum Rezeptor gebracht werden, wo er die Aktivierung von Ras und dessen Effektor-Molekülen vermitteln kann. Es wurde gezeigt, dass Shc und Grb2 auch mit Gab-Proteinen assoziiert sind (Schaeper et al., 2000) und diese zu Ret rekrutieren können. Über Gab1/2 besteht die Möglichkeit zur Aktivierung der PI3K und Shp-2 (Besset et al., 2000; Hayashi et al., 2000) (Abb. 5). Unterhalb der PI3K ergibt sich die Möglichkeit zur Aktivierung von Akt/PKB und zur Stimulation der Rho-GTPase Rac (Fukuda et al., 2002). Ersteres verhindert die Apoptose und trägt so zum Überleben der Zellen bei, Letzteres spielt bei der Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts, sowie in der Zellmigration eine wichtige Rolle.

Ret-assoziierte Krankheiten

In der Embryonalentwicklung in Mammalia erfüllt Ret in mehreren Prozessen eine wichtige Funktion. Während der Embryogenese der Maus ist Ret vor allem im Nerven- und Exkretorisches System exprimiert (Pachnis et al., 1993). Im Nervensystem ist Ret-Expression in Vorläufern des enterischen Nervensystems (ENS), in autonomen und sensorischen Neuronen des peripheren Nervensystems, sowie in Motoneuronen und katecholaminergischen Neuronen des Zentralnervensystems zu finden. Deletion des *ret* Gens in der Maus führt zu Fehlern in der Entwicklung der Niere und des ENS, was auf eine essentielle Funktion von Ret in diesen Geweben schließen lässt (Sanchez et al., 1996; Schuchardt et al., 1994; Schuchardt et al., 1996; Srinivas et al., 1999).

Im Menschen liegt das *ret*-Gen auf Chromosom 10q11.2 (Ishizaka et al., 1989). Es wurden sowohl aktivierende als auch inaktivierende Mutationen gefunden. Bislang sind 13 familiär auftretende, konstitutiv aktivierende Mutationen im *ret*-Gen bekannt (Jhiang, 2000), die sowohl im extrazellulären wie auch im intrazellulären Teil des Rezeptors liegen. Der Mechanismus der onkogenen Aktivierung durch die verschiedenen Mutationen beinhaltet entweder die Mutation eines Cystein-Restes in der extrazellulären Domäne wodurch über eine Disulfidbrücke kovalent verbundene Rezeptordimere entstehen, oder die konstitutive Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne. Diese Mutationen sind assoziiert mit Typ 2 Multipler Endokriner Neoplasie (MEN 2). Abhängig von den involvierten Zelltypen wird MEN 2 in drei Subtypen, MEN 2A, MEN 2B und FMTC (familial medullary thyroid carcinoma), unterteilt. MEN 2A und B, sowie FMTC sind erbliche Krebsarten, die Tumore in neuroendokrinem Gewebe hervorrufen (van Heyningen, 1994).

Eine weitere Form konstitutiv aktiven Rets sind Chromosomentranslokationen zwischen *H4*, *RI α* , *ELE1*, *RFG5*, *HTIF*, *RFG7* und *ELKS* und dem *ret*-Gen, die zu 8 verschiedenen Fusionsrezeptoren Ret/PTC1-7 bzw. Ret/ELKS führen (Bongarzone et al., 1993; Fugazzola et al., 1996; Grieco et al., 1990; Jhiang, 2000; Klugbauer et al., 1998; Lanzi et al., 1992; Santoro et al., 1994). Hierbei führt die Translokation, wie bei anderen bekannten Tyrosinkinase-Translokationsprodukten, zur konstitutiven Dimerisierung eines Großteils der zytoplasmatischen Domäne inklusive der Tyrosinkinase-Domäne von Ret, und damit zur permanenten Phosphorylierung der für die Signalweiterleitung relevanten Tyrosine. Bei

allen Ret/PTC-Onkogenen bis auf Ret/PTC4 liegt die Fusionsstelle im zytoplasmatischen Teil von Ret, die codierten Proteine sind daher im Zytoplasma zu finden. Ret/PTC Proteine werden, unter dem Einfluß der Promotoren ihrer Fusionspartner, ausschließlich in Thyroid Follikelzellen exprimiert und führen dort zur Bildung von Schilddrüsenkrebs (papillary thyroid carcinoma, PTC). Interessanterweise sind ca. 60% der Fälle von Schilddrüsenkrebs in der Ukraine, die mit dem Reaktorunfall in Chernobyl 1986 in Verbindung gebracht werden, auf Ret/PTC-Chromosomentranslokationen zurückzuführen (Balter, 1995; Baverstock et al., 1992; Bonn, 1996; Williams, 1994).

Inaktivierende Mutationen im *ret*-Gen führen zur Hirschsprungschen Krankheit sowie in einigen Fällen zu Dysplasien in der Niere. Inaktivierende Mutationen betreffen häufig die Tyrosinkinase-Domäne von Ret, sodass nach Ligandenbindung kein Signal in die Zelle weitergegeben werden kann, oder verhindern die korrekte Prozessierung des Rezeptors in ER und Golgi (Carlomagno et al., 1996; Pasini et al., 1995). Bei der Hirschsprungschen Krankheit ist die Wanderung bestimmter Neuralleisten-Zellen gestört. Vorläufer-Zellen endokriner Neuronen können nicht in den Darm einwandern, was dazu führt, dass ein großer Teil des Darms nicht innerviert wird und daher nicht funktionsfähig ist. Es sind außerdem einige Fälle von Hirschsprung-Patienten beschrieben, bei denen es zu einer Fehlbildung der Niere kommt. Diese ist in der Schwere sehr unterschiedlich und meist einseitig, sodass angenommen wird, dass Nierenmissbildungen bei Hirschsprung-Patienten oft keine erkennbaren Störungen hervorrufen und daher übersehen werden (Lore et al., 2000; Lore et al., 2001; McIntyre et al., 2003).

2.4 Tubulogenese - ein komplexer Vorgang in Epithelzellen

Tubuläre Organe sind in allen höheren Lebewesen von *C. elegans* über *Drosophila* und Zebrafish bis hin zu Mammalia zu finden (Hogan and Kolodziej, 2002). Durch solche Strukturen wird die für metabolische Prozesse, wie beispielsweise Nährstoff- und Gasaustausch, zur Verfügung stehende Körperoberfläche drastisch vergrößert, wobei gleichzeitig der Transportweg der Metaboliten kurz gehalten wird. Die Entwicklung tubulärer Organe mag eine entscheidende Rolle bei der Evolution von Organismen mit zunehmender Körpergröße gespielt haben (West et al., 1999). Die Natur hat dabei mehrere, prinzipiell

verschiedene Mechanismen zur Bildung von Tubuli evolviert: die Ausstülpung von Zellen aus einer Epithelzellschicht und die anschließende Verzweigung der Röhren, wie z. B. in der Lunge (Hogan and Kolodziej, 2002), die Bildung von Tubuli zwischen zwei aufeinander liegenden Epithelzellschichten mit lokalen Unterschieden in der Adhärenz zwischen den Zellschichten, z. B. in *Drosophila* Flügelvenen (Bier, 2000), die Kondensation von unpolarierten Zellen zu polarisierten Epithelzellen mit anschließender Lumenbildung, wie z. B. im Pankreas (Edlund, 2002), und die Bildung von Röhren innerhalb einer einzelnen Zelle, wie in *C. elegans* Exkretions-Zellen (Buechner et al., 1999). In Mammalia bildet die Tubulogenese die Grundlage der funktionellen Einheiten parenchymaler Organe wie Lunge, Leber, Brustdrüse und Niere, aber auch für die Bildung von Blutgefäßen (Hogan and Kolodziej, 2002). Obwohl Morphologie und Funktion der genannten Organe sehr unterschiedlich sind, sind doch gemeinsame Mechanismen in der initialen Ausbildung der Röhrenstrukturen erkennbar. Polarisierte epitheliale Zellen werden zu röhrenartigen Strukturen umorganisiert. Die Röhren gehen aus einer apikal-basolateral polarisierten Epithelzellschicht hervor, die sich zunächst an einer Stelle ausstülpt und diese Ausstülpung dann als Röhre verlängert. Die Wände der Röhre bestehen wiederum aus apikal-basolateral polarisierten Epithelzellen, deren apikale Seite zum Lumen der Röhre zeigt. An der Spitze der Röhre können sich immer wieder Verzweigungen bilden, sodass ein komplexes, stark verzweigtes Röhrensystem entsteht.

Tubulogenese in der Niere

Die Nierenentwicklung beginnt mit der Bildung des Wolff'schen Ganges, und dessen kaudaler Elongation entlang der Körperachse. Bevor die adulte Niere, der sogenannte Metanephros, induziert wird, dient der Wolff'sche Gang zwei transienten Nierenstrukturen, dem Pronephros und dem Mesonephros. Im Verlauf von Tag 10.5-11 der Embryonalentwicklung der Maus, bzw. Tag 35-37 der menschlichen Embryonalentwicklung, wird der Wolff'sche Gang vom umliegenden mesenchymalen Gewebe induziert, und es bildet sich eine Ausstülpung, der sogenannte „ureteric bud“ (UB). Der UB ist ein Röhrensystem, das sich durch Wachstum und Verzweigung zum proximalen Teil des Sammelkanals des sekretorischen Röhrensystems der Niere entwickelt (zusammengefasst in (Saxen and Sariola, 1987; Vainio and Lin, 2002)). Verzweigung und Wachstum des UB wird kontinuierlich vom umliegenden metanephrischen Mesenchym durch Sekretion verschiedener

Wachstumsfaktoren gesteuert (Sariola and Sainio, 1997; Saxen and Sariola, 1987). Parallel dazu induziert der wachsende UB Zellen im Mesenchym. Diese kondensieren, wandeln sich in epitheliale Zellen um (mesenchymal-epithelial transition) und bilden Zysten aus, die im Verlauf der weiteren Entwicklung des Organs Röhren bilden. Die Röhren verschmelzen an ihrem distalen Ende mit dem UB und bilden den eigentlichen sekretorischen Teil der Niere (Sariola, 2002). Die Induktion des UB, dessen Wachstum und Verzweigung, sowie die Induktion des Mesenchyms sind streng regulierte Prozesse, an denen eine Reihe von Wachstumsfaktoren beteiligt sind. Durch genetische Analysen in der Maus konnten Retinoide, Fgf7, Bmp4 und 7, TGF β , Wnt4 und GDNF als essentielle Faktoren identifiziert werden, die vom Mesenchym oder Stroma sezerniert werden und auf das UB Epithelium wirken (Vainio and Lin, 2002). Signale, die vom UB auf das Mesenchym wirken sind weit weniger gut charakterisiert. Mäuse, in denen beispielsweise der im UB exprimierte Homeobox-Transcriptionsfactor *Emx2* deletiert wurde, zeigen eine normale UB Induktion, das Mesenchym kondensiert jedoch nicht, weshalb keine Signale an das UB-Epithelium zurück gesendet werden können und sich keine funktionelle Niere ausbildet (Miyamoto et al., 1997). Der durch *Emx2* induzierte sezernierte Faktor ist nicht bekannt.

Um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die der Bildung epithelialen Röhrensysteme in der Niere zu Grunde liegen, wurde ein experimenteller *In Vitro*-Ansatz entwickelt, mit dem die *In Vivo*-Situation vereinfacht und gut kontrollierbar nachgestellt werden kann (Montesano et al., 1991; Santos and Nigam, 1993; Weidner et al., 1993). Hierbei werden Epithelzellen, zum Beispiel MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney cells), in eine 3D-Kollagenmatrix eingesät. Nach einiger Zeit bilden sich Zysten, die auf ihrer Oberfläche eine Einzelschicht apikal-basolateral polarisierter Epithelzellen aufweisen und ein mit Flüssigkeit gefülltes Lumen einschließen. Stimuliert man diese Zysten mit geeigneten Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel HGF/SF (Weidner et al., 1993), bilden sie zunächst kleine Fortsätze, die sich dann zu verzweigten Röhren weiterentwickeln, vergleichbar zur Bildung des UB *in vivo*. Mit Hilfe dieses Assays konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass HGF/SF und FGF, zusammen mit ihren jeweiligen Rezeptoren, Tubulogenese induzieren (Ohmichi et al., 1998), TGF β jedoch die Verzweigung wachsender Röhren verhindert (Sakurai and Nigam, 1997).

Die Rolle von Rezeptor-Tyrosinkinasen in der Tubulogenese

An der komplizierten Wechselwirkung zwischen mesenchymalen und epithelialen Zellen der Niere sind eine Reihe von Wachstumsfaktoren beteiligt, die RTK stimulieren (Abb. 6). Dies sind die Faktoren GDNF, TGF α , EGF, FGF und HGF/SF mit ihren entsprechenden Rezeptoren GFR α /Ret, EGFR, FGFR bzw. Met (Cybulsky et al., 1994; Perantoni et al., 1995; Rogers et al., 1992; Sanchez et al., 1996; Santos et al., 1994). Ihre Wirkungsweise wurde in genetischen Analysen in der Maus, in der Organkultur von UB-Explantaten, sowie in Zellkultursystemen untersucht (zusammengefasst in (Vainio and Lin, 2002)). HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor) kann über seinen Rezeptor Met in *in vitro* Experimenten die Tubulbildung von Nieren-Epithelzellen anregen (Weidner et al., 1993). In vivo spielt Met eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Leber und Brustdrüse (Birchmeier and Gherardi, 1998) und in der Regeneration der Niere nach einer Schädigung (Kawaida et al., 1994). Die Deletion der Gene für HGF/SF oder Met in der Maus zeigen jedoch keinen Nierenphänotyp (Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995). Die Tatsache, dass weitere Signalwege unterhalb von GDNF, FGF und EGF an der Entwicklung dieses Organs beteiligt sind, legt nahe, dass mehrere, möglicherweise redundante Signalwege in der Niere zur Bildung von Tubuli führen, was eine vorstellbare Erklärung

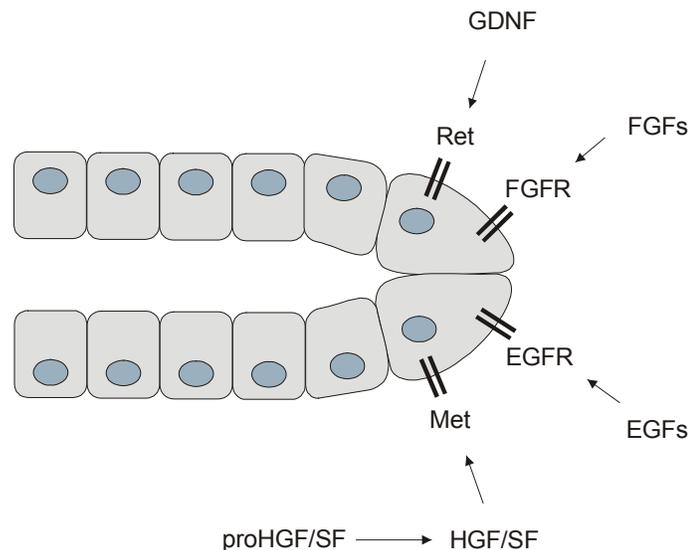


Abb. 6 - RTK in der Tubulogenese der Niere. Die RTK Met, EGF-Rezeptor (EGFR), FGF Rezeptor (FGFR) und Ret, sowie ihre Liganden HGF/SF, EGF, FGF und GDNF übernehmen wichtige Funktionen in der Entwicklung der Niere. Speziell für die Induktion, das Wachstum und die Verzweigung der epithelialen Tubuli sind diese unter anderem in den Spitzen wachsender Tubuli von besonderer Bedeutung.

für das Fehlen eines Nierenphänotyps nach Deletion von Met oder HGF/SF *in vivo* ist.

Die Deletion des *fgf7*-Gens in der Maus führt zu eingeschränktem Wachstum und Teilung des UB und es bilden sich etwa 30% weniger Nephrons aus. Die resultierende Niere ist missgeformt und kleiner als eine Wildtyp-Niere (Qiao et al., 1999). Eine Funktion des EGFR und seiner Liganden konnte in Zellkultur-Experimenten gezeigt werden. EGF, HB-EGF und TGF α sind in der Lage ist die Tubulibildung verschiedener Epithelzellen zu stimulieren, wenn auch deutlich schwächer, als HGF/SF (Barros et al., 1995; Takemura et al., 2002). Aussagekräftige *In Vivo*-Daten zu EGF-Liganden in der Niere liegen nicht vor. Essentielle Funktionen in der Nierenentwicklung übernehmen hingegen GDNF und Ret. Die Deletion der entsprechenden Gene in der Maus haben nahezu identische Phänotypen: der UB wird vom umliegenden Mesenchym nicht induziert, und es kann sich in Folge dessen keine Niere ausbilden.

Ret9 und Ret51 in der Tubulogenese

GDNF wird von mesenchymalen Zellen sekretiert und bindet an seinen Ko-Rezeptor GFR α 1 und an Ret in den Spitzen des UB, wo es an der Tubul-Bildung und Verzweigung beteiligt ist (Vainio and Lin, 2002). Das Ret-Signalsystem ist eine essentielle Komponente für die Entwicklung des UB. Entfernt man GDNF oder Ret durch gezielte Deletion der entsprechenden Gene in der Maus, kann die Induktion des UB aus dem Wolff'schen Gang nicht erfolgen (Sanchez et al., 1996; Schuchardt et al., 1994). Die Deletion von GFR α 1 wurde bislang nicht durchgeführt, man kann jedoch einen ähnlichen Phänotyp wie in den entsprechenden Experimenten mit GDNF und Ret erwarten. Alle drei Komponenten des Ret-Signalwegs müssen vorhanden sein um ein Signal an das Epithelium weiterzuleiten. Ret ist auch in der Niere hauptsächlich in den beiden Isoformen Ret9 und Ret51 exprimiert (Ivanchuk et al., 1998). Wie *In Vivo*-Experimente zeigen differiert die Funktion von Ret9 und Ret51 in der Niere stark. Durch die Re-Expression der Ret9-cDNA vom Ret-Locus kann der schwere Nierenphänotyp der Ret-Null-Mutante reversiert werden, wogegen Re-Expression der Ret51-cDNA nicht ausreichend ist, um eine normale Nierenentwicklung zu ermöglichen (de Graaff et al., 2001; Srinivas et al., 1999). Ret9 ist also alleine für die vollständige und korrekte Nierenentwicklung ausreichend.