
3 Ergebnisse

3.1 Ret9 interagiert mit Mitgliedern der Shank-Proteinfamilie

Ret9 und Ret51 unterscheiden sich nur durch wenige Aminosäuren an ihren C-Termini. Trotz dieses geringen Unterschieds variiert die Funktion der beiden Splice-Varianten *in vivo* deutlich (de Graaff et al., 2001; Srinivas et al., 1999). Der Mechanismus, der dieser Divergenz unterliegt, ist bislang jedoch nicht verstanden. Um Effektoren in der Signaltransduktion unterhalb von Ret zu identifizieren, wurden Hefe-2-Hybrid-Screens mit der zytoplasmatischen Domäne von Ret9 gegen eine embryonale Maus cDNA-Bibliothek durchgeführt. Dabei konnten cDNA-Klone identifiziert werden, die die PDZ-Domäne des Proteins Shank3 kodieren (Grimm, 2001), z. B. die Region der Aminosäuren 588-741 (Abb. 7c). In weiteren Hefe-Experimenten, in denen Mutanten von Ret9 und Ret51 auf die Interaktion mit der Shank3-PDZ-Domäne getestet wurden, konnte ich zeigen, dass Shank3 ausschließlich an den Ret9 C-Terminus bindet. Die Sequenzanalyse der Ret C-Termini ergab, dass nur Ret9, nicht aber Ret51, eine potentielle Bindestelle für PDZ-Proteine besitzt (Abb. 7a). Die letzten vier Aminosäuren in Ret9, FTRF, entsprechen der Konsensussequenz für Typ-I-PDZ-Bindemotive X [T/S] X Φ *, wobei Φ eine hydrophobe Aminosäure und * das Stopkodon darstellt. In der Tat verhindert das Einführen von Punkt- und Deletionsmutationen in den Ret9 C-Terminus an Stellen, die für die PDZ-Bindung essentiell sind (Songyang et al., 1997), die Bindung von Shank3 an Ret9. Im Gegensatz zu Ret9, welches die Shank3-PDZ-Domäne binden kann, sind Ret51 oder die Deletionsmutante Ret9 Δ 4 bzw. die Punktmutante Ret9 FA nicht in der Lage mit Shank3 zu interagieren (Abb. 7b). In Ret9 Δ 4 sind die letzten vier Aminosäure-Reste und damit das gesamte PDZ-Bindemotiv deletiert, in Ret9 FA ist die letzte Aminosäure Phenylalanin gegen Alanin ausgetauscht (Abb. 7a). Diese Ergebnisse zeigen, dass Shank3 mit Ret9 über ein neu identifiziertes PDZ-Bindemotiv in Ret9 interagiert.

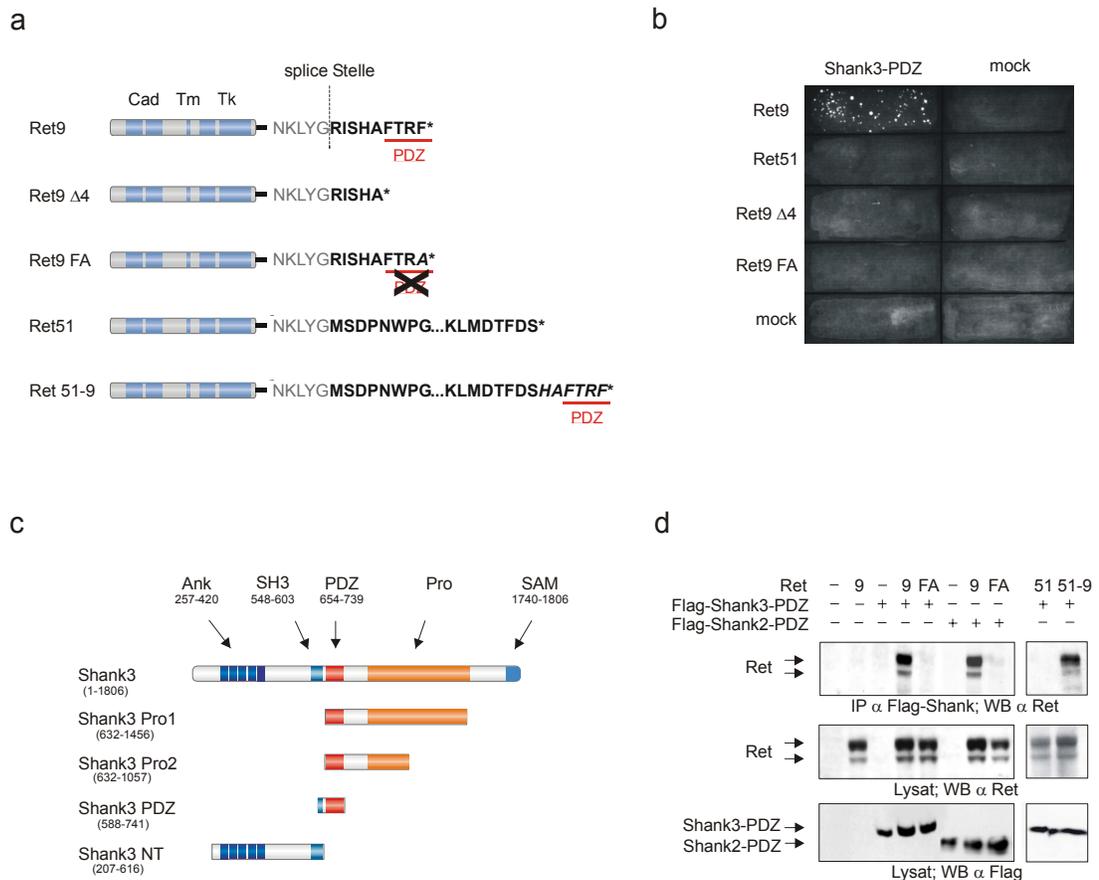


Abb. 7 – Shank3 interagiert spezifisch mit Ret9. (a) Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Ret-Konstrukte. Die Splice-Stelle, die zur Expression von Ret9 bzw. Ret51 führt ist gekennzeichnet. (b) Interaktion von Ret und Shank3 nach Expression in der Hefe. Die Bindung von Ret9, Ret51, Ret Δ 4 und Ret FA an die Shank3 PDZ-Domäne wurde im Hefe-2-Hybrid System getestet. Gezeigt ist das Wachstum von Hefe auf Selektionsmedium. (c) Interaktion von Ret und Shank in Zellen von Mammalia. Flag-Shank2 bzw. Flag-Shank3 wurde nach Ko-Transfektion mit den angegebenen Ret9 und Ret51 Mutanten aus HEK293 Zellen immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE wurden auf den gezeigten Westernblots die angegebenen Proteine mittels spezifischer Antikörperfärbung detektiert.

Die Interaktion konnte in Ko-Immunpräzipitationen (KoIP) bestätigt werden. Die in HEK293 (Human Embryonic Kidney)-Zellen überexprimierte PDZ-Domäne von Shank3 kann Ret9 ko-präzipitieren. Zusätzlich zu Shank3 kann auch die PDZ-Domäne eines weiteren Mitgliedes der Shank-Proteinfamilie, Shank2, Ret9 ko-präzipitieren. Wie schon das Hefe-Experiment, zeigt auch die KoIP, dass Shank3 mit Ret9, nicht aber mit Ret9 FA interagieren kann (Abb. 7d). Des Weiteren kann die Bindung von Shank3 an Ret51 hergestellt werden, indem die C-Terminalen sechs Aminosäuren von Ret9 an den

Ret51 C-Terminus angehängt werden. Wie man für PDZ-Interaktionen erwarten kann, ist die Bindung von Shank2 und Shank3 an Ret9 unabhängig von dessen Tyrosinkinase-Aktivität. Eine Tyrosinkinase-defiziente Mutante von Ret9, in der die ATP Bindestelle der Kinasedomäne mutiert wurde, ist nach wie vor in der Lage Shank2 und Shank3 zu binden (Daten nicht gezeigt). Diese Resultate bestätigen, dass Mitglieder der Shank-Proteinfamilie phosphorylierungs-unabhängig über die neu identifizierte PDZ-Bindestelle mit Ret9 interagieren.

3.2 Die Ret9-Shank-Interaktion ist direkt

In einem „PDZ-Class-Switch“ Experiment konnte ich die direkte Interaktion zwischen Shank3 und Ret9 zeigen. Hierfür wurde ausgenutzt, dass die Natur mehrere Klassen von PDZ-Interaktionen entwickelt hat. Mindestens vier Klassen von PDZ-Domänen wurden aufgrund ihrer Spezifität für Bindepeptide unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung beschrieben (Vaccaro and Dente, 2002). Die verschiedenen Klassen unterscheiden sich nur durch den Austausch weniger Aminosäuren in der PDZ-Domäne und dem PDZ-Bindemotiv. Durch Einführung kompensatorischer Mutationen in PDZ-Domäne und Bindemotiv kann die Spezifität der Interaktion von einer Klasse in eine andere Klasse überführt werden (Kaeck et al., 1998). Shank3 hat eine Typ-I-PDZ-Domäne, die durch einen Histidin-Rest an Position 716 charakterisiert ist, die korrespondierende Typ-I-Ret9 PDZ-Bindestelle ist charakterisiert durch ein Threonin an Position -2 im C-Terminus (Abb. 8a; konventionsgemäß wird die letzte Aminosäure als Rest 0, die vorletzte als Rest -1 usw. bezeichnet). Die Ko-Kristallisation der dritten PDZ-Domäne von PSD-95 mit einem Bindepeptid, eine Klasse-I-PDZ-Interaktion, zeigt, dass nur zwei Interaktionen zwischen dem 0 bzw. -2 Rest des Bindepeptids und der PDZ-Domäne, sowie wenige Kontakte des Bindepeptid-Rückgrats mit Resten der PDZ-Domäne die Interaktion stabilisieren (Doyle et al., 1996; Morais Cabral et al., 1996). Das Histidin der Klasse-I-PDZ-Domäne tritt mit dem Threonin des Bindepeptids über eine Wasserstoffbrücke in Verbindung. Die Störung dieser Wasserstoffbrückenbildung durch Mutation eines der beiden Reste sollte die PDZ-Bindung negativ beeinflussen. Durch Mutation des kritischen Histidin 716 nach Valin (Shank3-PDZ HV) wird die Typ-I-

PDZ-Domäne von Shank3 in eine Typ-II-PDZ-Domäne konvertiert und bindet erwartungsgemäß nicht mehr an Ret9 (Abb. 8b).

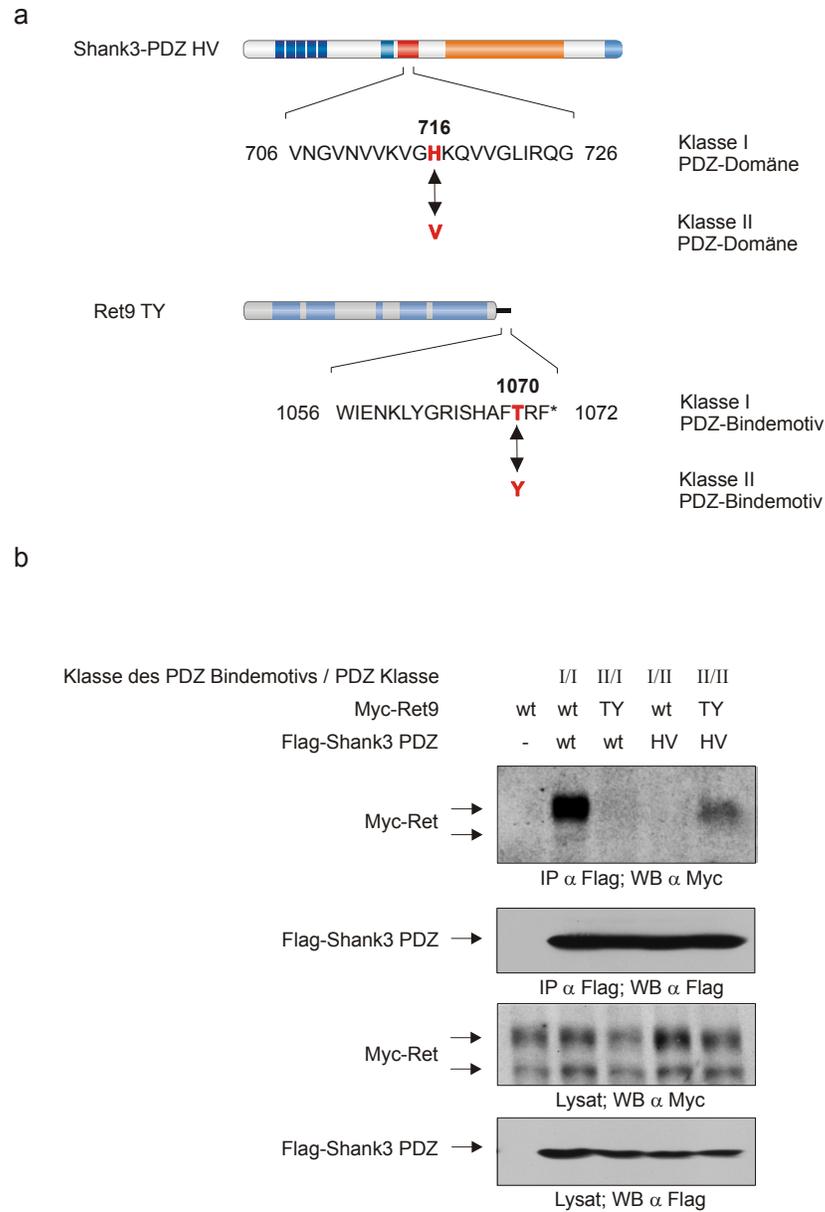


Abb. 8 – Shank3 interagiert direkt mit Ret9. (a) Schematische Darstellung der im „Class Switch“-Experiment eingeführten Mutationen in Ret9, T1070Y, und Shank3, H716V. (b) Interaktion zwischen Klasse-I-Ret9-Shank3 und Klasse-II-Ret9-Shank3. Gezeigt sind Westernblots gegen die angegebenen Proteine nach Immunpräzipitation der Shank3-PDZ-Domäne aus transfizierten HEK293-Zellen. Es wurde Ret9 wt und Shank3-PDZ wt, Ret9 TY und Shank3-PDZ wt, Ret9 wt und Shank3-PDZ HV sowie Ret9 TY und Shank3-PDZ HV ko-transfiziert. Die Klasse der PDZ-Domäne und des PDZ-Bindepeptids ist jeweils angegeben.

Durch Einführen einer kompensatorischen Mutation in den Ret9 C-Terminus (Threonin 1070 nach Tyrosin) wird das Typ-I-PDZ-Bindemotiv in eine Typ-II-Bindestelle umgewandelt. Das Tyrosin 1070 kann mit Valin 716 durch hydrophobe Wechselwirkungen interagieren. Diese Mutation kann die Bindung zu Shank3 zumindest partiell wieder herstellen, was auf eine direkte Interaktion beider Proteine schließen lässt.

3.3 Ret interagiert mit Shank *in vivo*

Obwohl Shank-Proteine ursprünglich in neuronalen Zellen identifiziert wurden (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) konnte vor kurzem gezeigt werden, dass sie auch außerhalb des Nervensystems exprimiert sind. Shank2/ProSAP1-Expression wurde in epithelialen Kanälen der Lunge, des Pancreas und der Niere, sowie im „hepatic bile duct“ nachgewiesen (Redecker et al., 2001). Auch Shank3 ist in der Niere exprimiert, wie ich im Westernblot nach Immunpräzipitation von Shank3 aus Nierenlysaten der Maus zeigen konnte (Abb. 9). Der Westernblot zeigt gleichzeitig die endogene Interaktion zwischen Ret9 und Shank3 in der Niere, da in Immunpräzipitaten von Shank3 aus der Mausniere Ret9 im Westernblot nachgewiesen werden kann.

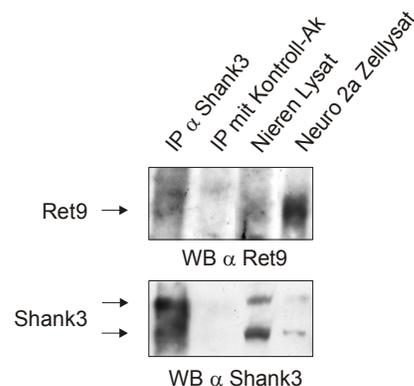


Abb. 9 – Endogene Interaktion zwischen Ret9 und Shank3. Shank3 wurde mit anti-Shank3-Antiserum aus Mausnieren präzipitiert und die Präzipitate durch SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt ist der Westernblot gegen Shank3 und Ret9. Die Spur „Neuro 2A Lysat“ zeigt Lysate aus Neuro2a-Zellen, die reich an Ret9 und Shank3 sind, und wurde aufgetragen, um die Banden für Ret9 und Shank3 im Westernblot besser identifizieren zu können.

Die Expression von Shank3 in Nieren-Epithelzellen konnte auch in der Immunhistochemie bestätigt werden. Schnitte von Maus Embryonen am Tag 16.5 der Embryonalentwicklung zeigen eine spezifische Membranfärbung für Shank3 in tubulären Epithelzellen (Abb. 10a, b), während mesenchymale Zellen in der Umgebung nicht angefärbt sind. Zwei epitheliale Tubuli sind durch gestrichelte Linien in Abb. 10b gekennzeichnet. Die Expression von Shank3 beschränkt sich hier also auf epitheliale Zellen, in denen auch Ret exprimiert ist (Pachnis et al., 1993). Die kommerziell verfügbaren Antikörper gegen Ret eignen sich leider nicht für die Immunfärbung auf Gewebeschnitten.

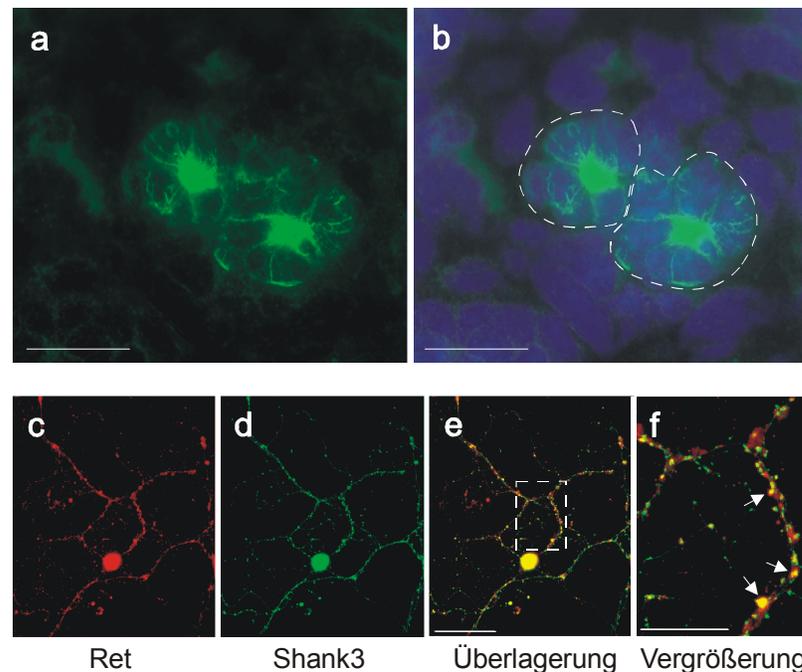


Abb. 10 – Lokalisation von Shank3 und Ret in vivo. (a, b) Immunfärbung von Shank3 in der embryonalen Niere. Gefrorene Schnitte von E16.5-Maus-Embryonen wurden mit anti-Shank3-Antikörpern (a) und dem DNA-Farbstoff DAPI (b) inkubiert. Zwei epitheliale Tubuli sind in b umrandet. (c-f) Immunfärbung von Ret (c) und Shank3 (d) in primären Retinaganglion Zellen der Ratte. (e) Zeigt die Überlagerung beider Färbungen, (f) einen vergrößerten Bereich, in (e) durch eine gestrichelte Linie markiert. In (f) sind exemplarisch drei „dendritic spines“, in denen Ret und Shank3 ko-lokalisieren, durch Pfeile markiert. Skalierungsbalken in a, b und e 50 μm , in f 20 μm .

Es wurde gezeigt, dass Shank in neuronalen Zellen in der „post synaptic density“ (PSD) lokalisiert ist. Um die Ko-Lokalisation zwischen Shank3 und Ret *in vivo* zu zeigen,

habe ich in der Immunfärbung von primären Retinaganglion-Zellen aus der Ratte beide Proteine angefärbt. Die Zellen wurden aus der Retina neugeborener Ratten präpariert und in Kultur genommen (Nagler et al., 2001). Nach fünf Tagen Wachstum wurden die Zellen fixiert und Ret und Shank3 mittels spezifischer Antikörper detektiert (Abb. 10c-e). Die Zellen bilden in Kultur lange Dendriten aus, die entlang ihrer gesamten Länge so genannte „dendritic spines“ formen. Diese kleinen Fortsätze sind Orte möglicher Synapsenbildung mit Axonen. Sie beinhalten die hoch komplexe Struktur der PSD, in der viele Rezeptoren und deren intrazelluläre Adaptorproteine zu einer dichten Struktur zusammengefasst sind. In Übereinstimmung mit publizierten Ergebnissen (Bockers et al., 2001; Bockmann et al., 2002; Du et al., 1998; Naisbitt et al., 1999; Park et al., 2003; Qualmann et al., 2004; Sala et al., 2001; Soltau et al., 2002; Tu et al., 1999), konnte ich Shank3 in „dendritic spines“ detektieren. Shank3 und Ret ko-lokalisieren in den Spitzen dieser Strukturen wie an der gelben Überlagerung der roten und grünen Färbung zu erkennen ist (Abb. 10c-e).

3.4 Ret9, nicht aber Ret51 induziert Tubulogenese *in vitro*

Experimente in der Maus haben gezeigt, dass Ret9 alleine ausreichend ist, um Tubulogenese während der Nierenentwicklung zu gewährleisten, Ret51 ist dazu nicht in der Lage (de Graaff et al., 2001). Um den molekularen Mechanismus des Ret-Signalweges in der Tubulogenese zu untersuchen habe ich als Modellsystem einen *In Vitro*-Tubulogenese-Assay gewählt. Hierbei wurden Hunde-Nieren-Epithelzellen (Madin-Darby canine kidney epithelial cells, MDCK-Zellen) in eine dreidimensionale Kollagenmatrix eingebettet und durch einen spezifischen Stimulus zur Ausbildung von Tubuli angeregt. Die in der Kollagenmatrix eingebetteten Zellen proliferieren zunächst und bilden nach 5-7 Tagen Zysten, die aus einer Einzelschicht apiko-basolateral polarisierter Epithelzellen bestehen und ein mit Flüssigkeit gefülltes Lumen umschließen. Stimuliert man die Zysten mit einem Wachstumsfaktor, wie zum Beispiel HGF/SF, bilden die Zellen Fortsätze in die Kollagenmatrix hinein, die später zu hohlen, verzweigten Röhren auswachsen, deren Lumen mit dem der ursprünglichen Zyste in Kontakt steht (Pollack et al., 1998). Dieser Vorgang spiegelt die zellulären Vorgänge

während der Bildung des „ureteric bud“, in der Nierenentwicklung wider (Montesano et al., 1991; Santos and Nigam, 1993; Weidner et al., 1993).

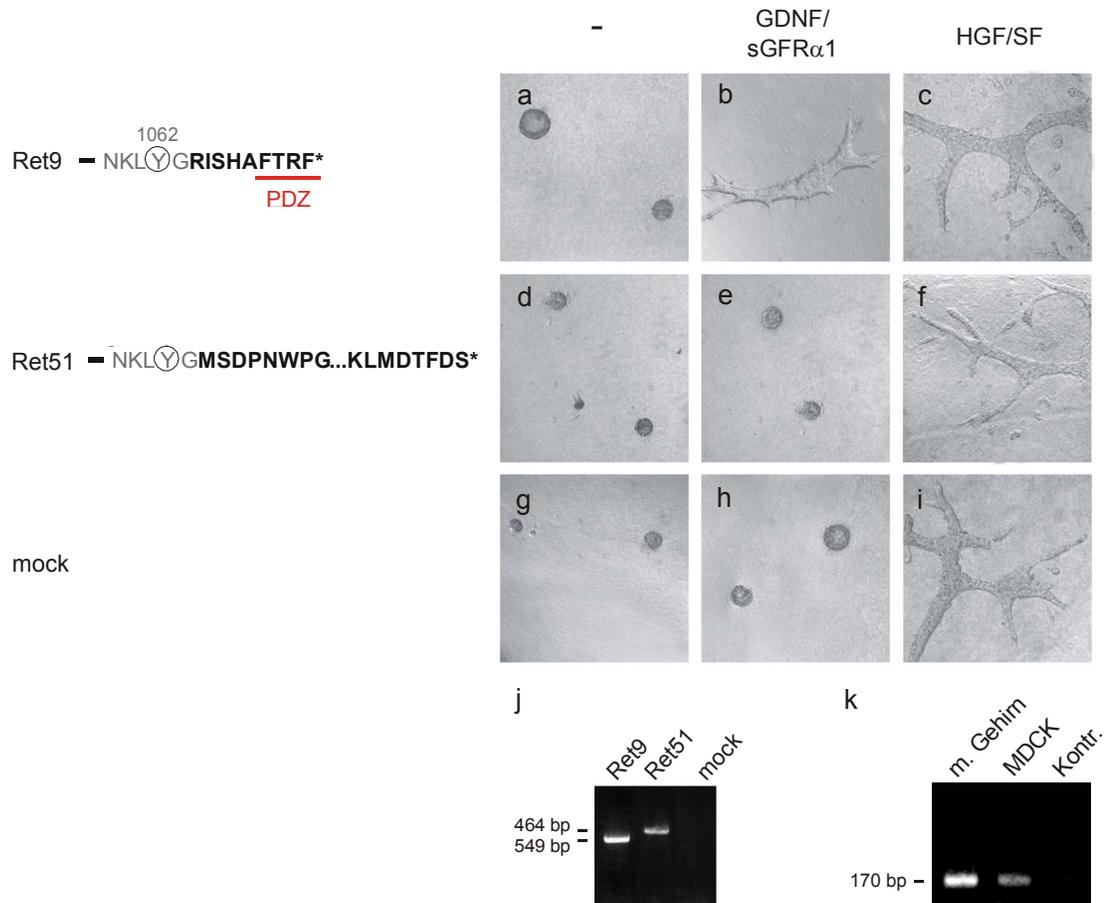


Abb. 11 – Tubuli-Bildung in MDCK-Zellen durch Ret9. MDCK-Zelllinien, die Ret9 (a-c), Ret51 (d-f) oder Leervektor (g-i) exprimieren, wurden als Einzelzellen in eine dreidimensionale Kollagenmatrix eingesetzt. Nach 5 Tagen Wachstum wurde entweder GDNF/sGFR α 1 oder HGF/SF zugegeben. Die Zellen wurden nach weiteren 5-7 Tagen fixiert und fotografiert. (j) zeigt die Expression von Ret9 und Ret51, (k) die Expression von Shank3 auf mRNA Ebene durch RT-PCR.

Unter Verwendung dieses Tubulogenese-Experiments konnte ich erstmals zeigen, dass Stimulation von Ret9, nicht aber Stimulation von Ret51, ausreicht um *In Vitro*-Tubulogenese zu induzieren (Abb. 11). Dazu wurden MDCK-Zelllinien generiert, die Ret9, Ret51 und Ret9-Mutanten stabil exprimieren. Diese wurden in die Kollagenmatrix eingebettet und mit GDNF und löslichem Ko-Rezeptor GFR α 1 stimuliert (sGFR α 1)

(Paratcha et al., 2001). Nur in Ret9-exprimierenden Zellen konnte Tubuli-Bildung beobachtet werden (Abb. 11a, b). Zellen, die Ret51 exprimieren, zeigten keine Reaktion auf den Stimulus (Abb. 11d, e). In mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen, die kein Ret exprimieren, können durch GDNF/sGFR α 1 keine Tubuli induziert werden (Abb. 11g, Std.). Die Expression der genannten Ret-Konstrukte, sowie die Expression von endogenem Shank3 in den MDCK Zelllinien wurde mittels RT-PCR kontrolliert (Abb. 11j, k). Zellen, welche die Ret9-Punktmutante Ret9 FA exprimieren, die Shank nicht binden kann, reagieren wie Ret51-exprimierende Zellen ebenfalls nicht auf die Stimulation (Abb. 12a, b). Eine Zelllinie hingegen, die Ret51-9 exprimiert, kann durch GDNF/sGFR α 1-Stimulation zur Tubulogenese angeregt werden (Abb. 12d, e). In Ret51-9 sind die sechs carboxy-terminalen Aminosäuren von Ret9 an Ret51 angehängt, wodurch diese Mutante in der Lage ist Shank-Proteine zu binden (siehe Abb. 7a, d).

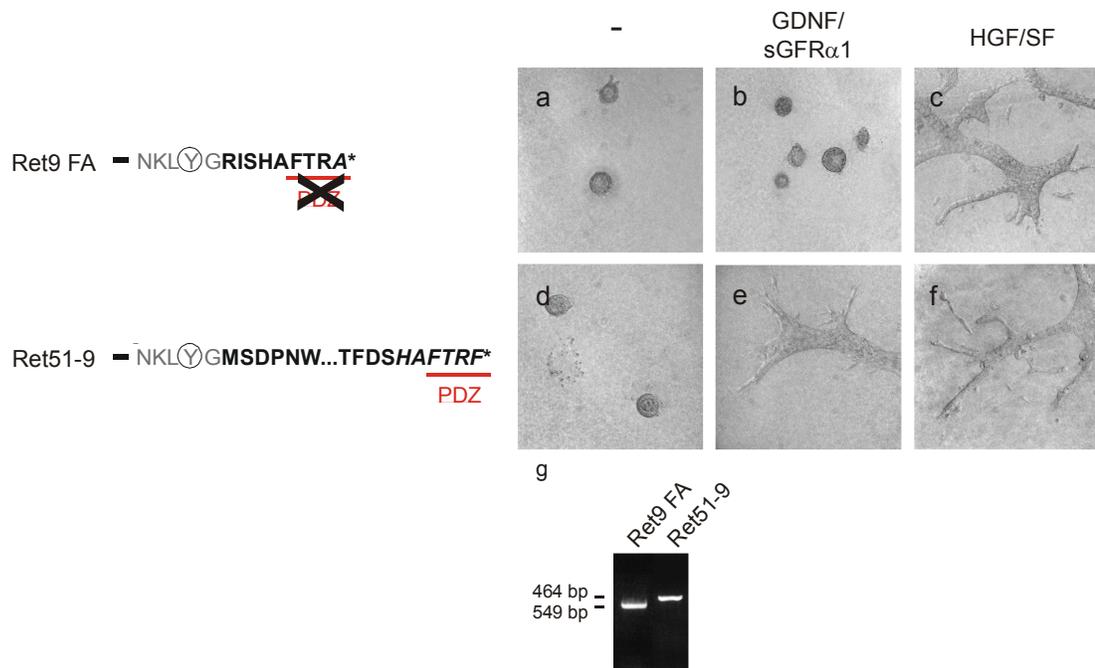


Abb. 12 - Tubuli Bildung in MDCK-Zellen ist Abhängig von der Eigenschaft von Ret, PDZ-Proteine binden zu können. MDCK-Zelllinien, die Ret9 FA (a-c) oder Ret51-9 (d-f) exprimieren wurden als Einzelzellen in eine dreidimensionale Kollagenmatrix eingesät. Nach 5 Tagen Wachstum wurde entweder GDNF/sGFR α 1 oder HGF/SF zugegeben. Die Zellen wurden nach weiteren 5-7 Tagen fixiert und fotografiert. (g) zeigt die Expression von Ret9 FA und Ret51-9 durch RT-PCR.

Die Expression der Ret-Konstrukte wurde auch hier durch RT-PCR kontrolliert (Abb. 12g). In den verwendeten Zelllinien ist die Tubuli-Bildung nicht per se gestört, da Stimulation mit HGF/SF nach wie vor zur Tubulogenese führt (jeweils die rechten Spalten in Abb. 11 und Abb. 12). Diese Ergebnisse zeigen, dass das intakte PDZ-Bindemotiv, welches die Bindung von Shank-Proteinen an Ret9 vermittelt, notwendig ist um die Tubulogenese durch Ret zu ermöglichen.

3.5 Die Ret9-induzierte Tubulogenese benötigt die Interaktion mit Shank3

Das PDZ-Bindemotiv von Ret9 vermittelt sowohl die Bindung von Shank-Proteinen, als auch die Induktion der Tubulogenese. Das nächste Ziel war es daher zu untersuchen, ob Shank die Ret9 induzierte Tubulogenese ermöglicht. Um dies herauszufinden, habe ich einen Ansatz gewählt, in dem verschiedene Deletionsmutanten von Shank3 direkt an Ret9 fusioniert wurden. Aus Kristallstrukturanalysen ist bekannt, dass bei der PDZ-Bindung die letzten vier Aminosäuren des Rezeptors in einer Tasche der PDZ-Domäne zu liegen kommen, wobei die freie Carboxygruppe am C-Terminus des Rezeptors einen wichtigen Beitrag zur Stabilität der Bindung leistet, da sie direkt mit der so genannten GLGF-Schleife der PDZ-Domäne interagiert (Doyle et al., 1996; Songyang et al., 1997). Das Anhängen von Aminosäuren an das PDZ-Bindemotiv führt zum Wegfall bzw. der räumlichen Verlagerung der freien Carboxygruppe und daher zum Verlust der Bindung. Die Fusion von Shank3 an den C-Terminus von Ret9 inhibiert also dessen Bindung an PDZ-Proteine, die potentielle Funktion des Ret9-Shank3-Komplexes sollte aber durch die konstitutive Shank-Bindung erhalten bleiben. Durch diesen Ansatz konnte ich zeigen, dass die Prolin-reiche Region in Shank3 für die Induktion der Tubulogenese verantwortlich ist.

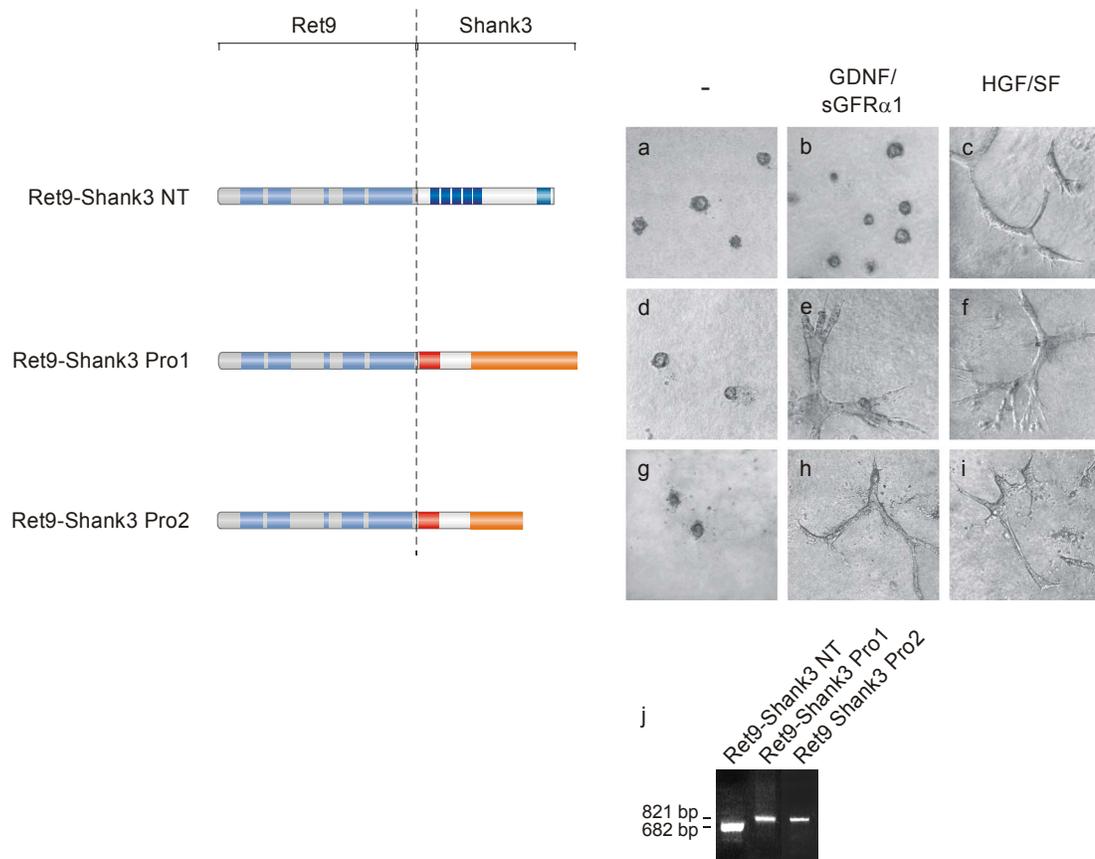


Abb. 13 – Ret9-induzierte Tubuli-Bildung in MDCK-Zellen wird durch Shank vermittelt. MDCK-Zelllinien, die die schematisch dargestellten Ret9-Shank3-Fusionskonstrukte exprimieren, wurden als Einzelzellen in eine dreidimensionale Kollagenmatrix eingesät. Nach 5 Tagen Wachstum wurde entweder GDNF/sGFR α 1 oder HGF/SF zugegeben. Die Zellen wurden nach weiteren 5 Tagen fixiert und fotografiert. (j) zeigt die Expression der verwendeten cDNA Konstrukte mittels RT-PCR.

MDCK-Zellen, die Fusionskonstrukte aus Ret9 und Shank3-Pro1 bzw. Shank3-Pro2 exprimieren sind in der Lage nach Stimulation mit GDNF/sGFR α 1 Tubulogenese in der Kollagenmatrix zu induzieren (Abb. 13d, e und g, Std.; vgl. Abb. 7c für die genaue Identität der verwendeten Shank3 Fragmente). Im Gegensatz dazu reagieren Zellen, die einen Ret9-Shank3-NT-Fusionsrezeptor exprimieren, nicht auf den Stimulus (Abb. 13a, b). Die generelle Fähigkeit der Zelllinien, Tubuli zu bilden, bleibt von der Expression der angegebenen Konstrukte unberührt, wie die Stimulation mit HGF/SF zeigt (Abb. 13c, f und i). Die Expression der genannten Konstrukte wurde durch RT-PCR nachge-

wiesen (Abb. 13j). Dieses Experiment zeigt, dass Shank3 in der Tat die Induktion tubulärer Strukturen in Nieren-Epithelzellen unterhalb von Ret9 moduliert.

3.6 Shank3 reguliert die Dauer des Signals von Ret9

Für die HGF/SF-induzierte Tubulogenese ist die anhaltende Aktivierung des Erk-MAPK-Signalwegs sowie des PI3K-Signalwegs notwendig, wie am Beispiel der RTK Met gezeigt wurde (Khwaja et al., 1998; Maroun et al., 2000; Schaeper et al., 2000). Eine transiente Aktivierung dagegen, zum Beispiel durch EGF, führt unter den meisten Konditionen nicht zu Differenzierung und zur Bildung von Tubuli (Barros et al., 1995; Traverse et al., 1992). Beide Signalwege werden auch durch Ret9 und Ret51 aktiviert (Besset et al., 2000; Hayashi et al., 2000; Melillo et al., 2001; Pelicci et al., 2002; van Puijenbroek et al., 1997). Daher habe ich untersucht, ob die Aktivierung dieser Signalwege durch das PDZ-Bindemotiv in Ret9 moduliert wird. Die Experimente wurden mit den in Kapitel 3.4 und 3.5 beschriebenen MDCK-Zelllinien durchgeführt. Nach Stimulation von Ret9 exprimierenden Zellen mit GDNF und sGFR α 1 kann eine maximale Erk1/2-Aktivierung, gemessen an der Erk-Phosphorylierung, nach 10 Min. beobachtet werden, die bis zu 8 Std. anhält (Abb. 14a). In Zellen, die die Ret9-Mutante Ret9 FA exprimieren, zeigt der Erk-MAPK-Signalweg nur eine transiente Aktivierung: die Phosphorylierung von Erk1/2 ist nach 10 Min. maximal, klingt jedoch im weiteren Verlauf wieder vollständig ab (Abb. 14b). Ein vergleichbares Ergebnis erhält man mit einer Ret51-exprimierenden MDCK-Zelllinie: der transienten Aktivierung des Erk-MAPK-Signalweges nach 30 Min. folgt ein rasches Abklingen des Signals (Abb. 14c). Die MEK Inhibitoren U0129 und PD98059 blockieren die Tubulibildung nach Stimulation von Ret9 exprimierenden MDCK-Zellen mit GDNF/sGFR α 1 vollständig (Daten nicht gezeigt). MDCK-Zellen, die kein Ret exprimieren reagieren auf GDNF/sGFR α 1 mit einem transienten Erk-MAPK-Signal (Abb. 14d), was möglicherweise durch einen Ret-unabhängigen Signalweg induziert wird (Poteryaev et al., 1999).

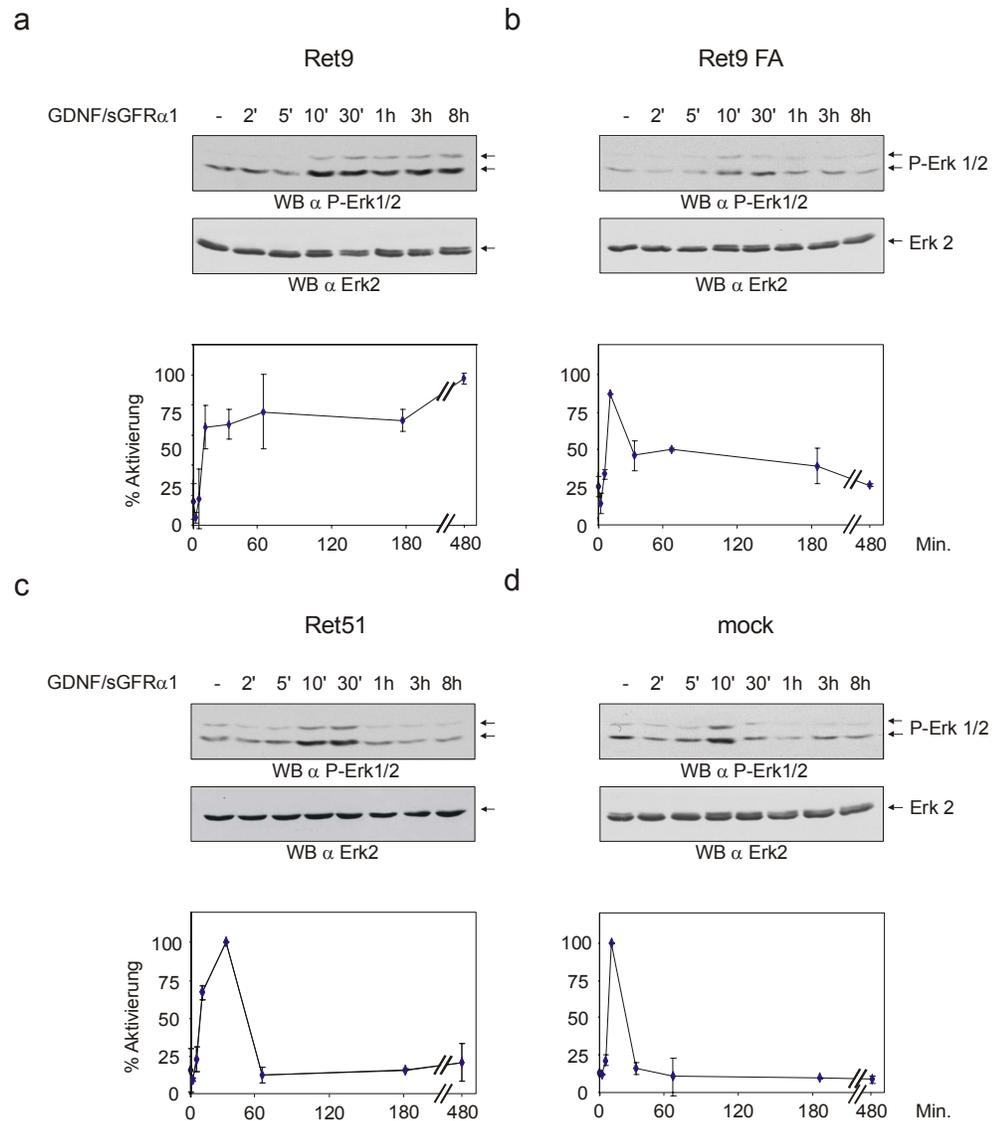


Abb. 14 – Ret9-induzierte, anhaltende Aktivierung des Erk-MAPK-Signalweges. MDCK-Zelllinien, die Ret9 (a), Ret9 FA (b), Ret51 (c) oder Leervektor (d) exprimieren, wurden für 20 Std. gehungert und anschließend mit GDNF/sGFR α 1 für die angegebenen Zeiträume stimuliert, lysiert, und die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt sind Western-Blots gegen aktive Erk-MAPK (P-Erk1/2) und gesamt Erk-MAPK (Erk-2). Zur Quantifizierung wurden die Westernblots densitometrisch ausgewertet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten wider.

Ähnliche Aktivierungsschemen gelten für den PI3K-Signalweg, der durch die Betrachtung der Phosphorylierung des PI3K-Substrats Akt/PKB kontrolliert wurde. Hier ist in Ret9-exprimierenden Zellen eine Aktivierung nach 30 Min. zu beobachten, die, wie das Erk-MAPK-Signal, ebenfalls bis zu 8 Std. anhält (Abb. 15a). In Ret9 FA-exprimierenden Zellen ist der PI3K-Signalweg nahezu vollständig inhibiert (Abb. 15b);

eine Aktivierung des PI3K-Signalweges ist auch mit Ret51 nicht zu beobachten (Abb. 15c). In Zellen, die kein Ret exprimieren, ist ein PI3K-Signal ebenfalls nicht nachweisbar (Abb. 15d).

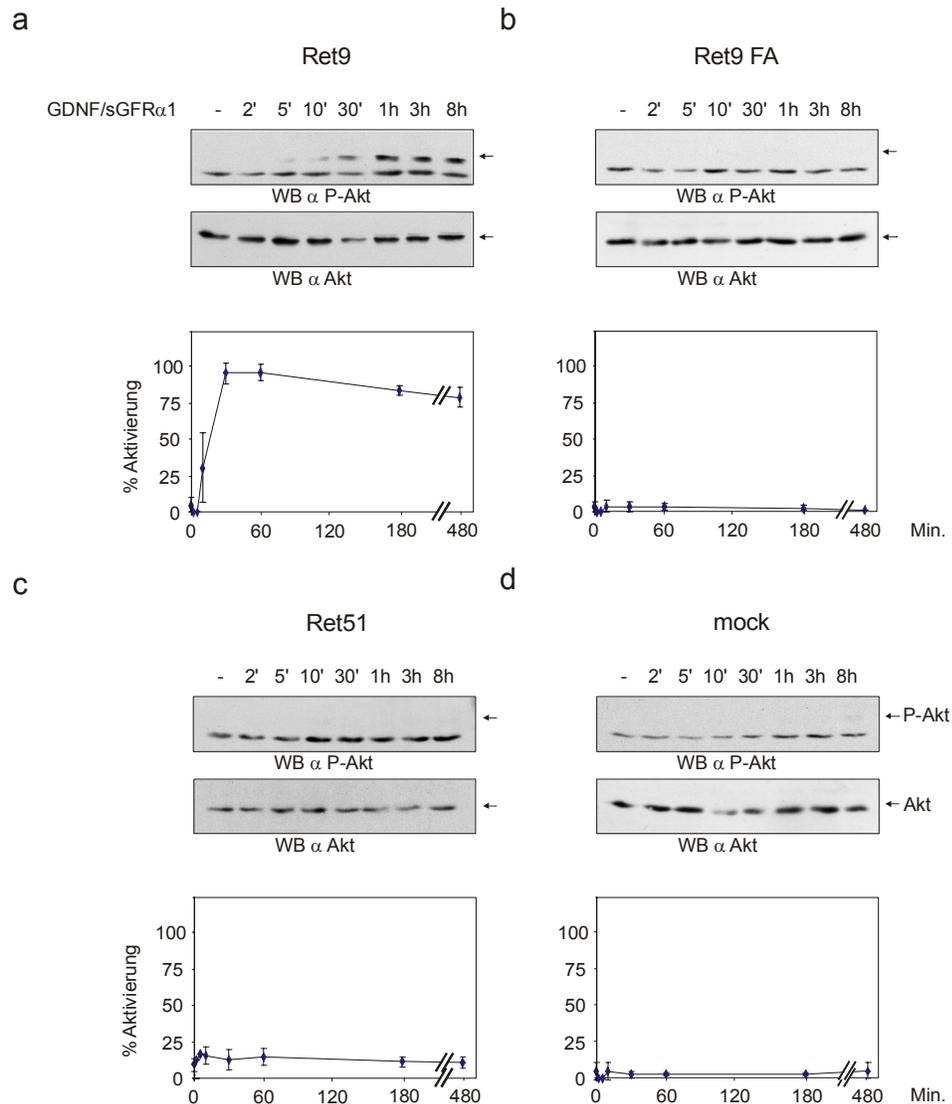


Abb. 15 – Ret9-induzierte, anhaltende Aktivierung des PI3K-Signalweges. MDCK-Zelllinien, die Ret9 (a), Ret9 FA (b), Ret51 (c) oder Leervektor (d) exprimieren, wurden für 20 Std. gehungert und anschließend mit GDNF/sGFR α 1 für die angegebenen Zeiträume stimuliert, lysiert, und die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt sind Western-Blots gegen aktives Akt (P-Akt) und gesamt Akt. Zur Quantifizierung wurden die Westernblots densitometrisch ausgewertet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten wider.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass das PDZ-Bindemotiv in Ret9 nicht nur für die Induktion der Tubulogenese notwendig ist, sondern auch für die anhaltende Aktivierung der Erk-MAPK- und PI3K-Signalwege unterhalb von Ret, die zur Tubulogenese führen. MDCK-Zellen, die Ret9-Shank3-Pro2 Fusionsrezeptoren exprimieren sind ebenfalls in der Lage die anhaltende Aktivierung des Erk-MAPK- und des PI3K-Signalweges zu aktivieren (Daten nicht gezeigt).

3.7 Shank3 interagiert mit dem Adaptorprotein Grb2

Die Ergebnisse werfen die Frage nach dem Mechanismus auf, durch den Shank den Erk-MAPK- und den PI3K-Signalweg aktivieren kann. Daher wurde die Shank3-Pro2-Aminosäuresequenz zunächst auf Bindestellen für Proteine untersucht, die eine bekannte Funktion in der Aktivierung der beiden Signalwege haben.



Abb. 16 – Potentielle Protein-Protein-Interaktionsstellen in Shank3-Pro1. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von Shank3-Pro1 (AS 632-1456 von Shank3) und Shank3-Pro2 (AS 632-1057 von Shank3, gestrichelt eingerahmt). Die PDZ-Domäne ist fett gedruckt und eingerahmt. Die potentiellen Bindungstellen für Shp-2, die Grb2-SH3-Domäne und die Grb2-SH2-Domäne sind in rot, gelb bzw.

Shank3-Pro1 trägt 9 Konsensussequenzen für die Bindung der Grb2-SH3-Domäne (PXXP, AS 951-954, AS 990-993, AS 999-1002, AS 1019-1022, AS 1178-1181, AS 1239-1242, AS 1306-1309, AS 1336-1339, AS 1418-1421), eine Konsensussequenz für die Bindung der Grb2-SH2-Domäne (pYXNX, AS 1006-1009), sowie eine Konsensussequenz für die Interaktion mit Shp-2 (pY(X)₁₅₋₃₀pYXXV/I/L, AS 902-926) (Abb. 16) (Songyang et al., 1994; Sparks et al., 1996; Zhao and Zhao, 2000).

Eine Interaktion mit Shp-2 konnte in der Ko-Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden (Abb. 17). Shp-2 interagiert weder mit unphosphoryliertem Shank3-Pro2 noch mit phosphoryliertem Shank3-Pro2 nach Ko-Expression mit Ret9 oder Ret9 FA. Die Phosphorylierung von Shank3-Pro2 nach Ret9 Expression ist in Abb. 18a zu sehen. Als Positiv-Kontrolle wurde in diesem Experiment die bekannte Interaktion von Shp-2 mit Gab1 herangezogen, deren Wechselwirkung nach Stimulation von endogenem Met nachgewiesen werden kann.

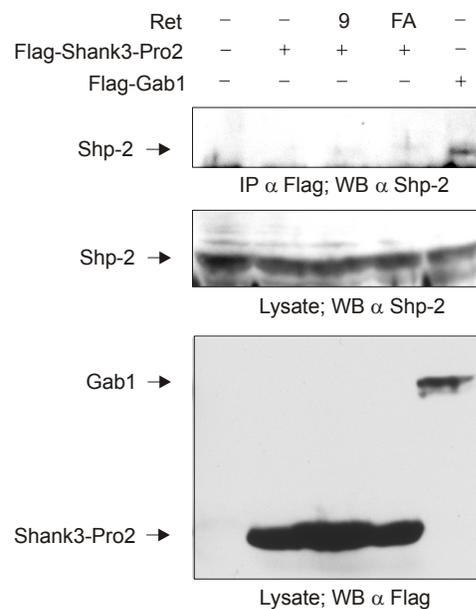


Abb. 17 – Shp-2 interagiert nicht mit Shank3. Im Ko-Immunpräzipitations Experiment konnte keine Interaktion von Shank3 und Shp-2 festgestellt werden. Als Positive Kontrolle diente die Ko-Immunpräzipitation von Shp-2 mit Gab1. Gezeigt sind Westernblots inkubiert mit Antikörpern gegen die entsprechenden Proteine.

Durch Ko-Immunpräzipitation von endogenem Grb2 mit Shank3-Pro2 konnte die Interaktion dieser beiden Moleküle miteinander bestätigt werden (Abb. 18). Grb2 kann mit Shank3-Pro2 interagieren, wenn Ret9 ko-transfiziert wurde. Ko-Transfektion von Shank3-Pro2 mit Ret9 führt zur Phosphorylierung von Shank3 (Abb. 18b). Für eine Wechselwirkung zwischen Shank3 und der SH2-Domäne von Grb2 muss Shank3 phosphoryliert sein, da es sich bei der SH2-Domäne um eine Phosphotyrosin-Bindedomäne handelt. Ko-Expression von Ret9 FA dagegen führt nicht zur Phosphorylierung von Shank3 und auch nicht zu einer Shank3-Grb2 Interaktion.

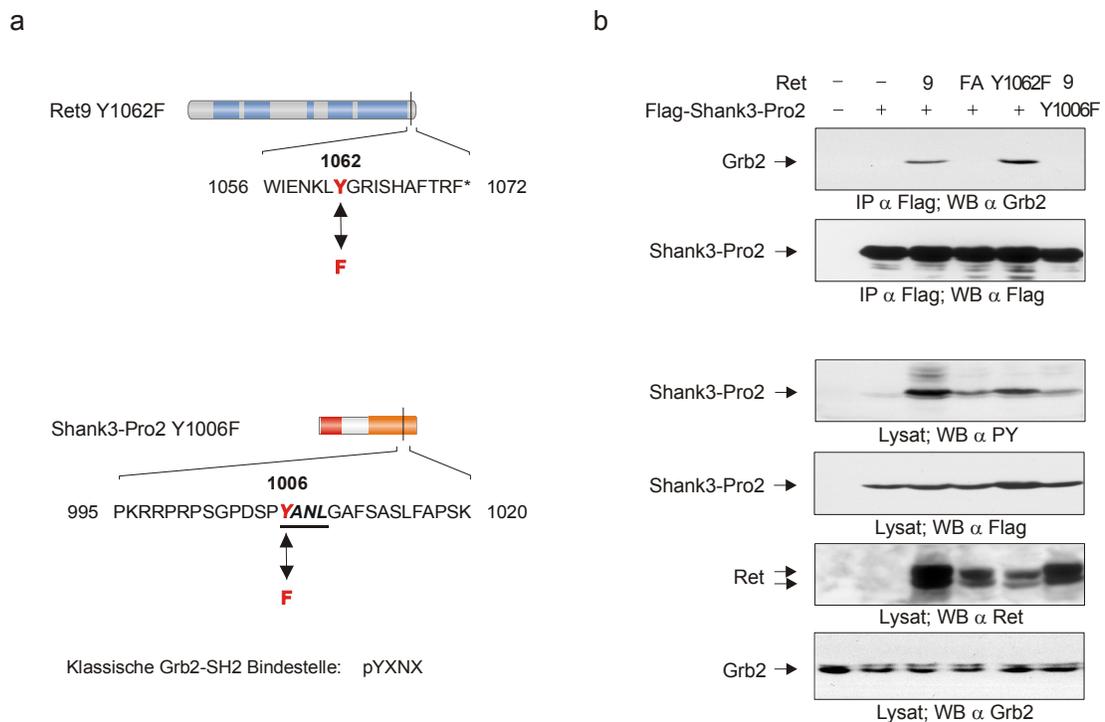


Abb. 18 – Shank3 rekrutiert Grb2 in den Ret9-Rezeptorkomplex. (a) HEK293 Zellen wurden mit Ret9, Ret9 FA, Ret9 Y1062F und Shank3-Pro2 wt bzw. Shank3-Pro2 Y1006F ko-transfiziert. Nach Immunpräzipitation und SDS-PAGE wurde der gezeigte Westernblot mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine inkubiert. (b) Schematische Darstellung der in a verwendeten Mutationen in Ret9 und Shank3.

Grb2 kann auch über die Interaktion mit Shc an Ret binden. Durch die Verwendung einer Shc-Bindemutante von Ret (AS Y1062F, Ret9 YF; Abb. 18a) konnte ausgeschlossen werden, dass das präzipitierte Grb2 mit Ret statt mit Shank3 komplexiert war. Zur weiteren direkten Kontrolle wurde Tyrosin 1006 in der Grb2 Bindestelle von Shank3 zu

Phenylalanin mutiert (Abb. 18a). Diese Punktmutation verhindert die Bindung einer SH2-Domäne, da die notwendige Phosphorylierung des Restes 1006 nicht mehr möglich ist. In der Tat wird Shank3-Pro2 YF deutlich schlechter phosphoryliert als Shank3-Pro1 wt, und gleichzeitig geht die Interaktion mit Grb2 verloren (Abb. 18b). Dies bestätigt zum einen die Interaktion zwischen Shank3 und der Grb2-SH2-Domäne, zum anderen impliziert es, dass die potentiellen Grb2-SH3-Bindestellen in Shank3-Pro2 für die Wechselwirkung mit Grb2 nicht notwendig sind.

3.8 Die Bindung von Grb2 an Shank3 moduliert die Tubulilbildung durch Ret

Um zu überprüfen, ob Grb2 in der Bildung von Tubuli unterhalb von Ret9 eine Rolle spielt, habe ich Shank3-Pro2 Y1006F (siehe Abb. 7c) direkt an Ret9 fusioniert und auf

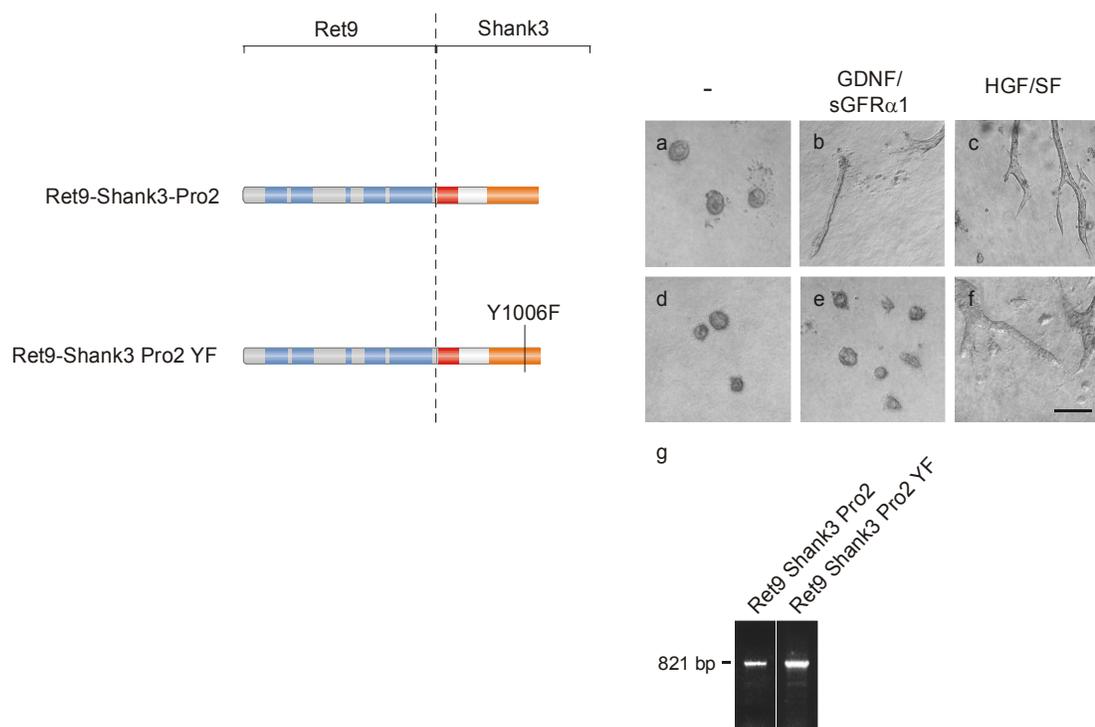


Abb. 19 – Mutation der Grb2 Bindestelle in Shank3 führt zum Verlust der Funktion in der Tubulilbildung. MDCK Zelllinien, die die schematisch dargestellten Ret9-Shank3-Pro2 Fusionskonstrukte exprimieren, wurden als Einzelzellen in eine dreidimensionale Collagen Matrix eingesät. Nach 5 Tagen Wachstum wurde entweder GDNF/sGFR α 1 oder HGF/SF zugegeben. Die Zellen wurden nach weiteren 5 Tagen fixiert und fotografiert. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von 200 μ m und gilt für a-f.

eine Funktion in der Tubulibildung getestet (vgl. auch Kapitel 3.5). Sollte Grb2 unterhalb von Shank3 essentiell in der biologischen Reaktion der Zellen sein, ist mit dieser Mutante keine Bildung von Tubuli zu erwarten. In der Tat sind MDCK-Zellen, die das Shank3-Pro2 Y1006F-Konstrukt exprimieren, nicht in der Lage tubuläre Strukturen zu induzieren (Abb. 19d, e), während dies Ret9-Shank3-Pro2 wt exprimierenden Zellen möglich ist (Abb. 19a, b; vgl auch Abb. 13g, Std.). Alle getesteten Zelllinien können nach Stimulation von endogenem Met durch HGF/SF Tubuli bilden (Abb. 19c, f), was zeigt, dass die Tubuli-Bildung nicht generell inhibiert ist.

Zusammengenommen zeigen meine Daten, dass Shank3, welches direkt mit Ret9, nicht aber mit Ret51 interagiert, das Adaptorprotein Grb2 phosphorylierungs-abhängig binden kann, wodurch der Erk-MAPK- und der PI3K-Signalweg in einer Weise moduliert werden, die die Tubulogenese epithelialer Zellen ermöglicht.