
4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt das PDZ-Protein Shank3 als neuen Effektor der Rezeptor-Tyrosinkinase Ret in Epithelzellen. Shank3 interagiert mit einem hier neu identifizierten PDZ-Bindemotiv im C-Terminus von Ret9, nicht aber mit Ret51. Die Interaktion von Shank3 mit Ret9 ist notwendig, um den Erk-MAPK- und den PI3K-Signalweg anhaltend zu aktivieren. Durch die Interaktion mit dem Adaptorprotein Grb2 kann Shank3 eine Verbindung von Ret zum Erk-MAPK- und PI3K-Signalweg herstellen. Die Anhaltende Aktivierung des Erk-MAPK- und des PI3K-Signalwegs führt nachfolgend zur Bildung von Tubuli in einer dreidimensionalen Kultur von MDCK-Nierenepithelzellen. Ret51, welches Shank3 nicht binden kann, kann die genannten Signalwege nur transient aktivieren und führt daher nicht zur Induktion tubulärer Strukturen. Die Ergebnisse weisen Shank3, zusätzlich zu seiner Rolle als Strukturprotein, eine Funktion in der Signaltransduktion von RTK auch außerhalb des neuronalen Systems zu. Mit der Interaktion von Shank-Proteinen mit Ret9 konnten erstmals isoformspezifische Effektoren für Ret identifiziert werden. Diese Spezifität kann eine Erklärung dafür geben, warum Ret9, nicht aber Ret51, für die Embryonalentwicklung der Niere eine wichtige Rolle spielt.

4.1 Die PDZ-Bindung als wichtiger Modulationsmechanismus in der Signalverarbeitung von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die PDZ-Domäne wurde als Protein-Protein-Interaktionsdomäne vor gut zehn Jahren erstmals in dem neuronalen „Scaffold“-Protein PSD-95 (post synaptic density - 95 kDa) als eine Reihe von drei „Repeats“ beschrieben. Aufgrund der Homologie zu dem *Drosophila*-Protein Dlg (Discs-Large) wurde eine Funktion von PSD-95 in der Bildung und Stabilisierung des synaptischen Zell-Zell-Kontakts angenommen (Cho et al., 1992). In der Folge wurden einige weitere PDZ-Domänen enthaltene Proteine entdeckt, denen man zum größten Teil eine Funktion in der Zusammensetzung und Stabilisierung von Proteinkomplexen, vornehmlich an der Postsynaptischen Plasmamembran, zuschrieb (Adamski et al., 1998; Kim et al., 1995; Muller et al., 1996; Naisbitt et al., 1999; Niehammer et al., 1996; Ponting et al., 1997; Torres et al., 1998). Eine Reihe von PDZ-Proteinen sind auch außerhalb des neuronalen Systems exprimiert, und es wird ihnen

insbesondere eine Rolle bei der Bildung von Zell-Zell-Kontakten, vor allem bei der Organisation von „tight junctions“, und der apiko-basolateralen Polarisation von Epithelzellen zugeordnet (Borg et al., 2000; Buchert et al., 1999; Cao et al., 1999; Cohen et al., 1998; Kaech et al., 1998; Kim, 1997; Rongo et al., 1998; Whitfield et al., 1999; Willott et al., 1993). Auch einige Interaktionen von PDZ-Proteinen mit Rezeptor-Tyrosinkinasen, die ein PDZ-Bindemotiv auf ihrem C-Terminus besitzen, wurden beschrieben (Borg et al., 2000; Buchert et al., 1999; Maudsley et al., 2000; Shelly et al., 2003). Obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass PDZ-Proteine eine eher strukturelle Rolle übernehmen und in erster Linie für korrekte Rezeptor-Sortierung, Lokalisation und Gruppierung verantwortlich sind und daher als Gerüst- oder „Scaffold“-Proteine bezeichnet wurden (Glynnne and Evans, 2002; Kaech et al., 1998; Ma et al., 2003; Shelly et al., 2003), häufen sich die Hinweise für weitere Funktionen dieser Proteine. Dem PDZ-Protein ERBIN zum Beispiel wurde ursprünglich die Funktion der korrekten Lokalisation der RTK ErbB2 zugewiesen (Borg et al., 2000). Jüngere Arbeiten zeigen jedoch, dass ERBIN direkt in die Regulation des Ras-MAPK-Signalweges unterhalb von ErbB2 involviert ist (Huang et al., 2003; Kolch, 2003). Ähnliches gilt für die Interaktion des PDGF-Rezeptors (Platelet Derived Growth Factor) mit dem NHERF-Adaptor-Protein (Na(+)/H(+) regulatory factor). NHERF wurde zunächst eine Funktion in der Lokalisation und Organisation von Transmembran- und zytosolischen Signalweg-Komponenten zugeordnet (Fanning and Anderson, 1999), später wurde jedoch beschrieben, dass NHERF distinkte Signalwege unterhalb des PDGF-Rezeptors spezifisch induzieren kann und so direkt in die Signalverarbeitung des Rezeptors eingreift (Jung Kang et al., 2004; Maudsley et al., 2000).

Die beiden Ret-Isoformen unterscheiden sich nur durch ihre C-terminalen 9 bzw. 51 Aminosäuren. Der einzige in der Literatur beschriebene informative Unterschied zwischen beiden C-Termini ist eine Grb2-Bindestelle in Ret51, die in Ret9 fehlt (Alberti et al., 1998; Lorenzo et al., 1997). Basierend auf dieser Interaktionsstelle konnte jedoch kein Unterschied in den biologischen Funktionen von Ret9 und Ret51 beobachtet werden. Hier beschreibe ich zum ersten Mal ein funktionelles PDZ-Bindemotiv im C-Terminus von Ret9, welches die zuvor beschriebene biologische Divergenz zwischen beiden Isoformen (de Graaff et al., 2001; Srinivas et al., 1999) mechanistisch erklären kann.

Das PDZ-Bindemotiv in Ret9 vermittelt die Interaktion mit der PDZ-Domäne von Shank2 und Shank3. Shank-Proteine wurden bisher als „Scaffold“-Proteine, die relevant für die Organisation der PSD sind, beschrieben (Boeckers et al., 1999b; Naisbitt et al., 1999; Sheng and Kim, 2000; Tu et al., 1999; Yao et al., 1999). Dort ermöglicht Shank eine dynamische Verbindung zwischen Neurotransmitter-Rezeptoren und dem Aktin-Zytoskelett (Huang et al., 1997; Qualmann et al., 2004). Die Expression von Shank-Proteinen außerhalb des zentralen Nervensystems wurde bislang nur für Shank2 beschrieben (Redecker et al., 2001), eine Funktion konnte Shank2 dort jedoch nicht zugeordnet werden. Die hier vorgelegte Arbeit demonstriert zum ersten Mal eine biologische Funktion von Shank3 in epithelialen Zellen. In Nieren-Epithelzellen kann Shank3 Funktionen in der Signaltransduktion unterhalb von Ret9 übernehmen. Durch die Rekrutierung von Grb2 zum aktiven Rezeptor-Komplex beeinflusst Shank3 die zeitliche Modulation des Erk-MAPK- und PI3K-Signalweges. Mit der Ret9-Shank3-Interaktion konnte eine weitere RTK identifiziert werden, bei der die Bindung eines PDZ-Proteins entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung von Signalwegen und die biologische Reaktion hat. Die Rolle in der Integration von Rezeptoren in das Zytoskelett, die Shank3 in neuronalen Zellen übernimmt, wurde in dieser Arbeit nicht betrachtet. Es ist jedoch vorstellbar, dass Shank-Proteine in Epithelzellen auf ähnliche Weise wie in Neuronen in das Zytoskelett integriert sind, und sie daher auch hier, zusätzlich zu ihrer Funktion in der Signaltransduktion, an der Gruppierung von Rezeptoren in der Zellmembran beteiligt sind.

4.2 Das PDZ-Bindemotiv in Ret9 erweitert die Konsensussequenz für Klasse-I-PDZ-Interaktionen

Nach einer Debatte in der Literatur (Bezprozvanny and Maximov, 2001; Songyang et al., 1997; Vaccaro and Dente, 2002) wurde von Vaccaro et al. 2002 vorgeschlagen, die bekannten PDZ-Interaktionen entsprechend der letzten 3 Aminosäuren im PDZ-Bindemotiv in 4 Klassen einzuteilen. Klasse-I-PDZ-Interaktionen tragen demnach die Konsensussequenz $[T/S] X \Phi^*$, Klasse-II-Interaktionen die Sequenz $[\Phi/\Psi] X \Phi^*$, Klasse-III-Bindungen die Sequenz $[D/E] X V^*$ und Klasse-IV-Interaktionen die Konsensussequenz $X \Psi [D/E]^*$; Φ stellt hierbei eine der hydrophoben Aminosäuren Valin, Isoleucin oder Leucin, Ψ eine aromatische Aminosäure, X eine beliebige Aminosäure

und * das Stopcodon dar (Songyang et al., 1997; Vaccaro and Dente, 2002). Konventionsgemäß wird der dem Stopcodon vorangehende Rest als Rest 0 bezeichnet, der Rest davor mit -1 usw. Die Mehrheit der PDZ-Bindungen sind „klassische“ Typ-I-Interaktionen (Bezprozvanny and Maximov, 2001). Das in dieser Arbeit in Ret9 identifizierte PDZ-Bindemotiv entspricht nur teilweise der Konsensussequenz für Klasse-I-PDZ-Bindemotive. Die Ret9-Shank3-Interaktion kann aufgrund des Threonins an Position -2 der Klasse-I-zugeordnet werden, der Rest 0 in Ret9 entspricht mit Phenylalanin jedoch nicht der klassischen Typ-I-Konsensussequenz. Aufgrund der Ergebnisse in dieser Arbeit kann die Konsensussequenz für die Zuordnung von PDZ-Interaktionen zur Klasse-I erweitert werden. Auch die aromatische, hydrophobe Aminosäure Phenylalanin ist an dieser Position möglich.

4.3 Shank als Adaptorprotein in der Signaltransduktion

Signale, die eine Zelle auf ihrer Oberfläche in Form von Wachstumsfaktoren empfängt, werden nicht direkt durch den entsprechenden Rezeptor an ihr Ziel, zum Beispiel das Zytoskelett oder die Translationsmaschinerie im Zellkern, weitergegeben. Vielmehr aktivieren Rezeptoren durch die Rekrutierung entsprechender Adaptorproteine ein oder mehrere Signalmodule in der Zelle, die den Stimulus verarbeiten und gegebenenfalls mit anderen Signalen integrieren, um eine spezifische biologische Antwort einzuleiten. Adaptorproteine sind die Mediatoren zwischen RTK und Signalmodulen in der Zelle. Sie binden an die RTK, werden von diesen phosphoryliert und rekrutieren nachfolgend weitere Signalproteine, um so die Verbindung zu distinkten intrazellulären Signalwegen zu ermöglichen. Damit tragen sie auch zur Spezifität der RTK in Bezug auf die verwendeten Signalwege in verschiedenen Zelltypen und Geweben bei (Grimm, 2001; Guy et al., 2002; Tan and Kim, 1999).

Die Proteine der Shank-Familie wurden in der Literatur bislang als „Scaffold“-Proteine beschrieben, die vor allem Neurotransmitter-Rezeptoren in das Zytoskelett integrieren und so möglicherweise eine effizientere Signalverarbeitung ermöglichen. Diese Funktion ist jedoch passiver Natur, d. h. Shank nimmt nicht direkt an der Signalweiterleitung teil. Es komplexiert die notwendigen Signalproteine auch in Abwesenheit eines Stimulus, ohne dabei eine zelluläre Reaktion auszulösen. In der Literatur sind einige

Interaktionspartner von Shank3 beschrieben, die in der Region zwischen Aminosäure 632 und 1456 an Shank3 binden der Region, die, fusioniert an Ret, Tubuli induzieren kann (siehe Abb. 13d, e). Die PDZ-Domäne bindet neben dem neuronalen „Scaffold“-Protein GKAP (Boeckers et al., 1999b) den PAK (p21 activated kinase)-assoziierten Rho-Familien-GDP/GTP-Austauschfaktor PIX (PAK interAkting exchange factor) (Park et al., 2003). Das in den Aktin-Umbau involvierte Protein IRSp53 (insulin receptor substrate p53) bindet im Bereich der Aminosäuren 908-918 (Bockmann et al., 2002), und das Gerüstprotein Homer interagiert mit den Aminosäuren 1380-1387 (Tu et al., 1999). Jedoch wurde für keines dieser Proteine eine Verbindung zum Erk-MAPK- oder PI3K-Signalweg beschrieben. Die Analyse der Shank3-Proteinsequenz in dieser Arbeit zeigte Bindestellen für das Adaptorprotein Grb2, das oberhalb des Erk-MAPK- und des PI3K-Signalwegs einzuordnen ist. Seine Funktionalität als Verbindungsglied zwischen Shank3 und dem Erk-MAPK-Modul konnte ich experimentell bestätigen: Das Einführen einer Mutation in Shank3, die die Interaktion mit Grb2 verhindert, führt zum Verlust der Tubulibildung unterhalb des Erk-MAPK-Signalweges. Shank3 erhöht die Zahl möglicher Effektoren, die mit dem aktiven Rezeptor interagieren, und kann somit zur Formierung neuer, sowie zur Stabilisierung vorhandener Signalkomplexe beitragen. Die Möglichkeit der phosphorylierungs-abhängigen Interaktion von Shank3 mit Grb2 unterhalb von Ret9 zeigt, dass Shank3 die Aufgabe eines Signal-Adaptorproteins übernehmen kann. Shank3 ist dadurch aktiv in die Signalweiterleitung involviert. Obwohl Shank3 möglicherweise schon an den inaktiven Rezeptor binden kann, ist die Bildung eines funktionellen Signalkomplexes erst nach der Aktivierung des Rezeptors und der Phosphorylierung von Shank3 möglich. Sehr ähnlich funktionieren andere bekannte Adaptorproteine unterhalb von RTK: Gab1, FRS2 und Dok beispielsweise binden an aktive Rezeptoren und können dort phosphoryliert werden um weitere Komponenten in den Signalkomplex an der Zellmembran zu rekrutieren, unterhalb derer dann unter anderem das Erk-MAPK- und das PI3K-Signalmodul aktiviert werden kann (Grimm et al., 2001; Ong et al., 2000; Sachs et al., 2000; Schaeper et al., 2000).

4.4 Die Grb2-Bindestelle in Shank3 ist in Fisch und Mammalia konserviert

Aminosäure-Regionen in Proteinen, die über mehrere verschiedene Spezies konserviert sind, legen die funktionelle Relevanz der entsprechenden Region nahe, insbesondere dann, wenn die Konservierung in Organismen wie Fisch und Mensch zu finden ist. Derart konservierte Protein-Bindestellen lassen vermuten, dass das Motiv für die Funktion eines Proteins wichtig ist und sich schon früh in der Evolution manifestiert hat. Die Interaktionsstelle für Grb2 in Shank3 ist von Zebrafisch (*Danio rerio*) und Kugelfisch (*Tetraodon nigroviridis*) über Maus und Ratte bis hin zum Menschen konserviert. Ein Aminosäuresequenz-Vergleich zeigt ein identisches Bindemotiv in Maus, Ratte und Mensch. In Zebrafisch ist lediglich Leucin 1009 gegen Valin ausgetauscht, was in Einklang mit der bekannten Konsensus-Sequenz für die Grb2-SH2-Domäne, pYXNX (Songyang et al., 1994), steht (Abb. 20a). Die gute Konservierung unterstreicht die funktionelle Relevanz der Bindung von Grb2 an Shank3.

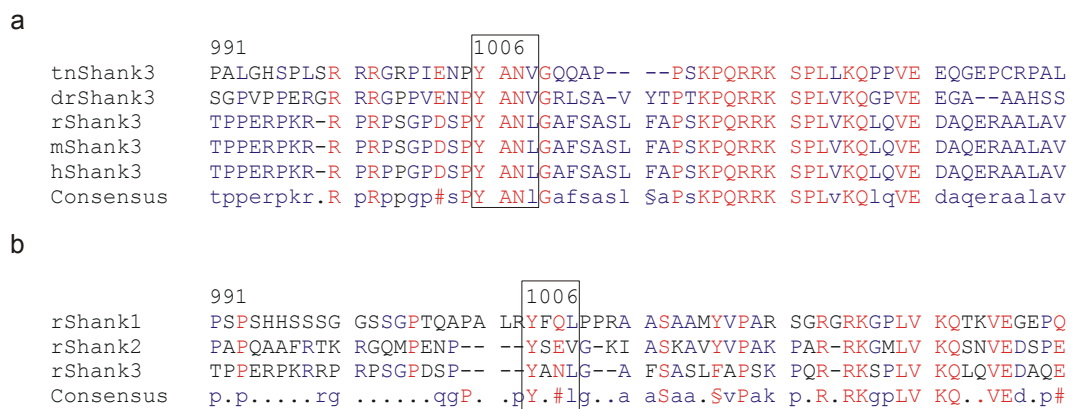


Abb. 20 – Vergleich des Aminosäuresequenzbereichs 991-1049 der Shank-Proteinfamilie. (a) Vergleich von Shank3 aus Kugelfisch (tn) Zebrafisch (dr), Maus (m), Ratte (r) und Mensch (Std.) **(b)** Vergleich zwischen Ratte-Shank1, -2 und -3; die Konsensus-Bindestellen für Grb2 sind eingerahmt. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf rShank3. Verwendete Symbole in der Konsensussequenz: %: F oder Y; #: N, D, Q oder E.

In den Experimenten zur Funktion von Shank-Proteinen im Erk-MAPK- und PI3K-Signalweg wurde nur Shank3 eingesetzt. Initiale Experimente in RK13-Zellen (rabbit kidney 13; Kaninchen-Nieren-Epithelzellen), bei denen Ret9 zusammen mit Shank2

und Shank3 transient überexprimiert wurden, zeigten, dass mit Shank2 kein anhaltendes Erk-MAPK-Signal induziert werden kann. Die Grb2-Bindestelle an Y1006 findet sich nur in Shank3, nicht aber in Shank1 oder Shank2 (Abb. 20b). Shank1 trägt an dieser Stelle die Sequenz YFQL, Shank2 die Sequenz YSEV, beides nicht homolog zu der Konsensus-Bindestelle für Grb2-SH2-Domänen, pYXNX (Songyang et al., 1994). Gleiches gilt nicht nur für die in Abb. 20b gezeigte Shank-Proteinfamilie aus der Ratte sondern auch für die Shank-Proteine aus Fisch, Maus und Mensch. Es ist davon auszugehen, dass weder Shank1 noch Shank2 in der Lage ist, eine Grb2-abhängige Funktion in der Tubulogenese unterhalb von Ret auszuüben. Möglicherweise binden hier andere, noch nicht identifizierte Effektoren, die weitere Funktionen unterhalb von Shank1 und Shank2 aktivieren. Es kann vermutet werden, dass tatsächlich nur Shank3 eine Funktion in der Erk-MAPK- und PI3K-Signalverarbeitung unterhalb von Ret9 erfüllt.

4.5 Shank3 als Modulator der Ret9 Signaltransduktion

Adaptorproteine regulieren die Signalweiterleitung unterhalb von RTK, indem sie Verbindungen zu Signalkaskaden in der Zelle herstellen. Signalwege von der Plasmamembran in den Zellkern unterliegen einer strengen regulatorischen Kontrolle. Die Kinetik der Aktivierung zum Beispiel der Erk-MAPK und PI3K ist entscheidend für die biologische Reaktion einer Zelle, wie vermehrte Migration oder Tubulibildung in Epithelzellen (Boccaccio et al., 2002; Khwaja et al., 1998; Marshall, 1995; Rosario and Birchmeier, 2003; Traverse et al., 1992). Aus Studien über die RTK Met ist bekannt, dass lang anhaltende Aktivierung des Erk-MAPK- und des PI3K-Signalweges durch Met *in vitro* zur Bildung von Tubuli führt, während transiente Stimulation beider Signalwege durch den EGFR nicht ausreicht, solche morphologischen Veränderungen zu induzieren (Maroun et al., 2000). Die Beobachtung, dass Shank3 in Nieren-Epithelzellen die Kinetik der Aktivierung des Erk-MAPK- und des PI3K-Signalweges unterhalb von Ret9 beeinflusst, weist auf eine wichtige Funktion Shanks in der Signalverarbeitung hin. Ich konnte zeigen, dass die Interaktion von Ret9 mit Shank3 notwendig ist, um eine anhaltende Aktivierung des Erk-MAPK- und des PI3K-Signalweges nach Stimulation von Ret9 zu erreichen. Ret51 oder Mutanten von Ret9, die Shank3 nicht binden, können die genannten Signalwege nur transient aktivieren.

Damit ist Shank3 der erste beschriebene Ret-Effektor, der isoformspezifisch nur die Signaltransduktion von Ret9 beeinflusst.

Daraus ergibt sich direkt die Frage nach dem Mechanismus, der das Umschalten von transientem zu anhaltendem Signal ermöglicht. Es wird vermutet, dass die Stabilität des Komplexes aus Signalmolekülen am Rezeptor entscheidend für die Dauer des Signals ist. Hinweise darauf geben Arbeiten mit der Ras-Familien GTPase Rap1 bzw. seinen assoziierten Faktoren C3G und CrkL (Stork, 2003). Rap1 wird vermutlich in einen langlebigen Komplex zusammen mit entsprechenden Aktivatoren und Effektoren an die Plasmamembran oder an endosomale Membranen rekrutiert und ermöglicht hierdurch die anhaltende Aktivierung darunterliegender Signalwege (Wu et al., 2001). Shank3 rekrutiert mit Grb2 ein zusätzliches Adaptorprotein in den aktiven Signalkomplex an der Zellmembran, was neben der Möglichkeit der direkten Aktivierung von Ras über Sos auch zur Stabilisierung der Interaktion mit weiteren Signalproteinen beitragen kann. Die RTK Met kann das Adaptorprotein Gab1 gleichzeitig direkt und indirekt über Grb2

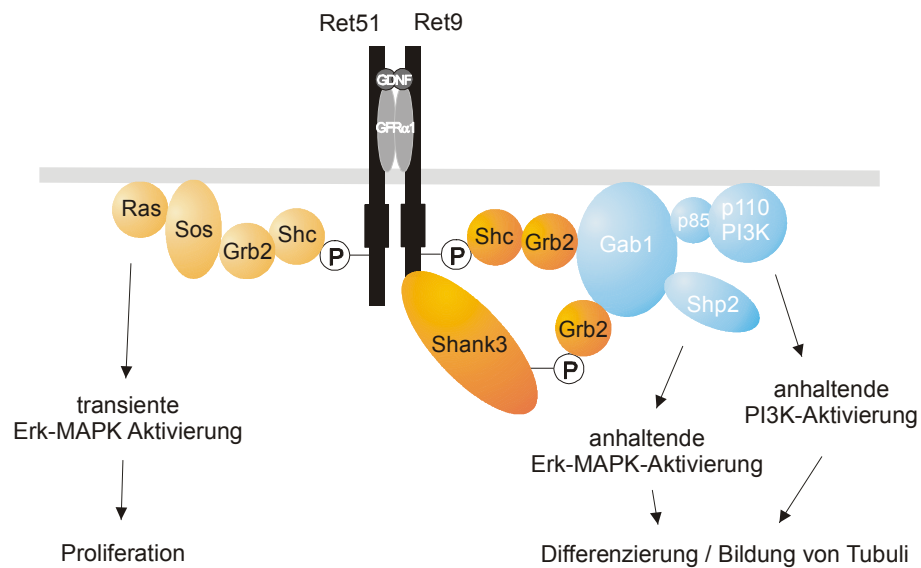


Abb. 21 – Model der Signalverarbeitung unterhalb von Ret9 und Ret51. Die Stimulation von Ret51 führt zu einer transienten Aktivierung des Erk-MAPK-Signalweges, die Stimulation von Ret9 dagegen über Shank3 zu einer lang anhaltenden Aktivierung des Erk-MAPK- und des PI3K-Signalweges. Die blau dargestellten Komponenten des Komplexes sind bislang nicht experimentell bestätigt.

binden, wobei Grb2 die Interaktion stabilisiert (Bardelli et al., 1997; Schaeper et al., 2000). Die resultierende anhaltende Aktivierung des Erk-MAPK-Signals führt zur Induktion eines invasiven morphogenetischen Programms der Zellen. Andere RTK, wie zum Beispiel der EGFR, die Gab1 nur indirekt über Grb2 binden können, induzieren kein solches Programm. Die Stabilisierung der Interaktion mit dem Signalprotein ist hier entscheidend für die biologische Reaktion der Zellen.

Ret bindet nach Aktivierung unter anderem die Adaptorproteine Shc und FRS-2, die eine transiente Aktivierung des Erk-MAPK-Signalweges durch die Interaktion mit Grb2 initiieren, das wie beschrieben Sos rekrutiert und Ras aktiviert. Shc kann unterhalb von Ret über Grb2 auch mit Gab1 interagieren, was jedoch ähnlich wie beim EGFR nicht per se zur Invasivität der Zellen führt (Hayashi et al., 2000). Meine experimentellen Daten legen nahe, dass Shank3 im Ret9-Signalweg eine ähnliche Funktion wie Grb2 im Met-Signalweg einnimmt und die Interaktion mit weiteren Signalmolekülen stabilisiert. In Anwesenheit von Shank3 könnte die Interaktion von Shc mit Gab1 über das zusätzliche Grb2-Molekül am aktiven Rezeptor stabilisiert werden (Abb. 21). Es ist anzunehmen, dass der so entstandene erweiterte Signalkomplex eine hinreichend lange Lebensdauer besitzt, um die Induktion eines anhaltenden Erk-MAPK- und PI3K-Signals zu gewährleisten. Eventuell fördern auch weitere Effektoren, die durch Gab1 an die Plasmamembran gebracht werden, diesen Effekt. Hinzu kommt, dass Ret9 und Shank3 unabhängig von äußeren Stimuli interagieren können, was eine Stabilisierung des Signalkomplexes zusätzlich unterstützt. Die Bildung eines solchen Komplexes an Ret51 ist aufgrund der dort fehlenden PDZ-Bindestelle nicht möglich, und es ist daher unterhalb dieser Ret-Isoform nur ein transientes Signal zu beobachten.

4.6 Die Funktion von Ret9 und Shank3 in der Tubulogenese

Zellkultursysteme, in denen Epithelzellen in eine dreidimensionale Kollagenmatrix eingesät werden und zur Bildung von Tubuli, ähnlich denen in der Organentwicklung *in vivo*, angeregt werden können, sind in der Literatur beschrieben (Brinkmann et al., 1995; Montesano et al., 1991; Niemann et al., 1998; Pollack et al., 1998; Sachs et al., 1996; Weidner et al., 1996; Weidner et al., 1993). Die komplexen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch vergleichsweise wenig verstanden. Ohne Stimu-

lus bilden MDCK Zellen in einer Kollagenmatrix mit Flüssigkeit gefüllte Zysten aus. Nach Stimulation mit spezifischen Wachstumsfaktoren beginnen die Zellen Tubuli zu bilden, indem sie Adhäsionsproteine herunterregulieren, ohne jedoch den Zellverband zu verlassen, und kurzzeitig ihre epitheliale Polarität aufgeben, um anschließend neue Zell-Zell-Kontakte auszubilden und die apikal-basolaterale Polarität wieder herzustellen (O'Brien et al., 2004; Pollack et al., 1998). Eingeleitet wird dieser Prozess durch Stimulation von RTK, zum Beispiel Met, oder wie hier gezeigt Ret9, die in der Lage sind die Transkription entscheidender Gene zu induzieren (Fukuda et al., 2003; Muller et al., 2002). Obwohl bekannt ist, dass Ret9, nicht aber Ret51, in der Nierenentwicklung der Maus eine wichtige Rolle spielt, konnte diese Funktion bislang nicht *in vitro* rekonstruiert werden, um den molekularen Signalmechanismus aufzuklären. Durch die Etablierung des Tubulogenese-Assays für Ret steht ein gut handhabbares System zur Verfügung, die biologische Relevanz der Interaktion von Ret9 mit Shank-Proteinen zu testen.

Die zentrale Region von Shank3 (die Aminosäuren 632-1057) verleiht Ret die Fähigkeit, Tubulogenese zu induzieren. Der Ansatz dies durch die Verwendung von Fusionsproteinen zwischen Rezeptor und Adaptorprotein zu zeigen, ist der Natur entnommen. In *Drosophila* ist das Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS), das in Mammalia-Zellen als separates Adaptorprotein vorliegt, direkt an den Insulin-Rezeptor fusioniert und übt dort dieselbe insulinabhängige Funktion aus wie IRS in Mammalia (Yenush et al., 1996). Diese Herangehensweise bietet die Möglichkeit, die Interaktion von Ret mit anderen PDZ-Proteinen zu unterbinden, ohne die Funktion der untersuchten Interaktion oder die Stimulusabhängigkeit der Signalwege zu beeinflussen. Die Ergebnisse demonstrieren, dass Shank3 in der Tubulogenese eine wichtige Rolle übernimmt, indem es weitere Signalmoleküle in den Rezeptor-Komplex rekrutiert. Im Fall von Met fällt diese Aufgabe Gab1 zu, während an den EGFR keine Adaptoren binden, die eine vergleichbare Funktion übernehmen können. An Ret51 kann kein entsprechender Komplex gebildet werden, was erklärt, warum diese RTK die in Kap. 4.5 beschriebenen Signalwege nicht anhaltend aktiviert und keine Tubulogenese induzieren kann. Die MEK-Inhibitoren U0129 und PD98059 blockieren den Erk-MAPK-Signalweg und damit die Tubulibildung in Ret9 exprimierenden MDCK-Zellen, was die Signifikanz dieses Signalweges in der Tubulogenese unterhalb von Ret9 bestätigt. Inhibitoren der PI3K

führen rasch zur Induktion der Apoptose von MDCK-Zellen in der Kollagenmatrix und konnten daher in dem hier verwendeten Tubulogenese-Experiment nicht eingesetzt werden. Shank3 fällt somit die Organisation des entscheidenden Signalkomplexes zu, der Differenzierungsprozesse, wie die Tubulibildung, gewährleisten kann.

4.7 Eine mögliche Funktion von Ret9 und Shank3 in der Nierenentwicklung

Experimente in der Maus haben gezeigt, dass die Ret9-Isoform, nicht aber die Ret51-Isoform, für die normale Nierenentwicklung essentiell ist. Im Gegensatz zu Ret9-exprimierenden Mäusen ist in Ret51-exprimierenden Mäusen die Induktion des Röhrenchensystems des „ureteric buds“ (UB) gestört (de Graaff et al., 2001; Srinivas et al., 1999). Der zugrunde liegende Mechanismus war jedoch unklar. Aus der Erkenntnis der *In Vitro*-Experimente, in denen Ret9, unterstützt von Shank3, die Tubulibildung induzieren kann, Ret51 jedoch nicht, ergibt sich direkt ein Hinweis auf die Situation *in vivo*. Möglicherweise übernimmt Shank3 auch in der Niere eine wichtige Rolle in der Verarbeitung der Ret9-Signale. Die basolaterale Expression von Shank3 in epithelialen Nierentubuli und die Interaktion von endogenem Ret9 mit Shank3 in der Maus-Niere legen eine gemeinsame Funktion beider Proteine in diesem Organ nahe. Die Erzeugung eines Ret9 FA-Allels, oder die Nieren-spezifische Deletion oder Mutation des Shank3-Gens in der Maus wären logische Experimente, um diese Theorie zu überprüfen. Sowohl das Ret9 FA-Allel, als auch die Deletion oder Mutation des Shank3-Gens sollten die normale Nierenentwicklung stören.

Zusammengenommen etablieren die vorgelegten Ergebnisse Shank3 als wichtigen Bestandteil des Ret9-Signalkomplexes an der Plasmamembran. Shank3 dient als Adaptorprotein um weitere Signalmoleküle an den aktiven Rezeptor zu binden und über die Regulation der Aktivierungskinetik zweier Signalwege eine spezifische biologische Reaktion auszulösen. Damit kann Shank3, zusätzlich zu seiner Rolle als „Scaffold“-

Protein in Neuronen, erstmals eine Funktion als Signalmolekül in epithelialen Zellen zugewiesen werden. Die Spezifität der Ret9-Shank3-Interaktion bietet außerdem einen Mechanismus, der die signifikante Divergenz in der Signalverarbeitung zwischen Ret9 und Ret51 in der Nierenentwicklung in Mammalia erklären kann. Das PDZ-Bindemotiv in Ret9 ist auch in dem mit Schilddrüsenkrebs in Verbindung gebrachten Fusionsprotein Ret/PTC2 konserviert, und Shank-Proteine könnten daher auch in der Tumorentstehung nach der Ret/PTC2 Chromosomentranslokation eine Rolle spielen.