

# **Die Bedeutung neuronaler Tyrosinkinase-Rezeptoren für die Entwicklung und die Regeneration im Nervensystem**

## *Zusammenfassung*

Die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) bestimmt Morphologie und Identität von Zellen des Nervensystems, aber auch die Wanderung von Nervenzellen (Neuronen) an ihren Bestimmungsort und ihre dortige Integration in ein neuronales Netzwerk sowie die Ausbildung von Synapsen. Hier wird auf die wichtigsten zellulären und molekularen Aspekte neuronaler RTKs sowie auf ihre intrazellulären Signaltransduktions-Mechanismen eingegangen, die den durch sie bewirkten morphologischen und biochemischen Veränderungen zu Grunde liegen. Beispielhaft werden die Fibroblasten-Wachstums-Faktoren (FGFs) und ihre Rezeptoren genauer besprochen.

Die Aktivierung von FGF-Rezeptoren (FGFRs) ist an vielen Entwicklungs- und Reparatursprozessen in nahezu allen Geweben von Säugern beteiligt. Unter den 23 FGF-Proteinen wurden 10 im Gehirn identifiziert. Es gibt vier FGFRs, die sämtlich zu den RTKs gezählt werden. Im Zentralnervensystem (ZNS) werden mehrere FGFs und FGFRs exprimiert. FGF-2 wird hauptsächlich von Astrozyten produziert, während andere Mitglieder der FGF-Familie, wie beispielsweise FGF-5, FGF-8 und FGF-9, primär von Neuronen synthetisiert werden. Während der Entwicklung des ZNS spielen FGFs und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle für die Neurogenese, das Axonwachstums und im Rahmen neuronaler Differenzierung. Neben ihrer Bedeutung bei neurologischen Erkrankungen scheinen FGF-1 und FGF-2 auch an der Regulation synaptischer Plastizität und bei Lern- und Gedächtnisvorgängen beteiligt zu sein.

## *Inhaltsverzeichnis*

Allgemeine Funktionen von RTKs bei der neuronalen Entwicklung .....	3
Fibroblastenwachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren .....	5
Gen- und Protein-Struktur der FGFs .....	5
Molekularbiologie der FGF Rezeptoren .....	6
Signalwege von RTKs in Nervenzellen .....	9
Die zentrale Bedeutung von ERK und PI3K .....	9
Negative Feedback-Inhibitoren der RTK Signalwege .....	11
Schlussfolgerungen und Ausblick.....	13
Abkürzungen.....	14
Referenzen .....	15

## ***Allgemeine Funktionen von RTKs bei der neuronalen Entwicklung***

Neurone erhalten, verarbeiten und senden Information an andere Nervenzellen weiter. Während der Entwicklung vergrößert der diese Informationen aufnehmende Anteil des Neurons, der Dendrit, seine Oberfläche durch Ausbildung von Verzweigungen und Dornen (sog. Spines). Der einzig abgehende Fortsatz, das Axon, trägt die Information weiter und bildet dafür terminale, synaptische Endigungen aus. Diese Komplexität auf morphologischer Ebene wird gesteuert durch Wachstumsfaktoren, z.B. durch Neurotrophine wie NGF (nerve growth factor), BDNF (brain derived neurotrophic factor) oder Neurotrophin-3 (NT3). Diese Moleküle sind essentiell für die neuronale Entwicklung, aber auch für die Aufrechterhaltung, Adaption und Plastizität im adulten Nervensystem. Neurotrophine und andere Wachstumsfaktoren werden im zentralen und peripheren Nervensystem nur in kleinen Mengen produziert, wodurch sie sehr genau die Anzahl und Morphologie von Neuronen über hoch-affine Rezeptoren determinieren.

Neurotrophine binden an Trk (tropomyosin-related kinase)-Rezeptoren, welche an axonalen Endigungen (Synapsen) angereichert sind. Diese Membranproteine übertragen nach ihrer Aktivierung ein Signal an den Zellkörper (und damit auch an den Zellkern) der entsprechenden Nervenzelle. Gemeinsam mit Rezeptoren für andere Faktoren mit neurotropher Aktivität, wie z. B. FGF (fibroblast growth factor) oder EGF (epidermal growth factor), bilden sie die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) Familie, die das Überleben, die Differenzierung und die Plastizität von Neuronen bestimmen. Hier werden die wichtigsten neuronalen RTKs (hauptsächlich Trks und FGFRs) und ihre Fähigkeit, intrinsisch-neuronale Signalwege und neuronale Genexpression zu beeinflussen, vorgestellt.

Die in vivo-Relevanz von RTKs für das Nervensystem wurde hauptsächlich an transgenen Tieren (sog. knock-out Mäusen), denen einzelne RTKs im ganzen Körper fehlen, erforscht. Da diese Tiere oft nicht lange überlebensfähig sind, werden z.Zt. sog. induzierbare und/oder konditionale Maus-Mutanten hergestellt, um die Expression von RTKs in neuronalen Subpopulationen während spezifischer Entwicklungsstadien auszuschalten (und damit ihre Funktion für bestimmte Nervenzellen zu bestimmen). Nur eine detaillierte Analyse des Phänotyps dieser Mäuse wird definitive Hinweise für die spezifische Rolle von RTKs in der Regulation von neuronaler Entwicklung und regenerativem Axonwachstum liefern. Derzeit sind wir auf Studien an konventionellen knock-out Mäusen angewiesen, die darauf hinweisen, dass die Neurotrophin-Rezeptoren (Trks) eine wichtige Rolle in der Entwicklung von peripheren sensiblen, motorischen und sympathischen Neuronen spielen. Es ist von Bedeutung, dass adulte periphere sympathische und sensible Neurone keine Neurotrophine zum Überleben benötigen, obwohl diese während der Embryogenese und im frühen postnatalen Leben unbedingt erforderlich sind. Sogar bei Entfernen von jeglichen Quellen von neurotrophen Faktoren,

wie z. B. nicht-neuronalen Zellen, überleben > 80% der adulten Neurone in Zellkultur und bilden lange Fortsätze aus.

Die spezifische Rolle von TrkA, -B und -C-Rezeptoren wurde genauer untersucht im Ganglion cervicale superius (SCG) von Nagetieren. In diesem Modell wird TrkC bereits in frühen Entwicklungsphasen exprimiert, noch bevor es zur Verbindung der sog. präganglionären Neurone mit dem SCG kommt. TrkB (BDNF-Rezeptor) spielt keine Rolle in der Entwicklung postganglionärer Neurone, wird aber für präganglionäre Neurone benötigt, die zum Nebennierenmark projizieren. Das Fehlen von TrkA (NGF-Rezeptor) beeinflusst weder die Neurogenese, die Expression von neuronalen Markern oder das initiale Axonwachstum von SCG-Neuronen. Im Gegensatz dazu ist TrkA aber absolut notwendig für das Überleben und die periphere Innervation von sympathischen Neuronen in der späteren Entwicklungsphase. Mäuse, denen TrkA-Rezeptoren fehlen, haben nicht nur sympathische, sondern auch schwere sensible Neuropathien und die meisten sterben innerhalb eines Monats nach der Geburt. Neuronaler Zelltod wurde in diesen Tieren im SCG, im trigeminalen sowie im Hinterwurzelganglion (dorsal root ganglion, DRG) detektiert. Die Expression und die Aktivität von vielen Überlebens-assoziierten Proteinen, wie z.B. Caspase-9, Bax oder Bcl-xL, werden von allen Trk-Rezeptoren reguliert. Weiters wurde eine Reduktion von cholinergen basalen Frontalhirn-Projektionen zum Hippocampus und in den Cortex TrkA-defizienter Tiere beobachtet. Alle peripheren sensiblen Neurone exprimieren einen der drei Trk-Rezeptoren in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. TrkA knock-out-Mäusen fehlen nocizeptive und thermozeptive Neurone, während TrkC knock-out-Tieren die großen, propriozeptiven Neurone fehlen. TrkA-positive, sensible Neurone besitzen nicht-myelinisierte C-Fasern oder dünn myelinisierte A $\delta$ -Fasern und sind vorwiegend nocizeptiv. Ihr neurochemischer Phänotyp ist charakterisiert durch die Expression von Substanz P, CGRP (calcitonin gene-related peptide), den Capsaicin-Rezeptor und durch die Expression von Na-Kanälen, was darauf hindeutet, dass Trk Rezeptoren nicht nur eine permissive, sondern auch eine instruktive Rolle während der neuronalen Entwicklung spielen. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass das Fehlen von pro-apoptotischem Bax DRG-Neurone in TrkA knock-out-Tieren rettet, aber die überlebenden Neurone keine korrekten peripheren Verbindungen herstellen und ihre nocizeptiven Markermoleküle verlieren.

Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFRs) spielen eine wichtige Rolle bei der Neuralrohr-Entwicklung des ZNS, indem sie die Proliferation der kortikalen Vorläuferzellen regulieren. Letzteres erfordert insbesondere FGFR3, der für die migratorischen Eigenschaften der entstehenden neuronalen Precursorzellen notwendig zu sein scheint. Darüber hinaus entwickeln sich Oligodendrozyten unter dem Einfluss von FGFR-Signalkaskaden. Im folgenden Abschnitt wird näher auf die Molekularbiologie der neuronalen RTKs und ihrer Liganden am Beispiel der Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs) und ihrer Rezeptoren (FGFR) eingegangen.

# Fibroblastenwachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren

## Gen- und Protein-Struktur der FGFs

Alle bekannten FGF-Gene bestehen aus drei kodierenden Exons, wobei Exon 1 für das Start-Codon kodiert. Allerdings enthalten einige FGF-Gene, z.B. FGF-2 und FGF-3, zusätzliche 5' untranskribierte Regionen. Die Größe der kodierenden Region von FGF-Genen reicht von weniger als 5 kb (FGF-3 und FGF-4) bis über 100 kb (FGF-12). In Bezug auf ihre chromosomale Lokalisation zeigen FGF-Gene eine weit verstreute Verteilung. Mit Ausnahme von FGF-16 ist die chromosomale Lokalisation für alle menschlichen FGF-Gene bekannt. Mehrere dieser Gene sind auf verschiedene spezifische chromosomale Regionen konzentriert.

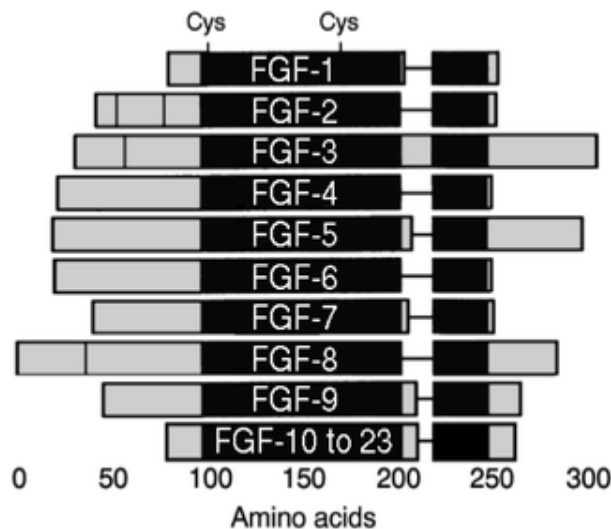


Abb. 1. Schematischer Domänen-Vergleich von verschiedenen Mitgliedern der FGF-Familie von Wachstumsfaktoren. Alle FGFs bestehen aus zwei hoch konservierten Kern-Domänen (schwarz), welche durch eine zentrale Spacer-Region variabler Länge voneinander getrennt sind. Auch C- und N-terminale Regionen (grau) unterscheiden sich in ihrer Länge (modifiziert aus Bieger und Unsicker, 1996).

Hinsichtlich ihrer evolutionären Entwicklung sind FGFs vergleichsweise alte Moleküle, die schon bei Invertebraten nachgewiesen werden können. FGF-ähnliche Gene wurden auch in mehreren viralen Genomen identifiziert. Allerdings enthalten Genome von einzelligen Organismen, wie z.B. *E. coli* oder Hefe (*S. cerevisiae*), keine FGF-ähnlichen Sequenzen. Bei wirbellosen Organismen (z.B. bei der Fruchtfliege, *Drosophila*, oder dem Fadenwurm, *Caenorhabditis elegans*) wurde für *Drosophila* nur eine FGF-ähnliche Sequenz (*branchless*) gezeigt und zwei für *C. elegans*. Zwischen den unterschiedlichen Arten sind FGF-Proteine hoch konserviert mit mehr als 90% homologen Aminosäuresequenzen. Bis heute wurden vier FGFs im Zebrafisch (FGF-3, -8, -17 und -18), sechs im Krallenfrosch *Xenopus* (FGF-3, Fgfi, Fgfii, FGF-8, -9, und -20), und sieben im Huhn (FGF-2, -4, -8, -12, -14, -18 und -19) identifiziert.

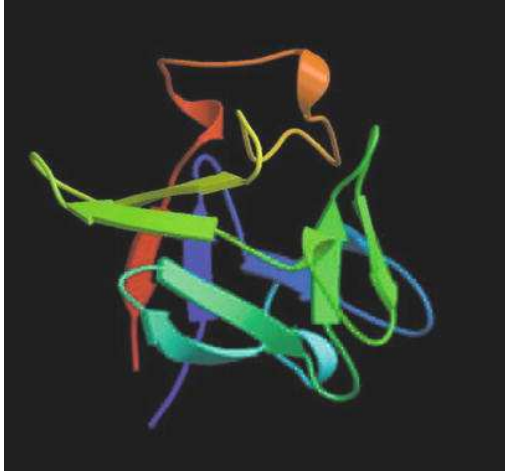


Abb. 2. Die dreidimensionale Struktur des FGF-2-Proteins (modifiziert nach Zhu et al., 1991)

Humane FGFs sind teilweise homolog und können daher in mehrere Unterfamilien gruppiert werden. Eine dieser Unterfamilien umfasst FGF-8, -17 und -18, welche 70-80% ihrer Aminosäuresequenzen teilen und einen hohen Grad der Ähnlichkeit in ihrer Rezeptorbindungsspezifität aufweisen. Auch finden sich überlappende Expressionsorte, wie z. B. die Mittelhirn-Hinterhirn Grenze. FGF-Proteine von Vertebraten haben ein Molekulargewicht von 17 bis 34 kDa, wohingegen das Translationsprodukt von *Drosophila branchless* 84 kDa beträgt. Die prinzipielle Proteinstruktur ist allen FGFs ähnlich, mit einem inneren Kernbereich bestehend aus 28 hoch konservierten und sechs identischen Aminosäureresten (Abb. 1). Zehn dieser konservierten Aminosäurereste sind verantwortlich für Interaktionen mit dem FGF-Rezeptor. In FGF-1 und FGF-2 besteht der Kern des Proteins aus 12 antiparallelen beta-Strängen (Abb. 2). Zwei dieser beta-Stränge (Nr. 10 und 11) beinhalten basische Aminosäurereste, welche die Heparin-Bindungsstelle von FGF-2 bilden.

Die Mehrheit der FGFs (FGF-3 bis -8, -10, -15, -17 bis -19 und -21 bis -23) verfügen über aminoterminaler Signalpeptide. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sie aus den Zellen sekretiert werden. Allerdings fehlen den Proteinen FGF-1, -2, -9, -16 und -20 konventionelle Signalpeptide, dennoch werden sie aber in den Extrazellulärraum ausgeschieden. FGF-1 und -2 werden vermutlich nur von geschädigten Zellen durch einen Mechanismus freigesetzt, der unabhängig vom klassischen endoplasmatischen Retikulum-Golgi-Weg ist. FGF-9 verfügt über eine aminoterminaler hydrophobe Sequenz, welche für die Sekretion verantwortlich ist. Für FGF-2 und FGF-3 wurden hochmolekulare Formen mit überwiegend nukleärer Lokalisation nachgewiesen.

## Molekularbiologie der FGF Rezeptoren

Die Existenz der hoch-affinen FGF-Rezeptoren wurde zuerst in 3T3-Fibroblasten mittels Phosphotyrosin-spezifischer Antikörper nachgewiesen, durch die die von FGF-1 und FGF-2 stimulierte Tyrosin-Phosphorylierung detektiert werden konnte. Direkte Beweise für die Existenz von Membran-gebundenen FGF-Rezeptoren mit hoher Affinität ( $KD = 20 \text{ pmol/l}$ ) stammten aus

Bindungsstudien mit <sup>125</sup>I-markiertem FGF-2. Mehrere Untersuchungen identifizierten die für die Bindung verantwortlichen Rezeptor-Proteine, welche ein Molekulargewicht zwischen 125 und 160 kDa aufweisen.

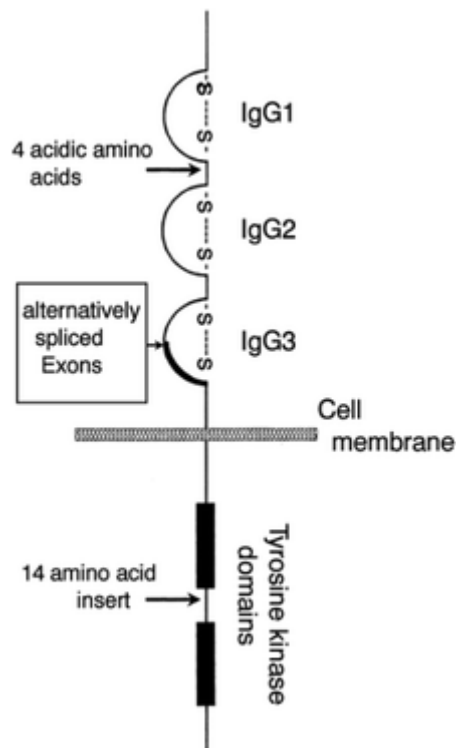


Abb. 3. Struktur der FGF-Rezeptoren. Die Rezeptoren bestehen aus drei extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen, einer Transmembran-Domäne und zwei intrazellulären Tyrosinkinase-Domänen. Eine saure Domäne von vier Aminosäuren ist wichtig für die Heparinbindung und somit für die Rezeptor-Dimerisierung (modifiziert nach Bieger und Unsicker, 1996).

Ein weiterer Durchbruch in Bezug auf die Charakterisierung von FGF-Rezeptoren wurde durch die Isolierung von cDNA aus Hühnergewebe für ein Protein mit hoher Affinität für FGF-1 erreicht. Die strukturelle Charakterisierung dieses Moleküls führte zur Identifizierung der prototypischen Kennzeichen aller FGF-Rezeptoren. Es handelt sich um Transmembranproteine mit drei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen (IgI, IgII und IgIII), die einen sauren Bereich zwischen IgI und IgII, eine hydrophobe Transmembran-Domäne und eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne besitzen (Abb. 3). Bisher wurden vier verschiedene Subtypen von FGF-Rezeptoren identifiziert. Die Affinität von FGF-Rezeptoren für ihre Liganden ist sehr vielfältig mit unterschiedlichen Affinitäten für jedes Mitglied der FGF-Familie von Wachstumsfaktoren.

Die Bindung eines Liganden an den FGF-Rezeptor führt zur Bildung eines Rezeptor-Komplexes bestehend aus zwei FGF-Molekülen gebunden an jeweils einen Rezeptor, welche durch Heparin (ein Heparansulfat-Proteoglykan) miteinander verbunden sind (Abb. 4). Vermutlich bilden sich zwei unabhängige FGF/FGFR-Komplexe, die dann durch ein Glykosaminoglykan verbunden werden. Die Entstehung des Rezeptor-Dimers löst die Aktivierung der Rezeptor-Monomere durch gegenseitige Phosphorylierung (*in trans*) aus, was zur Rekrutierung von intrazellulären Signalmolekülen führt. Eine wichtige Klasse von Signal-Proteinen, die an den aktivierten FGF-Rezeptor-Komplex binden, gehört

zur Gruppe der src-homology2 (SH2)-Proteine. Das gemeinsame strukturelle Merkmal dieser Proteine ist die SH2-Domäne, die der intrazellulären Interaktion mit dem Rezeptor-Komplex dient. Die SH2-Proteine können als Substrat für Rezeptor-vermittelte Phosphorylierung selbst oder als Adapter-Proteine dienen, um andere Zielproteine zu rekrutieren. RTKs transduzieren Signale durch Phosphotyrosin-induzierte Konformationsänderungen ihrer Zielproteine in Folge dessen es zur Aktivierung verschiedener katalytischer Aktivitäten kommt.

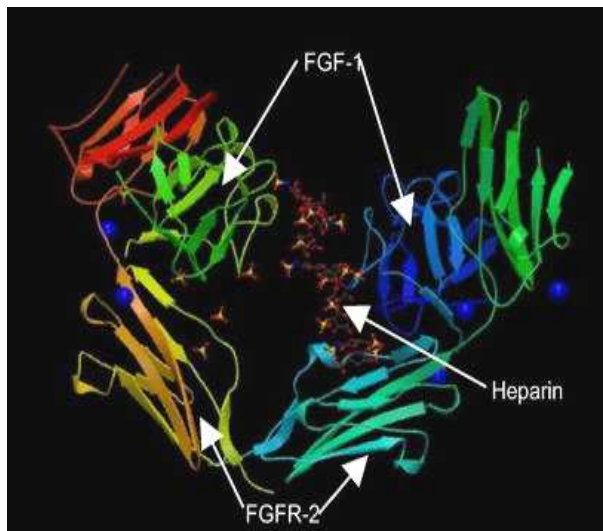


Abb. 4. Die dreidimensionale Struktur des extrazellulären Teils eines Komplexes bestehend aus FGF-1/FGFR-2 Heterodimeren, die miteinander verbunden sind durch Heparin (modifiziert nach Pellegrini et al., 2000).

Die meisten Untersuchungen über FGF-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion wurden am FGFR-1 als *dem* prototypischen FGFR durchgeführt. Die Signalwege verschiedener FGF-Rezeptoren sind auf Grund eines hohen Maßes an Homologie auf Aminosäure-Ebene zwischen den verschiedenen Arten von Rezeptoren sehr ähnlich. Darüber hinaus wurde unter Verwendung von chimären Rezeptoren (bestehend aus den zytoplasmatischen Domänen von FGFR-1, FGFR-3 und FGFR-4 jeweils verknüpft mit der extrazellulären Domäne des PDGF-Rezeptors) gezeigt, dass der Hauptunterschied zwischen FGFRs die Stärke der Tyrosinkinase-Aktivität ist und nicht Unterschiede in ihren Zielproteinen. Dies bedeutet, dass alle FGFR-Subtypen die gleichen Signalkaskaden ansteuern, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung.

Sieben Tyrosin-Reste am zytoplasmatischen Ende des FGFR-1 dienen als Substrat für die Phosphorylierung: Tyr463, Tyr583, Tyr585, Tyr653, Tyr654, Tyr730 und Tyr766. Tyr653 und Tyr654 sind für die auto-katalytische Aktivität der FGF-Rezeptoren wichtig und damit wesentlich für die Signaltransduktion. Für Tyr766 wurde gezeigt, dass es die SH2-Domäne der Phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ) bindet und für die FGFR-medierte Aktivierung von PLC $\gamma$  notwendig ist. Im Gegensatz dazu können die anderen Tyrosine zu Phenylalanin-Resten mutiert sein. Sie stellen keine Substrate für die Rezeptor-auto-Phosphorylierung dar. Ihre Bedeutung in der FGFR- Signaltransduktion ist bisher unbekannt.

## ***Signalwege von RTKs in Nervenzellen***

Wie oben beschrieben resultiert die durch Liganden-Bindung induzierte Aktivierung und Autophosphorylierung in der Rekrutierung von mehreren Adapter-Molekülen an Tyrosin-Reste in der intrazellulären Domäne von RTKs. Adapter-Proteine wie FRS2 oder Shc lösen dann die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege aus. Die wichtigsten Signalkaskaden, welche durch RTKs aktiviert werden, sind der Ras/Raf/MEK/ERK- und der PI3K/Akt-Signalweg (Abb. 5). Aktives ERK und Akt sind sowohl für neuronales Überleben in der Entwicklung und im erwachsenen Nervensystem als auch für axonales und dendritisches Wachstum verantwortlich. Phospholipase C (PLC) regelt vor allem die intrazelluläre Ca-Konzentration und die Proteinkinase C (PKC)-Aktivität über die Spaltung von PIP<sub>2</sub> zu DAG und IP<sub>3</sub>. Dieser Mechanismus scheint wiederum die MEK-Aktivität zu fördern und an der Neurotrophin-Freisetzung beteiligt zu sein.

### **Die zentrale Bedeutung von ERK und PI3K**

Die Aktivierung von PI3K/Akt und ihrer nachgeordneten Zielproteine stellen die wichtigsten Überlebens-Signale in adulten Neuronen dar. Im Gegensatz dazu spielt ERK eine vorherrschende Rolle in der Entwicklung und nach einer Zellschädigung. PI3K und sein Zielmolekül Akt sind notwendig für das NGF-abhängige Überleben von sympathischen und sensorischen Neuronen. Aktivierung von ERK induziert Transkriptions-Prozesse, die die Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 beeinhaltet. Dagegen phosphoryliert Akt BAD und verhindert so die Inaktivierung von anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen. Der Transkriptionsfaktor Forkhead, der Apoptose durch steigende Konzentrationen an Fas-Ligand induziert, wird durch Akt gehemmt. Weiters verhindert Akt indirekt Apoptose durch die Suppression der GSK-3 (Glykogen-Synthase-3-Kinase). Neben der Aktivierung von Akt fördert PI3K das Überleben durch die Aktivierung einer Gruppe von Caspase-Inhibitoren, die sog. Inhibitoren der Apoptose (IAP), welche am Neurotrophin-mediierten Überleben in sensiblen und sympathischen Neuronen beteiligt sind (Abb. 5).

RTK-Signalwege fördern axonales Wachstum nicht nur während der Embryonalentwicklung, sondern auch in adulten Neuronen. Aktivierung von PI3K, Akt, Ras, Raf, MEK und ERK ist notwendig für NGF-induziertes Neuritenwachstum, und Überexpression von Ras, Raf und MEK induziert Neuritogenese in der Abwesenheit von NGF in sog. PC12-Zellen, einer neuronal differenzierenden Zelllinie. Nachhaltige ERK-Aktivierung ist für Neuritenwachstum von PC12-Zellen erforderlich, während vorübergehende ERK-Aktivierung zur Proliferation führt, was darauf hindeutet, dass die Dauer des ERK-Signals die Differenzierung dieser Zellen bestimmt. In der primär neuronalen Zellkultur induziert aktives Ras Neuritenwachstum von Neuronen in Abwesenheit von

Neurotrophinen, während in sympathischen Neuronen das ERK-Signal für BDNF/TrkB-vermittelte axonale Elongation erforderlich ist. Darüber hinaus ist die ERK-Phosphorylierung für den retrograden Transport eines Schädigungs-Signals erforderlich und für den durch Neurotrophine induzierten lokalen Aufbau von Axonen. Umgekehrt führt eine Hemmung von ERK zur Aktin-Depolymerisation und zur Zerstörung des Wachstumskegels.

PI3K ist ebenso notwendig für das NGF-induzierte Axonwachstum von sympathischen Neuronen und für die Wachstumskegel-Reaktion auf NGF. Es wurde gezeigt, dass aktiviertes Akt die Axonregeneration von Motoneuronen *in vivo* beschleunigt. Die lokale Anordnung des Zytoskeletts, welche die axonale Morphogenese reguliert, ist auch unter Kontrolle des PI3K-Signalweges. PI3K beeinflusst die Aktivität von verschiedenen kleinen GTPasen der Rho-Familie wie Rac, Cdc42 und RhoA, wodurch es zur Veränderung des Aktin-Zytoskeletts kommt, das für dendritisches und axonales Wachstum von herausragender Bedeutung ist. In Fibroblasten induziert die Aktivierung von Cdc42 fingerförmige Ausstülpungen (Filopodien) und die Aktivierung von Rac die Bildung von Lamellipodien (flächenhafte Protrusionen), während die Aktivierung von RhoA zur sog. Stressfaserbildung führt. Neuriten können sich ausbreiten durch Verlängerung der Filopodien und nachfolgender Generierung von Lamellipodien zwischen den Filopodien. In PC12-Zellen werden sowohl Cdc42 und Rac durch PI3K reguliert, und die Bildung von Lamellipodien ist von der Rac-Aktivität abhängig. In primären Rückenmarksneuronen fördert die Überexpression von aktivem Cdc42 die Wachstumskegel-Bildung der Filopodien und die axonale Elongation. RhoA aktiviert die Rho-Kinase ROCK, welche zur Phosphorylierung von verschiedenen Ziel-Proteinen führt, einschließlich der Myosin Leicht-Kette, die wiederum Myosin aktiviert. Im Gegensatz zu Rac und Cdc42, welche das Neuritenwachstum fördern, verursacht RhoA den Wachstumskegelkollaps und eine Retraktion der Neuriten.

Pharmakologische Inhibition von RhoA induziert Neuritenwachstum in PC12-Zellen. Umgekehrt wird die PC12-Zell-Differenzierung blockiert durch eine aktiv-dominante Mutante von RhoA. Bei erwachsenen DRG-Neuronen stimuliert die Hemmung von RhoA das Neuritenwachstum. Die NGF-induzierte PI3K-Aktivierung inaktiviert vorübergehend RhoA über Rac1, wodurch RhoA von der Membran in das Zytoplasma transloziert und seine Fähigkeit mit ROCK zu assoziieren vermindert wird. Integrine inaktivieren RhoA über die Aktivierung von RhoGAP. Die Aktivierung von PI3K/Akt wiederum inaktiviert GSK-3 $\beta$ , welches Axonwachstum durch die Regulation der Mikrotubuli-bindende Proteine (MBPs) hemmt. GSK-3 $\beta$  beeinflusst alle Aspekte der Mikrotubuli-Anordnung wie Mikrotubuli-Polymerisation und Erhaltung der Mikrotubuli-Dynamik von verschiedenen MBPs. Bei erwachsenen DRG-Neuronen führt die Hemmung von GSK-3 $\beta$  zu einem verbesserten Neuritenwachstum (Abb. 5).

Der ERK- und der PI3K-Signalweg haben unterschiedliche Funktionen im Rahmen axonaler Regeneration. In embryonalen DRG-Kulturen sowie bei adulten DRG-Explantaten, welche nicht von neurotrophen Faktoren abhängig sind, führt die Inhibition von PI3K zu vermindertem Axonwachstum. PI3K-Inhibitoren hemmen spontanes und NGF-induziertes Neuritenwachstum. Inhibitoren des Ras/ERK-Signalweges hemmen nur vorübergehend spontanes Auswachsen von Axonen aus DRG-Explantaten, während NGF-induziertes Wachstum davon wesentlich beeinträchtigt wird. In Bax-knockout-Mäusen führt die Überexpression von Ras und Raf-1 (c-Raf) zu axonaler Elongation von embryonalen sensiblen Neuronen, während die Überexpression von Akt oder PI3K den Axondurchmesser und die axonale Verzweigung erhöht. Die Co-Transfektion mit Raf und Akt führt zu langen, dicken und mäßig verzweigten Axonen. Die Effekte von Raf und Akt scheinen voneinander unabhängig sein. Bei adulten DRG-Neuronen induziert die FGF-2 Behandlung eine prominente ERK-Phosphorylierung, während die Akt-Phosphorylierung nur leicht erhöht wird. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit NGF zur Phosphorylierung von sowohl ERK als auch Akt in einem ähnlichen Ausmaß. Es ist daher nicht verwunderlich, dass FGF-2, aber nicht NGF, das elongative Axonwachstum von sensiblen Neuronen als Antwort auf eine Nervenläsion positiv beeinflussen kann.

### **Negative Feedback-Inhibitoren der RTK Signalwege**

Die Signaltransduktion von RTKs wird abgeschwächt durch Degradation der Rezeptoren oder durch negative Feedback-Inhibitoren wie Sprouty oder Sef. Sprouty-Proteine wurden erstmals 1998 entdeckt. Sie stellen eine bedeutende Gruppe von negativen Feedback-Inhibitoren in Nervenzellen dar, die Intensität und Dauer der Aktivierung von Tyrosinkinase begrenzen und damit Wachstum und Differenzierungsprozesse wesentlich beeinflussen. In Säugetieren wurden vier Sprouty-Isoformen gefunden (Sprouty1-4), deren Expression durch Wachstumsfaktoren reguliert wird. Aktivierung von Sprouty hemmt spezifisch den Ras/Raf/ERK-Signalweg, induziert durch FGF, BDNF (brain-derived neurotrophic factor), GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), PDGF (platelet-derived growth factor) oder VEGF (vascular epithelial growth factor). Sprouty1 und -2 binden Grb2 und hemmen die Rekrutierung des Grb2-SOS-Komplexes an FRS2 oder Shp2. Sprouty2 und -4 binden Raf und interferieren ebenso mit der Aktivierung des Ras/ERK-Signalwegs.

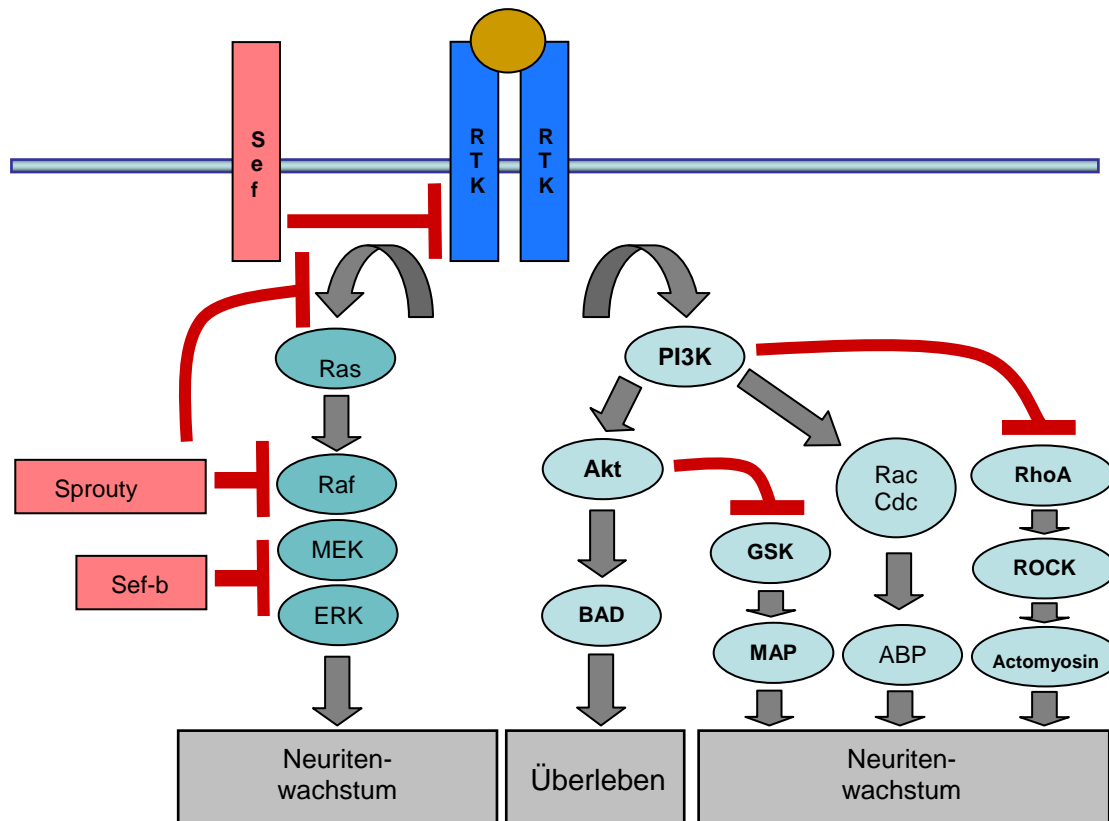


Abb. 5. Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)-abhängige Signalwege, die für neuronales Überleben und Neuritenwachstum verantwortlich sind und durch negative Feedback-Inhibitoren gehemmt werden (rot). In adulten Neuronen fördert die Aktivierung von ERK über Ras/Raf/MEK primär das Neuritenwachstum durch transkriptionale Kontrolle, d.h. ERK transloziert in den neuronalen Zellkern. Der Überlebensweg wird von PI3K, welches über Akt BAD phosphoryliert und dadurch seine Inhibition von anti-apoptotischen Proteinen verhindert. Die Hemmung von GSK induziert Neuritenwachstum durch die Regulation Mikrotubulus-bindender Proteine (MAPs). Rac und Cdc42 regulieren die Aktin-Dynamik über Aktin-bindende Proteine (ABP). RhoA beeinflusst das Aktin-Zytoskelett über das Aktin-basierende Motor-Protein Myosin II. PI3K inaktiviert RhoA vorübergehend, was seine Fähigkeit herabsetzt, mit ROCK zu assoziieren. Die negativen Feedback-Inhibitoren Sprouty und Sef schwächen RTK-Signalwege ab. Sprouty hemmt spezifisch MAP-Kinase-Aktivität auf der Ebene von Grb2 und Raf. Sef-a verhindert die Phosphorylierung des Rezeptors als Transmembranprotein und das zytoplasmatische SEF-b verhindert die nukleäre Translokation von ERK durch Hemmung der Dissoziation des ERK-MEK Komplexes (nach Hausott et al., 2009)

Überexpression von Sprouty1 und -2 verhindert das durch NGF (nerve growth factor) oder FGF-2 induzierte Neuritenwachstum von PC12-Zellen. Nicht-phosphoryliertes dominant-negatives Sprouty1, -2 oder -4 fördert dagegen FGF-induziertes Neuritenwachstum. In Kulturen von unreifen Granula-Nervenzellen des Kleinhirns verhindert die Überexpression von Sprouty2 Neuritenbildung und die Hemmung von Sprouty2 durch eine dominant-negative Mutante oder siRNA fördert demgegenüber das Neuritenwachstum. In reifen Nervenzellen, die bereits ein umfangreiches Netzwerk von Axonen besitzen, induziert die Überexpression von Sprouty2 den Zelltod, während seine Hemmung das Überleben fördert. Dies weist auf einen Entwicklungsunterschied in der Wirkung von Ras/ERK-Aktivierung hin, welches Neuritenwachstum oder das Überleben in Abhängigkeit vom Alter

beeinflusst. Sprouty2 wird hoch exprimiert in adulten DRG-Neuronen und seine Hemmung induziert elongatives Axonwachstum durch Verstärkung des Ras/ERK-Signalweges.

Der negative Feedback-Inhibitor Sef (similar expression of FGF genes) wurde erstmals im Zebrafisch identifiziert. Sef wird co-exprimiert mit Sprouty2 und Sprouty4. Ähnlichkeiten zwischen den Expressionsmustern dieser Gene deuten darauf hin, dass sie ko-reguliert werden. In Abhängigkeit von der Isoform blockiert Sef die Phosphorylierung des Rezeptors als ein Transmembranprotein durch Hemmung der FRS2-Phosphorylierung (Sef-a), oder es verhindert die nukleäre Translokation von ERK durch Hemmung der Dissoziation des ERK-MEK Komplexes als zytoplasmatische Isoform (Sef-b, Abb. 5). Überexpression von Sef hemmt FGF-2- und NGF-induziertes Neuritenwachstum von PC12-Zellen. Sef wird im Gehirn, im Rückenmark und in DRGs exprimiert.

### ***Schlussfolgerungen und Ausblick***

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz erheblicher Fortschritte in unserem Verständnis der molekularen und zellulären Veränderungen, die durch Aktivierung von RTKs induziert werden, noch wichtige Fragen beantwortet werden müssen. Im Fokus vieler Labors steht daher z.Zt. die Untersuchung der Aktivierung und das Recycling von RTKs, die Bindung und die Modifikation von Signalmolekülen sowie die Regulierung der nukleären Transkription und damit die Veränderungen in der neuronalen Genexpression durch RTKs.

Viele dieser Studien zielen auf die Entwicklung von Therapien ab, die zur Förderung von neuronalem Überleben und axonaler Regeneration bei verschiedenen Erkrankungen des Nervensystems beitragen können. In der Tat konnte eine neuroprotektive Wirkung durch die Behandlung mit RTK-Liganden nach traumatischen oder ischämischen Läsionen erzielt werden, aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), Chorea Huntington oder der Parkinson-Krankheit und verschiedenen peripheren Neuropathien wurden positive Effekte beobachtet. Als Neurotrophine und andere Wachstumsfaktoren in rekombinanter Form hergestellt werden konnten, wurden rasch therapeutische Erfolge bei diesen Erkrankungen erwartet (ähnlich dem Erfolg von Erythropoietin bei Störungen im hämatopoietischen System). Allerdings haben klinische Studien mit Neurotrophinen bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen bisher nicht ihr Versprechen halten können. Folglich wird auf Basis detaillierter Kenntnisse der Signaltransduktionswege und transkriptioneller Veränderungen nach RTK-Aktivierung die Suche nach neuen endogenen oder pharmakologischen Modulatoren der RTK-Signalwege fortgesetzt. Vielversprechende Ergebnisse der bisherigen prä-klinischen Studien deuten auf ein grosses therapeutisches Potenzial von diesen Molekülen hin, die vielleicht nicht zu einer Heilung, aber evtl. doch zu einer Verlangsamung des Fortschreitens von neurodegenerativen Erkrankungen führen können.

## ***Abkürzungen***

ABP = actin binding protein

BDNF = brain derived neurotrophic factor

DRG = dorsal root ganglion

ERK = extracellular signal-regulated kinase

FGF = fibroblast growth factor

GDNF = glial cell line-derived neurotrophic factor

GSK-3 = glycogen synthase 3-kinase

IAP = inhibitor of apoptosis

MAP = microtubule associated protein

MAP kinase = mitogen activated protein kinase

MBP = microtubule binding proteins

MEK = MAPK kinase

NGF = nerve growth factor

NT3 = Neurotrophin 3

p75NTR = p75 neurotrophin receptor

PI3K = phosphatidylinositol-3 kinase

PLC = phospholipase C

RTK = receptor tyrosine kinase

ROCK = Rho-associated kinase

SCG = superior cervical ganglion

Trk = tropomyosin related kinase

ZNS = central nervous system (Zentralnervensystem)

## ***Referenzen***

- Dikic I, Giordano S. 2003. Negative receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol* 15:128-135.
- Frade JM, Barde YA. 1998. Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays* 20:137-145.
- Heumann R. 1994. Neurotrophin signalling. *Curr Opin Neurobiol* 4:668-679.
- Huang EJ, Reichardt LF. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Huang EJ, Reichardt LF. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
- Hubbard SR, Miller WT. 2007. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19:117-123.
- Hausott B, Kurnaz I, Gajovic S, Klimaschewski L. 2009. Signalling by neuronal tyrosine kinase receptors: Relevance for development and regeneration. *Anatom Rec (Special Issue)* 292:1976-1985
- Kaplan DR, Miller FD. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381-391.
- Klint P, Claesson-Welsh L. 1999. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci* 4:D165-D177.
- Lee FS, Kim AH, Khursigara G, Chao MV. 2001. The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol* 11:281-286.
- Markus A, Patel TD, Snider WD. 2002. Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* 12:523-531.
- Patapoutian A, Reichardt LF. 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11:272-280.
- Reichardt LF. 2006. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545-1564.
- Reuss B, Bohlen und Halbach O. 2003. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 313:139-157.
- Richardson PM. 1991. Neurotrophic factors in regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 1:401-406.
- Saltiel AR, Decker SJ. 1994. Cellular mechanisms of signal transduction for neurotrophins. *Bioessays* 16:405-411.
- Skaper SD, Moore SE, Walsh FS. 2001. Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Prog Neurobiol* 65:593-608.