

Aus dem Med.Zentrum für Pathologie der Philipps-Universität Marburg.  
Geschäftsführender Direktor : Prof. R.Moll  
Abteilung für Neuropathologie  
Direktor: Prof. H. D. Mennel

Charakterisierung der Aktivierung des antiapoptotischen Phosphatidylinositol-3'-Kinase-  
abhängigen Signalwegs durch den neuroprotektiven Faktor *Glial cell line derived  
neurotrophic factor* (GDNF)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von  
Frauke Neff aus Unna

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am  
15.08.02, gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Koreferent: Prof. Dr. T. O. Kleine

# Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	6
2	Einleitung	10
2.1	Problemstellung	10
2.2	Darstellung des Morbus Parkinson	10
2.2.1	Physiologie und Pathophysiologie der Substantia Nigra	10
2.2.1.1	Physiologie	10
2.2.1.2	Pathophysiologie	12
2.2.1.3	Theorien zum Untergang der Neurone der Substantia Nigra	12
2.2.1.4	Genetische Faktoren	13
2.2.1.5	Oxidativer Streß	13
2.2.1.6	Mitochondriale Dysfunktion	14
2.2.1.7	Excitotoxine	14
2.2.1.8	Neurotrophe Faktoren	15
2.2.2	Klinik des Morbus Parkinson	15
2.2.2.1	Inzidenz, Prävalenz und Ätiologie	15
2.2.2.2	Symptome und Verlauf	15
2.2.2.3	Diagnostik	16
2.2.3	Therapien des Parkinson	17
2.2.3.1	Medikamentöse Therapie	17
2.2.3.1.1	L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA)	17
2.2.3.1.2	Dopaminagonisten	17
2.2.3.1.3	Anticholinergika	18
2.2.3.1.4	Amantadin, Monoaminoxidase-B-Hemmer (Mao-B)und Catechol-O-Methyltransferase-Inhibitoren (COMT)	18
2.2.3.1.5	Neuroleptika –Therapie	19
2.2.3.2	Nicht -Medikamentöse Therapien	19
2.2.3.2.1	Neurochirurgische Therapien	19
2.2.3.2.2	Neurotrophe und –restaurative Therapieansätze	21
2.3	Tiermodelle zum Morbus Parkinson	22
2.4	Durch Ret-Mutationen verursachte Erkrankungen	23
2.4.1	Multiplen Endokrinen Neoplasie 2A und 2B	24
2.4.2	M. Hirschsprung	24
2.5	Rezeptor – Tyrosin – Kinasen	25
2.5.1	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen	28
2.5.2	Serin-/Threonin-Kinasen	29
2.6	Neurotrophe Faktoren	30
2.7	Signalwege	33
2.7.1	Phosphatidylinositol-3-Kinase –Signalweg	35
2.7.2	Der PKB/Akt-Signalweg	38
2.7.3	Die MAPK-Kaskaden	41
2.7.4	Der GDNFR-Ret-Signalweg	43
3	Zielsetzung der Arbeit	45

4	<b>Material und Methodik</b>	46
4.1	Material	46
4.1.1	Chemikalien und Geräte	46
4.1.2	Zelllinien	46
4.1.3	Puffer und Lösungen	46
4.1.4	Antikörper	47
4.2	Methoden	47
4.2.1	Zellkultur	47
4.2.2	Stimulation	48
4.2.3	Proteinextraktion	48
4.2.4	Bradfordassay	49
4.2.5	SDS-PAGE	49
4.2.6	Western Blot	49
4.2.7	Behandlung der Membranen zur Expressionskontrollen-Analyse	50
4.2.8	Immunprecipitation	50
4.2.9	Immunprecipitationsassay	50
4.2.10	Radioaktives Akt-Assay	51
5	<b>Ergebnisse</b>	52
5.1	Nachweis des GFR $\alpha$ in den SH-SY5Y-Zellen	52
5.2	Nachweis des Ret-Rezeptors in SH-SY5Y-Zellen.	52
5.3	Nachweis des EGF-Rezeptors	53
5.4	Nachweis der phosphorylierten PI3K	53
5.4.1	Phosphorylierung der PI3K mit Genistein als Inhibitor	54
5.4.2	Wortmannin-sensitive Phosphorylierung der PI3K	55
5.4.3	PD098059 –sensitive Phosphorylierung der PI3K	55
5.5	Nachweis von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Akt	56
5.5.1	Genistein- sensitive Phosphorylierung von Akt	56
5.5.2	Wortmannin-abhängige Phosphorylierung von Akt	57
5.5.3	PD098059-sensitive Phosphorylierung von Akt	58
5.6	Inhibitor-sensitive Phosphorylierung der MAPK	59
5.6.1	Genistein-anhängige Phosphorylierung der MAPK	59
5.6.2	Wortmannin-sensitive Phosphorylierung der MAPK	60
5.6.3	PD098059-sensitive Phosphorylierung der MAPK	61
5.7	Nachweis Inhibitor-abhängiger BAD-Bindung	62
5.7.1	Genistein-sensitive BAD-Bindung	63
5.7.2	Wortmannin-sensitive BAD-Bindung	64
5.7.3	PD098059 – abhängige BAD-Bindung.	64
5.8	Phosphorylierung von MAPK und Akt in PC12-Zellen	65
5.8.1	Phosphorylierung der MAPK in PC12-Zellen	65
5.8.2	Phosphorylierung von Akt in PC12-Zellen	66
5.8.3	Radioaktives Akt-Assay	66
5.8.4	Phosphorylierungskontrolle des radioaktiven Akt-Assays	67
6	<b>Diskussion</b>	69
6.1	Kritische Bewertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit	69
6.2	Kritische Bewertung der eingesetzten Methoden.	70
6.3	Verwendete Signalwegkomponenten	72

6.4	Bedeutung für die Klinik	75
6.5	Schlußfolgerung	78
7	Zusammenfassung	79
8	Literaturverzeichnis	81
9	Danksagung	94
10	Meine akademischen Lehrer waren Damen und Herren in Marburg:	95
11	Lebenslauf	96
12	Ehrenwörtliche Erklärung	97

# 1 Abkürzungen

4E-BP	eIF4E-binding proteins
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
Akt	Produkt des c-Akt-Oncogens, benannt nach dem Viralen Äquivalent des Retrovirus AKT8
A-loop	activity-loop – Aktivitätsschleife
ANS	autonomen Nerven System
Apaf1	apoptotic protease activating factor1
ART	Artemin
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-Triphosphat
atyp.PKC	atypische Protein-Kinase C
BAD	Bcl-2/BCL-XL- associated death promotor
BCL-2	B-cell-lymphoma-Gen 2
BDNF	brain derived neurotrophic factor – Gehir nabstammender Wachstumsfaktor
Caspase	Cytosolic Aspartate-Specific cysteine proteases
CDK	cyclin-dependent-kinases
CN	Cyanid, „Blausäure“
CO	Kohlenmonoxyd
COMT	Catechol O-Methyltransferase
CNTF	ciliary neurotrophic factor – Ziliarer Wachstumsfaktor
D	Domäne
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd
ECD	Extrazelluläre Domäne
EGF	Epidermal growth factor – Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermal growth factor rezeptor
FAK	Fokal Adhesion Kinase
F-box	Leucin reiche Proteine
FGF	fibroblast growth factor – Fibroblastenwachstumsfaktor
FHA-Domänen	Forkhead-assozierte Domänen
FKHRL1	Forkhead related L1
FRAP	FKBP12 and rapamycin-binding protein kinases

G.P.	Globus Pallidus
GABA	$\gamma$ -Aminobutyrat
GAP	GTPase activating proteins
GDNF	glial cell line derived neurotrophic factor – Gliazellabstammender Wachstumsfaktor
GFR $\alpha$	GDNF-Rezeptor- $\alpha$
GNEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol, ein Membran-Anker
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase 3
GTP	Guanosin Tri-Phosphat
H2B	Histon 2B
HOG1	high-osmolarity glycerol response 1
HSP	heat shock protein
I $\kappa$ B	Inhibitor of $\kappa$ B
ICD	Intrazelluläre Domäne
ICE	Interleukin-1 $\beta$ converting enzyme
IGF-1R	Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 - Insulin-like growth-factor-receptor 1
IKK	I $\kappa$ B kinase
I-MEKK	Insulin stimulated MEKK
IP3	Inositol-Triphosphat
IRS-1	Insulin-Rezeptor-Substrat 1
JAK3	Janus-Kinase-3
JNK	Jun-N-terminal-kinase
JNKK	JNK-Kinase
L-DOPA	LevoDOPA –L-Dihydroxyphenylalanin
LIF	leukaemia inhibitory factor – Leukämieinhibitionsfaktor
MaMiPu	Magermilch Pulver
MAO-B	Monoaminoxidase B
MAP2K	MAPK-Kinase
MAP3K	MAPK-kinase-kinase – Synonym zu MEKK
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MAPKAP-Kinasen	MAPK-activated protein-Kinase
M.	Morbus – Krankheit

MKK4	MAP2K Isoform 4, synonym zu JNKK und SEK
MMAC1	mutated in multiple advanced cancers
MOS	Mos-Protoonkogene Produkt
MPDP	1-Methyl-4-Phenyl-2,3-Dihydropyridinium
MPP+	1-Methyl-4-Phenylpyridinium Ion
MPPP	1-Methyl-4-Phenyl-4-Propionoxy-Piperidin
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid Hydrid
Ncl	Nucleus
NFκB	nuclear factor κB
NGF	nerve growth factor – Nervenwachstumsfaktor
NIK	NFκB- inducing kinase
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NOS	Nitric Oxide Synthase , Stickstoffmonoxyd-Synthase
NS	Nervenssystem
NTN	Neurturin
NT-X	Neurotrophin – X
p70 <sup>s6k</sup>	p70 ribosomale S6 kinase
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase
PDGF	Plateled derived growth factor - Thrombozytenabstammender- Wachstumsfaktor
PDGF-BB	platelet-derived growth factor-BB – Thrombozytenabstammender Wachstumsfaktor-BB
PDGFR	Plateled derived growth factor rezeptor
PDK1	3-Phosphatidylinositol-Dependend-Kinase 1
PET	Positron Emissions Tomographie
PH	pleckstrin homology domain
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIK	Phosphatidylinositol-Kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein-Kinase B –Synonym für AKT
PLA2	Phospholipase A2
PSP	Persephin



PTB	phospho-Tyrosin bindende Domäne
PtdInsP	Phosphatidylinositolphosphat
PTEN	phosphatase and tensin homologue
RalGDS	ras-related guanine nucleotide dissociation stimulator
Ret	Produkt des Protoonkogens c-ret <i>RE</i> arranged in <i>T</i> ransformation
Rho-GAPs	region of homology to GTPase-activating proteins for the rho-family of small G-proteins- Homologien zu GTPase aktivierende G- Proteinen der rho-Familie
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
S.N.	Substantia Nigra
SAPK	stress-activated-protein-kinase
SH	src-homology domain
SPECT	Single Photon Emissions Computer Tomographie
TGF	transforming growth factor – Transformierender Wachstumsfaktor
TK	Tyrosin-Kinase
TMD	Transmembrane Domäne
TOR	target of rapamycin
UCH-L1	Ubiquitin Carboxyterminale Hydroxylase - L1
UE	Untereinheit
WW-Domänen	Tryptophan (W)-Tryptophan (W)-Domänen
X-X	„Platzhalter“ für beliebige Aminosäuren
ZNS	Zentrales Nerven System

## **2 Einleitung**

### **2.1 Problemstellung**

Der Morbus Parkinson ist nach dem Morbus Alzheimer die zweithäufigste Neurodegenerative Erkrankung, deren Ätiologie noch weitgehend unbekannt ist. Bei circa 10 % der idiopathischen Form ist eine familiäre Häufung zu finden.

Klinisch imponiert die Erkrankung vor allem durch ihre drei Leitsymptome: Akinese, Rigor und Tremor, deren neuropathologisches Korrelat eine Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia Nigra ist. Warum und wie es zu diesem Zelluntergang kommt, ist noch weitgehend unklar. Die Therapie ist zur Zeit rein symptomatisch und versucht die Kardinalsymptome soweit zu reduzieren, daß die Patienten möglichst lange ihren Alltagspflichten nachkommen können. Neuere experimentelle Therapieansätze versuchen embryonale Zellen in das Striatum zu implantieren, um die fehlenden Dopaminproduzierenden Neurone zu ersetzen. Hierbei werden jedoch ein Großteil der Zellen abgestoßen, so daß bisher eine sehr geringe Effizienz erreicht wurde. Wie von Mahalik et al. (Mahalik, Hahn et al. 1994) gezeigt werden konnte, gehen die meisten dieser Implantatneurone ebenso wie die Mehrzahl der Originalneurone (Burke and Kholodilov 1998) an Apoptose zugrunde. Es wurde nun versucht, diesen programmierten Zelltod zu verhindern, und Clarkson et al. (Clarkson, Zawada et al. 1995) konnten experimentell zeigen, daß neurotrophe Wachstumsfaktoren wie der Glia-Zelllinien abstammende neurotrophe Faktor (*glial-cell-line derived-neurotrophic factor*) (GDNF) die Apoptose reduzieren, und das Überleben der Neurone verlängern. Diese Erkenntnis konnte von Granholm (Granholm, Mott et al. 1997) und Gash (Gash, Zhang et al. 1996) bestätigt werden. Der Mechanismus, über den GDNF und andere neurotrophe Faktoren ihre neuroprotektive Wirkung vermitteln und die Apoptose der dopaminergen Neurone verhindert, ist größtenteils noch unklar.

In dieser Arbeit wird versucht, einen vermittelnden Signalweg der neuroprotektiven Wirkung von GDNF nachzuweisen.

### **2.2 Darstellung des Morbus Parkinson**

#### **2.2.1 Physiologie und Pathophysiologie der Substantia Nigra**

##### **2.2.1.1 Physiologie**

Die Substantia Nigra (S.N.) besteht aus einer ventral liegenden pars reticulari und einer dorsal davon liegendem pars compacta mit dicht stehenden, melanhaltigen, dopaminergen Neuronen. Sie wird zusammen mit dem Globus Pallidus (G.P.) und dem Corpus Striatum (Ncl. Caudatum und Putamen) als Basalganglien bezeichnet und wird funktionell dem

extrapyramidalem System zugerechnet. Die Basalganglien erhalten ihren Efferenzen vom gesamtem Kortex und projizieren über den Thalamus zum prämotorischen Kortex zurück. Bewegungsabläufe werden von den Basalganglien somit wie folgt moduliert:

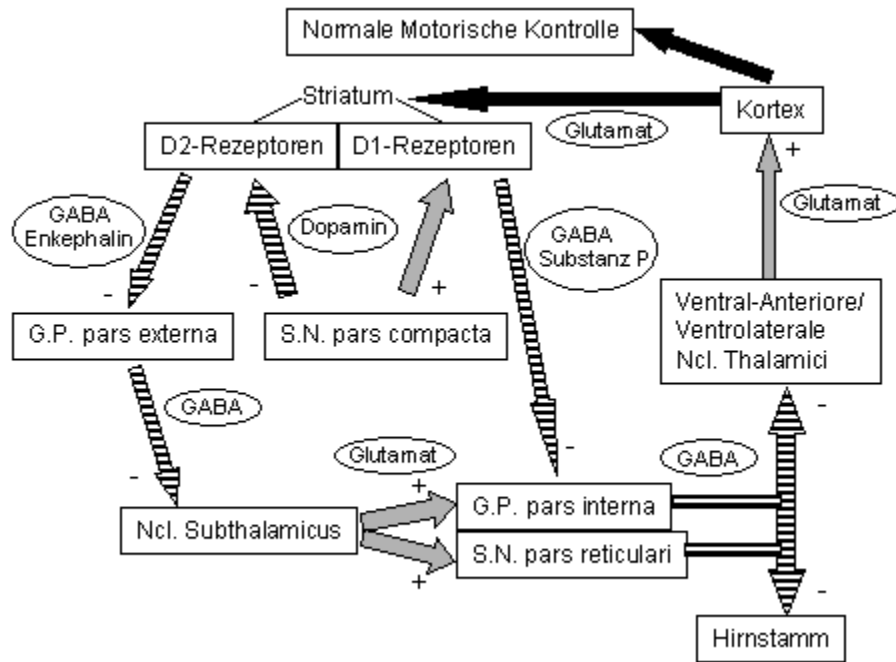


Abbildung 1: Normaler Erregungsablauf in den Basalganglien; nach Lang (Lang and Lozano 1998)

Die S.N. pars compacta stimuliert  $\gamma$ -Amino-Butter-Säure-abhängige (GABAerge) Neurone des Striatums. Die dort vorhandenen D<sub>1</sub>-Rezeptoren inhibieren direkt die S.N. pars reticulari (ebenfalls GABAerge Neurone). Die im Striatum vorhandenen D<sub>2</sub>-Rezeptoren inhibieren GABAerge Neurone im G.P. pars externa. Diese wiederum hemmt (ebenfalls GABAerge Neurone) im Ncl. Subthalamicus. Von dort kommen dann erregende Signale mittels Glutamat zum G.P. pars interna, der funktionell der S.N. pars reticulari vergleichbar ist. Von der S.N. pars reticularis bzw. der G.P. pars interna gehen dann erregende Einflüsse zu den ventral anterioren und ventrolateralen Nuclei Thalamici, welche auch als motorischer Thalamus bezeichnet werden. Der motorische Thalamus inhibiert anschließend den Kortex. So wirkt Dopamin also über einen direkten Weg (D<sub>1</sub>-Rezeptoren) inhibierend, und über einen indirekten Weg (D<sub>2</sub>-Rezeptoren) stimulierend auf die S.N. pars reticulari / G.P. pars interna. Und je kleiner dort der stimulierende Einfluß ist, desto kleiner ist auch der stimulierende Effekt auf den motorischen Thalamus und um so kleiner ist der hemmende Einfluß auf den Kortex und die Bewegungen.

### 2.2.1.2 Pathophysiologie

Aus noch ungeklärter Ursache kommt es beim idiopathischen Parkinson zu einem Untergang der melaninhaltigen, Dopamin-produzierenden Neurone in der S.N.

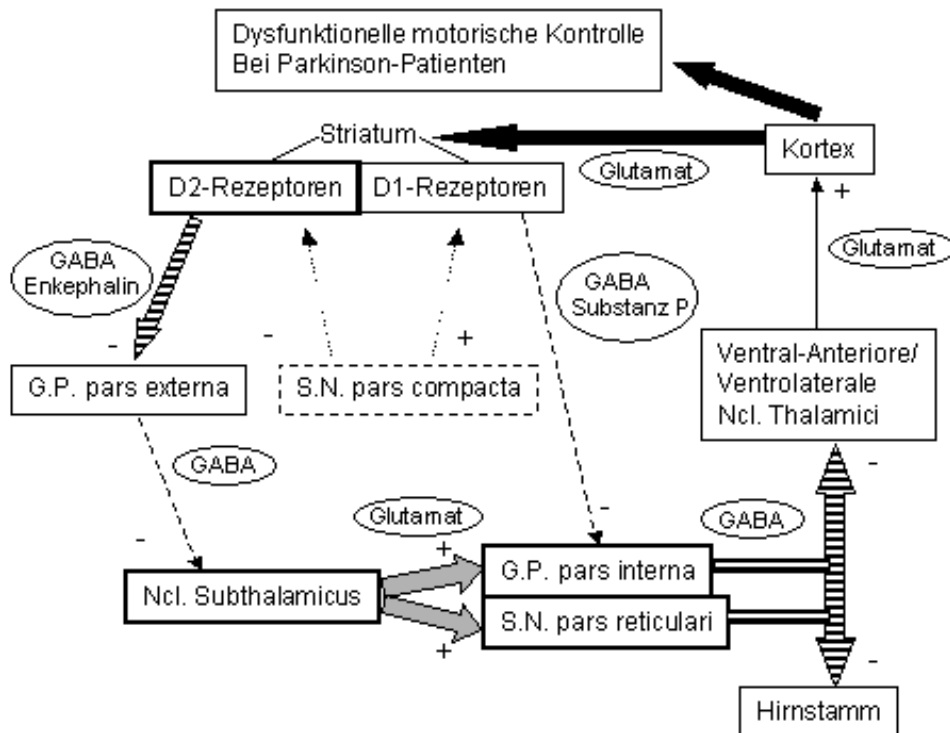


Abbildung 2: Erregungsablauf in den Basalganglien beim M. Parkinson; aus Lang (Lang and Lozano 1998). Die Blockpfeile und die starken Umrandungen zeigen das Überwiegen einzelner Bestandteile der Basalganglien in der motorischen Kontrolle nach Degeneration dopaminerge Neurone der S.N. an

Dadurch fällt der stimulierende Einfluß auf die D<sub>1</sub>-Rezeptoren im Striatum weg, und damit auch der inhibierende Effekt des Striatums auf die S.N. pars reticulari. Dies ist somit ein Ausfall des direkt hemmenden Weges. Auf der anderen Seite fällt der inhibierende Einfluß auf die D<sub>2</sub>-Rezeptoren des Striatums weg, und im Folgenden auch die hemmenden Effekte vom Striatum auf den G.P., bzw. von dort auf den Ncl. Subthalamicus. Dieser kann dann ungehemmt den G.P. stimulieren. Von dort gehen dann mehr erregende Impulse zum motorischen Thalamus und von da starke inhibitorische zum Kortex. Daraus folgt, daß durch den Dopaminmangel eine hohe Aktivität im Thalamus besteht und dadurch ein stark hemmender Effekt auf die Bewegungsbildung im Kortex, was v.a. für die Akinese verantwortlich zu sein scheint.

### 2.2.1.3 Theorien zum Untergang der Neurone der Substantia Nigra

Die Symptome des Morbus Parkinson treten erst ab einem Verlust von über 70% der Dopamin-Neurone der Substantia Nigra auf, wobei McGeer et al. (McGeer, Itagaki et al.

1988) konnten nachweisen konnten, dass der physiologische Zellschwund der S.N. in der Normalbevölkerung bei ungefähr 5% pro Dekade liegt. Eine Theorie besagt, daß der Zellverlust durch ein beschleunigtes Altern der Neurone bedingt sein kann, wodurch die Symptomschwelle des Parkinson noch zu Lebzeiten unterschritten wird. Dafür sprechen Untersuchungen von Brooks et al. [Brooks, 1998 #10], die mit SPECT nachweisen konnten, daß der deg. Prozeß c.a. 4-5 Jahre vor dem Symptombeginn einsetzt. Einer anderen Theorie zufolge könnte es durch ein akutes Ereignis wie z.B. Insult oder neurotoxischen Streß zu einem akuten Zellverlust mit nachfolgendem normalem oder exponentiellem Schwund kommen, was wiederum zum Unterschreiten der Symptomschwelle führt. Dafür sprechen Untersuchungen von McGeer (McGeer, Itagaki et al. 1988), wonach der Zellverlust bei ca. 45% der Zellen pro Dekade liegt. Im folgenden sollen die Theorien, die zur Erklärung dieses degenerativen Prozesses formuliert wurden, kurz ausgeführt werden.

#### **2.2.1.4 Genetische Faktoren**

Für die erste Theorie sprechen Beobachtungen bei den genetisch bedingten Formen des Parkinson, bei denen fast immer Mutationen in Genen auftreten, die für  $\alpha$ -Synuclein (Polymeropoulos, Lavedan et al. 1997) oder Ubiquitin Carboxyterminale Hydrolase L1 (UCH-L1) (Leroy, Boyer et al. 1998) codieren.  $\alpha$ -Synuclein ist ein Protein, was wahrscheinlich in der Neuriten-Plastizität involviert ist, welches bei den betroffenen Patienten post-translational falsch gespalten wird und deshalb ausfällt. Präzipitiertes  $\alpha$ -Synuclein-Protein ist ein Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen (s.u.) (Spillantini, Schmidt et al. 1997). Die UCH-L1 ist eine Protease, die Ubiquitin-Polymere zu Monomeren spaltet, und Bindungen zwischen Ubiquitinmolekülen und kleineren Molekülen wie Glutathion oder zellulären Aminen hydrolysiert. Durch die Mutation ist die Aktivität der UCH-L1 vermindert, so daß vermehrt unlösliches Ubiquitin anfällt. Ubiquitin ist ebenfalls ein Hauptbestandteil der für die Parkinson-Erkrankung typischen Lewy-Körperchen (Leroy, Boyer et al. 1998). Es wird von Trojanowski et al. (Trojanowski and Lee 1994) vermutet, daß die Lewy-Körperchen kritische Strukturen in den Neuronen stören, und so einen retrograden axonalen Zelltod verursachen.

#### **2.2.1.5 Oxidativer Streß**

In jeder Zelle entstehen während des normalen Metabolismus freie Radikale wie z.B. Superoxidanion ( $O_2^-$ ), Hydroxylionen ( $OH^-$ ) oder Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welche mit Proteinen oder Desoxyribonucleinsäuren reagieren können. Gewöhnlich wird  $O_2^-$  durch die Superoxid-Dismutase und  $H_2O_2$  durch die Katalase oder Glutathion-Peroxidase abgefangen.

Ebadi et al. (Ebadi, Srinivasan et al. 1996) zeigten, daß die Dopamin-Neurone bei Parkinson-Patienten aufgrund einer 30-60%igen Verminderung an reduziertem Glutathion, eine reduzierte Fähigkeit besitzen, oxidativen Streß abzufangen. In Verbindung mit einer erhöhten Eisenionenkonzentration in den Melanin granula führen diese beiden Tatsachen dazu, daß mehr OH<sup>-</sup>-Ionen über die Fenton-Reaktion ( $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}} \rightarrow \text{OH} + \text{OH}^-$ ) gebildet werden, die mangels Neutralisation destruktiv in den Neuronen wirken können (Jenner and Olanow 1996). Ähnliches wird für Dopamin selber angenommen, da Dopamin einmal über die Monoaminoxidase B zu 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd (DOPAC) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prozessiert, als auch über Autooxidation zu reaktiven Quinonen umgewandelt wird. Michel et al (Michel and Hefti 1990) konnten zeigen, das diese Produkte zumindest in der Zellkultur auf dopaminerge Neurone toxisch wirken.

### **2.2.1.6 Mitochondriale Dysfunktion**

Im Mitochondrium wird Energie in Form von ATP mittels der Atmungskette produziert. Die Atmungskette besteht aus 5 Komplexen in der inneren Mitochondrienmembran, wobei der Komplex I zwei Protonen in den Intermembranraum und ein Elektron vom NADH auf den Komplex II verschiebt. Der Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran wird später vom Komplex V zur Bildung von ATP genutzt. Schapira et al. (Schapira, Cooper et al. 1989) konnten zeigen, daß bei Parkinson-Patienten die Aktivität des Komplex I signifikant vermindert ist, was zu einem starken Abfall von ATP und somit Energie führt. Dadurch ist die Zelle in ihren Fähigkeiten z.B. oxidativen Streß oder erhöhtes intrazelluläres Calcium zu bewältigen, eingeschränkt (Haas, Nasirian et al. 1995).

### **2.2.1.7 Excitotoxine**

Für Ischämien, ebenso wie für einige neurodegenerativen Erkrankungen, wurde das Konzept der „Toxizität erregender neuraler Transmitter“ beschrieben (Beal 1995). Starke Stimulationen der S.N. durch Glutamat, wie sie z.B. vom Neokortex oder dem Ncl. Subthalamicus kommen, erhöhen das intrazelluläre Calcium über *N-Methyl-D-Aspartat*-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren). Erhöhtes intrazelluläres Calcium stimuliert die Stickstoffmonoxyd-Synthase (*Nitric Oxide Synthase* (NOS)), die wiederum freie Radikale produziert, welche dann wieder oxidativen Streß ausüben.

### **2.2.1.8 Neurotrophe Faktoren**

Neurotrophe Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Heilung und Gesunderhaltung von Neuronen, wie es für GDNF von Beck (Beck, Valverde et al. 1995) und Gash (Gash, Zhang et al. 1996) dargestellt wurde. Es ist bekannt, daß Wachstumsfaktormangel zum Zelltod in verschiedenen Systemen führt, daher besagt eine Theorie, daß ein Mangel an spezifischen Wachstumsfaktoren zumindest ein wesentlicher Kofaktor beim Untergang der dopaminergen Neurone beim Parkinson darstellt.

## **2.2.2 Klinik des Morbus Parkinson**

### **2.2.2.1 Inzidenz, Prävalenz und Ätiologie**

Der Morbus Parkinson als neurodegenerative Erkrankung wurde 1817 zum erstenmal durch James Parkinson beschrieben. Die Erkrankung hat eine Prävalenz von insgesamt ca. 0,3% in der Gesamtbevölkerung und ca. 3% bei den über 65-Jährigen (Moghal, Rajput et al. 1994). Die Ätiologie für die Erkrankung ist unbekannt. Es werden zum einen Umweltfaktoren diskutiert denn Amerikaner haben eine höhere Inzidenz als Asiaten oder Afrikaner, zum anderen findet man in einem kleinen Teil der Fälle eine genetische Komponente. Es sind sowohl autosomal dominante als auch rezessive Erbgänge bekannt (Übersicht bei Dunnett et al. (Dunnett and Bjorklund 1999)). Kürzlich konnten zumindest drei der dabei betroffenen Gene kloniert werden. Hierbei handelt es sich um das  $\alpha$ -Synuclein-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 4 (Polymeropoulos, Lavedan et al. 1997), das UCH-L1-Gen (Leroy, Boyer et al. 1998) und das Parkin-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 6 (Kitada, Asakawa et al. 1998).

### **2.2.2.2 Symptome und Verlauf**

Die Erkrankung ist durch die Kardinalsymptome charakterisiert: Tremor, Rigor und Akinese. Zusätzlich zu diesen drei Hauptsymptomen kann es noch weitere neurologische (Gang- und Handlungsdefizite, u.ä.), vegetative (Seborrhoe u.ä.) und psychische (Depression, Demenz, Psychosen u.ä.) Störungen geben. Die Frühsymptome sind recht unspezifisch wie z.B.: Muskel- und Gelenkschmerzen, Konzentrationsstörungen, Störungen der Feinmotorik beim Schreiben, vegetative Störungen etc.. Später kommen weitere neurologische Defizite wie Gang- und Handlungsstörungen sowie die Kardinalsymptome hinzu. Im Verlauf der Erkrankung nimmt die Schwere der Symptome und die Beeinträchtigung des Patienten zu, bis hin zur völligen psychischen und physischen Hilflosigkeit.

Aufgrund der uncharakteristischen Frühsymptome ist es schwierig, die idiopathische Parkinson-Erkrankung von symptomatischen Parkinson-Syndromen zu unterscheiden, wie sie z.B. bei Vergiftungen mit Kohlenmonoxyd (CO), Mangan (Mn), Zyanid (CN), Infektionen, anderen neurodegenerativen Erkrankungen (Übersicht bei Lang et al. (Lang and Lozano 1998)) und als Nebenwirkung bei Neuroleptikatherapie (Casey 1997) auftreten. Diese „sekundären“ Parkinson-Syndrome unterscheiden sich klinisch so gut wie überhaupt nicht vom idiopathischen Parkinson. Eine Übersicht über mögliche klinische Unterscheidungsmerkmale ist bei Lang et al. (Lang and Lozano 1998) gegeben. Ein spätes Problem der Erkrankung und der Therapien sind die psychischen Veränderungen, von denen 40-60% der Patienten betroffen sind, und die neben den motorischen Unfähigkeiten die stärkste Behinderung darstellen. Diese psychischen Veränderungen umfassen v.a. Schlafstörungen, Demenz, Delirien und Halluzinationen, Dysphorien und Ängstlichkeit (Übersicht bei Juncos (Juncos 1999)). Ein Teil dieser psychotischen Störungen wird u.a. durch die Therapie mitverursacht, und ist deswegen auch besonders schwierig zu behandeln (s.u.).

### **2.2.2.3 Diagnostik**

Angesichts der oben aufgeführten sekundären Parkinson-Syndrome ist die Diagnose eines idiopathischen M. Parkinson mit einem Fehler von ca. 25% behaftet, wie von Hughes et al. (Hughes, Daniel et al. 1993) gezeigt wurde. Zur Diagnose wurden bisher auch nur die Klinik und ein probatorischer L-Dopa-Test herangezogen, da die Symptome des idiopathischen Parkinson im allgemeinen gut auf L-Dopa ansprechen, während die Parkinson-Syndrome meist kaum oder gar nicht reagieren. Als eine neue Methode in der Diagnostik wurden funktionelle bildgebende Verfahren, wie die *Positronen-Emissions-Tomographie* (PET) oder *Single-Photon-Emissions-Computer-Tomographie* (SPECT) etabliert, welche schon im vor-klinischen Stadium neurodegenerative Veränderungen nachweisen können (Brooks 1998). Ein Problem bei diesen Untersuchungen ist der enorme Kostenaufwand, weswegen sie bisher nicht in der klinischen Routine als Methode eingesetzt werden. Eine Sicherung der Diagnose bietet z. Zt. also nur die neuropathologische Untersuchung, in der sich dann die für den idiopathischen Parkinson typische Veränderungen zeigen: Der Verlust der dopaminergen Neurone der Substantia Nigra als wichtigstes morphologisches Korrelat und die sogenannten Lewy-Körperchen, ebenfalls in der Substantia Nigra. Diese Lewy-Körperchen sind sphärische, hyaline Einschlüsse, welche aus einem dichten eosinophilen Kern und einem blassem Rand bestehen, die im Zytoplasma der betroffenen Neurone auftreten. In der immunhistologischen Färbung stellt sich dann  $\alpha$ -Synuclein als Hauptbestandteil des



eosinophilen Kerns (siehe Spillantini et al. (Spillantini, Schmidt et al. 1997)) und Ubiquitin als wichtigster Bestandteil des Randes (siehe Dunnet et al. (Dunnett and Bjorklund 1999)) dar.

## **2.2.3 Therapien des Parkinson**

### **2.2.3.1 Medikamentöse Therapie**

#### **2.2.3.1.1 L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA)**

Durch die Gabe von L-DOPA als ein Dopaminvorläufer, der durch die Dopa-Decarboxylase zu Dopamin prozessiert wird, versucht man den Dopaminmangel der Substantia Nigra zu ersetzen. Nachdem man Ende der 50er Jahre den Nutzen von intravenöser Applikation bei Parkinson Patienten entdeckt hatte, war es zumindest möglich, den Rigor und die Akinese zu behandeln. Nach Kombination mit Carbidopa als Hemmer der peripheren DOPA-Decarboxylase, war es möglich, die Therapie auf hohe orale Dosen von L-DOPA umzustellen. Nach wie vor ist L-DOPA kombiniert mit Carbidopa die Standardtherapie des Morbus Parkinson. L-DOPA wirkt gut bei Akinese und Rigor in frühen und mittleren Stadien der Erkrankung, jedoch tritt in späteren Stadien ein Wirkungsverlust auf, der eine Dosisanpassung notwendig macht. Das führt wiederum zu einer Steigerung der Nebenwirkung, wobei diskutiert wird, ob es sich dabei um Nebenwirkungen des L-DOPA, oder um neue Symptome der Grunderkrankung handelt (Fahn 1999). Sehr störend für den Patienten sind die Dyskinesien und sog. On / Off-Phänomene, bei denen Phasen mit guter (erhöhter) Mobilität abrupt mit solchen mit starker Immobilität und / oder Verstärkung der anderen Parkinsonsymptome abwechseln. Teilweise kann man einen zeitlichen Zusammenhang zwischen Medikation und Symptomen herstellen („Peak-Dose“-Dyskinesien, „Off“-Perioden am Ende der Dosiswirkung (Riley and Lang 1993)). Dem versucht man mit verschiedenen Therapieansätzen entgegen zu wirken, so z.B.: mit stündlichen Applikationen von flüssigen L-DOPA-Präparationen in Kombination mit Cisaprid (steigert die Magenmotilität und beschleunigt so die Resorption im Duodenum), oder durch duodenale Infusion von Apomorphin oder Lisurid (s.u.). Ebenso versucht man eine Kombination von L-DOPA mit Dopamin-Agonisten (s.u.) und Substanzen die den Metabolismus von L-DOPA / Dopamin reduzieren (MAO-B-Hemmer (s.u.) oder COMT-Hemmer) und so die Wirkung verlängern.

#### **2.2.3.1.2 Dopaminagonisten**

Zu den Dopaminagonisten gehören: Bromocriptin, Pergolid, Cabergolin und Lisurid als Secale-Alkaloid-Derivate, sowie Ropinirol, Pramipexol, und Apomorphin als Nicht-Ergot-Alkaloide. Die Dopaminagonisten sind allesamt in der Lage, D<sub>2</sub>-Rezeptoren im ZNS (und

auch der Peripherie) direkt zu stimulieren und so die Wirkung des Dopamin zumindest teilweise zu imitieren. Die meisten Erfahrungen liegen z.Zt. für Bromocriptin vor. Ungefähr ein Drittel der mit Bromocriptin-behandelten Patienten sprechen sehr gut darauf an, haben keine motorischen Nebenwirkungen und benötigen kein zusätzliches L-DOPA für 2-5 Jahre (Hely, Morris et al. 1994). Ein Problem der Dopamin-Agonisten ist aber, (I) daß es einen recht hohen Anteil an Nicht-Respondern unter den Patienten gibt, (II) daß die Agonisten länger brauchen, um effektive Dosen zu erreichen, und (III) daß im Allgemeinen eine Zugabe von L-DOPA notwendig ist, um die zunehmende Behinderung der Patienten zu behandeln. Ein weiteres Problem sind die Nebenwirkungen, v.a. der Mutterkorn-Derivate, wie z.B. Übelkeit, Erbrechen, orthostatische Hypotonie, Dyskinesien, Konfusionen und Raynaud-Phänomen, welche oft zum Therapieabbruch führen.

#### **2.2.3.1.3 Anticholinergika**

Anticholinergika blockieren striatale Muskarinrezeptoren und hemmen so den beim Parkinson überwiegenden cholinergen Einfluß in den Basalganglien. Zu den anticholinergen Substanzen der Parkinson-Therapie zählen: Benztropin, Biperiden, Trihexyphenidyl, Phenglutarimid und Metixen. Diese Substanzen wirken mäßig gegen den Tremor und den Rigor, weshalb im allgemeinen ihre Kombination mit L-DOPA notwendig ist. Die unangenehmen peripheren Nebenwirkungen (Mundtrockenheit, Miktionsstörungen, Akkomodationslähmung, Tachykardien) und ZNS-Nebenwirkungen (Konfusionen, Erinnerungsstörungen, Halluzinationen) verhindern zum einen die erforderliche hohe Dosierung und führen zum anderen oft zum Therapieabbruch. Diese Nebenwirkungen limitieren daher auch den Einsatz dieser Medikamente bei älteren Patienten und bei Patienten mit psychischen Störungen.

#### **2.2.3.1.4 Amantadin, Monoaminoxidase-B-Hemmer (Mao-B) und Catechol-O-Methyltransferase-Inhibitoren (COMT)**

Das ursprünglich als Virustatikum entwickelte Amantadin unterdrückt alle drei Kardinalsymptome des Parkinson, vermutlich über eine Blockade von NMDA-Rezeptoren. Dadurch vermindert es erregende Einflüsse aus dem Ncl. Subthalamicus und Kortex. Da häufig ein schneller Wirkungsverlust auftritt und anticholinerge Nebenwirkungen wird es im Allgemeinen nur in Kombination mit L-Dopa gegeben. Der MAO-B-Hemmer Selegilin/Deprenyl ist bisher der einzige, der therapeutisch in der Parkinsontherapie eingesetzt wird. Es hemmt spezifisch die MAO-B, die Dopamin desaminiert und so dessen Wirkung beendet. Da die Hemmung irreversibel ist, kann nur die Neusynthese der Enzymmoleküle die Wirkung aufheben. The Parkinson Study Group konnte zeigen, daß die Patienten von einem

frühen Einsatz von Selegilin profitieren, da der Einsatz von L-Dopa hinausgezögert und die Dosis verringert werden konnte.(Group 1996; Group 1996) (Shoulson 1993). Leider limitieren auch hier die kardialen (Arrhythmien) und psychischen (Insomnie, Konfusionen) Nebenwirkungen den Einsatz.

Die *Catechol-O-Methyltransferase* (COMT) methyliert Neurotransmitter unspezifisch und inhibiert sie so. Neuere COMT-Hemmer sind Tolcapon und Entacapon. Ihre Verwendung verlängert die Wirkungsdauer der L-DOPA Einzeldosen und verringert den Bedarf um fast 25% (Kurth, Adler et al. 1997), weswegen sie später in der Therapie eingesetzt werden. An Nebenwirkungen verstärken sie zum einen die des L-DOPA und zum anderen machen sie selber Diarrhöe und können die Leberfunktion beeinträchtigen.

### **2.2.3.1.5 Neuroleptika –Therapie**

Wie oben bereits erwähnt ist ein besonderes Problem in der Betreuung Parkinson-Krankter die Behandlung der psychischen und psychotischen Symptome der Grunderkrankung als auch der Therapeutikanebenwirkungen. So wird denn auch als erster Therapieversuch soweit als möglich eine Reduktion der Parkinson-Therapeutika-Dosis oder eine Umstellung angestrebt. (Übersicht bei Juncos (Juncos 1999)). Wenn die Psychose sehr ausgeprägt ist oder eine Therapie-Umstellung unmöglich ist, muß man auf Neuroleptika zurückgreifen. Die konventionellen hochpotenten Neuroleptika wie Haloperidol sind bei Parkinson-Patienten jedoch kontraindiziert, da sie die Symptomatik noch verstärken und den Verlauf beschleunigen können. Deshalb werden i.a. atypische Neuroleptika wie Clozapin, Olanzapin oder Quetiapin verwendet. Aufgrund ihrer hohen Affinität für Serotonin<sub>2</sub>-Rezeptoren anstelle von Dopamin-Rezeptoren haben sie kaum extrapyramidale Nebenwirkungen. Wie bei Juncos (Juncos 1999) beschrieben, schlägt bei über 80% die Therapie an. In einem Teil der Fälle mußte die Therapie aufgrund der Nebenwirkungen wie Sedation, Delirium, Orthostase, oder Schwindel abgebrochen werden. Trotz dieser positiven Effekte ist man in der Verwendung von Clozapin doch sehr zurückhaltend, und zwar aufgrund der seltenen, aber ernsten Nebenwirkung der Agranulozytose. Aus diesem Grund hat man neuere atypische Neuroleptika wie Olanzapin und Quetiapin entwickelt, die dieses Risiko nicht mehr haben.

### **2.2.3.2 Nicht -Medikamentöse Therapien**

#### **2.2.3.2.1 Neurochirurgische Therapien**

Die neurochirurgische Intervention ist besonders schweren, mit der medikamentösen Therapie nicht zu beherrschenden Fällen vorbehalten, denn die Gefahr, perioperativer Komplikationen

mit der Folge kognitiver Beeinträchtigungen, Gleichgewichts- oder Gangstörungen ist doch gegeben. Zur Zeit gibt es zwei klassische und zwei neuere Therapieansätze. Die klassischen Ansätze sind die Thalamotomie und die Pallidotomie und die zwei neueren Ansätze sind die „deep-brain“-Stimulation und Transplantation. Bei der Thalamotomie werden stereotaktische Läsionen im Ncl. Subthalamicus oder im Ncl. ventralis intermedius gesetzt. Der klinische angestrebte Effekt ist eine Reduktion des Tremors auf der kontralateralen Seite (im Allgemeinen um über 80%), so daß sich diese Therapie für schwerwiegenden, stark beeinträchtigenden Kopf- oder Rumpftremor anbietet, jedoch verbessert sich dadurch nicht die Fähigkeit der Patienten, Alltagsaufgaben zu erledigen. Bei der Pallidotomie werden die Läsionen im inneren Segment des Globus Pallidus gesetzt. Dadurch vermindern sich in über 80% der Fälle die Medikamenten-induzierten Dyskinesien, und auch der Tremor, Rigor und die Akinese werden signifikant vermindert (Taha, Janszen et al. 1999). Daher bietet sich diese Therapie bei schwerer, medikamentös nicht mehr zu beherrschender Symptomatik an. Auch wenn durch moderne bildgebende Verfahren und computergesteuerte Stereotaxiegeräte die Mortalität und Komplikationsrate gesunken ist, haben beide Therapieformen einen Nachteil: Das Problem ist, daß die gesetzten Läsionen irreversibel sind. Haben die Patienten keinen Benefit nach der Operation, müssen sie unter Umständen dennoch Lebenslang unter den Nebenwirkungen leiden. Deshalb ist man seit einiger Zeit dazu übergegangen, die anatomischen Läsionen durch funktionelle zu ersetzen. Dies wird mit der „deep-brain“-Stimulation erreicht, bei der durch hochfrequente Stimulation ein funktioneller Block geschaffen und somit das gleiche Resultat erzielt wird, wie mit der klassischen Methode (siehe Taha et al. (Taha, Janszen et al. 1999)). Diese Methode hat den Vorteil, daß sie reversibel ist, und daß man die Elektroden neu plazieren kann, wenn die berechneten Zielkoordinaten nicht den erhofften Effekt erbrachten.

Bei den Transplantationen werden fetale mesencephale Neurone in das Striatum implantiert, um die Funktion der Neurone der S.N. zu ersetzen. Die Neurone werden deshalb ins Striatum und nicht in die S.N. implantiert, damit eine Verbindung zwischen Dopamin-produzierenden Zellen und -empfangenden Neuronen erleichtert wird. Ein Teil der transplantierten Neurone überleben und reinnervieren einen Teil (bis zu 78%) des Striatums. Die Transplantate sind funktionsfähig, produzieren und sezernieren Dopamin, wie von Kordower et al. (Kordower, Freeman et al. 1995) und Wenning et al. (Wenning, Odin et al. 1997) gezeigt werden konnte. Für die Patienten verbessert sich die Symptomatik und stagniert für mindestens 4 Jahre. Bei einigen Patienten verschlechterte sich der Zustand nach 4-7 Jahren, häufig jedoch aufgrund einer Progression auf der nicht transplantierten Seite. Autopsien zeigten, dass das Transplantat

histologisch unbeeinträchtigt war. Bisher ist bei noch keinem Patienten eine Transplantat-Abstoßung beobachtet worden, auch nach Absetzen der Immunsuppressiva nicht, obwohl bei einigen Autopsiedaten T- und B-Lymphozyten im und am Transplantat beschrieben wurden (Kordower, Freeman et al. 1995; Hauser, Freeman et al. 1999). Bisher ist diese Therapie jedoch noch sehr experimentell, denn viele Faktoren beeinflussen die Qualität der Transplantate: Alter und Anzahl der Donoren, Gewebeaufbereitung und -lagerung, Seite und Anzahl der Implantate und Zusatzbehandlungen, v.a. mit neurotrophen Faktoren (siehe auch Borlongan et al. (Borlongan, Sanberg et al. 1999)). Zudem ist diese Therapieform ethisch sehr umstritten, denn die Transplantat-Donoren sind menschliche fetale Aborte und es werden pro Patient pro Seite 3-4 dieser Aborte benötigt, da nur 5-20% der transplantierten Neurone überleben. Die Überlebensrate der Neurone konnte zwar durch zusätzliche Gabe von neurotrophen Faktoren („Neurotrophen“) (Granholm, Mott et al. 1997) oder durch Blockade proapoptotischer Faktoren signifikant gesteigert werden (Schierle et al. (Schierle, Hansson et al. 1999)), aber es werden trotzdem noch (zu) viele Feten benötigt. Aus diesen Gründen versucht man alternative Quellen zu finden, wie z.B. embryonale mesencephale Schweinezellen, humane neuronale Stammzellen, oder genetisch veränderte humane Zellen. Diese Zellen sind aber noch im Stadium der experimentellen Forschung, so daß man darauf noch einige Zeit warten müssen.

#### **2.2.3.2 Neurotrophe und –restaurative Therapieansätze**

Nachdem der protektive und restaurative Effekt von GDNF im Tiermodell (Gash, Zhang et al. 1996) und in vitro an menschlichen Neuronen (Clarkson, Zawada et al. 1997) bekannt war, versucht man jetzt, die dopaminergen Neurone vor weiterem Zelltod zu schützen, indem man Neurotrophine wie GDNF intraventrikulär appliziert (Gash, Zhang et al. 1996). Weitere Applikationsmethoden um GDNF an den Ort des Geschehens zu bringen, werden gerade untersucht, wie z.B.: genetisch veränderte körpereigene Zellen, welche dann GDNF produzieren oder körperfremde Zellen, die durch eine semipermeable Kapsel vor Immunreaktionen geschützt werden sollen. Ebenso wird die Injektion von viralen Vektoren oder einfach der kodierenden DNA, in geeigneter Form, untersucht, um ortständige Zellen zu transformieren. Doch auch diese Ansätze sind im Augenblick noch Gegenstand der Forschung. Ebenfalls befinden sich neue Medikamente in der Forschung, wie z.B.: Glutamatantagonisten, um die exzitatorischen Impulse zu vermindern, oder neurale Nikotin-Rezeptor-Agonisten, die das striatale Dopamin erhöhen sollen, wie auch noch weitere komplexe Wirkungen haben, und viele andere Medikamente mehr (Übersicht bei Lang et al.

(Lang and Lozano 1998)). Insofern bestehen Hoffnungen, daß sich in näherer oder fernerer Zukunft neue Therapiemöglichkeiten in der Behandlung Parkinson-Kranker ergeben.

### **2.3 Tiermodelle zum Morbus Parkinson**

Da der Morbus Parkinson natürlicherweise nicht in der Tierwelt vorkommt, ist man zur Erforschung neuer Therapien auf experimentelle Tiermodelle angewiesen. Seit langem schon sind die Parkinson-Syndrome nach Neuroleptika-Therapie bekannt, und boten sich daher zur Etablierung eines Tiermodells an. Durchgesetzt hat sich dabei das Reserpin-Modell. Reserpin entspeichert die Neurotransmitter-Granula in adrenergen Nervenendigungen im ZNS. Durch die Entspeicherung der Dopamin-Granula kommt es dann zu einem Parkinson-ähnlichen Bild mit Rigor, Tremor und Akinese. Dieses Modell wurde v.a. bei Ratten und Mäusen angewendet, ist jedoch durch die fehlende Selektivität der Entspeicherung nicht Parkinson-spezifisch. Die Entdeckung verschiedener Neurotoxine wie z.B. *6-Hydroxydopamin* (6-OHDA) oder *1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin* (MPTP) sorgten für eine spezifischere Basalganglien-Schädigungen, und damit für bessere Modelle. Von Ungerstedt wurde 1968 (Ungerstedt 1968) erstmals die selektive Degeneration monoaminerger Neurone im ZNS nach Applikation von 6-OHDA beschrieben. 6-OHDA ist Dopamin mit einem weiteren Hydroxylion an Position 6 des Phenyl-Ringes. Dadurch kann es noch besser als Dopamin oxydieren und freie Radikale (über die oben genannten Mechanismen) freisetzen, und schädigt vermutlich über oxidativen Streß die Neurone. Während 6-OHDA in der Zellkultur relativ unspezifisch sowohl dopaminerge als auch nicht-dopaminerge Neurone schädigt (Michel und Hefti (Michel and Hefti 1990)), konnten Perese et al (Perese, Ulman et al. 1989) als auch Sauer und Oertel (Sauer and Oertel 1994) zeigen, daß sich sowohl bei systemischer als auch intrastriärer Applikation bei Ratten ein Parkinson-Syndrom entwickelt. Sauer und Oertel zeigten außerdem noch den zeitlichen Verlauf und die Selektivität der dopaminergen Degeneration nach 6-OHDA- Injektion. Da man bei den Tieren kaum Rigor, Tremor und Akinese wie beim Menschen diagnostizieren kann, werden als Parameter Rotationstests, Laufrad-Tests, sensomotorische Tests und Labyrinth-Tests verwendet, um die Spontanbewegungen zu testen. 1983 wurde von Langston et al. (Langston, Ballard et al. 1983) ein Parkinson-Syndrom nach Einnahme von „synthetischem Heroin“ bei vier Drogenabhängigen Personen beschrieben. Es stellte sich heraus, daß sie ein Meperidin-Derivat (*1-Methyl-4-Phenyl-4-Propionoxy-Piperidin* (MPPP)) aus einem illegalen Labor als Heroin-Ersatz konsumiert hatten. Diese Proben waren jedoch mit einem Nebenprodukt der MPPP-Synthese, *1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin* (MPTP) verunreinigt. Dieses

MPTP erzeugt bei allen 4 Konsumenten ein schweres Parkinson-Syndrom, das auch nach Absetzen der Drogen persistierte und gut auf L-Dopa ansprach. Auch histologisch konnte postmortem eine Degeneration der dopaminergen Neurone der S.N. sowie vereinzelte Lewy-Körperchen nachgewiesen werden. Die MPTP-Toxizität wird durch die MAO-B vermittelt. Sie oxidiert MPTP zu 1-Methyl-4-Phenyl-2,3-Dihydropyridinium (MPDP) und dann zu 1-Methyl-4-Phenylpyridiniumion (MPP+), das dann über einen Dopamin-Transporter aufgenommen wird, und die Atmungskette blockiert. Mit diesen Erkenntnissen war also mit MPTP ein Neurotoxin gefunden, was sehr spezifisch wirkt, und daher inzwischen in verschiedenen Tiermodellen eingesetzt wurde. So wurde es in Goldfischen (Pollard et al. (Pollard, Dhariwal et al. 1992))] und Ratten verwendet, wobei Ratten jedoch eine partielle Resistenz gegen MPTP besitzen (Zuddas et al. (Zuddas, Fascetti et al. 1994)), und sich deswegen nicht so gut eignen. Die größte Ähnlichkeit mit dem idiopathischen Parkinson des Menschen weisen jedoch Affen auf (Langston et al. (Langston, Langston et al. 1984) und Smith et al. (Smith, Zhang et al. 1993)), wie durch Verhaltenstests und PET gezeigt wurde. Gleichmaßen wurde die Toxizität der verschiedenen Substanzen auch in neuronalen Zellkultur-Systemen u.a. durch Michel und Hefti (Michel, Dandapani et al. 1990) (Michel and Hefti 1990), Sheehan et al. (Sheehan, Palmer et al. 1997) und Walkinshaw (Walkinshaw and Waters 1994) nachgewiesen. Hiermit stehen stabile, reproduzierbare Tiermodelle und Zellkultursysteme zur Erforschung der Pathogenese und Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze des idiopathischen Parkinsons zur Verfügung.

## 2.4 Durch Ret-Mutationen verursachte Erkrankungen

Als Rezeptor für den neurotrophen Faktor GDNF wurde 1996 das Produkt des *Ret*-Proto-Onkogens auf Chromosom 10(s.u.) entdeckt, wobei das RET-Protein schon lange vorher im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen bekannt war. Schon 1988 beschrieb Takahashi (Takahashi, Buma et al. 1988) das Produkt des *Ret*-Onkogens als Rezeptor-Tyrosin-Kinase mit einer extrazellulären Domäne (ECD) mit einer Cadherin-Homologie Domäne und Cystein-reichen Regionen, einer transmembranen Domäne (TMD) und einer intrazellulären Domäne (ICD), mit zwei Tyrosin-Kinase (TK)-Domänen, die bei Ligandbindung autophosphoryliert werden (s.u.). RET liegt durch alternatives Spleißen in drei verschiedenen Versionen vor, als lange Variante mit 1114 Aminosäuren (AS), mittellang mit 1106 AS und als kurze Form mit 1072 AS, wobei diese Varianten keinerlei Einfluß auf die physiologischen Funktionen haben (Tahira et al. (Tahira, Ishizaka et al. 1990)), im Gegensatz zu den beiden unterschiedlich großen Glycosylierungsvarianten mit 170kDa als reifes, membranständiges

Protein und als 150kDa große Variante, die ausschließlich im Endoplasmatischen Retikulum vorkommt (Takahashi (Takahashi, Asai et al. 1993)). Physiologischerweise wird RET in der embryonalen Entwicklung in verschiedenen Geweben, die v.a. aus dem Neuralrohr abstammen, wie Schilddrüsen-C-Zellen, submukösen enteralen Nervenplexus oder Nebenmark, exprimiert. Daher sind es v.a. diese Gewebe bzw. Organe, die bei *Ret*-Mutationen betroffen sind und die Krankheitsbilder charakterisieren:

#### **2.4.1 Multiplen Endokrinen Neoplasie 2A und 2B**

Die Multiplen Endokrinen Neoplasien (MEN) Typ 2A und 2B sind durch Tumoren in verschiedenen Organsystemen gekennzeichnet. Typ 2A umfasst medulläre Schilddrüsenkarzinome, Phäochromozytome (c.a.50%) und Epithelkörperchen-Hyperplasie mit erhöhten Kalzitonin- und Parathormon-Werten und hohen Adrenalinspiegeln, während Typ 2B zusätzlich zu dem C-Zellkarzinom und Phäochromozytom multiple Mukosa-Neurome und z.T. auch Symptome einer Neurofibromatose hat (wenn zu den C-Zell-Karzinomen keine weiteren Tumoren hinzukommen besteht das Syndrom der familiären medullären Schilddrüsenkarzinome (FMTC)). Diese Veränderungen werden alle durch aktivierende Mutationen im *Ret*-Gen verursacht, die je nach Lage der Mutation stärkere oder weniger starke onkogene Potenz besitzen (Rossel, Pasini et al. 1997). Für MEN 2A liegt diese Mutation fast immer an dem Cystein-Rest in Position 634 in der ECD (Santoro, Carlomagno et al. 1995) (Während beim FMTC die Cysteine 609, 611, 618 oder 620 betroffen sind (Übersicht bei Ponder (Ponder 1999))), wodurch eine Ligand-unabhängige Rezeptor-Dimerisation und dadurch eine konstitutive Aktivierung stattfindet. Bei der MEN 2B liegt die Mutation fast ausschließlich beim Methionin in Position 918 in der TK-Region (Carlson (Carlson, Dou et al. 1994)), wodurch die Tyrosin-Kinase unabhängig von Ligandbindung und Dimerisation aktiviert wird, der Effekt jedoch durch Ligandbindung noch gesteigert werden kann (Bongarzone (Bongarzone, Vigano et al. 1998)). Auch wenn beiden Mutationen die Aktivierung von RET gemeinsam ist, konnte von Iwashita (Iwashita, Asai et al. 1996) und anderen gezeigt werden, daß die MEN 2B-Mutation die potentere ist, v.a. in Verbindung mit Ligandbindung (Übersicht bei Ponder (Ponder 1999)).

#### **2.4.2 M. Hirschsprung**

Der M. Hirschsprung (Synonym: kongenitales Megakolon) ist durch eine segmentale Aganglionose des Dickdarms gekennzeichnet mit prästenotischer Dilatation und Obstipation. Verursacht wird diese Erkrankung durch Funktionsverlust-Mutationen (*loss-of-function*-



Mutationen (LOF)) des RET-Rezeptors. Einiger dieser Mutationen liegen in der TK-Domäne (Arg972 was von Carlomagno et al. gezeigt werden konnte (Carlomagno, De Vita et al. 1996)), während andere häufiger die ECD betreffen, so z.B. bei einigen Cystein-Resten (Iwashita, Murakami et al. 1996) und den Serin- bzw. Phenylalanin-Resten in Position 32 bzw. 393 (Carlomagno, De Vita et al. 1996). Diese Cystein-, Serin- und Phenylalanin-Reste scheinen v.a. für die korrekte Translokation des Rezeptors an die Zellmembran verantwortlich zu sein, denn bei Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß Mutationen dort zu einer stark verminderten Rezeptordichte führten (Iwashita (Iwashita, Murakami et al. 1996), Carlomagno (Carlomagno, De Vita et al. 1996)). Diese verminderte Rezeptordichte führt dann dazu, daß die enteralen autonomen Nervenplexi nicht ausreifen. Einige Mutationen im Leucin an Position 64 bzw 393 beeinflussen die Größe des RET-Rezeptor-Proteins (Ito et al. (Ito, Iwashita et al. 1997)) welche auch mitverantwortlich ist für die Glycosylierung und die Translokation an die Zellmembran.

## 2.5 Rezeptor – Tyrosin – Kinasen

Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) sind transmembrane Glykoproteine, die Schlüsselfunktionen in Signalwegen der Zellproliferation, -differenzierung, -migration und -metabolismus haben (Übersicht bei Ullrich und Schlessinger (Ullrich and Schlessinger 1990)), sowie bei pathologischen Prozessen wie Tumorgenese (Porter and Vaillancourt 1998), Diab. Retinopathie und Atherosklerose (Pawson 1995). Diese Rezeptoren katalysieren den Transfer des  $\gamma$ -Phosphats von ATP auf die Hydroxyl-Seitenkette von Tyrosin-Resten in Proteinsubstraten. Liganden sind i.a. Wachstumsfaktoren wie Epidermaler Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor* (EGF)), Thrombozytenabstammender Wachstumsfaktor (*platelet derived growth factor* (PDGF)) oder Fibroblasten Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor* (FGF)) und andere. Die membranständigen Rezeptoren haben alle den gleichen Grundaufbau: Eine glykosylierte extrazelluläre Domäne (ECD), dann eine hydrophobe transmembrane Domäne (TMD) und eine intrazelluläre Domäne (ICD). Die intrazelluläre Domäne teilt sich in die juxtamembrane Region, die katalytische Tyrosin-Kinase (TK) und einen C-terminalen Abschnitt auf. Während die transmembrane Helix und die ICD bei allen RTKs ziemlich uniform sind, unterscheiden sich die extrazellulären Domänen innerhalb der Familie doch erheblich, so gibt es u.a. lineare Moleküle, Immunglobulin-ähnliche (Ig-like) oder Cysteinreiche Domänen u.s.w. (Übersicht bei Hubbard (Hubbard 1999)). Daher eignen sich diese Differenzen dazu, die RTKs in Subklassen einzuteilen, die i.a. nach ihrem prominentesten Vertreter benannt werden:

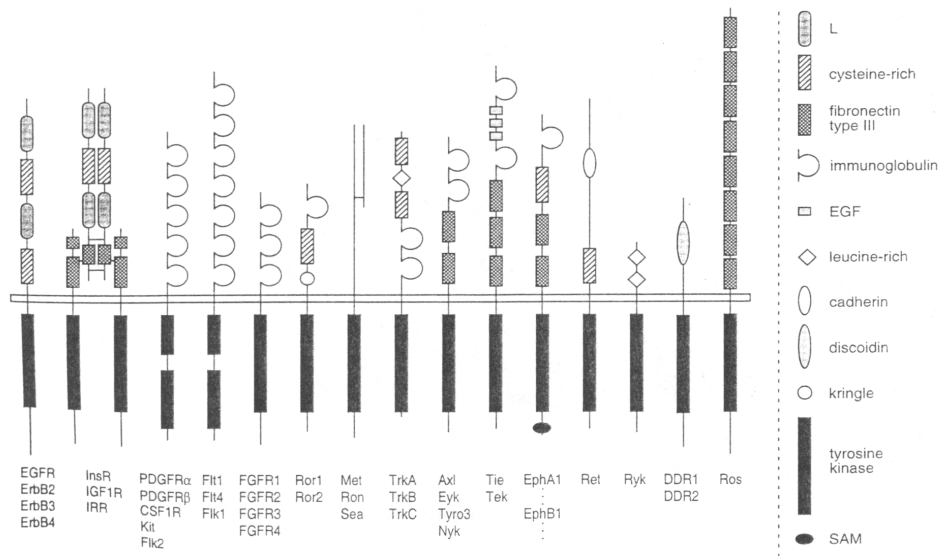


Abbildung 3: Aufbau verschiedener RTKs und Einteilung in Subklassen aufgrund der unterschiedlichen ECD nach Hubbard. Genannt sind jeweils die Hauptvertreter der Subklassen. Die Legende ist rechts gegeben.

Die meisten RTK liegen in Abwesenheit des meist löslichen Liganden als Monomere vor, mit Ausnahme des Met-Rezeptors, der an einer transmembranen  $\beta$ -Kette eine kurze, über Disulfidbrücken gebundene, extrazelluläre  $\alpha$ -Kette besitzt, und der Insulinrezeptor-Subfamilie, welche Heterotetramere aus je zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten bildet. Charakteristisch für die PDGF-Familie sind relativ große Insertionen in der TK-Region, wohingegen die Mitglieder der Eph-Subfamilie ein Steriles Alpha Motiv (SAM) an ihrem C-Terminus tragen. Die Aktivierung der RTK benötigt zwei Prozesse: Die Stimulierung der katalytischen Aktivität, und die Herstellung von Bindungsstellen für die Substrat-Proteine. Dies wird i.a. durch Rezeptor-Oligomerisation ermöglicht, was zur Transphosphorylierung der Rezeptoren führt. Dadurch ändert sich der Aktivitätsstatus der TK, und extrazelluläre Signale durch Ligandbindung können potenziert nach intrazellulär vermittelt werden. Die genaue Funktion der Oligomerisation ist noch relativ unklar. Die vermuteten Gründe sind: Eine Stabilisierung der Aktivitätsschleife (s.u.) der TK-Domäne, was dann zu einer Akkumulation von ATP, als Substrat für eine Phosphorylierung, in dieser Aktivitätsschleife führt. Zum anderen führt die Konformationsänderung zu einer lokalen Vermehrung der katalytischen Domänen und der Tyrosin-Reste im Bereich der Oligomerisation und dies führt zu einer Steigerung des Effekts (Weiss and Schlessinger 1998).

Der Prozeß der Ligandbindung an die ECD ist z.Zt. am besten am Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Rezeptor1 (*Insulin-like growth-factor-receptor1* (IGF-1R)) untersucht (Garrett et al. (Garrett, McKern et al. 1998)). Dort wurde mit Hilfe von hochauflösenden

Röntgenstudien die 3D-Struktur der ECD ermittelt, und konnte in 3 Unterdomänen aufgeteilt werden. Die Domänen 1 und 3 sind sog. L-Domänen, die aus  $\beta$ -Helices bestehen, und deren N- und C-terminalen Enden mit  $\alpha$ -Helices umschlossen sind. Domäne 2 besteht aus Disulfidbrücken-gebundenen Cystein-reichen Modulen. Die Seitenkette des Tryptophanrestes an Position 176 dieser Domäne sind in den hydrophoben Kern der L1 Domäne eingebunden, und stabilisieren so die relative Orientierung zur L2 Domäne. Dadurch bilden sie eine Spalte, in der dann IGF1 gebunden wird. Dies wurde auch durch Mutationsanalysen innerhalb der drei Domänen bestätigt (Roach et al (Roach, Zick et al. 1994)).

Die intrazelluläre TK-Domäne besteht aus flexiblen Segmenten, ein aus fünf  $\beta$ -Helices bestehender N-terminaler Lappen, und ein etwas größerer,  $\alpha$ -helikaler, C-terminaler Lappen. Die ATP-Bindungsstelle liegt in der Tasche zwischen beiden Lappen, und die Substrate binden an den C-terminalen Lappen. Die intrazellulären Prozesse der TK sind ebenfalls am besten am Insulinrezeptor untersucht (Hubbard, Wei et al. 1994). Der inaktive Zustand der TK wird durch die Aktivitätsschleife („A-loop“) gewährleistet, die unphosphoryliert mit der ATP-Bindungsstelle interferiert. Erst wenn sie an Tyr1162 phosphoryliert wird, fällt die Autoinhibition weg (Wilden, Kahn et al. 1992). Dadurch wird die basale Aktivität erhöht, und wenn zusätzlich noch Tyr1158 und 1163 phosphoryliert werden, findet eine Konformationsänderung der Aktivitätsschleife, sowie von C- und N-terminalen Lappen statt. Diese Konformationsänderung bringt den C- und N-terminalen Lappen näher aneinander und stabilisiert die Aktivitätsschleife (Hubbard, Wei et al. 1994). Dies ist wichtig für die Substratspezifität. Phosphorylierung von Tyrosin-Resten außerhalb der A-loop (innerhalb des C-terminalen Lappens) schaffen Bindungsstellen für Proteine mit Phospho-Tyrosin-Erkennungssequenzen, wie den src-Homologie-Domänen (*src-homology domain*) SH2, SH3, Pleckstrin-Homologie-Domänen (*pleckstrin homology domain*) PH und Phospho-Tyrosin-Bindende-Domäne (*phosphotyrosine-binding domain*) PTB-Domänen. Diese spez. Erkennungssequenzen wurden erstmals im src-Genprodukt pp60src nachgewiesen, weshalb sie *src-homology domain* (SH)2 und 3 bzw als *pleckstrin homology domain* (PH) bezeichnet werden (Übersicht bei Pawson (Pawson 1995)). Kürzlich wurden neue Phospho-Tyrosin-Bindungssequenzen im *Insulinrezeptorsubstrat* (IRS1) gefunden, die kaum Ähnlichkeit mit den bekannten Erkennungssequenzen besitzen, und deren Funktion noch nicht genau bekannt ist (van der Geer, Wiley et al. 1996). Nachdem ein Peptid an den C-Lappen gebunden hat, finden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Substrat und der A-loop statt. Dadurch können nur die längeren Tyrosin-Reste, und nicht Serin-/Threonin-Reste die aktive Seite erreichen (Zhou, Carraway et al. 1995) und phosphoryliert werden. Substrate für die RTKs

sind eine Vielzahl intrazellulärer Signalproteine, Rezeptoren und andere Polypeptide (Übersicht bei Mayer und Baltimore (Mayer 1993)).

### 2.5.1 Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen

Die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen (PI3K) werden nach Domin und Waterfield (Domin and Waterfield 1997) anhand ihres unterschiedlichen Aufbaus in drei Klassen unterteilt. Klasse I besteht aus einer katalytischen Untereinheit mit relativ konstanter Größe und einem regulatorischen Adapter mit variablen Größe. Die Klasse II sind große Proteine, die eine Phosphatidylinositol-Kinase (PIK) und eine katalytische Domäne beinhalten. Die Kinasen der Klasse III haben sehr viel Ähnlichkeit mit der katalytischen Domäne der Klasse I, ihnen fehlt jedoch die ras-bindende Domäne und die Assoziation mit regulatorischen Untereinheiten.

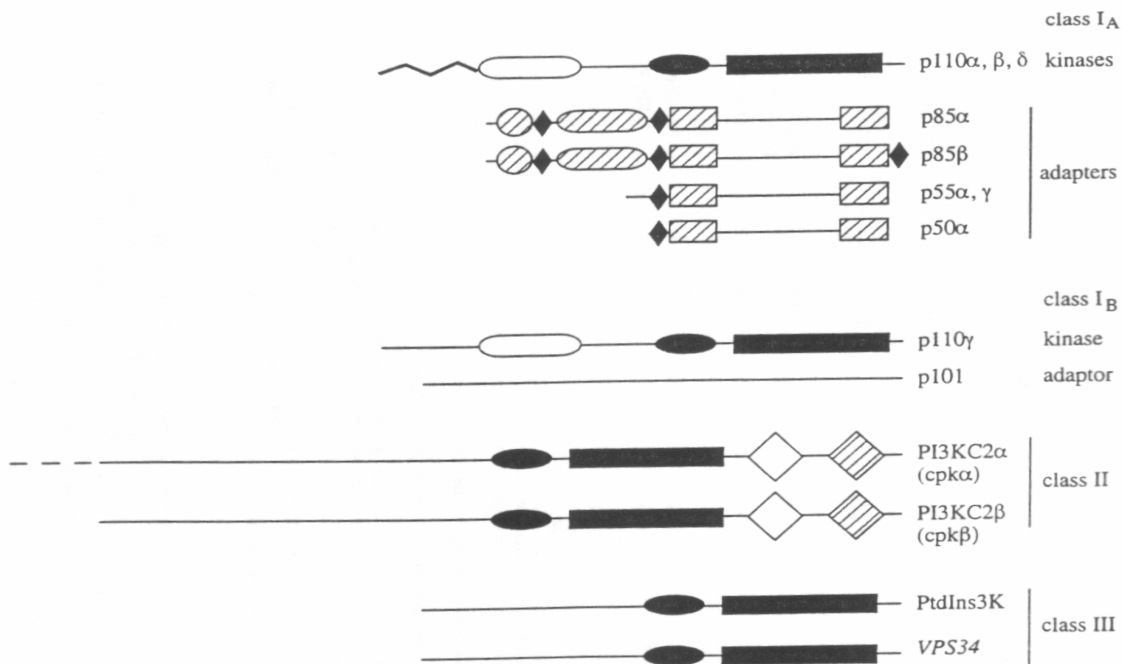


Abbildung 4: Einteilung der PI3K anhand ihrer Untereinheiten aus Fruman et al (Fruman, Meyers et al. 1998). Legende: solide Rechtecke: Katalytische D, solide Ovale: PIK-D, offene Ovale: ras-Bindende D, schraffierte Ovale: rho-GAP-Homologe D, schraffierte Rechtecke: SH2-D, schraffierte Kreise: SH3-D, solide Rauten: Proline-Reiche D, schraffierte Rauten: C2-D, offene Rauten: PX-D, Sägezahn-Linie: p85-Interaktions-Region in Klasse I<sub>A</sub>.

Allen drei Klassen ist gemeinsam, daß sie als Phospholipid-Kinasen Phosphatidylinositol phosphorylieren, und so „second messenger“-Moleküle wie Diacylglycerol und Inositolphosphat generieren, und die Membrantopologie verändern. V.a. die Klasse I PI3Ks besitzen zusätzlich auch Protein-Kinase-Aktivität. Dies liegt am Aufbau, denn die katalytischen

Untereinheiten besitzt eine Ras-bindende Domäne, während die regulatorischen Untereinheiten SH2-, SH3-, GTPase-aktivierende Proteine der *rho*-Familie (rho-GAPs) Homologie-Regionen und Prolin-reiche-Regionen besitzen. Die katalytische Untereinheit besitzt Serin-Kinase-Aktivität und phosphoryliert vornehmlich Serin-Reste in den regulatorischen Adaptern, oder innerhalb der katalytischen Einheit selbst, wodurch die Aktivität gesteuert wird. Ebenfalls einen Einfluß auf die Aktivität besitzt das kleine G-Protein Ras, was durch Bindung von GTP aktiviert wird. Dann kann Ras-GTP mit der katalytischen p110-Untereinheit reagieren, und sie zur Produktion von Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat anregen. Ein Komplex aus den p110/p85 Untereinheiten ist in der Lage z.B. IRS-1 u.ä. zu phosphorylieren. Von den Adapter-Molekülen ist die p85 Untereinheit bisher am besten untersucht (Übersicht bei Fruman und Meyers (Fruman, Meyers et al. 1998)). Durch Bindung von Peptiden an die SH2-Domänen wird die intrazelluläre Lokalisation ebenso wie die Aktivität der PI3K reguliert (Backer, Myers et al. 1992; Zhou, Carraway et al. 1995), so bindet Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat ebenfalls an SH-2 Domänen und reduziert die Aktivität des Komplexes (Rameh, Chen et al. 1995). Ähnliches wird für die SH3-bzw die rho-GAP-Homologie-Domänen angenommen. So binden dort u.a. src, lck, lyn, cbl sowie die G-Proteine rho, rac und cdc42, wodurch vermutlich ein Teil der antiapoptotischen Wirkung vermittelt wird (s.u.) (Franke, Kaplan et al. 1997), während die meisten zellulären Effekte durch die Phosphatidylinositol-Phosphate vermittelt werden.

## 2.5.2 Serin-/Threonin-Kinasen

Im Gegensatz zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind die Serin- / Threonin-Kinasen deutlich weniger gut untersucht und beschrieben. Zu dieser Kinasen-Gruppe zählen unter anderem auch Akt, die MAPK, C-abl und PDK1(s.u.) (Cross, Scheel-Toellner et al. 2000). Da die Serin- / Threonin-Kinasen im allgemeinen intrazellulär lokalisiert sind, fehlt ihnen meist die ECD. Nach Kandel und Hays (Kandel and Hay 1999) besitzt z.B. Akt lediglich eine Domäne zur Bindung an PtdIns-3,4,5-P und an RTK, anschließend eine katalytische Domäne mit Serin- / Threonin-Kinase-Funktion und eine regulatorische Domäne, die vermutlich die intrazelluläre Verteilung des Proteins steuert. Vor einigen Jahren noch war die allgemeine Theorie über die Funktion der Serin- / Threonin-Kinasen, daß sie lediglich die 3D-Struktur der Zielproteine verändern (Yaffe, Rittinger et al. 1997), während man heute weiß, daß sie ebenfalls Bindungsstellen für andere Proteine in ihren Zielproteinen schaffen, vergleichbar mit den SH-Domänen bei den RTK (Lu, Zhou et al. 1999) (Li, Smith et al. 1999). Relativ gut untersucht ist bei Akt die Aktivierung durch die PDK1 (Kandel and Hay 1999). Hierbei ist die

Phosphorylierung von Akt an Serin-Resten innerhalb der regulatorischen Domäne (je nach Isoform AS 472-474) und an Threonin-Resten (AS 308,309 oder 302) innerhalb der katalytischen Domäne zur Aktivierung notwendig. Wenn die Kinasen an den Serin- / Threonin-Resten phosphoryliert sind, können dort Proteine mit bestimmten Phosphoserin- / Phosphothreonin-Bindungsstellen binden. Diese Erkennungssequenzen sind z.B. Bindungsstellen innerhalb des 14-3-3 Proteins, der F-box-Proteine, der Forkhead-Familie oder Pin1 bzw. Nedd4 (s.u.) (Barinaga 1999). Für das 14-3-3-Protein ist diese Bindungsstelle ein Box1-Motiv im C-terminalen Ende (Ichimura, Ito et al. 1997) während sie in den F-box-Proteinen eine sogenannte WD40- oder auch Leucin-reiche-Domäne ist, in der Forkhead-Familie sind es *Forkhead-assoziierte* (FHA)-Domänen aus 75 AS mit 3-4 Sequenzwiederholungen und in den Proteinen Pin1 oder Nedd4 sind es Tryptophan-Tryptophan (WW) - Domänen, die phosphorylierte Serin- oder Threonin-Reste erkennen (Barinaga 1999) (Yaffe, Rittinger et al. 1997) (Lu, Zhou et al. 1999). Allen diesen Proteinen bzw. den Bindungsstellen in ihnen ist gemeinsam, daß sie phosphorylierte Serin- / Threonin-Reste erkennen und daran binden. Dadurch erfüllen sie eine Vielzahl von Aufgaben, so verhinderte eine Bindung an 14-3-3-Protein z.B. den Transport von Proteinen in den Zellkern (Brunet, Bonni et al. 1999) und die Bindung an Pin1 oder Nedd4 führt zu einer Protein-Degradation (Lu, Zhou et al. 1999). So vermitteln die Serin- / Threonin-Kinasen viele der durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen nach intrazellulär vermittelten Signale weiter (Yaffe, Rittinger et al. 1997) und in Zukunft werden wohl noch eine Menge ihrer Funktionen erforscht und entschlüsselt werden.

## 2.6 Neurotrophe Faktoren

Neurotrophe Faktoren sind lösliche Polypeptide, die für das Überleben bestimmter Neurone in der Entwicklungsphase und im Erwachsenenstadium notwendig sind. Viele Proteine sind (oft unkorrekterweise) als neurotrophe Faktoren bezeichnet worden, da sie das Überleben von Neuronen fördern. Die „neurotrophe Hypothese“, wie sie u.a. von Barde (Barde 1988) beschrieben wurde, gibt drei Hauptkriterien für die Einteilung als Neurotrophin an: Erstens müssen Neurone auf dieses Peptid für ihr Überleben angewiesen sein, zweitens müssen sie in ihrer biologisch aktiven Form vorliegen und von Zellen des Zielgewebes, in dem sich die neuronalen Zellen befinden, produziert werden, und drittens darf es nur in sehr geringen Konzentrationen im Zielgewebe vorhanden sein, um eine korrekte Organreifung zu ermöglichen. Denn hohe Konzentrationen von Wachstums- oder neurotrophen Faktoren verhindern den programmierten Zelltod und führen zur Tumorentwicklung in der Embryonalphase (siehe auch Barde (Barde 1988)). Die neurotrophen Faktoren, die den O.G.

Kriterien entsprechen, werden in verschiedene Familien eingeteilt: Zur NGF-Familie (Neurotrophine) zählen der Nerven-Wachstumsfaktor (*nerve growth factor* (NGF)), der Gehirn-abstammende Wachstumsfaktor (*brain derived neurotrophic factor* (BDNF)) und Neurotrophin-3 (*neurotrophin* (NT-3)) bis NT-6, in die Neurokin-Familie werden der ziliare neurotrophe Faktor (*ciliary neurotrophic factor* (CNTF)) und der Leukämie-Inhibitionsfaktor (*leukaemia inhibitory factor* (LIF)) eingeteilt, während man den Gliazell-abstammenden Wachstumsfaktor (*glial-cell-line derived neurotrophic factor* (GDNF)), den Neurturin (*neurturin* (NTN)) und den transformierenden Wachstumsfaktor (*Transforming growth factor* (TGF)) zur TGF $\beta$ 2-Familie zählt. Im molekularen Aufbau unterscheiden sich die Familien z.T. stark, so zeigen die Neurokine Cytokin-Struktur während die NGF-Familie und TGF $\beta$ 2-Familie als gemeinsames Merkmal den sog. Cystein-Knoten aufweisen. :

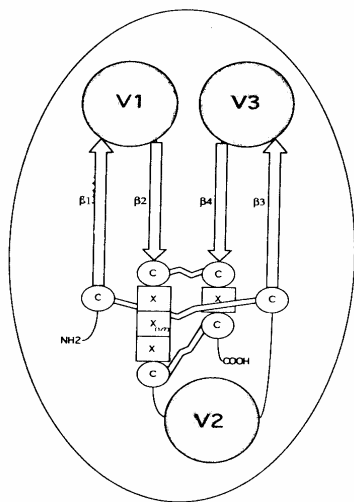


Abbildung 5: Cystein-Knoten-Motiv der Mitglieder der NGF- und TGF $\beta$ -Familie; aus (McDonald and Hendrickson 1993)

Dieses Motiv wiederholt sich bei den meisten Mitgliedern der neurotrophen Faktoren, wie z.B.: der NGF-Familie, der TGF $\beta$ 2-Familie oder der PDGF-Familie, als Beispiel für Wachstumsfaktoren allgemein (Übersicht bei McDonald and Hendrickson (McDonald and Hendrickson 1993)). Dabei bilden sich Disulfidbrücken zwischen Cystein-Resten aus, so daß ein Knoten entsteht. Bei NGF ist dies z.B.: Cystein(C)<sup>58</sup>-C<sup>108</sup> und C<sup>68</sup>-C<sup>110</sup>, mit denen durch zwei kurze Aminosäureketten (C-X-X-C) ein Ring gebildet wird, durch den sich die dritte Disulfid-Brücke zwischen C<sup>15</sup>-C<sup>80</sup> hindurchstülpt (Siehe Abb.5). Gleichmaßen wie der Cystein-Knoten gehören auch vier langgezogene, gedrehte, antiparallele  $\beta$ -Stränge zur typischen Struktur der neurotrophen Faktoren. Die 4 Stränge sind unterschiedlich lang und gedreht, wobei der  $\beta$ 4-Strang zur Stabilisierung des Protomers stärker gedreht ist als die anderen. Die Spezifität der verschiedenen Neurotrophine wird durch drei variable Regionen sowie verschiedene N- / C-terminale Sequenzen gewährleistet (Kruttgén, Heymach et al. 1997; Kullander, Kaplan et al. 1997). So besitzt die TGF $\beta$ 2-Familie im Gegensatz zu NGF-

Familie oder PDGF-Familie z.B. Helices in der V1/V2 und N-terminalen Region (McDonald and Hendrickson 1993). Interessanter Weise werden von allen Mitgliedern der Cystein-Knoten-Superfamilie Homodimere gebildet, jedoch mit unterschiedliche Mechanismen und Orientierungen. So binden NGF-Protomere parallel über nicht-kovalente hydrophobische Kräfte, so daß der Eindruck einer Spiegelung entsteht. Die TGF $\beta$ 2-Familie und PDGF-Familie besitzen zusätzlich zu den Cystein-Resten innerhalb des Knotens noch Disulfidbrücken und Cysteine, die mit Cysteinen in den anderen Protomeren eine kovalente Bindung eingehen, wodurch antiparallele Dimere entstehen

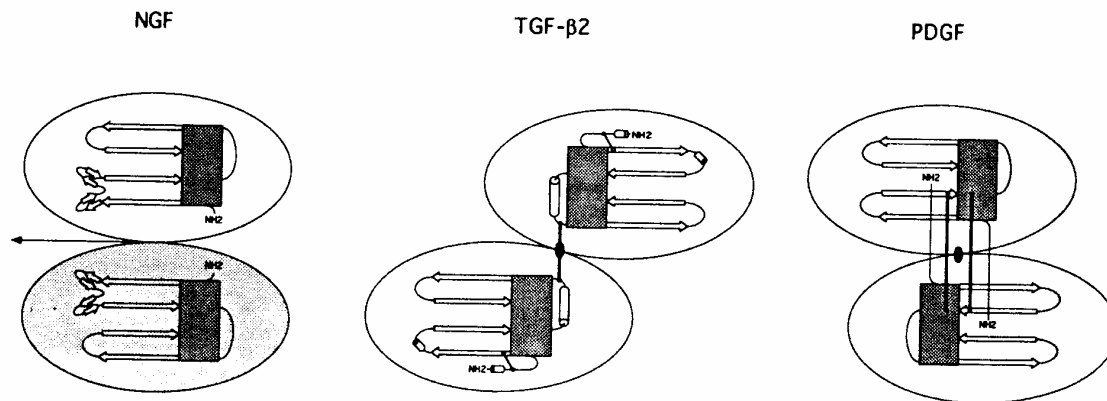


Abbildung 6.: Struktur der Bindungen in den Dimeren von NGF, TGF $\beta$ 2 und PDGF. Aus (McDonald and Hendrickson 1993).

Dadurch wird die Konformation und die biologische Aktivität stabilisiert, denn in physiologischen Konzentrationen (z.B. von NGF (Narhi, Rosenfeld et al. 1993)) liegen die neurotrophen Faktoren fast ausschließlich als Dimere vor, zudem sind diese Bindungen wichtig für die Rezeptorspezifität. Die Effekte der neurotrophen Faktoren variieren mit der Zellart, dem Applikationszeitpunkt, der Konzentration und den zur Verfügung stehenden Rezeptoren (Übersicht bei Henderson (Gouin, Bloch-Gallego et al. 1996; Henderson 1996)). Dies wurde v.a. mit Knock-out-Mäusen für die verschiedenen Neurotrophine oder deren Rezeptoren dargestellt. So zeigte Ernfors et al. (Ernfors, Lee et al. 1994), das bei Mäusen, bei denen NT-3 ausgeschaltet war, Defizite in der Propriozeption und im peripheren Nervensystem (PNS) auftreten, wohingegen bei Null-Mutanten für NGF Sensibilitätsstörungen und Defizite bei sympathischen Neuronen auftreten ((Crowley, Spencer et al. 1994)). Mc Allister et al. (McAllister, Lo et al. 1995) konnten in einer Serie von Experimenten zeigen, daß die Zellen im Kortex je nach Schicht unterschiedlich reagieren. Während die Zellen aus Schicht 4 und 5 durch BDNF zur Bildung von Dendriten angeregt werden, verhindert BDNF gleichzeitig das Dendritenwachstum von Schicht 6. Anders aber bei der Behandlung mit NT-3, da reagieren Schicht 5 und 6 dafür aber 4 nicht (McAllister,



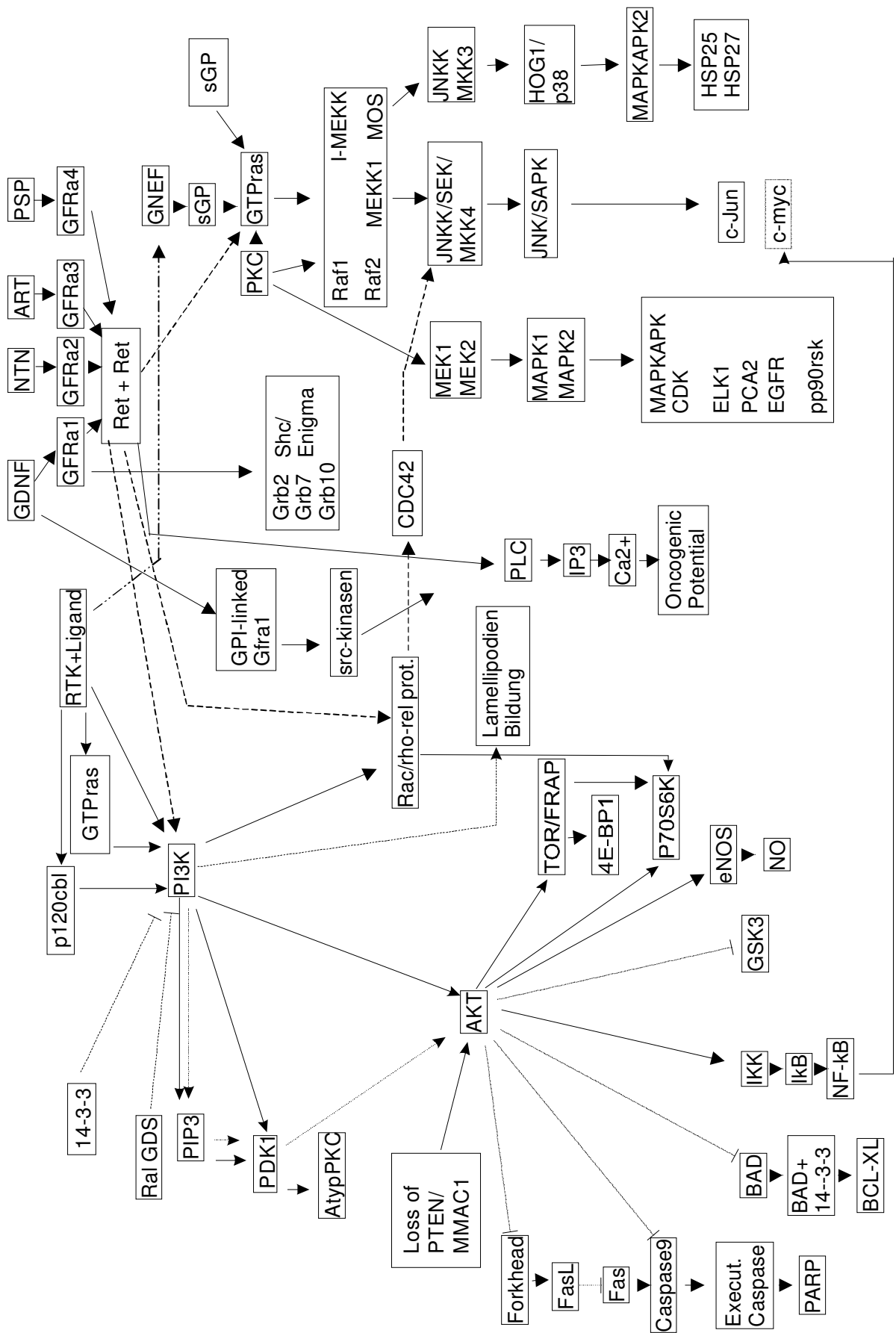
Katz et al. 1997). Neurone wechseln auch im zeitlichen Verlauf in ihrer Abhängigkeit gegenüber den neurotrophen Faktoren, wie an trigeminalen Zellen von Davies gezeigt wurde (Davies 1994). Nach einer Neurotrophin-unabhängigen Phase kommt eine, in der durch BDNF, NT-3/4 das Axonwachstum stimuliert wird. Anschließend wechseln die Zellen zu NGF. Ähnliches wurde für Faktoren der TGF $\beta$ 2-Familie gezeigt: In Kombination mit anderen Faktoren potenzieren sie deren Effekte (Gouin, Bloch-Gallego et al. 1996) während sie allein (v.a. GDNF) meist dopaminerge Neurone vor dem Zelltod bewahren (Lin, Doherty et al. 1993). Für die Effektvermittlung über die spezifischen Rezeptoren konnten Minichiello und Davies zeigen, daß bei Knockout-Mäusen für den eigentlichen NT-3-Rezeptor (trkC) NT-3, in genügend hoher Konzentration, über andere Rezeptoren (trkA/trkB) der gleichen Familie, das Überleben von Neuronen vermittelt.

## 2.7 Signalwege

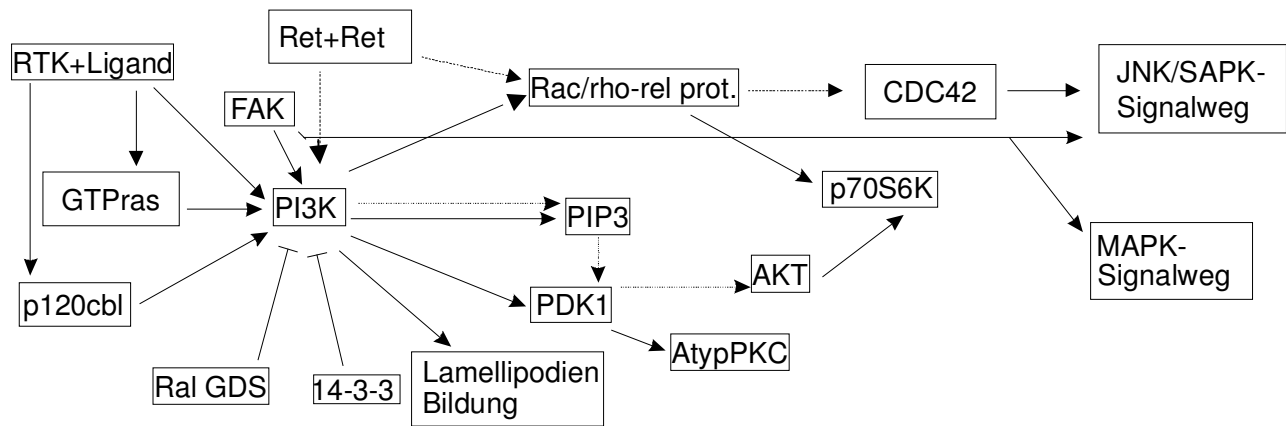
Extrazelluläre Stimuli wie z.B. die Bindung von neurotrophen Faktoren lösen intrazellulär Effekte aus. Diese Effekte werden im allgemeinen durch intrazelluläre Signalwege vermittelt. Einige dieser Signalwege werden im folgenden erklärt, ohne jedoch Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben, denn es werden fast täglich neue Komponenten gefunden.

Legende:

- Stimulierung der nachfolgenden Komponente
- Stimulierung der nachfolgenden Komponente,  
Verbindung von RET zu anderen Signalwegen
- .-.-.-.-→ Stimulierung der nachfolgenden Komponente,  
Verbindung von RTK-Ligandkomplexen zum Ras-Signalweg
- | Hemmung den nachfolgenden Komponente



## 2.7.1 Phosphatidylinositol-3-Kinase –Signalweg



Legende: —————> Stimulierung der nachfolgenden Komponente; - - - - -> s.v., Verbindung von RET zu anderen Signalwegen; - - - - -> s.v., Verbindung von RTK-Ligandkomplexen zum Ras-Signalweg; - - - - -| Hemmung der nachfolgenden Komponente.

Eine Komponente der intrazellulären Signaltransduktion ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), eine heterodimere Kinase mit mehreren Protein-Bindungsstellen (SH2 / SH3 / PH-Domänen). Eine Aktivierung der PI3K kann über mehrere Mechanismen stattfinden. Zum Beispiel kann die PI3K direkt an einen aktivierten Rezeptor-Ligand-Komplex (RTK+Ligand) binden, und dadurch phosphoryliert werden (Burgering and Coffey 1995). Ein Weg der Stimulierung von EGF über die PI3K geht z.B. über eine Bindung des stimulierten EGF-Rezeptors (im Schema nur als RTK+Ligand bezeichnet) mit dem Produkt des proto-Oncogens p120<sup>cbl</sup>, welches dann wiederum mit der PI3K assoziiert, und sie aktiviert (Soltoff and Cantley 1996). Sonoda et al (Sonoda, Watanabe et al. 1999) zeigten, daß die PI3K auch durch „Streß“ über die „focal adhesion kinase“ (FAK) aktiviert wird. Durch den Streß, den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Zellen ausübt, wird FAK phosphoryliert, und bindet dann an die PI3K, die dann wiederum Akt phosphoryliert. Die FAK ist eine Protein-Tyrosin-Kinase, die durch Integrine stimuliert wird, und so eine Bindung an eine extrazelluläre Matrix vermittelt und aufrechterhält. Schlaepfer et al. (Schlaepfer, Hauck et al. 1999) beschreiben viele Assoziationsmöglichkeiten für die FAK, u.a. auch src-Proteine und ähnliche, worüber auch andere Signalwege wie JNK oder MAPK angeregt werden. Eine andere Möglichkeit der PI3K-Stimulierung ist die Bindung an aktiviertes Ras (GTPras, GTP gebundenes Ras) (Rodriguez-Viciana, Warne et al. 1994). Ras gehört in die Gruppe der kleinen G-Proteine („smallGTPase“) die mit Rezeptoren assoziieren und GTP spalten. Ras ist ein weitverbreitetes, von einem Protoonkogen kodiertes Protein, welches in vielen Signalwegen mitagiert und häufig in Tumoren mutiert ist, wodurch sein onkogenes Potential vermittelt wird. (Drivas, Shih et al. 1990) (Saez, Chan et al. 1994).

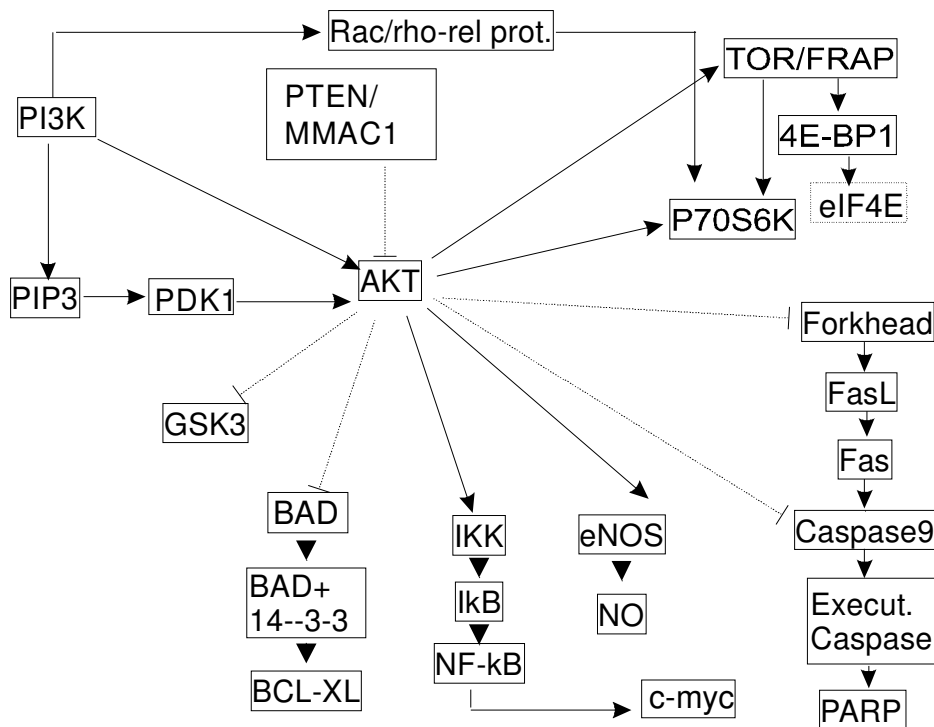
Die Aktivierung der PI3K durch GTPras kann durch „*ras-related guanine nucleotide dissociation stimulator*“ (RalGDS), ein Dissoziationsfaktor aus der Gruppe der „*GTPase activating proteins*“ (GAP), unterbrochen werden (Albright, Giddings et al. 1993). Ebenso wie durch RalGDS kann die Aktivität der PI3K auch durch Assoziation mit einem 14-3-3-Protein beendet bzw. gehemmt werden (Bonney-Berard, Liu et al. 1995) (Kosaki, Yamada et al. 1998). Die 14-3-3 Proteine sind ubiquitär vorhanden (Aitken, Collinge et al. 1992), und binden v.a. Onkogen-Produkte (Ichimura, Ito et al. 1997).

Eine weitere Möglichkeit, die PI3K zu aktivieren, ist über die Ret-Rezeptor-Tyrosin-Kinase (Ret, Ret + Ret). Van Weering et al (van Weering, de Rooij et al. 1998) konnten zeigen, daß Stimulierung des Ret-Rezeptors mittels GDNF oder EGF (als EGFR/Ret-Chimer) in einer Aktivierung der PI3K resultiert, was dann zu einer Lamellipodien-Bildung (große, flache Zellausläufer, ähnlich wie Pseudopodien) führt (van Weering and Bos 1997). Zusätzlich zu den hier aufgeführten gibt es noch eine Vielzahl von Adaptermolekülen, die zu einer Aktivierung der PI3K führen, so z.B. IRS-1 (Backer, Myers et al. 1992), *Phosphatidylinositol-3-Phosphate* (PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub>) oder Mitglieder der src-Kinasen-Familie (Fruman, Meyers et al. 1998). Die Effekte dieser Moleküle sind noch relativ unklar, so wird vermutet, das die PtdInsP<sub>3</sub>s eine autoregulatorische Funktion besitzen, während die src-Kinasen die intrazelluläre Lokalisation vermitteln und ebenfalls die Bindungseigenschaften der PI3K beeinflussen (Fruman, Meyers et al. 1998).

Die Effekte der PI3K sind genauso vielfältig wie die Aktivierungs- bzw. Deaktivierungsmechanismen. Ein Effekt ist die Produktion von „second-messenger“-Molekülen aus Phosphatidylinositol, z.B. zu *Phosphatidylinositol-Phosphat* (PIP), *Phosphatidylinositol-Diphosphat* (PtdInsP<sub>2</sub>, PIP<sub>2</sub>) und *Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat* (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, PIP<sub>3</sub>) (Fruman, Meyers et al. 1998). Diese „second-messenger“-Moleküle vermitteln eine Reihe von Signalen, wie Proliferation, zytoskelettale Organisation oder Thrombozytenfunktion (Banfic, Tang et al. 1998; Fruman, Meyers et al. 1998). Eine Rolle der PIP<sub>3</sub>s ist die Aktivierung der *Phosphatidylinositol-3-Phosphat abhängigen Kinase 1* (*phosphatidylinositol 3-phosphate dependend kinase 1* (PDK1)), die dann die Serin- / Threonin-Kinase Akt aktiviert (Anderson, Coadwell et al. 1998). PDK1 vermittelt aber auch die PI3K-abhängige Aktivierung der *atypischen Protein-Kinase C* (atyp. PKC, PKC $\xi$ ). PDK1 wird von der PI3K an seiner PH-Domäne phosphoryliert, bindet dann an PKC $\xi$  und aktiviert diese dann ebenfalls (Belham, Wu et al. 1999). PKC $\xi$  ist eine Protein-Kinase mit vielen Zielproteinen z.B. Muskelproteine oder zytoskelettale Proteine in Neuronen. Ein weiteres Substrat für die PI3K ist noch ein Mitglied aus den small-GTPasen, das zu den „rho-related

proteins“ gehörende Rac (Überall, Hellbert et al. 1999). So zeigte Chiariello et al, daß je nach Mutation in den Protein-bindenden Domänen, nach Stimulation u.a. auch Rac phosphoryliert wird, und dann der JNK-Signalweg (über die cdc42, ein Protein der rho-Familie (Albright, Giddings et al. 1993)) oder aber auch der MAPK-Signalweg aktiviert wird (Chiariello, Visconti et al. 1998). Dadurch vermittelt Rac eine Schar von Effekten, wie Zellwachstum und -transformation, Superoxid-Bildung oder sekretorische Effekte. Welch et al (Welch, Eguinoa et al. 1998) konnten zeigen, daß Rac durch die PI3K aktiviert wird, was über eine Aktivierung der p70<sup>s6k</sup> (*p70* Ribosomalen *S6* Kinase) zur Bildung von Lamellipodien und zur Formation von Wellen der Membran führt. Die p70<sup>s6k</sup> ist eine 70kDa große Protein-Kinase, die zuerst entdeckt wurde aufgrund ihrer Fähigkeit, in der S-Phase des Zellzyklus das Protein S6 zu phosphorylieren, dadurch kommt es zum Übergang von der G0 zur G1 Phase, oder zu einem Verbleib in der S-Phase (Chung, Grammer et al. 1994). Viele Kinasen können die p70<sup>s6k</sup> aktivieren, u.a. auch Akt (s.u.). Das z.Zt. interessanteste Substrat für die PI3K ist die *Protein Kinase B* (PKB) oder auch Akt (Zelluläres Homologe zum Produkt des Retrovirus Akt-8, auch homolog zur PKC und A, daher auch PKB). Akt besitzt ebenfalls PH-Domänen, mit deren Hilfe es Homodimere bilden kann, was dann seine Serin- / Threonin-Kinase-Aktivität erhöht, und eine Translokation an die Plasmamembran gewährleistet (Hemmings 1997). Die Dimerisation bzw. Translokation wird zum einen über PIP<sub>2</sub> vermittelt (Franke, Kaplan et al. 1997), zum anderen durch die PDK1 (Anderson, Coadwell et al. 1998), oder durch direkte Assoziation mit der PI3K. Die Effekte der Akt-Aktivierung sind Vielfältig (s.u.).

## 2.7.2 Der PKB/Akt-Signalweg



Legende:  $\longrightarrow$  Stimulierung der nachfolgenden Komponente;  $\dashrightarrow$  s.v., Verbindung von RET zu anderen Signalwegen;  $\dashrightarrow$  s.v., Verbindung von RTK-Ligandkomplexen zum Ras-Signalweg;  $\dashv$  Hemmung der nachfolgenden Komponente.

Wie oben schon erwähnt, ist einer der häufigsten Stimulierungsmechanismen für Akt die PI3K-abhängige Phosphorylierung, sowohl die direkte als auch die indirekte über die PDK1 (und PIP<sub>2</sub>).

Die bisher einzige beschriebene Hemmung der Akt-Aktivität findet durch eine Phospholipid-Phosphatase statt, dem Produkt des Tumorsuppressors PTEN/MMAC1 (*phosphatase and tensin homologe / mutated in multiple advanced cancers*). Die PTEN-Phosphatase ist in der Lage, sowohl Phospho-Tyrosin-Reste, als auch Phospho-Serin- / Threonin-Reste, wie auch PIP<sub>3</sub>, zu dephosphorylieren (Myers and Tonks 1997; Maehama and Dixon 1998). Dadurch reguliert es die Aktivität u.a. von Akt, weshalb es bei einem Verlust dieses Tumorsuppressor-Gens auf Chromosom 10 häufig zu Malignomen kommt, was z.B. für Gliome, Mamma- und Prostatakarzinome sowie für das Cowden-Syndrom beschrieben wurde (Cairns, Okami et al. 1997; Liaw, Marsh et al. 1997; Rasheed, Stenzel et al. 1997; Rhei, Kang et al. 1997).

Die Signalwege, in denen Akt involviert ist, vermitteln i.a. anti-apoptotische Effekte. So wird z.B. die Translation über folgenden, von Gingras et al. (Gingras, Kennedy et al. 1998) beschriebenen Weg beeinflusst: Nach Aktivierung durch die PI3K phosphoryliert Akt die

Kinase TOR / FRAP (*target of rapamycin / FKBP12 and rapamycin-binding protein kinases*), eine PIK (*phosphatidylinositol-kinase*)-abhängige Kinase. Diese Kinasen phosphorylieren dann Mitglieder der 4E-BP-Familie (*eIF4E-binding proteins*), Proteine aus der Gruppe der Translations-Repressoren. Nach der Phosphorylierung dissoziieren die 4E-BPs von eIF4E, was dann mit zwei anderen Proteinen seiner Familie den Initiationskomplex bildet, und die Translation CAP-tragender mRNA-Stränge beschleunigt. So forciert Akt durch Hemmung eines Repressors die mRNA-Translation. TOR ist, genauso wie Akt, außerdem noch in der Lage, direkt die p70s6k zu aktivieren (Burgering and Coffey 1995), was zu einer Erhöhung der Protein-Synthese-Rate führt. Ein weiterer Effekt der Akt-Stimulierung ist die Phosphorylierung der eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*), wodurch sie aktiviert wird, und NO (*nitric oxide*, Stickoxid) produziert (Dimmeler, Fleming et al. 1999; Fulton, Gratton et al. 1999). NO vermittelt als gasförmiges „second-messenger“-Molekül Blutdruckänderungen und Angiogenese. Ein zusätzlicher nachgeschalteter Signalweg umfasst IKK (*I $\kappa$ B Kinase*) und c-myc (Ozes, Mayo et al. 1999). Hierbei wird die IKK durch Akt angeregt, I $\kappa$ B (*Inhibitor of  $\kappa$ B*) zu phosphorylieren. Dadurch dissoziiert I $\kappa$ B von NF $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*), einem Transkriptionsfaktor ab, der nun in den Nucleus wandern kann, und seine Zielgene wie z.B. c-myc transkribieren kann. Das c-myc Genprodukt vermittelt konträre Effekte: In Anwesenheit von Wachstumsfaktoren ist es notwendig zur Zellproliferation, wohingegen es in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren Apoptose induziert (Kauffmann-Zeh, Rodriguez-Viciana et al. 1997). So reagiert dieser gerade beschriebene Signalweg auf eine Stimulierung mit PDGF (Romashkova and Makarov 1999) mit Proliferation, während z.B. TNF $\alpha$  (*Tumor Necrose Faktor  $\alpha$* ) fast den gleichen Signalweg benutzt und dabei Apoptose induziert, nur dass die Rolle des Akt von NIK (*NF $\kappa$ B-inducing kinase*) übernommen wird (Khwaja 1999).

Ein Eingriff in proapoptische Signalwege ist z.B. die Hemmung der Transkription des Fas-Ligand-Gens. Dies geschieht folgendermaßen: Akt phosphoryliert FKHRL1 (*Forkhead related L1*), ein Mitglied der Forkhead-Transkriptionsfaktor-Familie. Durch die Phosphorylierung kann FKHRL1 an 14-3-3-Protein binden, wodurch seine Translokation in den Nucleus verhindert wird. In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren bindet FKHRL1 im Nucleus an ein Forkhead-response-element im Promotor des Fas-Ligand-Gens, wodurch die Transkription erhöht wird (Brunet, Bonni et al. 1999). FAS-Ligand kodiert für ein Zytokin, Fas-L. Fas-L bindet bei apoptotischen Stimuli, wie z.B. UV-Bestrahlung, an seinen Rezeptor Fas. Dieser Komplex inhibiert die inhibierende-Protease Caspase 8 und BCL-X<sub>L</sub> oder BCL-2, zwei antiapoptische Proteine, die u.a. die normale Mitochondrienfunktion aufrechterhalten.

Dadurch wird Cytochrom C aus den Mitochondrien frei, was Apaf1 (*apoptotic protease activating factor1*), und die Caspase 9 (*Cytosolic Aspartate-Specific cysteine proteases*) bindet und aktiviert (Green and Reed 1998). Caspase 9 ist der Startpunkt einer Caspasen-Kaskade, die zu den typischen apoptotischen Veränderungen wie Nukleus-Kondensation und Chromatindegradation führen. Eine dieser ausführenden Caspasen (Execut. Caspase) ist ICE (*Interleukin-1 $\beta$  converting enzyme*), und deren Substrat ist PARP (*poly(ADP-ribose) polymerase*). Die Spaltung von PARP verhindert ihren DNA-Reparatur-Mechanismus, was dann zum Zelltod beiträgt (Martin 1995). Durch Hemmung dieses Weges über Inhibition der Fas-Ligand-Transkription, oder über direkte Hemmung von Caspase 9 durch Akt (Cardone, Roy et al. 1998) werden also Apoptose-Events verhindert.

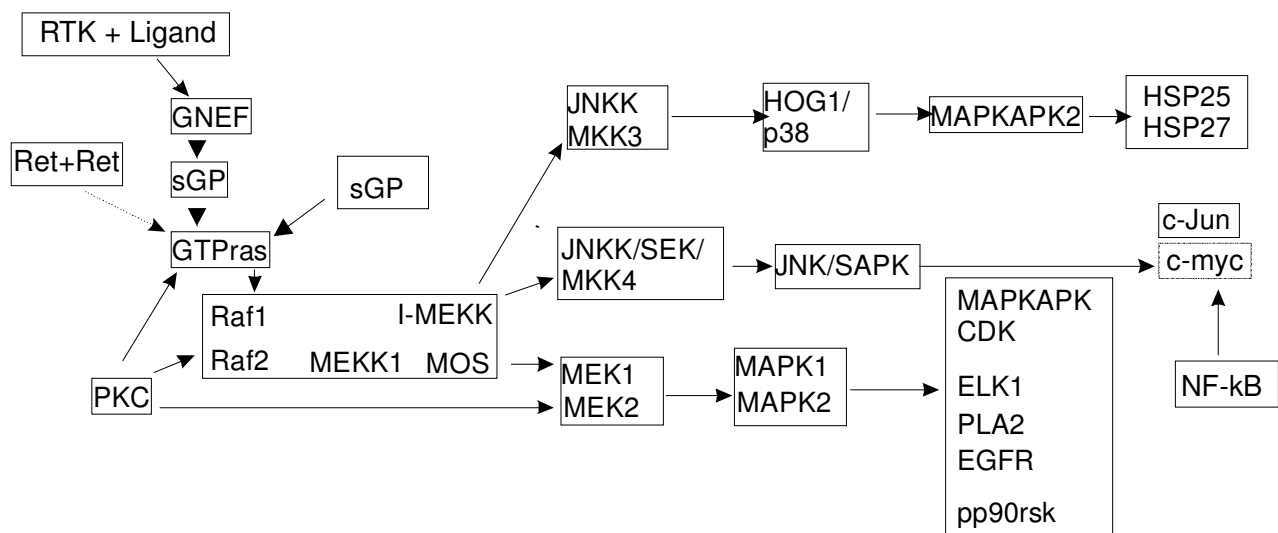
Als erstes Substrat für Akt wurde die GSK-3 (*Glycogen Synthase Kinase-3*) als Enzym beschrieben, daß die Glycogen-Synthese, als Antwort auf Insulinstimulation durch Phosphorylierung der Glycogen-Synthase, reguliert. Die GSK-3 phosphoryliert eine Vielzahl von Substraten, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Translationsfaktoren, Mitglieder der BCL-2-Familie, oder Caspasen. Wie von Pap und Cooper (Pap and Cooper 1998) beschrieben, hemmt die Phosphorylierung der GSK-3 durch Akt deren pro-apoptotischen Aktivitäten.

1996 beschrieben Zha et al. die Phosphorylierung eines Mitglieds der BCL-2-Familie, von BAD, durch Akt (Zha, Harada et al. 1996). Phosphoryliertes BAD gibt BCL-X<sub>L</sub> frei, während es selber an 14-3-3-Protein gebunden und im Zytosol gehalten wird. Durch diesen Weg wurde erstmals eine Verbindung zwischen dem antiapoptotischen Effekt Akts und der Zelltod-regulierenden BCL-2-Gen-Familie hergestellt. Das BCL-2-Gen wurde an einer Translokation (t(14/18)) bei folliculären B-Zell Lymphom (*B cell lymphoma*) gefunden, und kodiert für das Zelltod-verhindernde onkogene Protein BCL-2. Eine Reihe von Proteinen mit Sequenzhomologien wurden identifiziert und in 3 Subfamilien eingeteilt (Korsmeyer 1999): Erstens in Proteine mit starker Sequenzhomologie zu BCL-2 und antiapoptotischer Wirkung, hierzu zählen BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>, BCL-W, MCL-1, A1, NR-13 und CED-9 (bisher nur in *C.elegans* identifiziert). Zweitens in Proteine mit großer Sequenzhomologie und proapoptotischer Wirkung, hierzu werden BAX, BAK, BOK und BCL-X<sub>S</sub> gerechnet. Drittens in Proteine mit nur einer Sequenzhomologie (BH3) und ebenfalls proapoptotischer Wirkung, dazu werden BID, BAD, BIK, BLK, HRK und BIM gezählt. Die Proteine der Subfamilie 1 sind membranassoziiert, und können zum einen über den Benzodiazepin-Rezeptor Megaporen in der Mitochondrienmembran bilden, und dadurch deren Permeabilität steuern (Kroemer 1997), und zum anderen, was den antiapoptotischen Effekt bringt, Mitglieder der Subfamilie 2 binden (Downward 1999), und so deren proapoptotischen Effekt verhindern. So beschreibt



Korsmeyer, daß v.a. die Relation von BCL-2 und BAX über Leben und Tod der Zelle entscheiden. BAX bindet an ein in der Mitochondrienmembran liegendes BAX und bildet porenformende Homodimere, die die Mitochondrienfunktion destruieren und zum Freiwerden von Mitochondrienbestandteilen wie Cytochrom C führt. Cytochrom C aktiviert die Caspasen-Kaskade, die zum Zelltod führt. Die Mitglieder der Subfamilie 3 haben v.a. vermittelnde / regulatorische Funktion. So binden sie an die Subfamilie 1, und verhindern so, daß diese die Subfamilie 2 inhibieren können (Korsmeyer 1999).

### 2.7.3 Die MAPK-Kaskaden



Legende:  $\longrightarrow$  Stimulierung der nachfolgenden Komponente;  $\dashrightarrow$  s.v., Verbindung von RET zu anderen Signalwegen;  $\dashrightarrow$  s.v., Verbindung von RTK-Ligandkomplexen zum Ras-Signalweg;  $\dashv$  Hemmung der nachfolgenden Komponente.

Über die MAPK-Kaskade werden zum Großteil proliferative Effekte oder Streßreaktionen zu sogenannten „immediate early genes“ vermittelt. Aktiviert wird die Kaskade über Rezeptor-Ligand-Komplexe (z.B.  $\text{trk}\alpha$  + NGF), die dann GNEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factor) rekrutieren. Diese Komplexe aktivieren dann kleine G-Proteine (sGP) und dadurch die Bindung von GTP und Ras. SGPs können auch unabhängig von GNEFs Ras aktivieren. GTP gebundenes Ras (GTPras) bindet an das Onkogen-Produkt Raf1/Raf2 (eine Proteinkinase) wodurch diese an die Plasmamembran transloziert und aktiviert wird. Aktives Raf phosphoryliert dann MAP2K (MAPK-Kinase), die wiederum spezifisch die MAPK (Mitogen activated protein kinase) aktiviert. Ein weiterer Aktivator der MAP2K ist die PKC (Protein Kinase C), die sie sowohl direkt, als auch über GTPras oder Raf phosphoryliert. Analog zu Raf1/2 können auch andere Proteinkinasen aktiviert werden, die ebenfalls die MAP2K (oder die analogen Kinasen der Parallelwege, s.u.) phosphorylieren. Hierzu zählen

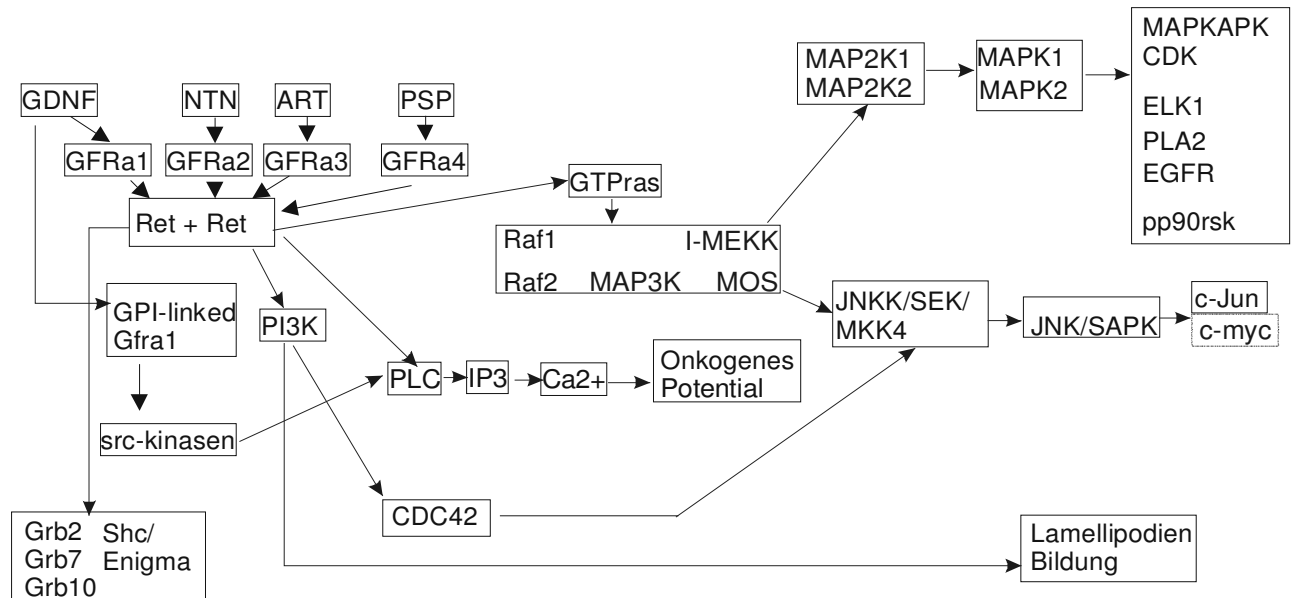
die MAP3K (*MAPK-Kinase-Kinase*), die I-MEKK (*Insulin stimulated MEKK (MAP3K)*) und MOS (*Mos-Protoonkogene-Produkt*, steuert bei *Xenopus laevis* die Oozyten-maturation).

Die Substrate für die MAPKn sind vielfältig, so werden z.B.: MAPKAP-Kinasen (*MAPK-activated-protein-Kinase*) oder die p90<sup>rsk</sup> (*90kDa ribosomal S6Kinase*) phosphoryliert, was zur Regulation der Gentranskription führt, ebenso wie die Phosphorylierung des „ternary complex“-Faktors ELK1, ein Transkriptionsfaktor, der zur Induktion des *c-fos*-Gens führt. Ein weiteres Substrat für die MAPK sind die CDKs (*cyclin-dependent-kinases*). Ihre Phosphorylierung führt zu einer Inhibition ihrer Aktivität, und dadurch kommt es zu einem Stillstand des Zellzyklus (Pumiglia and Decker 1997). Ebenfalls von der MAPK phosphoryliert werden die PLA2 (*Phospholipase A2*), deren Aktivierung führt zu einer Freisetzung von Arachidonsäure und Entzündungsmediatoren (Exton 1994) sowie der EGFR (*epidermal growth factor receptor*). Dessen Phosphorylierung bringt eine Runterregulierung („downregulation“) der Rezeptoren mit sich (Morrison, Takishima et al. 1993).

Je nach Stimulus können auf der Ebene von Raf auch noch die Parallel-Kaskaden aktiviert werden. So führt eine Stimulierung mittels TNF- $\alpha$  zu einer Aktivierung der MAP3K, die dann die MKK4 (MAP2K-Isoform 4, synonym zu JNKK und SEK, s.u.) phosphoryliert. Die MKK4/JNKK ist wiederum spezifisch für die JNK/SAPK (*Jun-N-terminal-kinase / stress-activated-protein-kinase*). JNK phosphoryliert das Protoonkogen-Produkt *c-Jun*, was dann zu einer Erhöhung der eigenen Transkriptionsaktivität führt. Wie *c-jun* dann zur Apoptose beiträgt ist noch unklar (Xia, Dickens et al. 1995). Ein weiteres Substrat für die JNK ist *c-myc*, dessen Genprodukt vielfältige Rollen in der Zellwachstumkontrolle wie RNA-Transkription und -Translation etc., übernimmt.

Wachstumsfaktorentzug führt über eine Aktivierung der MAP3K oder der I-MEKK zur Phosphorylierung von MKK3 (MAP2K-Isoform3) (oder ev. auch der JNKK) (Cobb and Goldsmith 1995) die dann spezifisch p38/HOG1 (38kDa MAPK-Isoform, *high-osmolarity glycerol response1*(bei Hefen)) aktiviert. P38/HOG1 aktiviert anschließend die MAPKAP-Kinase2, welche wieder die HSP25 oder HSP27 (*heat shock protein*) phosphoryliert und dadurch ihre antiapoptotische Wirkung inhibiert. Wie die kleinen HSP Apoptose verhindern, ist noch nicht bekannt (Welsh and Gaestel 1998).

## 2.7.4 Der GDNFR-Ret-Signalweg



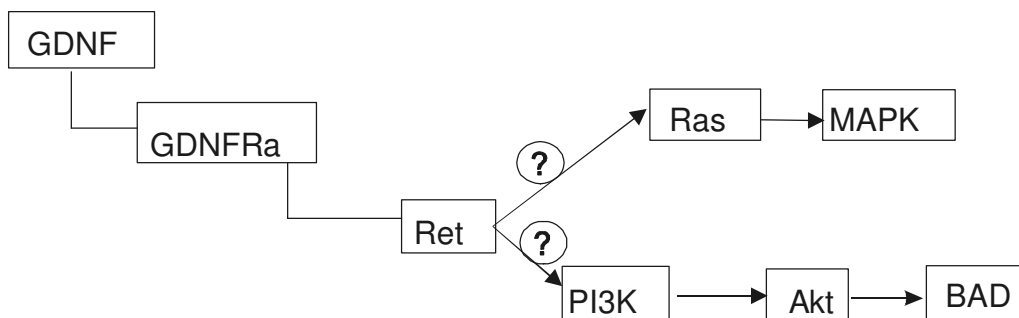
Legende: —————> Stimulierung der nachfolgenden Komponente; - - - - -> s.v., Verbindung von RET zu anderen Signalwegen; - · - · - · -> s.v., Verbindung von RTK-Ligandkomplexen zum Ras-Signalweg; - - - - -| Hemmung der nachfolgenden Komponente.

Ein Ligand für den Ret-Rezeptor Signalweg ist GDNF, oder andere Vertreter aus der GDNF-Subfamilie, der TGF- $\beta$  Familie, wie z.B. NTN (*Neurturin*), ART (*Artemin*) oder PSP (*Persephin*). Diese neurotrophen Faktoren binden an für sie spezifische Rezeptoren, so bindet GDNF an GFR $\alpha$ 1 (*GDNF-Rezeptor- $\alpha$ 1*), während NTN an GFR $\alpha$ 2, ART an GFR $\alpha$ 3 und PSP an GFR $\alpha$ 4 bindet (Airaksinen, Titievsky et al. 1999). Der Neurotrophin / GFR- $\alpha$ -Komplex interagiert anschließend mit RET (*Rearranged in Transformation*), und induziert deren Homodimerisation. RET ist ein Protoonkogen-Produkt, dessen aktive Mutationen z.B. Multiple Endokrine Neoplasien Typ2 (MEN2) oder Schilddrüsenkarzinome verursachen, während inaktive Mutationen den M. Hirschsprung (kongenitales Megakolon)(s.o.) bedingen. Nach der Homodimerisation und Autophosphorylierung kann RET je nach phosphoryliertem Tyrosin-Rest Adapterproteine wie Grb2/7/10, Shc/Enigma oder der PLC $\gamma$  binden. Enigma scheint für die korrekte Lokalisation von RET in „Signal-Zonen“ verantwortlich zu sein. Die PLC $\gamma$  (*Phospholipase C $\gamma$* ) bildet IP3 (*Inositol-Triphosphat*) als „Second-messenger“-Molekül, was dann zu einer Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> und Erhöhung der intrazellulären Konzentration führt. Dies kann dann viele Signalkaskaden aktivieren, u.a. auch die zur Regulation der Genexpression, woraus sich das onkogene Potential erklärt. Die PLC $\gamma$  kann auch unabhängig von RET über GPI-verankerten (Glycosiliertes Phosphatidyl-Inositol, ein Membran-Anker) GFR $\alpha$ 1 mittels Kinasen der Src-Familie aktiviert werden. Der Ret-Ret-Komplex ist außerdem über GTPPras in der Lage, den MAPK-Signalweg aktivieren (van Weering, Medema et al.

1995). Die PI3K ist ein weiteres Substrat von Ret, über die zum einen Lamellipodienbildung vermittelt wird (s.o.), und über die zu den rac/rho-related Proteinen (s.o.) gehörende cdc42 den JNK-Signalweg aktiviert, und so Apoptose verhindert wird (van Weering and Bos 1997; Chiariello, Visconti et al. 1998).

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Durch zahlreiche in vivo-Untersuchungen ist die gute neuroprotektive Wirkung des neurotrophen Faktors GDNF in experimentellen Modellen des M. Parkinson belegt (Gash, Zhang et al. 1996; Clarkson, Zawada et al. 1997; Granholm, Mott et al. 1997). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass an den GDNF-Rezeptor  $\alpha$  (GFR $\alpha$ ) gebundenes GDNF den Ret-Rezeptor aktiviert und so seine zelluläre Wirkung vermittelt (Jing, Wen et al. 1996; Airaksinen, Titievsky et al. 1999) Rezeptor-Tyrosin Kinasen aktivieren verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege, von denen die MAP-Kinasen-Kaskade und der PI3K-abhängige Signalweg die größte Bedeutung zu haben scheinen. Insbesondere der PI3K-Signalweg ist von großem Interesse für neuroprotektive Ansätze, da er über die Aktivierung der PKB u.a. ein anti-apoptotisches Signal vermittelt. Dabei scheint v.a. die PKB-abhängige Phosphorylierung des BCL-2-Familie Mitglieds BAD eine Hemmung der Apoptose zu fördern. Phospho-BAD wird an 14-3-3-Protein gebunden und kann dann nicht länger BCL-2 blockieren. Demgegenüber konnte für den MAPK-Signalweg gezeigt werden, daß insbesondere neurotrophe Differenzierungseffekte vermittelt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die endogenen GDNF-vermittelten Signal-Transduktionswege zu charakterisieren, und dabei insbesondere nachzuweisen, ob eine Verbindung zwischen dem GDNFR-Ret-Rezeptorkomplex und dem PI3K-Akt-BAD-Signalweg besteht. Ferner sollte überprüft werden, ob dieser Signalweg als Reaktion auf Stimulation von neuronalen Zellen mit GDNF funktional aktiviert wird. Dieser hypothetische Signalweg sollte folgende Komponenten umfassen:



Legende:  $\longrightarrow$  Stimulierung der nachfolgenden Komponente

Dabei sollte durch funktionelle Blockade der verschiedenen Schlüsselproteine versucht werden, deren Substrate auszuschalten und so einen bevorzugten Signalweg von GDNF zu zeigen. Im einzelnen sollte eine Inhibition der PI3K eine Blockade der Aktivierung von Akt und BAD durch GDNF zur Folge haben, während eine Blockade der MAPK ohne Einfluß auf die Phosphorylierung von Akt bleiben sollte. Ebenso sollte die Spezifität des Effektes von GDNF auf den Signalweg durch Vergleich mit einem Kontrollfaktor, EGF, überprüft werden.

## **4 Material und Methodik**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Chemikalien und Geräte**

Alle in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden – soweit nicht anders vermerkt – von Boehringer Ingelheim Bioproducte, Ingelheim und von Roth, Karlsruhe bezogen. Die sterile Plastikware für die Zellkultur stammt von Falcon, New Jersey, NJ, USA. Alle Medien (RPMI und DMEM) sowie das Fötale Kälber-Serum (FCS), Pferde-Serum, Trypsin, Glutamin, Penicillin und Streptomycin wurden bei Gibco-BRL, Karlsruhe, bestellt.

Alle Chemikalien für das Protein-Assay nach Bradford (Bradford 1976) wurden bei Biorad, München bezogen. Rh-GDNF und rh-EGF stammten ebenso wie Wortmannin, Genistein und PD098059 von Sigma-Aldrich, Deisenhofen.

Die Röntgenfilme Kodak X-OMAT MA und Kodak Biomax light stammten von Eastman Kodak, Rochester, USA.

Polyvinylidene difluoride (PVDF) Immobilon Membranen wurden von Milipor, Bedford, MA, USA bezogen.

Folgende Geräte kamen zum Einsatz:

Die Zellen wurden in einem Sterikult 200 Inkubator kultiviert. Die Protein-Gelelektrophoresekammer sowie die Blotkammer stammten von Biorad, Hercules, CA, USA. Die Spannungsquellen stammten von Pharmacia LKB, Freiburg, BRD.

#### **4.1.2 Zelllinien**

Folgende Zelllinien wurden eingesetzt:

SH-SY5Y-Zellen (Biedler, Helson et al. 1973), eine humane Neuroblastom-Zelllinie, sowie PC12-Zellen (Greene and Tischler 1976), eine Rattenphäochromozytom-Linie, stammten von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig.

#### **4.1.3 Puffer und Lösungen**

Folgende Standardpuffer (modifiziert nach Sambrook (Sambrook 1989) wurden eingesetzt:

TBS Puffer (pH 7,5): 20 mM Tris, 138 mM NaCl

TTBS Puffer: 20 mM Tris, 138 mM NaCl, 0,1% Tween 20

SDS Ladepuffer: 62.5 mM Tris-Cl (pH 6,8), 2% SDS, 10% Glycerol, 50 mM DTT,  
0,1% Bromphenol Blau

Zellyse Puffer: 20 mM Tris-Cl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% TritonX-100, 2,5 mM Natrium Pyrophosphate, 1 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin, 1 mM PMSF

PBS Puffer: 138 mM NaCl, 4,3 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

Bradford-Reagenz: 0,01% Coomassie Brilliant Blau G-250, 4,7% Ethanol, 8,5% Phosphorsäure,  $\text{H}_2\text{O}$  ad 1 Liter

#### **4.1.4 Antikörper**

Zum Proteinnachweis wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Der Anti-phospho-Akt-Antikörper (Polyklonales Kaninchen-IgG, erkennt AS S\*473 in Maus Akt), der Anti-total-Akt- Antikörper (ebenfalls polyklonales Kaninchen-IgG, erkennt AS 466-479 in Maus Akt), der Anti-phospho-MAPK- Antikörper (polyklonales Kaninchen-IgG, erkennt AS T\*202 und T\*204 der humanen MAPK), der Anti-total-MAPK- Antikörper (ebenfalls polyklonales Kaninchen-IgG, erkennt AS 345-358 der Ratten-MAPK) sowie der Anti-BAD-Antikörper (polyklonales Kaninchen-IgG, erkennt AS S112 in Maus-BAD) stammten von New England Biolabs, Inc., Beverly, USA, der PI3K-Antikörper (monoklonales Maus-IgG, Klon AB6, Isotyp  $\text{IgG}_{1\kappa}$ ) stammt von Calbiochem, San Diego, CA, USA. Der anti-Phosphotyrosin-Antikörper (monoklonales Maus-IgG, Klon PY20, Isotyp  $\text{IgG}_{2\text{b}\kappa}$ ) wurde bei Oncogene, Cambridge, MA, USA erworben. Der anti-Ret-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Antikörper (polyklonales Ziegen-IgG, Klon C-19) und der Anti-EGFR-Antikörper (Polyklonales- Kaninchen IgG, Klon 1005) wurden bei Santa Cruz, NM, USA bezogen, während der Anti-14-3-3-Protein-Antikörper (Polyklonales- Kaninchen IgG, erkennt die  $\epsilon$ -Isoform von Maus-14-3-3-Protein) , und der Anti-GFR $\alpha$ -1-AK (Polyklonales- Kaninchen IgG, erkennt AS 369-382 des humanen GFR $\alpha$ 1) bei Upstate, Lake Placid, NY, USA bestellt wurden. Als zweite Antikörper wurden an Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper verwendet, die gegen verschiedene Spezies gerichtet sind, so stammten die Anti-Kaninchen-Immunglobuline ebenfalls von New England Biolabs, die Anti-Maus- und Anti-Ziege-Antikörper von Calbiochem, San Diego, CA, USA.

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Zellkultur**

Die SH-SY5Y-Zellen wurden als Monolayer-Kulturen in 250ml-Flaschen oder in 10cm Petrischalen mit DMEM Medium gehalten, welches mit 15%FCS, 100U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin supplementiert war. Die PC12-Zellen wurden ebenfalls als

Monolayer-Kulturen in 250ml-Flaschen oder in 10 cm Petrischalen, welche mit Rattenschwanz-Kollagen beschichtet waren, kultiviert. Als Medium erhielten sie RPMI 1640 mit 10% Pferde-Serum, 5% FCS, 2mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin. Die Zellen wuchsen bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> und 92% Luftfeuchtigkeit bis zu einer Dichte von 80% (entspricht einer Zellzahl von 10<sup>5</sup> Zellen / 2,3cm<sup>2</sup>), bevor sie subkultiviert oder für die Versuche verwendet wurden.

#### **4.2.2 Stimulation**

Um Nebeneffekte der im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren zu vermeiden, wurden die Zellen vor einem Versuch 24 Stunden in Serum-freien Medium gehalten. Als spezifischer PI3K – Inhibitor wurde Wortmannin für 30 Minuten bei einer Konzentration von 234nmol/ml (100ng/ml)[Powis, 1994 #168]Medium eingesetzt, als klassischen MAPK- und MAPKK-Inhibitor wurde PD098059 mit 50µmol/ml[Alessi, 1995 #169] für 30 Minuten verwendet und als unspezifischer Tyrosin-Kinase-Inhibitor wurde Genistein in einer Konzentration von 300nmol/ml[Akiyama, 1987 #171][Wells CL, 1999 #234]Medium für 1 Stunde eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle für den MAPK-Signalweg wurden die Zellen mit 0,992pmol/ml Medium (10ng/ml) EGF (epidermal growth factor) für 5 Minuten.. Dieser Wachstumsfaktor wurde entweder direkt, oder zu den mit den Inhibitoren vorbehandelten Zellen gegeben. So wurde zum Beispiel erst 30 min mit Wortmannin die PI3K gehemmt, und dann wurde mit EGF stimuliert. Die Effekte von GDNF (glial-cell-line-derived-neurotrophic-factor) wurden bei Konzentrationen von 0,331pmol/ml (10ng/ml) Medium für 15 Minuten beobachtet. So wurden auch hier die Zellen entweder für die entsprechende Zeit (z.b. 60min für Genistein) mit den Inhibitoren vorbehandelt, und anschließend wurde GDNF hinzugefügt, oder GDNF wurde direkt zu den Zellen gegeben. Die PC12-Zellen wurden mit 0,509pmol/ml (100ng/ml) NGF, 9,92pmol/ml (100ng/ml) EGF, 0,993pmol/ml (30ng/ml) GDNF und ebenfalls mit 50mmol/l Haloperidol und 500mmol/l Metamphetamin behandelt, um die Auswirkungen sowohl auf die MAPK als auch auf Akt zu untersuchen. Zudem wurden bei jedem Versuch unbehandelte Zellen, die ebenfalls serumfrei gehalten wurden, als Leerkontrolle mitgeführt. Im Anschluß an die entsprechende Stimulation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, um die Stimulation zu beenden, und dann auf Eis wie unten beschrieben lysiert.

#### **4.2.3 Proteinextraktion**

In Anlehnung an das Standardprotokoll nach Sambrook (Sambrook 1989) wurden die Zellen nach Spülung mit eiskaltem PBS durch Inkubation mit TritonX-100-Lysis-Puffer (mit Leupeptin als Proteaseinhibitor) für 10min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde mit einem

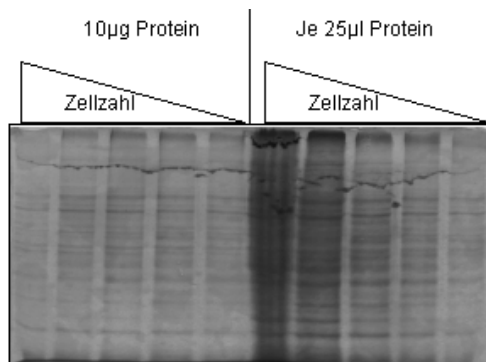


Zellschaber abgekratzt, und in Eppendorf-Hütchen überführt. Der Zelldebris wurde abzentrifugiert (10.000Upm, 10min, 4°C) und der Überstand bei -80°C aufbewahrt.

Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mittels der Methode nach Bradford (Bradford 1976) ermittelt.

#### 4.2.4 Bradfordassay

Das Bradfordassay beruht auf dem Prinzip, daß Proteine, welche an Coomassie-Blau binden, dessen Absorptionsmaximum von 465nm nach 595nm verschieben, und daß die bei dieser Wellenlänge gemessene Absorption proportional zu der in der Probe vorhandenen Proteinmenge ist (Bradford 1976). Die Proben wurden zunächst in PBS bzw. in PBS und 0,01% TritonX-100 1:200 bzw. 1:400 verdünnt. Anschließend wurde das Bradford-Reagenz (siehe 4.1.3) hinzugegeben und mit den Proben gemischt, die dann gegen einen Leerwert aus 0,01% TritonX-100 in PBS und Bradford-Reagenz gemessen wurden. Abschließend wurde die Absorption gegen einen Protein-Standard mit bekannten Konzentrationen aufgetragen und daraus die Konzentration in der Ausgangsprobe berechnet.



*Abbildung 4: Coomassie gefärbtes SDS -PAGE : auf der einen Hälfte wurden je 10µg Protein (nach Bradford) aufgeladen, auf der anderen jeweils 25µl von Lysaten aus 500000,250000,150000,100000 und 50000 Zellen (v.L.n.R).*

#### 4.2.5 SDS-PAGE

Dazu wurde 10µg des isolierten Proteins in 5-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer aufgenommen und 5min bei 100°C denaturiert, anschließend nochmals für 10sek abzentrifugiert und auf 10%ige denaturierende SDS-Polyacrylamidgele geladen. Im Anschluß daran wurde die Elektrophorese in der vertikalen Mini-Protein-Kammer von Biorad bei 70-80V für 1,5h in SDS-Laufpuffer (siehe 4.1.3) durchgeführt.

#### 4.2.6 Western Blot

Die SDS-Gele wurden nach Sambrook (Sambrook 1989) in einem Halbtrockenen („semi-dry“) System mit drei Puffern (Anodenpuffer1: 0,3M Tris, 20% Methanol, Anodenpuffer2: 25mM Tris, 20% Methanol, Kathodenpuffer: 25mM Tris, 40mM ε-amino-n-capronsäure, 20% Methanol) (150mA,1h), oder im Tank-System („wet-blot“) mit 25mM Tris, 40mM Glycin und 15% Methanol (14V, 12h) auf PVDV-Membranen (Immobilon) geblottet Nach

dem Transfer der Proteine wurde die Membran 1h in TTBS + 5% fettfreiem Magermilchpulver geblockt, 3x5min mit TTBS gewaschen und für 12h mit dem 1. Antikörper bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurde die Membran wieder 3x5min in TTBS gewaschen, und mit dem Sekundär-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Immunreaktion durch verstärkte Chemielumineszenz-Reaktion mit dem ECL-Reagenz von Amersham sichtbar gemacht. Die Reaktion basiert auf einem Umsetzen des in dem Reagenz enthaltenen Substrats in einen fluoreszierenden Farbstoff durch die Meerrettich-Peroxidase des Sekundär-Antikörpers. Durch Exposition von hochsensiblen Röntgenfilmen wie Kodak BioMax light für 30 und 60sek oder X-OMAT MA für 5 min kann man diese Fluoreszenzreaktion visualisieren.

#### **4.2.7 Behandlung der Membranen zur Expressionskontrollen-Analyse**

Zum Nachweis der Gesamtexpression einiger Proteine wurden die Membranen in 0,1M Glycin pH2,5 20 min. gestriipt und nachfolgend wieder in TTBS + 5% Magermilchpulver geblockt. Anschließend wurden die Membranen 3x5min mit TBS gewaschen und danach mit dem entsprechenden Primärantikörper für 12h bei 4°C inkubiert, 3x5min mit TBS gewaschen und dann wieder mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgend wurde 3x5 min mit TBS gewaschen, und die Immunreaktion wie unter 4.2.6 beschrieben durch Chemilumineszenz und Exposition auf Röntgenfilme dargestellt.

#### **4.2.8 Immunpräzipitation**

Zunächst wurden 500µg Protein und 10µl des Primärantikörpers in einer 1:100 Verdünnung (Protein und Lyse-Puffer) in einem Volumen von 1ml über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde Protein-A-Sepharose ( 50% Sepharose in PBS + 0,1% NaNitrat) hinzugefügt, und nochmals 2h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Darauf folgend wurden die Immunkomplexe bei 13.000 Upm für 1min abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde daraufhin 2x mit Lysepuffer gewaschen und anschließend in 90µl SDS-Ladepuffer (siehe 4.1.3) aufgenommen und 10min bei 100°C denaturiert. Im Anschluß daran wurden die Proben abzentrifugiert und 10µl des Überstandes auf ein SDS-Gel aufgetragen. Mit dem Gel wurde dann wie beim Western-Blot, wie unter 4.2.6 beschrieben, weiterverfahren.

#### **4.2.9 Immunpräzipitationsassay**

Dieses Assay beruht darauf, das phosphoryliertes BAD an das 14-3-3-Protein (siehe 4.1.4) bindet und dadurch BCL-X<sub>L</sub> freigibt, wodurch dies seine Antiapoptotische Wirkung entfalten

kann. Hier wurde also, wie oben beschrieben, das 14-3-3-Protein immunpräzipitiert, und dann mit einem BAD-Antikörper (siehe 4.1.4) die Menge des daran gebundenen BAD-Proteins gezeigt. Dadurch wurde indirekt die Menge des phosphorylierten BADs nachgewiesen.

Analog dazu wurde bei der PI3K mit einem Anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper (siehe 4.1.4) alles an Tyrosin-Resten phosphoryliertes Protein immunpräzipitiert, und anschließend mit einem PI3K-Antikörper (siehe 4.1.4) nach dem Anteil dieses Proteins unter dem Immunpräzipitat geschaut. Auch hier wurde somit indirekt die Phosphorylierung der PI3K nachgewiesen.

#### **4.2.10 Radioaktives Akt-Assay**

Hierbei handelt es sich um ein Assay mit „heißem“ (radioaktivem) ATP. In diesem Assay wird H2B (*Histone 2B*) als Substrat von HA-Akt (an *HämAgglutinin*-gebundenes Akt) phosphoryliert, und dabei wird radioaktiv markiertes Phosphat vom  $\gamma$ ATP auf H2B übertragen. Die auf dem Röntgenfilm nachweisbare Schwärzung ist proportional zur phosphorylierten Menge von H2B bzw. zur Aktivität von Akt in der jeweiligen Probe. Für dieses Assay wurden PC12-Zellen verwendet, die mit HA-gekoppelten Akt stabil transfiziert wurden, um einen Effekt dieser Kinase auf die Zellen sehen zu können.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Nachweis des GFR $\alpha$ in den SH-SY5Y-Zellen

Der Nachweis des GDNF- Rezeptors GFR $\alpha$  wurde durch Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und Genistein, GDNF, GDNF und Genistein sowie Genistein allein behandelt. Als Kontrollen wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigte sich GFR $\alpha$ -1 als immunreaktives 48kDa Protein in allen Proben Es ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Intensität der immunreaktiven Bande im Western-Blot (Abbildung 5).

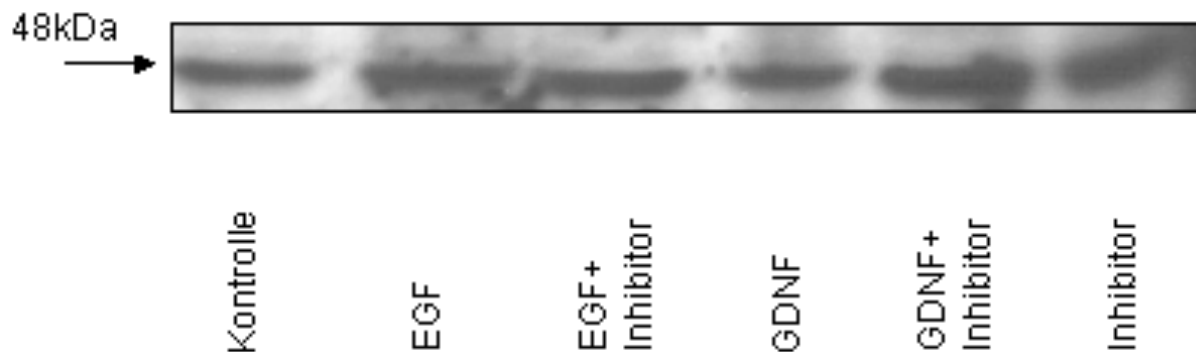


Abbildung 5: Expressionsnachweis des GFR $\alpha$ -1 in SH-SY5Y-Zellen nach Stimulation mit EGF, GDNF und Genistein. Als Kontrolle wurden jeweils unbehandelte Zellen mitgeführt.

### 5.2 Nachweis des Ret-Rezeptors in SH-SY5Y-Zellen.

Der Nachweis des GDNF-GFR $\alpha$ -Komplex bindenden Ret-Rezeptors wurde durch Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und Genistein, GDNF, GDNF und Genistein sowie Genistein allein behandelt. Als Kontrollen wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigte sich der Ret-Rezeptor als immunreaktives 150kDa und 170kDa großes Protein in allen Proben, wobei die 150kDa Form der errechneten unglykosylierten Variante entspricht. Dabei fand sich kein quantitativer Unterschied in der Expression des Ret-Rezeptors zwischen den einzelnen Behandlungsprotokollen (Abbildung 6).

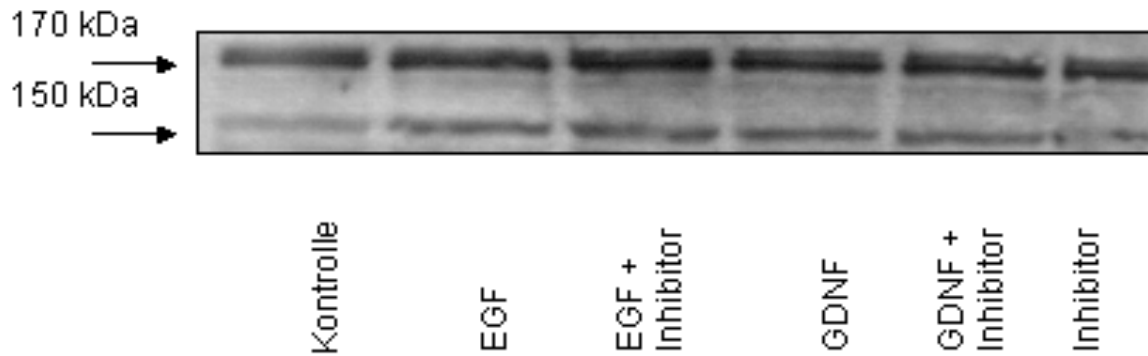


Abbildung 6: Expressionsnachweis des Ret-Rezeptorproteins in den SH-SY5Y-Zellen nach Stimulation mit EGF, GDNF und Genistein. Der Rezeptor stellt sich als 170 kDa große und als 150 kDa große immunreaktive Bande dar.

### 5.3 Nachweis des EGF-Rezeptors

In der vorliegenden Arbeit wurde EGF als bekannter Aktivator des MAPKinasen – Signalweges benutzt, um die proliferativen Effekte in den SH-SY5Y-Zellen zu untersuchen, und um einen Stimulus durch einen anderen Wachstumsfaktor zu haben. Daher wurde in der Western-Blot-Analyse die Expression des EGF-Rezeptors in den Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen, welche mit EGF, EGF und Wortmannin, GDNF, GDNF und Wortmannin, und Wortmannin alleine behandelt wurden. Das Rezeptor-Protein stellte sich im Western-Blot als 170 kDa große immunreaktive Bande dar, wobei der Antikörper noch eine 186 kDa und 160 kDa Variante erkennt, welche durch alternatives Spleißen (die kleinere Variante) bzw. durch Glykosylierung (die größere Variante) zustande kommen.

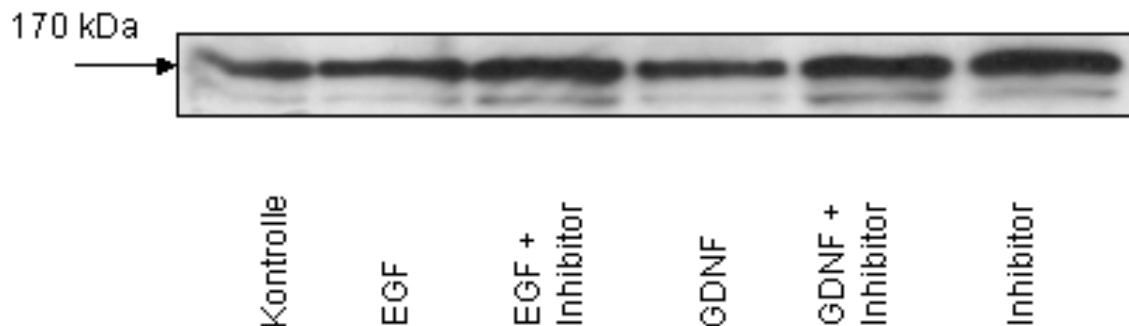


Abbildung 7 Expressionsnachweis des EGF-Rezeptors in den SH-SY5Y-Zellen nach Stimulation mit EGF, GDNF und Wortmannin. Der Rezeptor zeigt sich als 170 kDa große immunreaktive Bande in allen Proben. Außerdem erkennt der Antikörper noch eine 186kDa und 160kDa große Variante.

### 5.4 Nachweis der phosphorylierten PI3K

Um phosphorylierte PI3K in den SH-SY5Y-Zellen nachweisen zu können, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt, da die gängigen Antikörper nicht die phosphorylierten

Anteile der PI3K erkennen (siehe Abb8.). Zunächst wurde mit Hilfe des Phosphotyrosin ((Ab-4) PY20)-Antikörpers alles an Tyrosin-Resten phosphoryliertes Protein immunpräzipitiert, und anschließend mit einem gegen die 85kDa Untereinheit gerichteten PI3K-Antikörper deren phosphorylierte Anteile im Western-Blot detektiert. Hierbei zeigte sich eine Wachstumsfaktor-abhängige und Inhibitor-sensitive Phosphorylierung eines 55kDa großen Proteins, die einer bekannten Spleiß-Variante der 85 kDa Untereinheit entspricht.

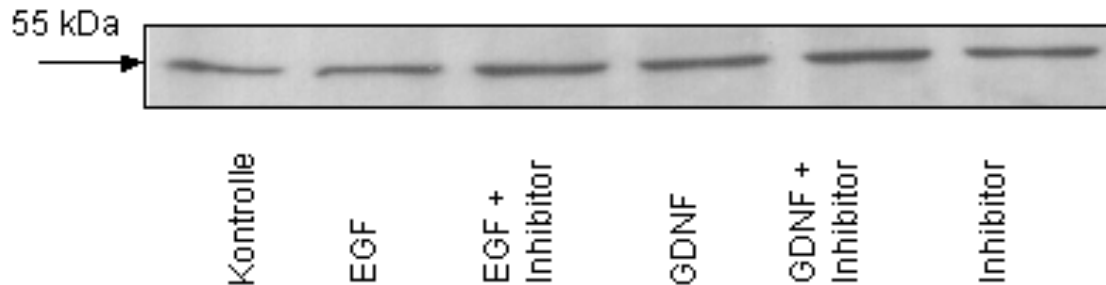


Abbildung 8 Expressionsnachweis der unphosphorylierten PI3K in Proteinextrakten der SHSY5Y-Zellen. Es zeigt sich kein Unterschied der Intensität der immunreaktiven Bande in den Proben.

#### 5.4.1 Phosphorylierung der PI3K mit Genistein als Inhibitor

Der Nachweis der phosphorylierten PI3K wurde mittels Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und Genistein, GDNF, GDNF und Genistein sowie Genistein allein behandelt. Als Kontrollen wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigte sich die PI3K als 55kDa große immunreaktive Bande. Hierbei zeigte sich, daß unter Zugabe von 300µmol/l Genistein die Intensität der immunreaktive Bande im Vergleich zum Basislevel abnahm, ebenso wurde die Intensität der Immunreaktion, welche durch Stimulation mit EGF und GDNF erreicht wurde, durch Genistein unter Basisniveau gedrückt.

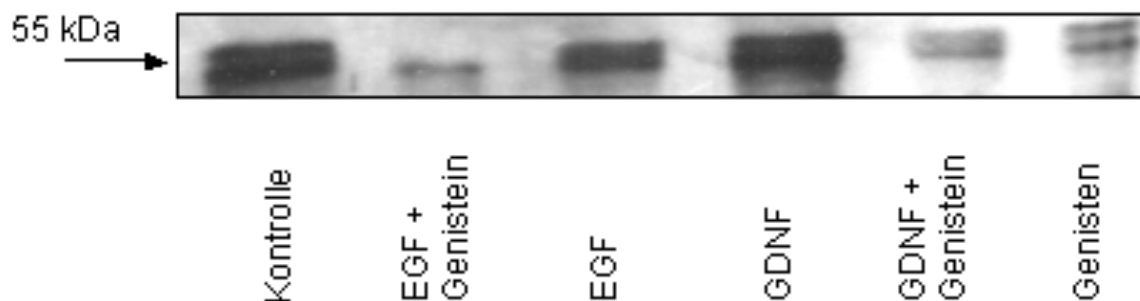
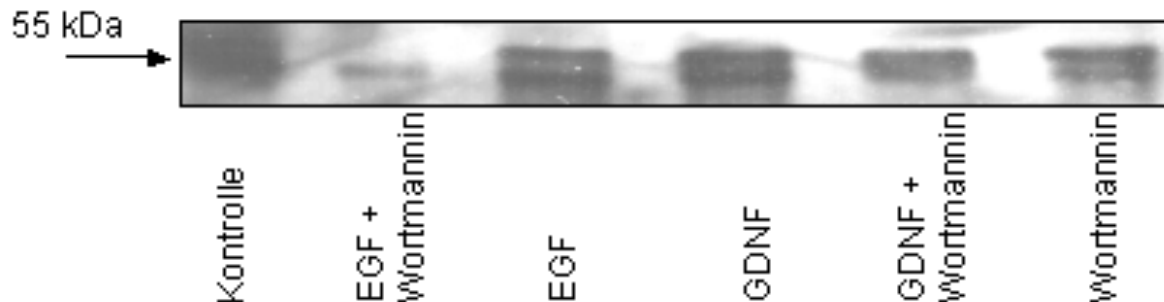


Abbildung 9: Wachstumsfaktor-abhängige und Genistein-sensitive Phosphorylierung der PI3K. Bei Zugabe von Genistein wird die Intensität der immunreaktiven Bande unter Basisniveau reduziert; ebenso wird die durch EGF, oder nochmehr durch GDNF, gesteigerte Immunreaktion deutlich reduziert.

### 5.4.2 Wortmannin-sensitive Phosphorylierung der PI3K

Der Nachweis der phosphorylierten PI3K wurde mittels Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und Wortmannin, GDNF, GDNF und Wortmannin, sowie Wortmannin allein behandelt. Als Kontrollen wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigte sich die PI3K als 55 kDa große immunreaktive Bande. Hierbei zeigte sich, daß unter Zugabe von 234nmol/l Wortmannin die Intensität der immunreaktiven Bande, welche durch Stimulation mit EGF und GDNF erreicht wurde, unter Basisniveau reduziert wurde.



*Abbildung 10: Wachstumsfaktor und Wortmannin sensitive Phosphorylierung der PI3K in den SH-SY5Y-Zellen. Hierbei wird deutlich, daß Wortmannin stark die EGF-abhängige und weniger stark die GDNF-abhängige Immunreaktion reduziert.*

### 5.4.3 PD098059 –sensitive Phosphorylierung der PI3K

Der Nachweis der phosphorylierten PI3K wurde mittels Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und PD098059, GDNF, GDNF und PD098059 sowie PD098059 allein behandelt. Als Kontrollen wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigte sich die PI3K als 55 kDa große immunreaktive Bande. Hierbei zeigte sich, daß unter Zugabe von 50mmol/l PD098059 die Intensität der immunreaktive Bande v.a. der Extrakte der mit GDNF und PD098059 behandelten Zellen und kaum der mit EGF und PD098059 im Vergleich zum Basislevel abnahm.

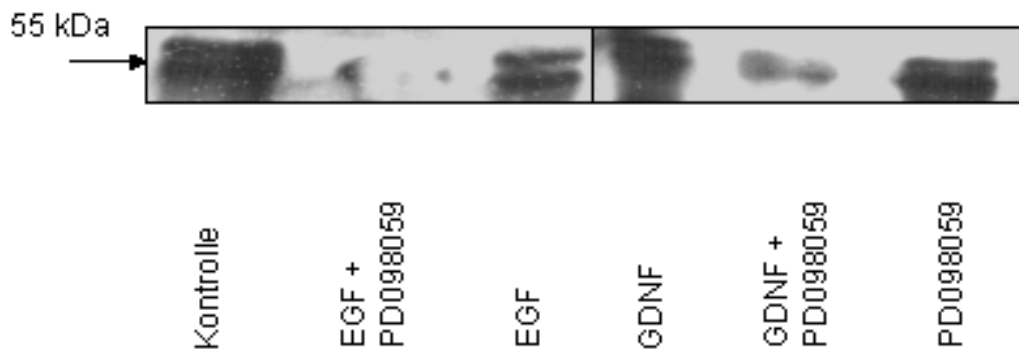


Abbildung 11: Wachstumsfaktor-abhängige und PD098059- sensitive Phosphorylierung der PI3K. Hier zeigt sich, daß die Wachstumsfaktoren kaum noch die Basisphosphorylierung erhöhen, jedoch eine deutliche Reduktion der Immunreaktion durch PD098059 stattfindet. Im Gegensatz dazu hat PD098059 allein kaum einen Effekt.

## 5.5 Nachweis von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Akt

Zur Detektion des phosphorylierten Akt wurde der Phospho-Akt(pSer473)-Antikörper, und zur Detektion des unphosphorylierten Akt der Akt(Ser473)-Antikörper, benutzt. Diese Antikörper reagieren mit Akt als eine 58 kDa Bande in der Western-Blot-Analyse.

### 5.5.1 Genistein- sensitive Phosphorylierung von Akt

Der Nachweis von phosphoryliertem Akt wurde mittels Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und Genistein, GDNF, GDNF und Genistein sowie Genistein allein behandelt. Als Kontrollen wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigt sich Akt als 58kDa große immunreaktive Bande. Hierbei zeigte sich, daß unter Zugabe von 300µmol/l Genistein die Intensität der immunreaktive Bande kaum im Vergleich zu den Extrakten der nur mit Wachstumsfaktoren behandelten Zellen abnahm. Lediglich die Kontrolle und die nur mit Genistein behandelten Zellen zeigten eine geringere Intensität.



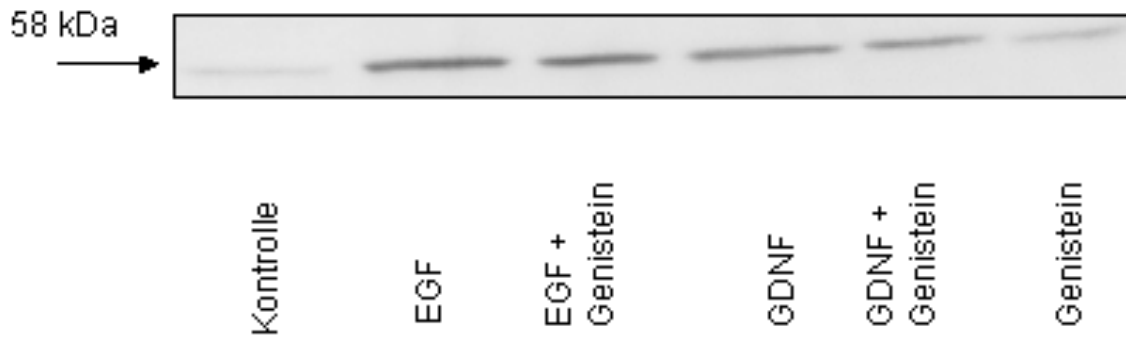


Abbildung 12: Nachweis von phosphoryliertem Akt in SH-SY5Y-Zellen nach Stimulation mit EGF, GDNF und Genistein. Hierbei zeigt sich keine Reduktion der im Vergleich zur Kontrolle durch EGF und GDNF erhöhten Intensität bei Behandlung der Zellen mit Genistein.

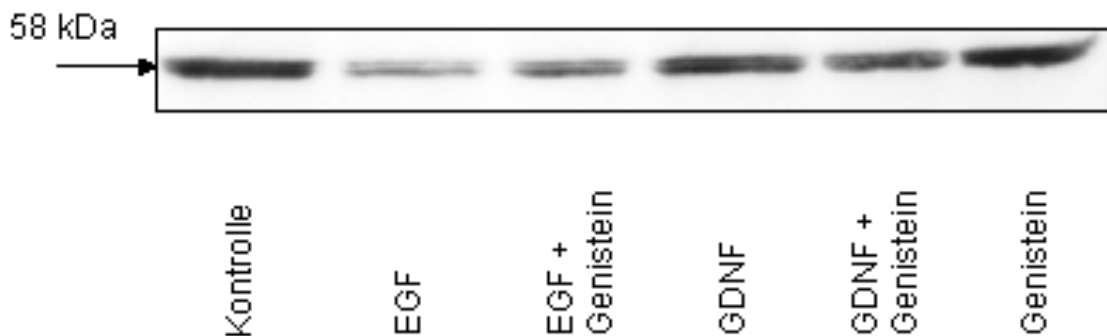


Abbildung 13: Expressionskontrolle von unphosphoryliertem Akt bei demselben Blot wie in Abbildung 12. Hier zeigt sich, daß in den Spuren von EGF und EGF und Genistein sogar etwas weniger Akt exprimiert wird als in den Restlichen, ansonsten zeigt sich eine gleichmäßige Expression des Proteins.

### 5.5.2 Wortmannin-abhängige Phosphorylierung von Akt

Der Nachweis von phosphoryliertem Akt wurde mittels Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und Wortmannin, GDNF, GDNF und Wortmannin sowie Wortmannin alleine behandelt. Als Kontrollen wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigt sich Akt als 58kDa große immunreaktive Bande. Hierbei zeigte sich, daß unter Zugabe von 234nmol/l Wortmannin die Intensität der immunreaktive Bande in den mit EGF und Wortmannin bzw. GDNF und Wortmannin oder Wortmannin alleine behandelten Zellen im Vergleich zu den Extrakten der nur mit Wachstumsfaktoren behandelten Zellen deutlich reduziert wurde.

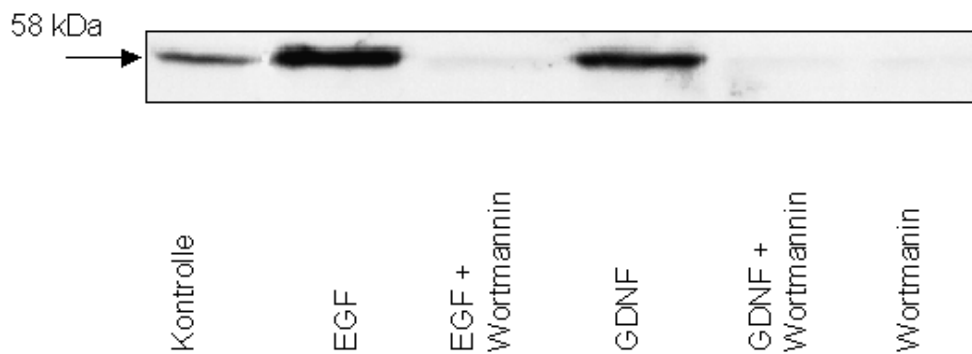


Abbildung 14: Nachweis von phosphoryliertem Akt in Extrakten von mit EGF, GDNF und Wortmannin behandelten SH-SY5Y-Zellen. Durch Wortmannin wurde die durch EGF und GDNF erhöhte Immunreaktion stark reduziert.

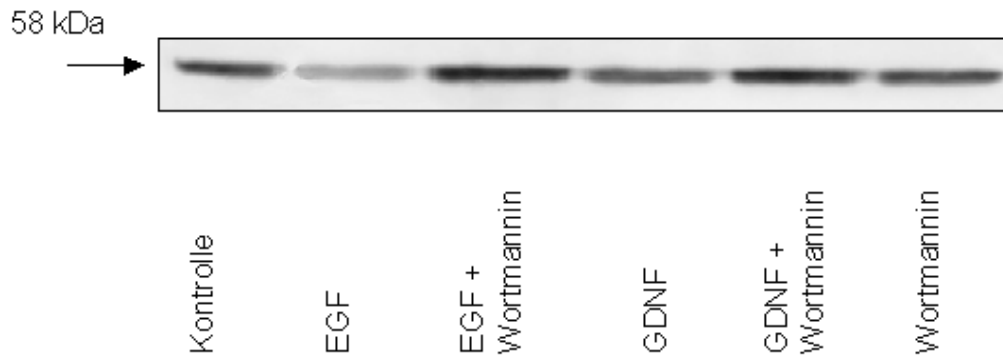


Abbildung 15: Expressionskontrolle von unphosphoryliertem Akt in demselben Blot wie in Abbildung 14. Dabei fällt auf, daß in der EGF-Spur weniger Protein exprimiert wird als in den restlichen Spuren, die eine gleichmäßige Expression zeigen.

### 5.5.3 PD098059-sensitive Phosphorylierung von Akt

Der Nachweis von phosphoryliertem Akt wurde mittels Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und PD098059, GDNF, GDNF und PD098059 sowie PD098059 allein behandelt. Als Kontrollen wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigt sich Akt als 58kDa große immunreaktive Bande. Hierbei zeigte sich, daß unter Zugabe von 50mmol/l PD098059 die Intensität der immunreaktiven Bande im Vergleich zu den Extrakten der nur mit Wachstumsfaktoren behandelten Zellen zunahm.

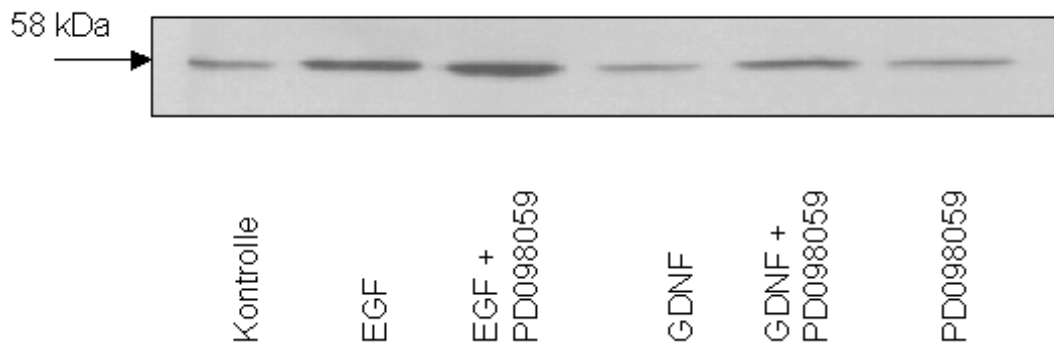


Abbildung 16: Nachweis von Phosphoryliertem Akt in mit EGF, GDNF und PD098059 behandelten Zellen. Dabei zeigt sich, daß unter der Zugabe von PD098059 die Intensität der Immunreaktiven Bande zunahm

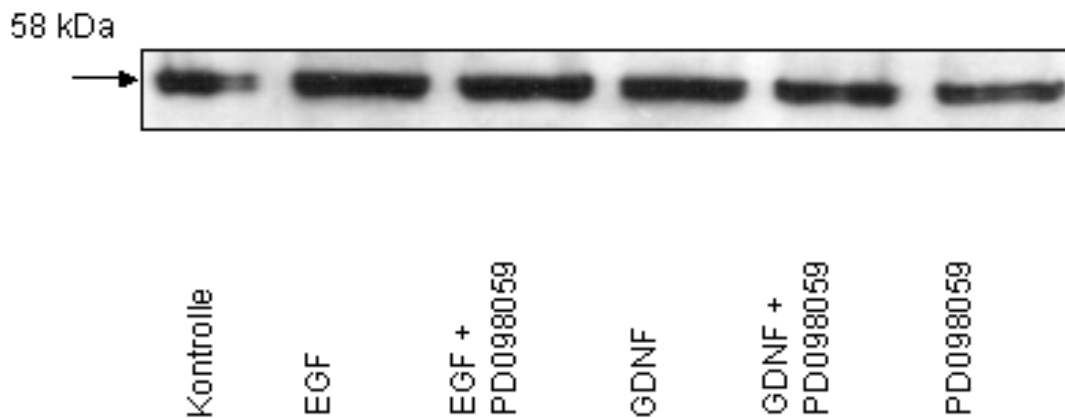


Abbildung 17: Expressionskontrolle des Akt-Proteins in demselben Blot wie in Abbildung 16. Hier ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Intensität der Immunreaktion in allen Proben.

## 5.6 Inhibitor-sensitive Phosphorylierung der MAPK

Mit Hilfe des Phospho-p44/42 MAPKinase Antiköpers und des p44/42 MAPKinase-Antiköpers wurde die phosphorylierte und unphosphorylierte MAPK in Proteinextrakten aus mit EGF, GDNF und Inhibitoren behandelten SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen. Der Antikörper erkennt sowohl die 42kDa wie auch die 44kDa Isoformen der MAPK, die dann als Doppelbande erscheinen.

### 5.6.1 Genistein-anhängige Phosphorylierung der MAPK

Der Nachweis der phosphorylierten MAPK wurde mittels Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und Genistein, GDNF, GDNF und Genistein sowie Genistein

allein behandelt. Als Kontrollen wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigen sich die beiden Isoformen als 42 und 44kDa große immunreaktive Doppelbande. Hierbei zeigte sich, daß unter Zugabe von 300µmol/l Genistein die Intensität der immunreaktiven Banden im Vergleich zu den Extrakten der nur mit Wachstumsfaktoren behandelten Zellen deutlich abnahm, und daß die durch GDNF verursachte Phosphorylierung geringer ist, als die von EGF

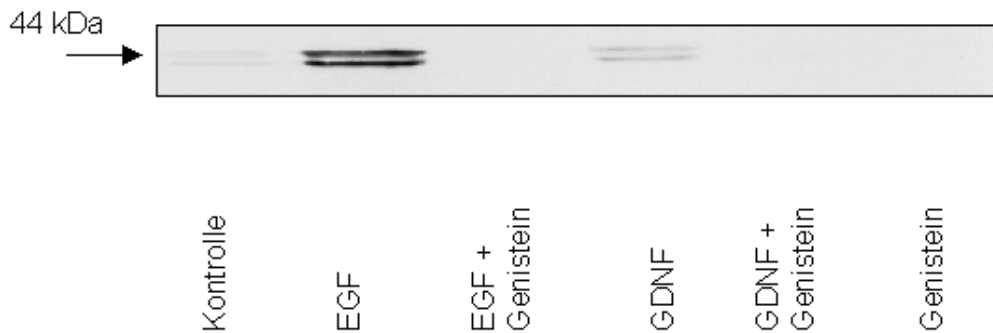


Abbildung 18: Nachweis von phosphorylierter MAPK in mit EGF, GDNF und Genistein behandelten Zellen. Dabei fällt eine sehr starke Reduktion der im Vergleich zur Kontrolle durch die Wachstumsfaktoren erhöhten Intensität der immunreaktiven Banden auf, wobei der Effekt durch GDNF deutlich geringer ist als der von EGF.

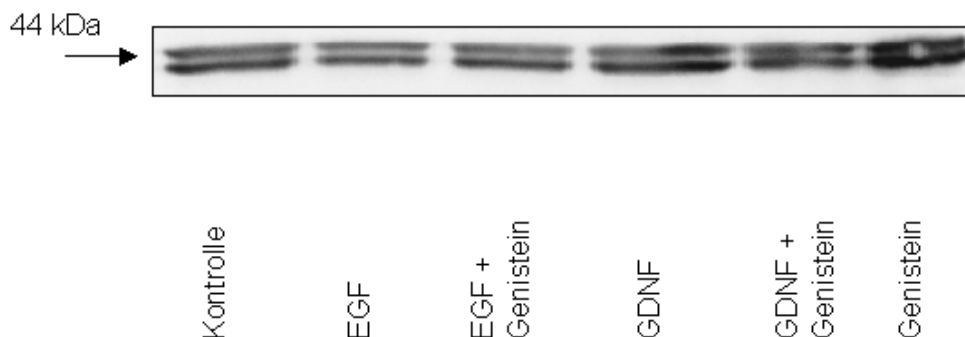


Abbildung 19: Expressionskontrolle der unphosphorylierten MAPK in demselben Blot wie in Abbildung 18. Es ergaben sich keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Intensität der immunreaktiven Bande.

## 5.6.2 Wortmannin-sensitive Phosphorylierung der MAPK

Der Nachweis der phosphorylierten MAPK wurde mittels Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und Wortmannin, GDNF, GDNF und Wortmannin sowie Wortmannin allein behandelt. Als Kontrollen wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigen sich die beiden Isoformen als 42 und 44kDa große immunreaktive Doppelbande. Hierbei zeigte sich, daß unter Zugabe von 234nmol/l

Genistein die Intensität der immunreaktiven Banden kaum beeinflusst wurde. Wie auch schon im Abbildung 18 zeigte sich hier, daß GDNF eine weniger starke Phosphorylierung der MAPK verursacht als EGF.

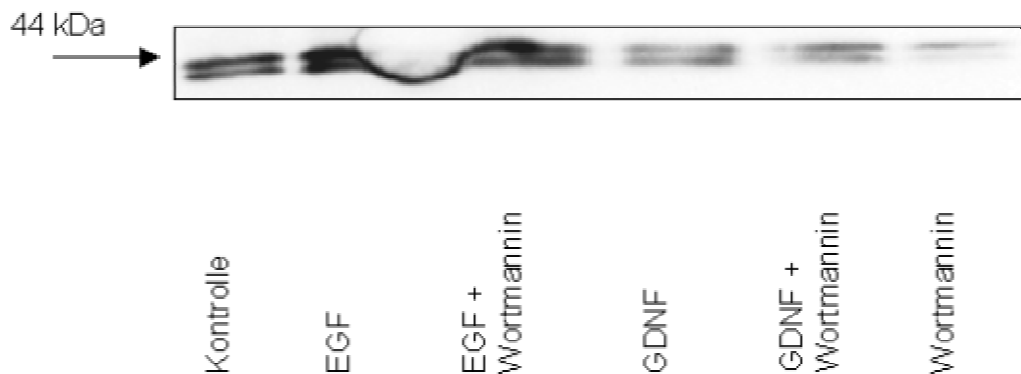


Abbildung 20: Nachweis der phosphorylierten MAPK in mit EGF, GDNF und Wortmannin behandelten Zellen. Hierbei zeigte sich, daß der Effekt der Wachstumsfaktoren auf die Intensität der Immunreaktion kaum durch Wortmannin beeinflusst wird, wobei der Effekt von GDNF auf die Phosphorylierung der MAPK deutlich geringer ist als der von EGF

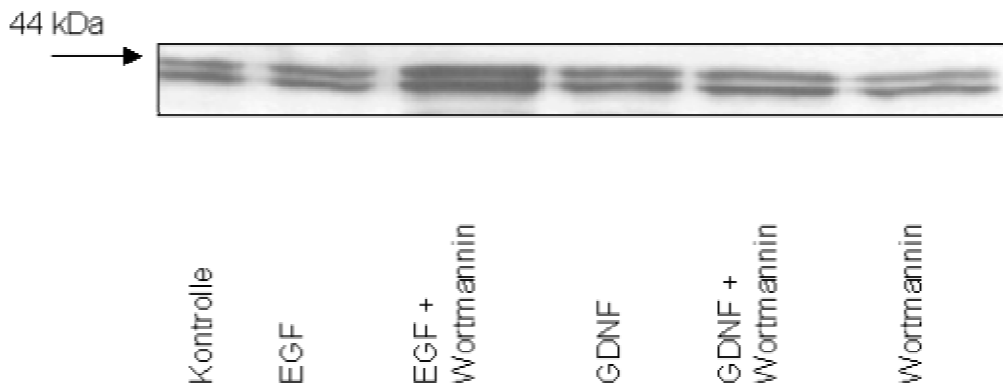


Abbildung 21: Expressionskontrolle unphosphorylierter MAPK in demselben Blot wie in Abbildung 20. Hierbei zeigte sich, daß lediglich in der Spur der mit EGF und Wortmannin behandelten Zellen eine starke Intensität der Immunreaktion auftrat als in den restlichen, bei denen sich keinerlei Unterschiede ergeben hatten.

### 5.6.3 PD098059-sensitive Phosphorylierung der MAPK

Der Nachweis der phosphorylierten MAPK wurde mittels Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und PD098059, GDNF, GDNF und PD098059 sowie PD098059 allein behandelt. Als Kontrollen wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigen sich die beiden Isoformen als 42 und 44kDa große immunreaktive Doppelbande. Hierbei zeigte sich, daß unter Zugabe von 50mmol/l PD098059

die Intensität der immunreaktiven Banden im Vergleich zu den Extrakten der nur mit Wachstumsfaktoren behandelten Zellen deutlich abnahm, wobei auch in diesem Blot wieder auffiel, daß der Effekt von GDNF auf die Intensität der Immunreaktion nicht ganz so ausgeprägt ist, wie der von EGF.

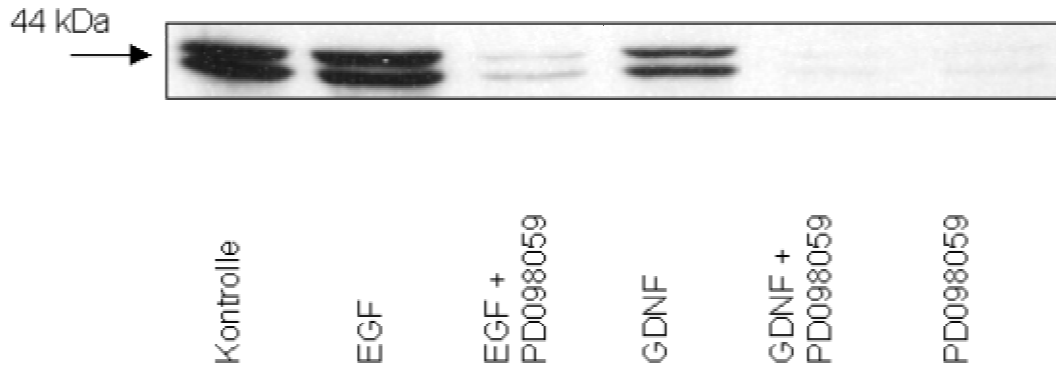


Abbildung 22: Nachweis von phosphorylierter MAPK in Extrakten aus mit EGF, GDNF und PD098059 behandelten Zellen. Dabei fällt auf, daß die Phosphorylierung durch GDNF im Vergleich mit EGF nicht ganz so intensiv ist, und daß sie durch die Zugabe von PD098059 stark reduziert wird.

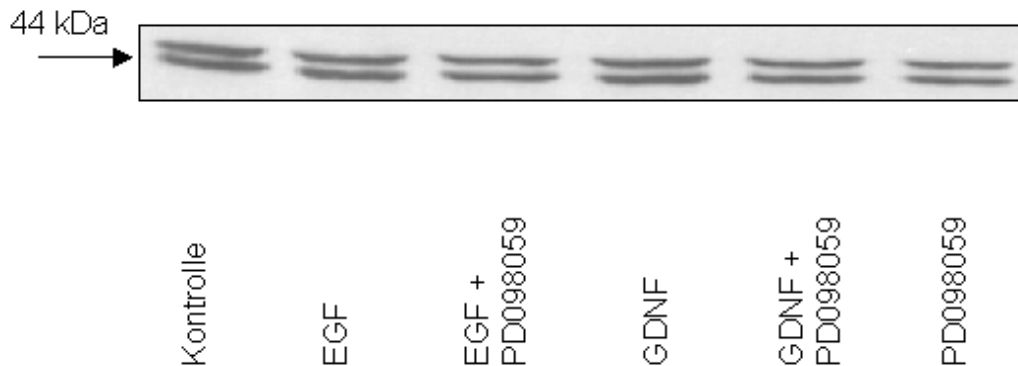


Abbildung 23: Expressionskontrolle von unphosphorylierter MAPK in demselben Blot wie in Abbildung 22. Es ergaben sich keine Intensitätsunterschiede der immunreaktiven Banden in den verschiedenen Behandlungsprotokollen.

## 5.7 Nachweis Inhibitor-abhängiger BAD-Bindung

Hierbei ergab sich das Problem, daß die auf dem Markt befindlichen Phospho-BAD-Antikörper so unspezifisch waren, daß sie keine Differenzen in der Phosphorylierung zeigten, und zudem noch viel Hintergrundaktivität produzierten, so daß keine spezifische Analyse möglich war. Deswegen wurde, wie unter 4.2.8 beschrieben, das 14-3-3 Protein Immunpräzipitiert, und dann eine Western-Blot-Analyse mit dem anti-BAD-Antikörper von

NEB durchgeführt. Dieser Antikörper zeigt eine immunreaktive Bande von 28kDa. Dabei zeigten sich Inhibitor-abhängige Differenzen in der Detektion.

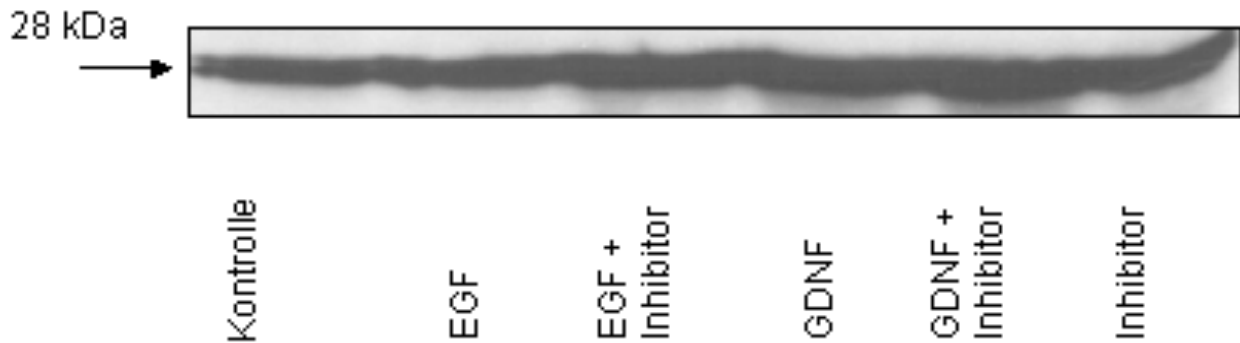


Abbildung 23: Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten aus mit EGF, GDNF und Wortmannin behandelten SH-SY5Y-Zellen mit einem phospho-BAD-Antikörper. Man sieht keinen Unterschied hinsichtlich der Intensität der immunreaktiven Bande.

### 5.7.1 Genistein-sensitve BAD-Bindung

Der Nachweis von phosphoryliertem BAD wurde mittels Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und Genistein, GDNF, GDNF und Genistein, sowie Genistein allein behandelt. Als Kontrolle wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigte sich BAD als 28kDa große immunreaktive Bande. Hierbei zeigte sich, daß unter Zugabe von 300µmol/l Genistein die Intensität der immunreaktiven Bande, welche durch Stimulation mit EGF und GDNF erreicht wurde, reduziert wurde.

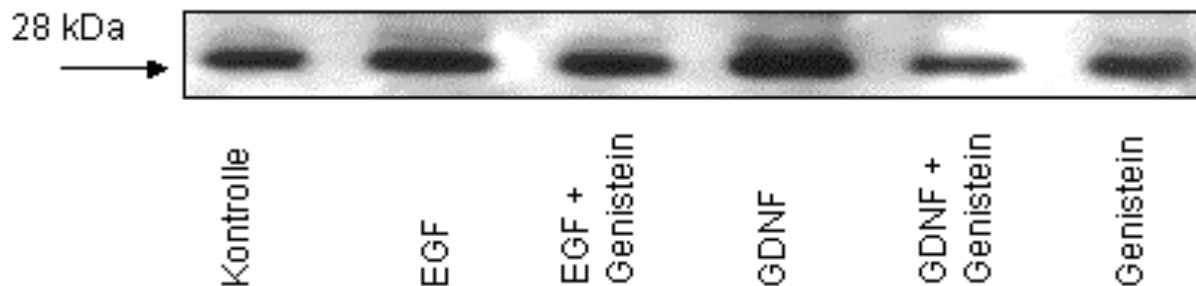


Abbildung 24: Nachweis 14-3-3 Protein gebundenen BAD nach Behandlung der Zellen mit EGF, GDNF und Genistein. Man kann in den EGF + Genistein und GDNF + Genistein Spuren eine Verminderung der Immunreaktion sehen, welche nach Zugabe der Wachstumsfaktoren erhöht war.

### 5.7.2 Wortmannin-sensitive BAD-Bindung

Der Nachweis von phosphoryliertem BAD wurde mittels Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und Wortmannin, GDNF, GDNF und Wortmannin, sowie Wortmannin allein behandelt. Als Kontrolle wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigte sich BAD als 28kDa große immunreaktive Bande. Hierbei zeigte sich, daß unter Zugabe von 234nmol/l Wortmannin die Intensität der immunreaktiven Bande, welche durch Stimulation mit EGF und GDNF erreicht wurde, reduziert wurde.

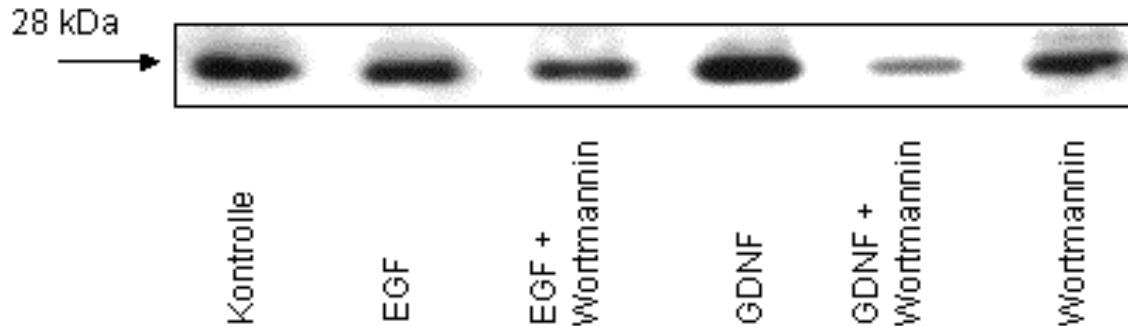


Abbildung 25: Hier wurde zu den mit den Wachstumsfaktoren behandelten Zellen Wortmannin zugegeben. Dies führte zu einer Reduktion der (v.a. bei GDNF) erhöhten Proteinbindung, und zwar bei GDNF+Wortmannin stärker als bei EGF + Wortmannin.

### 5.7.3 PD098059 – abhängige BAD-Bindung.

Der Nachweis von phosphoryliertem BAD wurde mittels Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse an Proteinextrakten der SH-SY5Y-Zelllinie durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben mit EGF, EGF und PD098059, GDNF, GDNF und PD098059, sowie PD098059 allein behandelt. Als Kontrolle wurde Proteinextrakt von unbehandelten SH-SY5Y-Zellen mitgeführt. Bei der Analyse zeigte sich BAD als 28kDa große immunreaktive Bande. Hierbei zeigte sich, daß unter Zugabe von 50mmol/l PD098059 die Intensität der immunreaktiven Bande, welche durch Stimulation mit EGF und GDNF erreicht wurde, reduziert wurde, wobei die Bindung in der Spur mit EGF und PD098059 deutlicher reduziert wurde als in der Spur mit GDNF und PD098059.



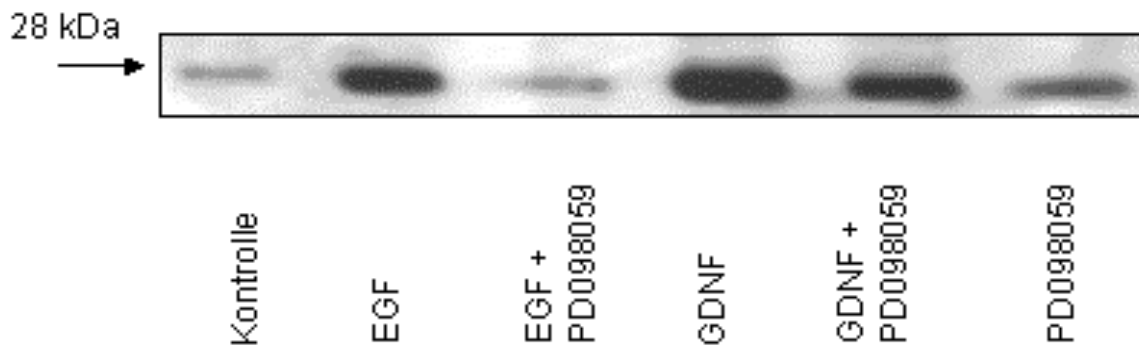


Abbildung 26: Nachweis der BAD-Bindung an 14-3-3-Protein in mit EGF, GDNF und PD098059 behandelten Zellen. Es fällt eine deutliche Verminderung der immunreaktiven Bande in der Spur der Extrakte der mit EGF + PD098059 behandelten Zellen und eine nicht so starke in der GDNF + PD098059 auf. Auch kann wieder eine Erhöhung des Signals durch die Wachstumsfaktoren bemerkt werden.

## 5.8 Phosphorylierung von MAPK und Akt in PC12-Zellen

Hier wurden PC12-Zellen mit NGF, EGF und GDNF zusammen mit verschiedenen potentiell neurotoxischen Substanzen unterschiedlich lange behandelt. Dies v.a. zu dem Ziel eines zeitlichen Verlaufs der Phosphorylierung der MAPK bzw. von Akt zu erhalten.

### 5.8.1 Phosphorylierung der MAPK in PC12-Zellen

Hier wurden PC12-Zellen für 5min, 40min und 90min mit 0,509pmol/ml NGF, NGF und 50mmol/l Haloperidol, Haloperidol oder 0,993pmol/ml GDNF alleine behandelt. Anschließend wurde an den Zellextrakten in einem Bandshift-Assay (wie unter 4.2.6 beschrieben) die Phosphorylierung der MAPK mittels eines pan-MAPK Antikörpers gezeigt.

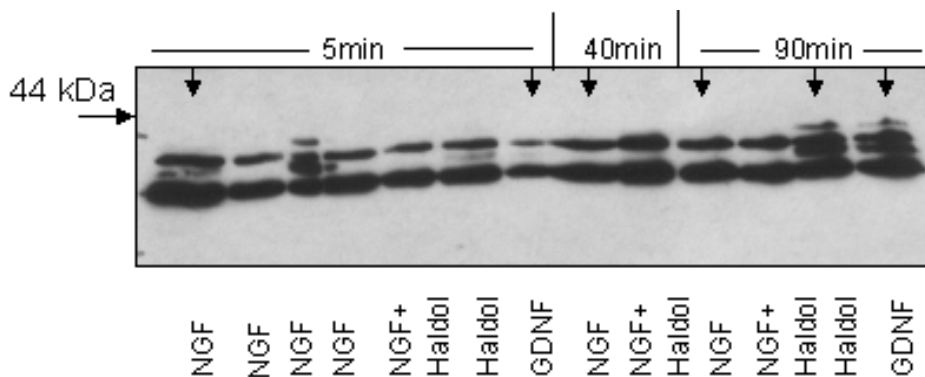


Abbildung 25: Phosphorylierung der MAPK bei Zellextrakten aus stimulierten PC12 Zellen Hierbei ist zu sehen, daß die MAPK nach Stimulation mit GDNF nach 90min mehr immunreaktive Banden zeigt, wobei nach NGF-Gabe nach 5 min ebenfalls mehr Immunreaktive Banden zu sehen sind, die bei 40 und 90 min kaum noch erscheinen. Ebenfalls kann nach Gabe von Haldol eine Steigerung der Immunreaktion nachzuweisen (Pfeile).

## 5.8.2 Phosphorylierung von Akt in PC12-Zellen

Hier wurden PC12-Zellen mit 0,509pmol/ml NGF, NGF und 50mmol/l Haloperidol, NGF und 500mmol/l Metamphetamin, Haloperidol, Metamphetamin, 9,92pmol/ml EGF und 0,993pmol/ml GDNF alleine für jeweils 5min, 30min und 90min behandelt. Anschließend wurde mit einem Anti-Phospho-Akt-Antikörper nach der Phosphorylierung von Akt geschaut. Zusätzlich wurde nochmals eine Positiv-Kontrolle mitgeführt.

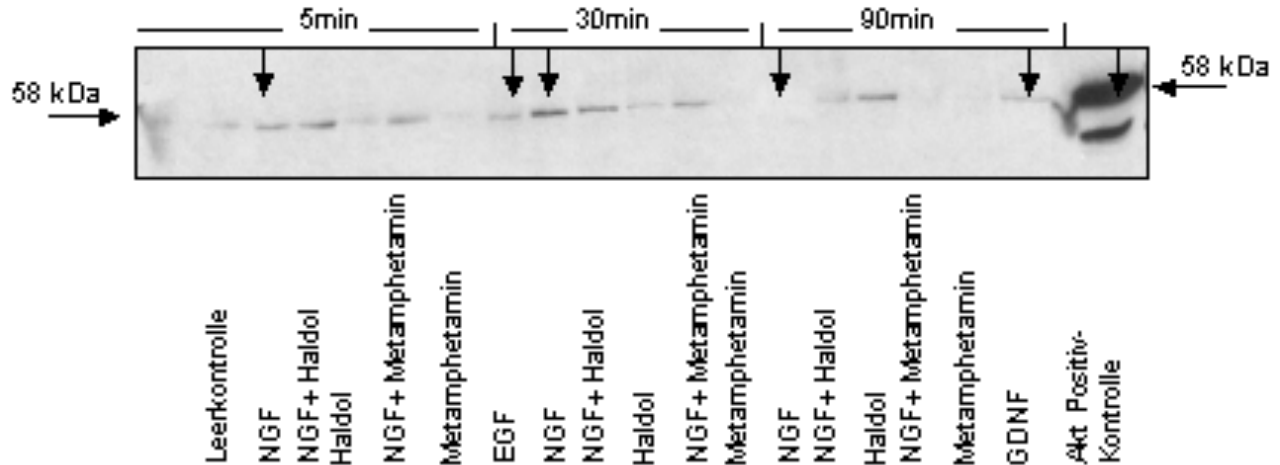


Abbildung 26: Phosphorylierung von Akt in PC12-Zellen nach Stimulation. Hierbei ist im Vergleich zur Positiv-Kontrolle eine schwache immunreaktive Bande in den Spuren mit Wachstumsfaktoren zu sehen, wie auch die Immunreaktion in der Leerkontrolle sehr schwach zu sehen ist (Pfeile).

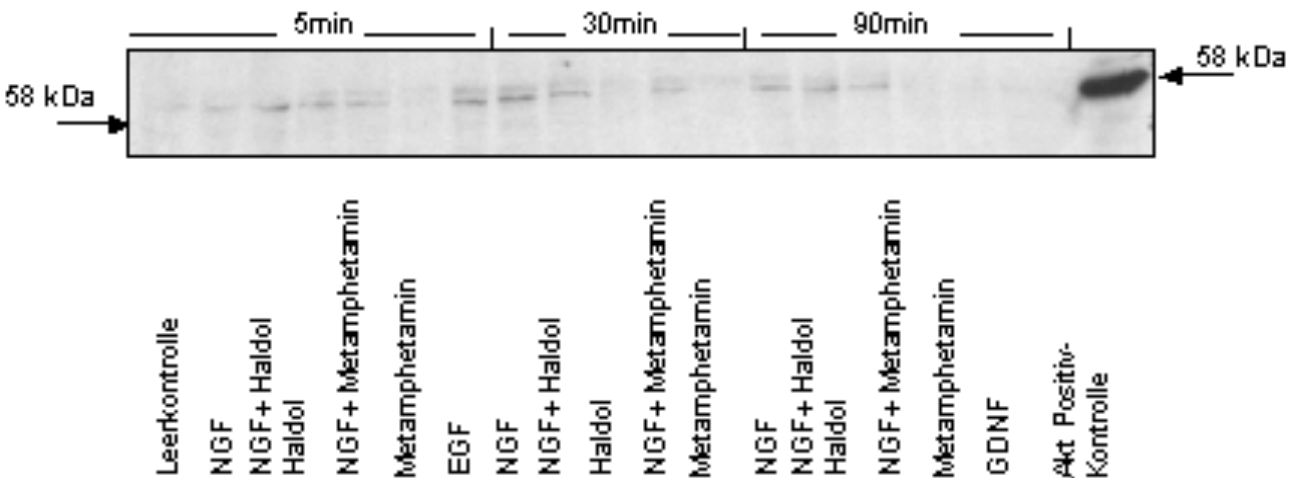


Abbildung 27: Kontrolle des unphosphorylierten Akt in demselben Blot wie in Abbildung 26. Hierbei fällt auf, daß in den Proben der PC12-Zellen deutlich weniger Akt enthalten ist als in der Kontrolle, und daß in den Proben, die mit Metamphetamin behandelt wurden, so gut wie kein Protein enthalten ist.

## 5.8.3 Radioaktives Akt-Assay

Hierbei handelt es sich um ein Assay mit „heißem“(radioaktivem) ATP. In diesem Assay wird Histon 2B als Substrat von HA-Akt (an HämAgglutinin-gebundenes Akt) phosphoryliert, und

dabei wird radioaktiv markiertes Phosphat vom  $\gamma$ ATP auf H2B übertragen. Die auf dem Röntgenfilm nachweisbare Schwärzung ist proportional zur phosphorylierten Menge von H2B bzw. zur Aktivität von Akt in der jeweiligen Probe. Als Kontrolle wurde nochmals Akt in demselben Blot mit einem Gesamt-Akt Antikörper nachgewiesen. Für dieses Assay wurden Extrakte aus PC12-Zellen verwendet, die mit HA-gekoppelten Akt stabil transfiziert wurden, um einen Effekt dieser Kinase auf die Zellen sehen zu können. Hier wurden die PC12-Zellen für 5min, 15min und 30min mit 0,509pmol/ml NGF, NGF und 50mmol/l Haloperidol, Haloperidol oder NGF und 500mmol/l Metamphetamin bzw Metamphetamin alleine behandelt.

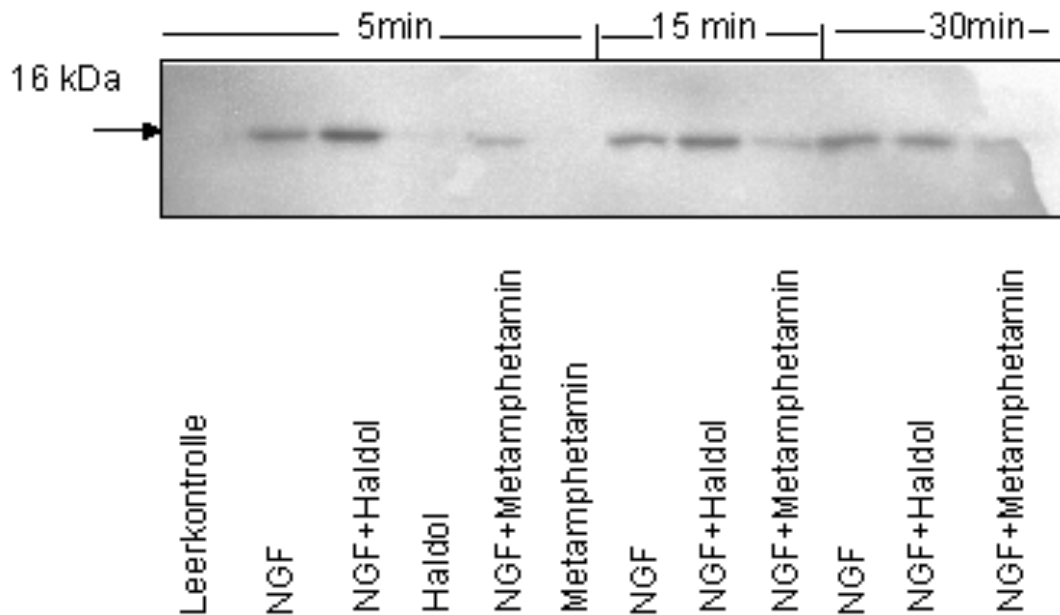


Abbildung 28: Radioaktives Akt-Assay aus Extrakten von mit NGF, Haloperidol und Metamphetamin-behandelten HA-Transfizierten PC12-Zellen. Es zeigt sich in den Spuren mit NGF, und NGF und Haloperidol eine Steigerung der Intensität der Bande des radioaktiven H2B. Die Intensität ist in den Spuren mit NGF und Metamphetamin sowie der mit Haloperidol deutlich geringer als in den restlichen Spuren.

#### 5.8.4 Phosphorylierungskontrolle des radioaktiven Akt-Assays

Hier wurde als Kontrolle der Aktivität und Expression von Akt in den Transfizierten PC12-Zellen aus dem Radioaktiven Assay die Membran mit einem Anti-Phospho-Akt-Antikörper behandelt.

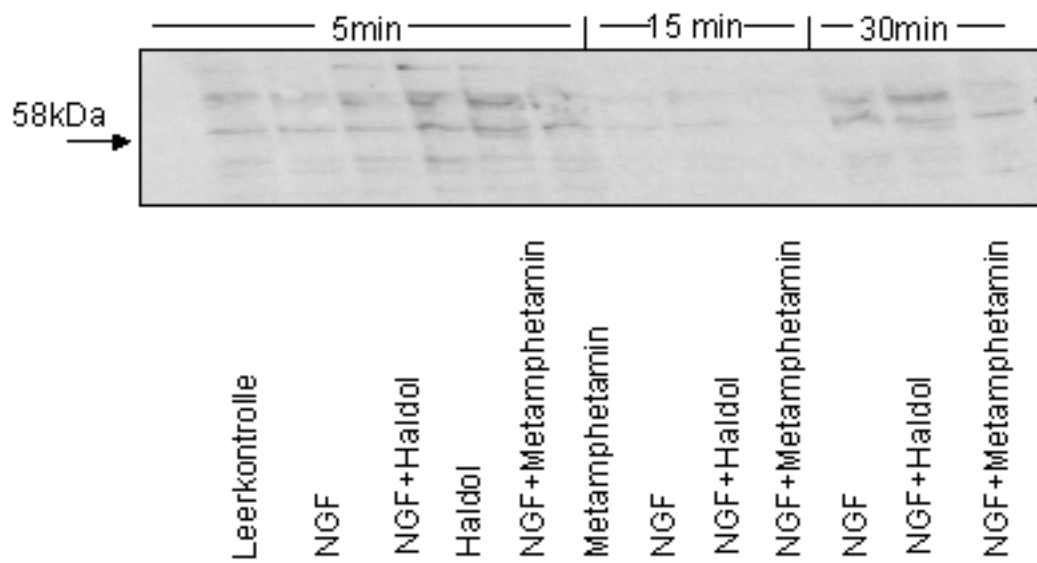


Abbildung 29: Kontrolle zum radioaktiven Akt-Assay. Hierbei wurde die Membran aus Abb.28 mit einem Anti-Phospho-Akt-Antikörper behandelt. Dabei fällt eine Intensitätserhöhung der immunreaktiven Bande in den Spuren von Haloperidol und NGF und Metamphetamin nach 5min, sowie NGF und NGF + Haloperidol nach 30min auf.

## 6 Diskussion

Neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. die Parkinson-Erkrankung sind in Mitteleuropa und den USA relativ häufig. Die der Degeneration der Neurone zugrundeliegenden Pathomechanismen sind nicht eindeutig geklärt, jedoch wird versucht, das Zugrundegehen der Neurone zu verhindern. Dabei wurde in verschiedenen *in Vivo* und *in Vitro*-Modellen des M. Parkinson der neuroprotektive Effekt von GDNF nachgewiesen (Gash, Zhang et al. 1996; Hou, Cohen et al. 1997) Der vermittelnde Rezeptor für GDNF ist ein Komplex aus dem Produkt des Ret-Protoonkogens und des GPI-verankerten GFR $\alpha$  (Airaksinen, Titievsky et al. 1999), jedoch ist über die intrazelluläre Vermittlung der GDNF-Wirkung nicht viel bekannt. Ein ausgewiesener antiapoptotischer Signalweg beinhaltet die PI3K, Akt und BAD. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß nach Stimulation von humanen Neuroblastomzellen mit GDNF eine Phosphorylierung von Komponenten des endogenen PI3K-Akt-Signalweges stattfindet. Somit wurde eine Verbindung zwischen dem PI3K/Akt-BAD-Signalweg und dem GDNFR $\alpha$ /Ret-Rezeptor gezeigt, worüber die antiapoptotische Wirkung vermittelt wird.

### 6.1 Kritische Bewertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Zunächst wurde in den SH-SY5Y-Zellen die Expression des Ret-Rezeptors und des GFR $\alpha$ s nachgewiesen. Dann wurden die Zellen mit GDNF und als Kontrolle mit EGF stimuliert, und die Schlüsselenzyme durch Inhibitoren geblockt, um die Phosphorylierung der nachgeschalteten Substrat-Moleküle zu verhindern. Ebenso wie die Auswirkungen auf den PI3K-Akt-Signalweg wurden auch die Effekte auf den eher Proliferations-assoziierten MAPK-Signalweg untersucht, um einen Kontrollweg zu haben, da EGF ebenfalls deutlich den MAPK-Weg stimuliert. Zunächst wurde in den SH-SY5Y-Zellen die Expression des Ret-Rezeptors, des GFR $\alpha$ s als auch des EGF-Rezeptors nachgewiesen. Nach Applikation von EGF wurden der MAPK-Signalweg, wie auch der PI3K-Signalweg, aktiviert, was zur gesteigerten BAD-Bindung führte. Im Gegensatz dazu aktivierte GDNF vornehmlich den PI3K-Signalweg und steigerte so die BAD-Bindung. Bei Zugabe von Genistein als Tyrosin-Kinase-Inhibitor wurde die PI3K, nicht jedoch Akt, dafür aber komplett die MAPK inhibiert. Bei Zugabe von PD098059 als Inhibitor der MAP2K wurde, wie erwartet, der MAPK-Signalweg komplett blockiert, also auch die BAD-Phosphorylierung in den EGF-Proben reduziert. Allerdings wurde auch die Aktivität der PI3K durch PD098059 reduziert, jedoch nur in Verbindung mit den Wachstumsfaktoren, denn die Inhibitorkontrolle ist fast so stark phosphoryliert wie die Leerkontrolle. Im Gegensatz dazu wurde Akt bei Blockade der MAP2K hochreguliert, also in Kombination mit dem Inhibitor stärker phosphoryliert als

durch die Wachstumsfaktoren allein. Auf die BAD-Phosphorylierung hatte dies aber keinen Einfluß, sie wurde bei den GDNF-Proben kaum durch den Inhibitor beeinflusst.

Bei Zugabe von Wortmannin als Inhibitor der PI3K wurde, wie erwartet, die Aktivierung von Akt komplett blockiert, wobei der Effekt auf die PI3K nicht ganz so ausgeprägt ist wie erhofft. Es sind jedoch in der Zwischenzeit Wortmannin-unsensible PI3K-Untereinheiten kloniert worden (Domin, Pages et al. 1997), wobei dies jedoch anscheinend kaum einen Einfluß auf den klinischen Effekt hat (Lemke, Paine-Murrieta et al. 1999). Dies hat sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bestätigt, da die Phosphorylierung von Akt ja deutlich reduziert wurde. Es wurde aber deutlich die durch GDNF vermittelte Phosphorylierung von BAD reduziert. Im Gegensatz dazu hatte Wortmannin keinen Effekt auf die MAPK und die durch EGF-vermittelte Phosphorylierung von BAD.

In den PC12-Zellen wurde zunächst nach der Aktivierung des Proliferations-assoziierten MAPK-Signalweg durch den Nervenwachstums-Faktor (*Nerve growth factor*(NGF)) und GDNF geschaut. NGF wurde dabei kombiniert mit potentiell neurotoxischen Medikamenten wie z.B. Haloperidol („Haldol“). Hierbei zeigte sich, daß NGF ein potenter, aber kurzlebiger, Aktivator der MAPK ist, wohingegen GDNF einen später einsetzenden, aber lang andauernden Effekt auf die MAPK zeigt. Interessanter Weise zeigte Haloperidol ebenfalls einen stimulierenden Effekt auf die MAPK. Es wurde in den PC12-Zellen auch die Aktivierung von Akt durch NGF, EGF und GDNF nachgewiesen. NGF wurde auch hier mit potentiell neurotoxischen Medikamenten (Haloperidol („Haldol“)) und mit Psychostimulantien (Metamphetamin („Speed“)) kombiniert. Dabei zeigten sich insgesamt sehr schwache Reaktion auf die Wachstumsfaktoren und Haloperidol, wobei der Effekt von NGF auch wieder kurzfristig war. Zusammengenommen war hierbei die Immunreaktion des Antikörpers sehr schwach im Vergleich zur Positiv-Kontrolle. Daher wurde dieser Versuch nochmal mit stabil-transfizierten PC12-Zellen mit einem radioaktivem Assay durchgeführt, wo die Ergebnisse deutlicher waren; vor allem von NGF und Haldol.

## **6.2 Kritische Bewertung der eingesetzten Methoden.**

Die PC12-Zellen sind ein sehr gut etabliertes Modell für Neurone in der Zellkultur. An diesen Zellen wurden bisher vor allem die Stimulierung die Effekte des MAPK-Signalweges (Differenzierung durch Langzeitbehandlung mit Wachstumsfaktoren (Cowley, Paterson et al. 1994)) Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst mit den PC12-Zellen gearbeitet, bis sich herausstellte, daß die Zellen dieser Zelllinie kaum endogenes Ret (Treanor, Goodman et al. 1996) und Akt exprimieren. Die Antiapoptotischen Effekte der Wachstumsfaktoren

werden aber weniger stark durch den MAPK-Signalweg als vielmehr durch den PI3K/Akt-Signalweg vermittelt, so daß sich dieses gut etablierte Modell nicht zur Untersuchung des GDNF-Ret-PI3K-Akt-Signalweges anbot. Nun gibt es auch PC12-Zellen, die mit Akt stabil transfiziert wurden, die man hätte auswählen können, zumal der Versuch mit dem radioaktivem Assay, in dem transfizierte Zellen verwendet wurden, ja auch Effekte zeigte. Nun ist jedoch die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der endogenen Signalwege, welche durch eine Überexpression von normalem oder konstitutiv aktiviertem Akt o.ä. verhindert würde (zumal transfizierte Zellen häufig Nebeneffekte zeigen (De Vita, Berlingieri et al. 2000)). Daher wurden hier die humanen SH-SY5Y-Zellen verwendet, die eine ausreichende endogene Menge von Ret (Treanor, Goodman et al. 1996), Akt und der MAPK exprimieren. Die SH-SY5Y-Zellen sind als Neuroblastomzellen ein nicht so gut etabliertes Modell wie die PC12-Zellen, exprimieren hingegen die endogenen Komponenten in ausreichendem Maße, sind auch ausdifferenzierbar wie die PC12-Zellen (Jalava, Heikkila et al. 1990), und sind zudem noch eine humane Zelllinie. Als Kontrolle wurde zunächst immer per Western-Blot geschaut, ob die entsprechenden Proteine in genügender Menge vorhanden sind, und anschließend wurde mit phosphospezifischen Antikörpern deren Aktivierung gezeigt. Durch den Einsatz von Inhibitoren wurden ganz gezielt bestimmte Schlüsselenzyme in den zu untersuchenden Signalwegen gehemmt und deren Auswirkungen getestet. Dadurch wurde eine höhere Spezifität erreicht, als wenn transfizierte Zellen mit konstitutiv aktivierten oder inaktiven Signalwegkomponenten eingesetzt worden wären, da man hierbei den Zeitpunkt der Blockade der Komponenten frei wählen kann, und der Zelle ansonsten ein physiologisches Wachstum ermöglichen kann. Die verwendeten Inhibitoren sind mittlerweile Standardsubstanzen, die sich durch eine hohe Selektivität und Spezifität in den hier verwendeten Konzentrationen auszeichnen. Dies wurde insbesondere für Wortmannin (Powis, Bonjouklian et al. 1994) und PD098059 beschrieben (Alessi, Cuenda et al. 1995), was der Zielsetzung der Blockade der Kinase-Aktivitäten zu einem bestimmten Zeitpunkt am nächsten kam. Dies hätte man durch inaktivierende Punktmutationen nicht erreichen können, denn z.B würde eine totale PI3K-Blockade gravierende (v.a. onkogene) Folgen für die Zelle haben, und keine Signaltransduktionsanalysen zulassen (Jimenez, Jones et al. 1998). Ähnliches gilt für die Blockade der MAPKK oder MAPK (Akiyama, Ishida et al. 1987). In der vorliegenden Arbeit wurde nicht mit einem Tierenmodell für die Parkinson-Erkrankung gearbeitet, da Tiere im allgemeinen wesentlich komplexer auf Neurotoxine oder Inhibitoren reagieren als Zellen, wodurch die Signaltransduktionsanalyse deutlich erschwert wird. Zumal man durch die Toxine und Inhibitoren ja nicht nur die Neurone in den Tieren

erreicht, denn selbst bei lokaler Applikation sind noch Gliazellen oder Endothelzellen zwischen den Neuronen, daher kann man schlecht unterscheiden, ob der zu beobachtende Effekt durch das Neurotoxin, den Inhibitor oder vielleicht eine Abwehrreaktion des Gesamtorganismus ist, und z.B. durch Immunzellen oder Cytokine verursacht wird. Die Zelllinien sind im Gegensatz dazu Reinkulturen, so daß man sagen kann, daß der zu beobachtende Effekt tatsächlich nur von den neuronalen Zellen kommt.

Zur Signaltransduktionsanalyse wurden in dieser Arbeit mit Western-Blot-Analysen und Immun-Präzipitations-Assays gearbeitet, da sich mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper eine Aktivierung von Proteinen besser darstellen läßt als z.B. mit einer Polymerase Ketten Reaktion (PCR). Diese phosphospezifischen Antikörper haben die gleiche Spezifität wie In-Vitro-Kinase-Assays, wobei der Vorteil der Antikörper gegenüber den Kinase-Assays in dem geringeren Bedarf an Protein, der besseren Handhabung, den niedrigeren Kosten und der fehlenden Radioaktivität liegen. Daher wurde mit (phospho-)spezifischen Antikörpern gearbeitet, und dort wo dies wegen nicht möglich war, wurden Immunpräzipitationsassays eingesetzt. Diese Assays basieren auf dem Prinzip, daß aktivierte (phosphorylierte) Proteine mit anderen Proteinen Komplexe bilden und durch eine Immunpräzipitation dieser Komplexe eine Analyse der Aktivierung der zu untersuchenden Proteine möglich ist. (Hier z.B. die Bindung von phosphoryliertem BAD an 14-3-3-Protein, dessen Präzipitation und anschließender Nachweis von BAD im Western-Blot).

### **6.3 Verwendete Signalwegkomponenten**

Bei der Vielzahl der in der Einleitung beschriebenen Signalwege und deren Komponenten stellt sich die Frage, warum hier lediglich einige wenige Proteine und Rezeptoren ausgewählt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, einen vermittelnden Signalweg für die von GDNF beobachtete antiapoptotische Wirkung (Clarkson, Zawada et al. 1995; Clarkson, Zawada et al. 1997) zu finden, daher lag es Nahe, bekannte antiapoptotische Komponenten in die Suche mit ein zu beziehen. Bereits 1996 wurde von Durbec et al (Durbec, Marcos-Gutierrez et al. 1996) das Produkt des *Ret*-Proto-Oncogens als der spezifische Rezeptor für GDNF beschrieben. Treanor et al wiesen im selben Jahr einen GPI-verankerten Co-Rezeptor für Ret (Treanor, Goodman et al. 1996) nach, der notwendig ist für die transmembrane Signaltransduktion (Creedon, Tansey et al. 1997) (Airaksinen, Titievsky et al. 1999) daher wurde der Ret-GDNFR $\alpha$ -Rezeptorkomplex als Startpunkt der Analyse gewählt. Als ein Effekt dieses Komplexes wurde von Worby und van Weering (Worby, Vega et al. 1996) (van Weering and Bos 1997) eine Aktivierung des ras-MAPK-Signalweges beschrieben. Dieser



Weg vermittelt aber eher proliferative und morphologische Effekte, wie z.B. die Kontrolle des Zellzyklus (Pumiglia and Decker 1997), die Proliferation (Porter and Vaillancourt 1998) (Johnson, Noble et al. 1996) und die Ausdifferenzierung von PC12-Zellen als Reaktion auf NGF-Behandlung (Cowley, Paterson et al. 1994). Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist jedoch die Untersuchung eines vermittelnden Signalweges für den antiapoptotischen Effekt von GDNF, so daß der MAPK-Signalweg nicht als vorherrschender Weg betrachtet wurde. Der PI3K-Akt-Signalweg ist wohl der bekannteste und am besten untersuchte antiapoptotische Signalweg (Franke, Kaplan et al. 1997; Kennedy, Wagner et al. 1997; Khwaja, Rodriguez-Viciana et al. 1997), so daß nahelag hier nach den Auswirkungen bei einer GDNF-Behandlung zu schauen. Zudem konnte u.a. von van Weering et al gezeigt werden, daß einige intrazelluläre Effekte von GDNF über die PI3K vermittelt werden, so z.B. die Lamellipodienbildung (van Weering and Bos 1997) womit eine Verbindung zum PI3K-Akt-Signalweg aufgezeigt wurde.

Ebenso vielfältig wie die Auswirkungen der PI3K sind auch die Effekte ihres nachgeschalteten Hauptsubstrats, von Akt. Nach Aktivierung vermittelt Akt eine Vielzahl von antiapoptotischen Effekten, so z.B. die Inhibition der "Forkhead"-Transkriptionsfaktor-Familie oder der Apoptose-induzierenden Caspase 9 (Brunet, Bonni et al. 1999) und anderen Caspasen (Sonoda, Watanabe et al. 1999). Zudem reguliert Akt über die I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-NF $\kappa$ B-Kaskade die Expression des c-myc-Protoonkogens, (Khwaja 1999; Ozes, Mayo et al. 1999; Romashkova and Makarov 1999) als Balanceakt zwischen der antiapoptotischen vs der zytotoxischen Wirkung von c-myc. Der Einfluß der PI3K-Akt-Kaskade auf die c-myc-Expression wurde schon vorher durch Kaufmann-Zeh beschrieben, allerdings nicht als Effekt der IKK-NF- $\kappa$ B-Kaskade, sondern als Auswirkung einer ras-Raf-Aktivierung (Kaufmann-Zeh, Rodriguez-Viciana et al. 1997) im Rahmen der Onkogenese bei ras-Mutationen. Weiterhin vermittelt Akt die Kontrolle verschiedener Translationsvorgänge, so z.B. mittels TOR/FRAP (Brunn, Williams et al. 1996; Dennis, Fumagalli et al. 1999; Zhong, Chiles et al. 2000) die Phosphorylierung der Translationsrepressoren 4E-BP1 (Gingras, Kennedy et al. 1998). Dies führt zur Translation verschiedenster mRNAs, oder beeinflusst die Aktivität der p70S6Kinase (Chung, Grammer et al. 1994), die wiederum den Zellzyklus durch Steigerung der Proteinsynthese (Translation) kontrolliert (Pearson and Thomas 1995). Zudem beeinflusst Akt auch die Bildung von gasförmigen „second messenger“-Molekülen, so beschrieben Dimmeler et al (Dimmeler, Fleming et al. 1999) und Fulton et al (Fulton, Gratton et al. 1999) die Aktivierung der eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) durch Akt und die dadurch gesteigerte Bildung von NO (*nitric oxide*, Stickstoffmonoxyd), was zur Erweiterung der

Blutgefäße oder auch zur Angiogenese führt. Neben diesen Translations- und Zellzyklusregulatorischen Funktionen vermittelt Akt vor allem antiapoptotische Effekte, so z.B. über die GSK3 $\beta$  (Cross, Alessi et al. 1995; Pap and Cooper 1998) mit diversen nachgeschalteten Faktoren oder über die seit langem bekannten Mitglieder der BCL-2-Familie (Korsmeyer 1999). So beschrieb Yang 1995 das Protein BAD als den zentralen Faktor bei der durch BCL-2-Mitglieder verursachten Apoptose (Yang, Zha et al. 1995). Unphosphoryliertes BAD bindet an BCL-X<sub>L</sub>, welches dann BAX freigibt, das anschließend als Homodimer Kanäle in Mitochondrienmembranen formt, wodurch zytotoxische Substanzen wie Cytochrom C frei werden (Oltvai, Milliman et al. 1993; Antonsson, Conti et al. 1997; Kroemer 1997; Green and Reed 1998). Eine Phosphorylierung von BAD führt dazu, dass dieses an das ubiquitäre 14-3-3 Protein bindet (Zha, Harada et al. 1996). Dadurch wird BCL-X<sub>L</sub> freigegeben und kann seine antiapoptotische Funktion erfüllen (Antonsson, Conti et al. 1997; Blomer, Kafri et al. 1998). Bis 1997 war jedoch nicht bekannt, was direkt die Phosphorylierung von BAD bewirkte, bis verschiedenen Gruppen Akt als Kinase von BAD beschrieben (Datta, Dudek et al. 1997; del Peso, Gonzalez-Garcia et al. 1997), und damit einen direkten Einfluß dieser Serine-Threonin-Kinase auf die Apoptose vermittelnden Faktoren der BCL-2-Familie. Kurze Zeit später wurde dann der PI3K-Akt-BAD-Signalweg als der antiapoptotische Signalweg postuliert und nachgewiesen (Scheid and Duronio 1998) (Datta, Dudek et al. 1997; del Peso, Gonzalez-Garcia et al. 1997).

Aufgrund dieser vielfältigen Effekte von Akt und den Mitgliedern der BCL-2-Familie lag es Nahe, in der vorliegenden Arbeit bei der Suche nach einem antiapoptotischen Signalweg im Zusammenhang mit GDNF-Behandlung von Zellen auf die PI3K und Akt zu fokussieren. Daher wurde als mögliche Signalweg-Komponenten Ret und der GFR $\alpha$  als Rezeptor-Komplex für GDNF ausgewählt, und als Verbindung zur Antiapoptose die PI3K. Im weiteren wurde dann das Substrat der PI3K, Akt und als antiapoptotischer Effektor BAD gewählt. Dies vor allem deswegen, weil es direkt durch Akt phosphoryliert wird und durch die Bindung an das 14-3-3-Protein dann nicht mehr apoptotisch wirken kann. Auf die Untersuchung weiterer Mitglieder der BCL-2-Familie (wie etwa BCL-X<sub>L</sub>) wurde verzichtet, da die effektive BAD-Phosphorylierung durch zahlreiche Untersucher gezeigt werden konnte (Yang, Zha et al. 1995; Zha, Harada et al. 1996) (Oltvai, Milliman et al. 1993). Zudem bestand bei den Mitgliedern dieser Familie das Problem des Nachweises einer Phosphorylierung, da zum damaligen Zeitpunkt weder phosphospezifische Antikörper noch zuverlässige Assays etabliert waren, so daß die Bindungs-(Phosphorylierungs-)Kontrolle schwierig war. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Immunpräzipitationsassay benutzt. Auf der anderen Seite wurde

dann die Effekte der PI3K auf den eher proliferativen MAPK-Signalweg nachgeprüft, da verschiedenste Gruppen eine Verbindung zwischen der PI3K und den MAPKinasen hergestellt hatten. Dies geschah v.a. in Verbindung mit der Differenzierung von neuronalen Zellen oder bei der Proliferation, also morphologischen Veränderungen, (van Weering, Medema et al. 1995; van Weering and Bos 1997; Khwaja, Lehmann et al. 1998) bzw. in einem etwas geringeren Ausmaß auch als Antwort auf eine GDNF-Behandlung von neuronalen Zellen (Worby, Vega et al. 1996) (Wodurch die Notwendigkeit von GDNF in der Entwicklung des autonomen NS erklärt wird). Dies war insbesondere im Hinblick auf die PC12-Zellen interessant, die ja das Standardmodell für die Erforschung des MAPK-Signalwegs gelten, und an denen eine Vielzahl dieser obengenannten Effekte beobachtet wurden (Cowley, Paterson et al. 1994), ebenso wie die Einflußnahme dieses Signalweges bei der anti-Apoptose (Xia, Dickens et al. 1995). Nach Fertigstellung der experimentellen Arbeit zeigt die Gruppe um Posern (Posern, Saffrich et al. 2000), daß auch morphologische Effekte von NGF über den PI3K-Akt-Signalweg statt nur über den MAPK-Signalweg vermittelt werden, und die Gruppe um Zimmermann (Zimmermann and Moelling 1999) zeigte, daß Akt die GTPase Raf phosphoryliert und dadurch ebenfalls die Proliferation mitbeeinflußt. Als weiterer Faktor wurde in der vorliegenden Arbeit EGF als Anregung für die verschiedenen Signalwege gewählt, da die Effekte von EGF sehr gut beschrieben sind und EGF als potenter Aktivator sowohl des PI3K-Akt-Signalweges (Burgering and Coffey 1995) als auch des MAPK-Signalweges (Takishima, Griswold-Prenner et al. 1991) gilt.

## **6.4 Bedeutung für die Klinik**

Der programmierte Zelltod ist in der Entwicklung von Organismen eine Notwendigkeit um eine normale Organogenese, Wachstum und das Altern zu ermöglichen (Jacobson, Weil et al. 1997). Eine Störung dieser Funktion führt im Allgemeinen zum tumorösen Wachstum und einem Funktionsverlust der Zellen mit einer gestörten Apoptose (Polverini and Nor 1999). Daher wurde die Apoptose zumeist als eine Störung derselben im Zusammenhang mit der Onkogenese untersucht und dem Versuch, eine gestörte Apoptose wieder in Gang zu bringen mit dem Ziel, so neue Ansätze für die Tumorbehandlung zu finden. So gibt es z.B. Berichte über Versuche mit Enzyminhibitoren zur Blockade des Zellwachstums von Tumorzelllinien, z.B. Leukämiezellen mit Herbimycin A, einem Tyrosin-Kinase-Inhibitor wie Genistein (Zhao, Kiyoi et al. 2000). Es gibt jedoch auch Erkrankungen, die durch eine beschleunigte Apoptose gekennzeichnet sind, wie z.B.: die Parkinson- (Burke and Kholodilov 1998) oder die Alzheimer-Erkrankung, die spinalen Muskelatrophien (v.a. die infantile) (Jablonka, Schrank

et al. 2000) und der Neuronen-Verlust nach Trauma oder Ischämie. Gerade bei diesen Erkrankungen wäre es wünschenswert, die Apoptose zumindest bei einem Teil der Zellen zu verhindern und so den Krankheitsprozeß zu verlangsamen oder aufzuhalten. Mit diesem Ansatz beschäftigen sich verschiedenen Gruppen, so konnten Blomer (Blomer, Kafri et al. 1998) und Schierle (Schierle, Hansson et al. 1999) zeigen, daß durch eine Blockade der Apoptose oder durch Überexpression antiapoptotischer Faktoren neuronale Zellen vor dem Zelltod geschützt werden konnten. Ebenfalls wies die Gruppe um Robertson (Robertson, Crocker et al. 2000) nach, daß durch eine Blockade verschiedener Caspasen der Zellverlust nach Frontalhirnischämie stark vermindert wird.

Die Transplantation von embryonalen dopaminergen Neuronen. Ist seit einiger Zeit in der Behandlung von Parkinson-Patienten eingeführt (Hauser, Freeman et al. 1999). Diese Patienten zeigen eine deutliche Verbesserung der Symptomatik und kommen oft mehrere Jahre ohne oder mit geringer zusätzlicher Medikation aus (Wenning, Odin et al. 1997; Borlongan, Sanberg et al. 1999). Ein Problem dieser Therapie ist allerdings, daß nach ein paar Jahren die Patienten eine Verschlechterung des Zustandes erfahren, der im Allgemeinen durch einen Progress der Erkrankung auf der nicht transplantierten Seite bedingt ist (Wenning, Odin et al. 1997). Nun gibt es bessere Erfahrungen bei Patienten, die auf beiden Seiten transplantiert wurden (Hauser, Freeman et al. 1999); dies ist jedoch ein enormer Spenderaufwand, denn pro Seite benötigt man zwischen 3-5 fetale Donoren. Dies ist vor allem dadurch bedingt, daß nur ein sehr geringer Teil der Neurone die Transplantationsprozedur überleben, während die meisten an Apoptose zugrunde gehen (Mahalik, Hahn et al. 1994). Durch den Einsatz von neuroprotektiven Substanzen und Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges könnte die Effektivität der Transplantation und Transplantataufbereitung verbessert werden. In diesem Zusammenhang ist die schon längerem bekannte antiapoptotische Wirkung von GDNF interessant, der von Clarkson in vitro (Clarkson, Zawada et al. 1995; Clarkson, Zawada et al. 1997) und von Gash und Choi-Lundberg in vivo (Gash, Zhang et al. 1996; Choi-Lundberg, Lin et al. 1997; Gash, Zhang et al. 1998) dargestellt wurde. So gibt es einige Versuche, diesen neurotrophen Faktor in der Therapie einzusetzen. Im Tiermodell waren die Resultate durchaus erfolgsversprechend (Beck, Valverde et al. 1995; Gash, Zhang et al. 1996) wobei hier auch die protektive Wirkung auf die Transplantate beschrieben wurde (Granhölm, Mott et al. 1997), jedoch zeigten sich bei einem Therapieversuch am Menschen starke Nebenwirkungen (Kordower, Palfi et al. 1999), so daß nach verbesserten Wegen der GDNF-Applikation gesucht wurde. Es gibt verschieden Ansätze, GDNF mittels viraler Vektoren (Bilang-Bleuel, Revah et al. 1997; Lachman and

Coffin 2000) oder gentechnisch veränderten Zelltransplantaten (Mohajeri, Figlewicz et al. 1999) in die Stammganglien zu bringen und so den neuroprotektiven und neuroregenerativen Effekt von GDNF zu nutzen. Leider sind diese Verfahren trotz aller Erfolge noch im Forschungsstadium, und je nach Stand der Diskussion über die Vor- und Nachteile der Gentherapie und den Einsatz gentechnisch veränderter Zellen am Menschen noch weit davon entfernt, in die klinische Erprobung zu gelangen. Also sucht man nach anderen, weniger belasteten Therapieansätzen. Wie oben schon erwähnt werden in der Onkologie verschiedene Enzyminhibitoren verwendet um die weitere Proliferation von Tumorzellen zu verhindern. In Anlehnung an diese Ergebnisse und Therapieversuche ergab sich die Frage nach dem Einsatz von Enzyminhibitoren auch bei neurodegenerativen Erkrankungen. So zeigte die Gruppe um Rapoport (Rapoport and Ferreira 2000), daß durch den Einsatz des MAP2K-Inhibitors PD098059 die Degeneration von Neuronen durch  $\beta$ -Amyloid-Fibrillen in einem Alzheimer-Modell, durch Blockade der durch die MAPK verursachten und durch das  $\beta$ -Amyloid induzierten Phosphorylierung des Tau-Proteins, verhindert werden konnte. Mit einer ähnlichen Idee beschäftigte sich die Gruppe um Trieu (Trieu, Liu et al. 2000). Sie konnte zeigen, daß durch den Einsatz des *Janus-Kinase-3* (JAK3)-Inhibitor WHI-P131 das Fortschreiten der Erkrankungssymptome in einem Tiermodell der familiären Amyotrophen Lateral Sklerose (fALS) verzögert werden konnte. Somit ergeben sich neue Möglichkeiten für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen. Eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz von Protein-Kinase-Inhibitoren in der Therapie von Erkrankungen ist aber, daß man den Mechanismus, der für die Entwicklung der pathologischen Vorgänge verantwortlich ist, kennt. Gerade bei den degenerativen Erkrankungen ist dies wichtig, denn man will ja mittels der Therapie die Degeneration aufhalten und nicht einen Tumor induzieren. Aus diesem Grund ist eine Signaltransduktionsanalyse sowohl bei degenerativen Erkrankungen wie auch bei Onkogenen Prozessen sinnvoll. So forschte die Gruppe um Kunapuli (Kunapuli, Lawson et al. 1998) über die intrazelluläre Signaltransduktion bei der Hypertrophie von Kardiomyozyten und stellten fest, das dieser Effekt vor allem über den JNK-c-jun-Signalweg vermittelt wird. Gleichzeitig zeigten sie, daß durch den Einsatz von Protein-Kinase-Inhibitoren wie Wortmannin oder Rapamycin der hypertrophe Effekt vermindert werden konnte. Ähnliche Ergebnisse stellte die Gruppe um Zhong (Zhong, Chiles et al. 2000) vor, jedoch beschäftigten sie sich mit der Expression von Transkriptions-Faktoren, im Zusammenhang mit der Angiogenese, in Tumorzellen. Sie zeigten, daß die Transkription von angiogenetischen Faktoren über den PI3K-Akt-FRAP-Signalweg vermittelt wird, und durch Inhibitoren wie LY294002 oder Rapamycin die Transkription diverser Faktoren zur

Tumorangiogenese geblockt wird. Ebenso notwendig wie die Signaltransduktionsanalyse ist die genaue Analyse der Wirkungsmechanismus von Inhibitoren, wenn man diese in der Therapie einsetzen möchte. Die hier dargestellten Arbeiten zeigen die GDNF-abhängige Aktivierung der für die anti-Apoptose wesentlichen intrazellulären Signaltransduktionswege. Die Aktivierung dieser Signalwege durch pharmakologisch einsetzbare Substanzen, wie etwa Lithium (Chalecka-Franaszek and Chuang 1999), könnte neue Behandlungsoptionen bei der neuroprotektiven Therapie des M. Parkinson eröffnen. Leider ist noch keine Substanz bekannt, die direkt die antiapoptotischen Faktoren wie Akt oder BCL-X<sub>L</sub> stimulieren, so daß man zur Zeit noch darauf angewiesen ist, mit Hilfe neurotropher Faktoren die antiapoptotischen Signalwege zu aktivieren und die proapoptotischen Faktoren wie Caspasen, Janus-Kinasen oder SAPK zu hemmen. Hier besteht also noch viel Handlungs- und Forschungsbedarf, jedoch auch völlig neue Perspektiven in der Behandlung von degenerativen oder proliferativen Erkrankungen.

## **6.5 Schlußfolgerung**

Hier konnte gezeigt werden, daß GDNF seine antiapoptotische Wirkung vor allem über den PI3K-Akt-BAD-Signalweg vermittelt, und das dieser Effekt durch Blockade des eher proliferativen MAPK-Signalweges noch gesteigert werden kann. Dies ist insbesondere deswegen interessant, weil bisher nicht viel bekannt war über die intrazellulären Mechanismen der GDNF-Wirkungen. Durch eine genaue Analyse der intrazellulären Signaltransduktion von GDNF, kann man sich die sehr potente neuroprotektive Wirkung möglicherweise für die Therapie am Menschen zu nutze machen. Denn trotz der guten Ergebnisse von GDNF in vielen Modellen des M. Parkinson ist es bisher nicht möglich GDNF selber, ohne starke Nebenwirkungen, in der Therapie am Menschen einzusetzen (Kordower, Palfi et al. 1999). Gerade bei der Vielzahl der intrazellulären Signalwegkomponenten, deren Kombinationsmöglichkeiten und daraus resultierenden vielfältigen Effekten ist eine weitergehende Analyse von Signalwegen bei Erkrankungen oder Therapien sinnvoll. So konnte z.B. Trupp et al (Trupp, Scott et al. 1999) zeigen, daß die intrazellulären Effekte von GDNF ebenfalls mit der Anwesenheit des Ret-Rezeptors bzw. der Konzentration des GFR $\alpha$  variieren und damit bestätigt daß auf diesem Gebiet noch viel Forschungsbedarf besteht. Mit den dabei gewonnen Erkenntnissen können sich völlig neue Therapiemöglichkeiten bei der Behandlung von onkologischen oder degenerativen Prozessen ergeben.

## 7 Zusammenfassung

Die Parkinson-Erkrankung ist neben dem M. Alzheimer die häufigste neurodegenerative Erkrankung mit einer Prävalenz von ca. 3% bei den über 65-Jährigen. Als Degenerationsmechanismus wird ein programmierter Zelltod (Apoptose) der dopaminergen Neurone in den Basalganglien vermutet. Neben den bestehenden klassischen symptomatischen Therapien mit L-Dopa und anderen Antiparkinsonmitteln gibt es immer wieder Ansätze, die den weiteren Untergang der Zellen verhindern oder den Verlust ersetzen sollen. Zu diesen Therapien zählen der Einsatz neurotropher Faktoren oder die Transplantation fetaler dopaminergener Neurone. Dabei zeigte der „Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor“ (GDNF) in verschiedenen in vivo und in vitro Modellen des M. Parkinson eine überzeugende und reproduzierbare Wirkung und gilt daher als potentester neuroprotektiver Faktor im experimentellen Modell. Dem Verständnis seiner Wirkungsweise gilt daher das wissenschaftliche Interesse, um darauf basierend neue Therapie-Ansätze zu entwickeln. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der vermittelnde intrazelluläre Mechanismus, die bislang im Wesentlichen ungeklärt sind.

GDNF bindet an einen Rezeptorkomplex aus dem extrazellulär lokalisierten GDNF Rezeptor ( $GFR\alpha$ ) und die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Ret. Nach der Bindung von GDNF,  $GFR\alpha$  und RET werden intrazelluläre Proteinkinasen aktiviert, unter anderem auch die Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K), die als Schlüsselenzym zur Aktivierung antiapoptotischer Signalwege gilt. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell der humanen Neuroblastom-Zelllinie SHSY5Y zeigte eine Expression des  $GFR\alpha$ s und des Ret-Rezeptors. Nach Stimulation mit GDNF konnte in einem Immunpräzipitationsassay auch die Phosphorylierung der PI3K nachgewiesen werden. Unter den PI3K-vermittelten intrazellulären Effekten scheint vor allem die Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B) für die anti-apoptotische Wirkung verantwortlich zu sein. Hier konnte gezeigt werden, daß Akt tatsächlich nach Stimulation durch GDNF PI3K-abhängig phosphoryliert wurde. Unter den Akt-Substraten spielt v.a. das bcl2-Familienmitglied BAD eine bedeutende Rolle in der Apoptose-Regulation. BAD ist ein proapoptotischer Faktor, von dem bekannt ist, daß er durch Akt phosphoryliert wird und dadurch das antiapoptotische Protein BCL-X<sub>L</sub> freigibt. Phosphoryliertes BAD bindet an 14-3-3-Protein, wodurch es im Zytosol gehalten wird, während BCL-X<sub>L</sub> BAX bindet, und so verhindert, daß dieses durch Tunnel-Bildung in der Mitochondrienmembran zytotoxische Substanzen entläßt. Durch ein im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu entwickeltes Immunpräzipitationsassay konnte gezeigt werden, daß BAD als Ergebnis der GDNF-Stimulation tatsächlich an das 14-3-3-Protein

bindet und dadurch nicht proapoptotisch wirken kann. Somit wurde erstmals eine direkte biochemische Verbindung zwischen dem GFR $\alpha$ -Ret-Rezeptorkomplex und dem PI3K/Akt-Signalweg nach Behandlung von humanen Neuroblastomzellen mit GDNF hergestellt. Dieser Signalweg scheint wesentlich an der Vermittlung der antiapoptotischen Wirkung von GDNF beteiligt zu sein.

In den hier dargestellten Untersuchungen fand sich ebenfalls eine Aktivierung der endogenen Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Cascade (MAPK) nach Stimulation mit GDNF, allerdings mit einer anderen Kinetik als in der Kontrollstimulation mit EGF. So zeigte sich, daß der Effekt von GDNF auf den PI3K/Akt-Signalweg ausgeprägter ist als auf den ras/MAPK-Signalweg, und das umgekehrt der Effekt von EGF auf den MAPK-Signalweg deutlicher ist, als auf den Akt-Signalweg. Interessanterweise wurde Akt bei Blockade des MAPK-Signalweges durch PD098059 stärker phosphoryliert als ohne den Inhibitor, so daß man davon ausgehen kann, daß die Zellen bei Blockade der Proliferation als Reaktion auf den Streß die Antiapoptose verstärken. Die Analyse der intrazellulären Signaltransduktion ermöglicht völlig neue Therapieansätze für die Zukunft, die neben möglichen neurorestorativen Strategien v.a. eine neuroprotektive Wirkung in Kombination mit neuen Transplantationsansätzen erreichen könnten.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Airaksinen, M. S., A. Titievsky, M. Saarma. 1999. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci.* 13: 313-25
2. Aitken, A., D. B. Collinge, B. P. van Heusden, T. Isobe, P. H. Roseboom, G. Rosenfeld, J. Soll. 1992. 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem Sci.* 17: 498-501
3. Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, Y. Fukami. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 262: 5592-5
4. Albright, C. F., B. W. Giddings, J. Liu, M. Vito, R. A. Weinberg. 1993. Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase. *Embo J.* 12: 339-47
5. Alessi, D. R., A. Cuenda, P. Cohen, D. T. Dudley, A. R. Saltiel. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen- activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 270: 27489-94
6. Anderson, K. E., J. Coadwell, L. R. Stephens, P. T. Hawkins. 1998. Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol.* 8: 684-91
7. Antonsson, B., F. Conti, A. Ciavatta, S. Montessuit, S. Lewis, I. Martinou, L. Bernasconi, A. Bernard, J. J. Mermoud, G. Mazzei, K. Maundrell, F. Gambale, R. Sadoul, J. C. Martinou. 1997. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science.* 277: 370-2
8. Backer, J. M., M. G. Myers, Jr., S. E. Shoelson, D. J. Chin, X. J. Sun, M. Miralpeix, P. Hu, B. Margolis, E. Y. Skolnik, J. Schlessinger, et al. 1992. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *Embo J.* 11: 3469-79
9. Banfic, H., X. Tang, I. H. Batty, C. P. Downes, C. Chen, S. E. Rittenhouse. 1998. A novel integrin-activated pathway forms PKB/Akt-stimulatory phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate via phosphatidylinositol 3- phosphate in platelets. *J Biol Chem.* 273: 13-6
10. Barde, Y. A. 1988. What, if anything, is a neurotrophic factor? *Trends Neurosci.* 11: 343-6
11. Barinaga, M. 1999. New clues to how proteins link up to run the cell [news; comment]. *Science.* 283: 1247, 1249
12. Beal, M. F. 1995. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol.* 38: 357-66
13. Beck, K. D., J. Valverde, T. Alexi, K. Poulsen, B. Moffat, R. A. Vandlen, A. Rosenthal, F. Hefti. 1995. Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy- induced degeneration in the adult brain [see comments]. *Nature.* 373: 339-41
14. Belham, C., S. Wu, J. Avruch. 1999. Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things. *Curr Biol.* 9: R93-6
15. Biedler, J. L., L. Helson, B. A. Spengler. 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33: 2643-52
16. Bilanz-Bleuel, A., F. Revah, P. Colin, I. Locquet, J. J. Robert, J. Mallet, P. Horellou. 1997. Intrastratial injection of an adenoviral vector expressing glial-cell- line-derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioral impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 8818-23

17. Blomer, U., T. Kafri, L. Randolph-Moore, I. M. Verma, F. H. Gage. 1998. Bcl-xL protects adult septal cholinergic neurons from axotomized cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 2603-8
18. Bongarzone, I., E. Vigano, L. Alberti, M. G. Borrello, B. Pasini, A. Greco, P. Mondellini, D. P. Smith, B. A. Ponder, G. Romeo, M. A. Pierotti. 1998. Full activation of MEN2B mutant RET by an additional MEN2A mutation or by ligand GDNF stimulation. *Oncogene.* 16: 2295-301
19. Bonnefoy-Berard, N., Y. C. Liu, M. von Willebrand, A. Sung, C. Elly, T. Mustelin, H. Yoshida, K. Ishizaka, A. Altman. 1995. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 10142-6
20. Borlongan, C. V., P. R. Sanberg, T. B. Freeman. 1999. Neural transplantation for neurodegenerative disorders. *Lancet.* 353 Suppl 1: S129-30
21. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54
22. Brooks, D. J. 1998. The early diagnosis of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 44: S10-8
23. Brown, E. J., P. A. Beal, C. T. Keith, J. Chen, T. B. Shin, S. L. Schreiber. 1995. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo [published erratum appears in Nature 1995 Dec 7;378(6557):644]. *Nature.* 377: 441-6
24. Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis, M. E. Greenberg. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 96: 857-68
25. Brunn, G. J., J. Williams, C. Sabers, G. Wiederrecht, J. C. Lawrence, Jr., R. T. Abraham. 1996. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *Embo J.* 15: 5256-67
26. Burgering, B. M., P. J. Coffey. 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction [see comments]. *Nature.* 376: 599-602
27. Burke, R. E., N. G. Kholodilov. 1998. Programmed cell death: does it play a role in Parkinson's disease? *Ann Neurol.* 44: S126-33
28. Cairns, P., K. Okami, S. Halachmi, N. Halachmi, M. Esteller, J. G. Herman, J. Jen, W. B. Isaacs, G. S. Bova, D. Sidransky. 1997. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res.* 57: 4997-5000
29. Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, J. C. Reed. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation [see comments]. *Science.* 282: 1318-21
30. Carlomagno, F., G. De Vita, M. T. Berlingieri, V. de Franciscis, R. M. Melillo, V. Colantuoni, M. H. Kraus, P. P. Di Fiore, A. Fusco, M. Santoro. 1996. Molecular heterogeneity of RET loss of function in Hirschsprung's disease. *Embo J.* 15: 2717-25
31. Carlson, K. M., S. Dou, D. Chi, N. Scavarda, K. Toshima, C. E. Jackson, S. A. Wells, Jr., P. J. Goodfellow, H. Donis-Keller. 1994. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 1579-83
32. Casey, D. E. 1997. The relationship of pharmacology to side effects. *J Clin Psychiatry.* 58: 55-62
33. Chalecka-Franaszek, E., D. M. Chuang. 1999. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 8745-50
34. Chiariello, M., R. Visconti, F. Carlomagno, R. M. Melillo, C. Bucci, V. de Franciscis, G. M. Fox, S. Jing, O. A. Coso, J. S. Gutkind, A. Fusco, M. Santoro. 1998. Signalling

- of the Ret receptor tyrosine kinase through the c-Jun NH<sub>2</sub>- terminal protein kinases (JNKs): evidence for a divergence of the ERKs and JNKs pathways induced by Ret. *Oncogene*. 16: 2435-45
35. Choi-Lundberg, D. L., Q. Lin, Y. N. Chang, Y. L. Chiang, C. M. Hay, H. Mohajeri, B. L. Davidson, M. C. Bohn. 1997. Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy [see comments]. *Science*. 275: 838-41
  36. Chung, J., T. C. Grammer, K. P. Lemon, A. Kazlauskas, J. Blenis. 1994. PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 370: 71-5
  37. Clarkson, E. D., W. M. Zawada, C. R. Freed. 1995. GDNF reduces apoptosis in dopaminergic neurons in vitro. *Neuroreport*. 7: 145-9
  38. Clarkson, E. D., W. M. Zawada, C. R. Freed. 1997. GDNF improves survival and reduces apoptosis in human embryonic dopaminergic neurons in vitro. *Cell Tissue Res*. 289: 207-10
  39. Cobb, M. H., E. J. Goldsmith. 1995. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*. 270: 14843-6
  40. Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp, C. J. Marshall. 1994. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*. 77: 841-52
  41. Creedon, D. J., M. G. Tansey, R. H. Baloh, P. A. Osborne, P. A. Lampe, T. J. Fahrner, R. O. Heuckeroth, J. Milbrandt, E. M. Johnson, Jr. 1997. Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 7018-23
  42. Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, B. A. Hemmings. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 378: 785-9
  43. Cross, T. G., D. Scheel-Toellner, N. V. Henriquez, E. Deacon, M. Salmon, J. M. Lord. 2000. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res*. 256: 34-41
  44. Crowley, C., S. D. Spencer, M. C. Nishimura, K. S. Chen, S. Pitts-Meek, M. P. Armanini, L. H. Ling, S. B. MacMahon, D. L. Shelton, A. D. Levinson, et al. 1994. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell*. 76: 1001-11
  45. Danilkovitch, A., S. Donley, A. Skeel, E. J. Leonard. 2000. Two independent signaling pathways mediate the antiapoptotic action of macrophage-stimulating protein on epithelial cells. *Mol Cell Biol*. 20: 2218-27
  46. Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, M. E. Greenberg. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell*. 91: 231-41
  47. Davies, A. M. 1994. Neurotrophic factors. Switching neurotrophin dependence. *Curr Biol*. 4: 273-6
  48. De Vita, G., M. T. Berlingieri, R. Visconti, M. D. Castellone, G. Viglietto, G. Baldassarre, M. Zannini, A. Bellacosa, P. N. Tsichlis, A. Fusco, M. Santoro. 2000. Akt/protein kinase B promotes survival and hormone-independent proliferation of thyroid cells in the absence of dedifferentiating and transforming effects. *Cancer Res*. 60: 3916-20
  49. del Peso, L., M. Gonzalez-Garcia, C. Page, R. Herrera, G. Nunez. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*. 278: 687-9
  50. Dennis, P. B., S. Fumagalli, G. Thomas. 1999. Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Curr Opin Genet Dev*. 9: 49-54

51. Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, A. M. Zeiher. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt- dependent phosphorylation. *Nature*. 399: 601-5
52. Domin, J., M. D. Waterfield. 1997. Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett*. 410: 91-5
53. Domin, J., F. Pages, S. Volinia, S. E. Rittenhouse, M. J. Zvelebil, R. C. Stein, M. D. Waterfield. 1997. Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochem J*. 326: 139-47
54. Downward, J. 1999. How BAD phosphorylation is good for survival. *nature cell biology*. 1: E33-E35
55. Drivas, G. T., A. Shih, E. Coutavas, M. G. Rush, P. D'Eustachio. 1990. Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Mol Cell Biol*. 10: 1793-8
56. Dunnett, S. B., A. Bjorklund. 1999. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature*. 399: A32-9
57. Durbec, P., C. V. Marcos-Gutierrez, C. Kilkenny, M. Grigoriou, K. Wartiovaara, P. Suvanto, D. Smith, B. Ponder, F. Costantini, M. Saarma, et al. 1996. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase [see comments]. *Nature*. 381: 789-93
58. Ebadi, M., S. K. Srinivasan, M. D. Baxi. 1996. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 48: 1-19
59. Ernfors, P., K. F. Lee, J. Kucera, R. Jaenisch. 1994. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell*. 77: 503-12
60. Exton, J. H. 1994. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta*. 1212: 26-42
61. Fahn, S. 1999. Parkinson disease, the effect of levodopa, and the ELLDOPA trial. Earlier vs Later L-DOPA [see comments]. *Arch Neurol*. 56: 529-35
62. Franke, T. F., D. R. Kaplan, L. C. Cantley. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 88: 435-7
63. Fruman, D. A., R. E. Meyers, L. C. Cantley. 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*. 67: 481-507
64. Fulton, D., J. P. Gratton, T. J. McCabe, J. Fontana, Y. Fujio, K. Walsh, T. F. Franke, A. Papapetropoulos, W. C. Sessa. 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 399: 597-601
65. Garrett, T. P., N. M. McKern, M. Lou, M. J. Frenkel, J. D. Bentley, G. O. Lovrecz, T. C. Elleman, L. J. Cosgrove, C. W. Ward. 1998. Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor. *Nature*. 394: 395-9
66. Gash, D. M., Z. Zhang, A. Ovidia, W. A. Cass, A. Yi, L. Simmerman, D. Russell, D. Martin, P. A. Lapchak, F. Collins, B. J. Hoffer, G. A. Gerhardt. 1996. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*. 380: 252-5
67. Gash, D. M., Z. Zhang, G. Gerhardt. 1998. Neuroprotective and neurorestorative properties of GDNF. *Ann Neurol*. 44: S121-5
68. Gingras, A. C., S. G. Kennedy, M. A. O'Leary, N. Sonenberg, N. Hay. 1998. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev*. 12: 502-13
69. Gouin, A., E. Bloch-Gallego, H. Tanaka, A. Rosenthal, C. E. Henderson. 1996. Transforming growth factor-beta 3, glial cell line-derived neurotrophic factor, and fibroblast growth factor-2, act in different manners to promote motoneuron survival in vitro. *J Neurosci Res*. 43: 454-64
70. Granholm, A. C., J. L. Mott, K. Bowenkamp, S. Eken, S. Henry, B. J. Hoffer, P. A. Lapchak, M. R. Palmer, C. van Horne, G. A. Gerhardt. 1997. Glial cell line-derived

- neurotrophic factor improves survival of ventral mesencephalic grafts to the 6-hydroxydopamine lesioned striatum. *Exp Brain Res.* 116: 29-38
71. Green, D. R., J. C. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281: 1309-12
  72. Greene, L. A., A. S. Tischler. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73: 2424-8
  73. Group, T. P. S. 1996. Impact of deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP patients requiring levodopa. Parkinson Study Group [see comments]. *Ann Neurol.* 39: 37-45
  74. Group, T. P. S. 1996. Impact of deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP subjects not requiring levodopa. Parkinson Study Group [see comments]. *Ann Neurol.* 39: 29-36
  75. Group, T. P. S. 1998. Mortality in DATATOP: a multicenter trial in early Parkinson's disease. Parkinson Study Group [see comments]. *Ann Neurol.* 43: 318-25
  76. Haas, R. H., F. Nasirian, K. Nakano, D. Ward, M. Pay, R. Hill, C. W. Shults. 1995. Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 37: 714-22
  77. Hauser, R. A., T. B. Freeman, B. J. Snow, M. Nauert, L. Gauger, J. H. Kordower, C. W. Olanow. 1999. Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch Neurol.* 56: 179-87
  78. Hely, M. A., J. G. Morris, W. G. Reid, D. J. O'Sullivan, P. M. Williamson, D. Rail, G. A. Broe, S. Margrie. 1994. The Sydney Multicentre Study of Parkinson's disease: a randomised, prospective five year study comparing low dose bromocriptine with low dose levodopa-carbidopa. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 57: 903-10
  79. Hemmings, B. A. 1997. Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions [comment]. *Science.* 275: 628-30
  80. Henderson, C. E. 1996. Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Curr Opin Neurobiol.* 6: 64-70
  81. Hou, J. G., G. Cohen, C. Mytilineou. 1997. Basic fibroblast growth factor stimulation of glial cells protects dopamine neurons from 6-hydroxydopamine toxicity: involvement of the glutathione system. *J Neurochem.* 69: 76-83
  82. Hubbard, S. R., L. Wei, L. Ellis, W. A. Hendrickson. 1994. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor [see comments]. *Nature.* 372: 746-54
  83. Hubbard, S. R. 1999. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol.* 71: 343-58
  84. Hughes, A. J., S. E. Daniel, S. Blankson, A. J. Lees. 1993. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol.* 50: 140-8
  85. Ichimura, T., M. Ito, C. Itagaki, M. Takahashi, T. Horigome, S. Omata, S. Ohno, T. Isobe. 1997. The 14-3-3 protein binds its target proteins with a common site located towards the C-terminus. *FEBS Lett.* 413: 273-6
  86. Ito, S., T. Iwashita, N. Asai, H. Murakami, Y. Iwata, G. Sobue, M. Takahashi. 1997. Biological properties of Ret with cysteine mutations correlate with multiple endocrine neoplasia type 2A, familial medullary thyroid carcinoma, and Hirschsprung's disease phenotype. *Cancer Res.* 57: 2870-2
  87. Iwashita, T., N. Asai, H. Murakami, M. Matsuyama, M. Takahashi. 1996. Identification of tyrosine residues that are essential for transforming activity of the ret proto-oncogene with MEN2A or MEN2B mutation. *Oncogene.* 12: 481-7
  88. Iwashita, T., H. Murakami, N. Asai, M. Takahashi. 1996. Mechanism of ret dysfunction by Hirschsprung mutations affecting its extracellular domain. *Hum Mol Genet.* 5: 1577-80

89. Jablonka, S., B. Schrank, M. Kralewski, W. Rossoll, M. Sendtner. 2000. Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum Mol Genet.* 9: 341-6
90. Jacobson, M. D., M. Weil, M. C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 88: 347-54
91. Jalava, A. M., J. Heikkila, G. Akerlind, G. R. Pettit, K. E. Akerman. 1990. Effects of bryostatins 1 and 2 on morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 50: 3422-8
92. Jenner, P., C. W. Olanow. 1996. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology.* 47: S161-70
93. Jimenez, C., D. R. Jones, P. Rodriguez-Viciana, A. Gonzalez-Garcia, E. Leonardo, S. Wennstrom, C. von Kobbe, J. L. Toran, R. B. L, V. Calvo, S. G. Copin, J. P. Albar, M. L. Gaspar, E. Diez, M. A. Marcos, J. Downward, A. C. Martinez, I. Merida, A. C. Carrera. 1998. Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Embo J.* 17: 743-53
94. Jing, S., D. Wen, Y. Yu, P. L. Holst, Y. Luo, M. Fang, R. Tamir, L. Antonio, Z. Hu, R. Cupples, J. C. Louis, S. Hu, B. W. Altrock, G. M. Fox. 1996. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell.* 85: 1113-24
95. Johnson, L. N., M. E. Noble, D. J. Owen. 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell.* 85: 149-58
96. Juncos, J. L. 1999. Management of psychotic aspects of Parkinson's disease. *J Clin Psychiatry.* 60: 42-53
97. Kandel, E. S., N. Hay. 1999. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res.* 253: 210-29
98. Kauffmann-Zeh, A., P. Rodriguez-Viciana, E. Ulrich, C. Gilbert, P. Coffey, J. Downward, G. Evan. 1997. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature.* 385: 544-8
99. Kennedy, S. G., A. J. Wagner, S. D. Conzen, J. Jordan, A. Bellacosa, P. N. Tsichlis, N. Hay. 1997. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.* 11: 701-13
100. Khwaja, A., P. Rodriguez-Viciana, S. Wennstrom, P. H. Warne, J. Downward. 1997. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *Embo J.* 16: 2783-93
101. Khwaja, A., K. Lehmann, B. M. Marte, J. Downward. 1998. Phosphoinositide 3-kinase induces scattering and tubulogenesis in epithelial cells through a novel pathway. *J Biol Chem.* 273: 18793-801
102. Khwaja, A. 1999. Akt is more than just a Bad kinase [news] [In Process Citation]. *Nature.* 401: 33-4
103. Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno, N. Shimizu. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism [see comments]. *Nature.* 392: 605-8
104. Kordower, J. H., T. B. Freeman, B. J. Snow, F. J. Vingerhoets, E. J. Mufson, P. R. Sanberg, R. A. Hauser, D. A. Smith, G. M. Nauert, D. P. Perl, et al. 1995. Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease [see comments]. *N Engl J Med.* 332: 1118-24
105. Kordower, J. H., S. Palfi, E. Y. Chen, S. Y. Ma, T. Sendra, E. J. Cochran, E. J. Mufson, R. Penn, C. G. Goetz, C. D. Comella. 1999. Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 46: 419-24

106. Korsmeyer, S. J. 1999. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 59: 1693s-1700s
107. Kosaki, A., K. Yamada, J. Suga, A. Otaka, H. Kuzuya. 1998. 14-3-3beta protein associates with insulin receptor substrate 1 and decreases insulin-stimulated phosphatidylinositol 3'-kinase activity in 3T3L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 273: 940-4
108. Kroemer, G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis [published erratum appears in *Nat Med* 1997 Aug;3(8):934]. *Nat Med.* 3: 614-20
109. Kruttgen, A., J. V. Heymach, Jr., P. J. Kahle, E. M. Shooter. 1997. The role of the nerve growth factor carboxyl terminus in receptor binding and conformational stability. *J Biol Chem.* 272: 29222-8
110. Kullander, K., D. Kaplan, T. Ebendal. 1997. Two restricted sites on the surface of the nerve growth factor molecule independently determine specific TrkA receptor binding and activation. *J Biol Chem.* 272: 9300-7
111. Kunapuli, P., J. A. Lawson, J. A. Rokach, J. L. Meinkoth, G. A. FitzGerald. 1998. Prostaglandin F2alpha (PGF2alpha) and the isoprostane, 8, 12-iso- isoprostane F2alpha-III, induce cardiomyocyte hypertrophy. Differential activation of downstream signaling pathways. *J Biol Chem.* 273: 22442-52
112. Kurth, M. C., C. H. Adler, M. S. Hilaire, C. Singer, C. Waters, P. LeWitt, D. A. Chernik, E. E. Dorflinger, K. Yoo. 1997. Tolcapone improves motor function and reduces levodopa requirement in patients with Parkinson's disease experiencing motor fluctuations: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Tolcapone Fluctuator Study Group I. *Neurology.* 48: 81-7
113. Lang, A. E., A. M. Lozano. 1998. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med.* 339: 1044-53
114. Lang, A. E., A. M. Lozano. 1998. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med.* 339: 1130-43
115. Langston, J. W., P. Ballard, J. W. Tetrud, I. Irwin. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 219: 979-80
116. Langston, J. W., E. B. Langston, I. Irwin. 1984. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl.* 100: 49-54
117. Latchman, D. S., R. S. Coffin. 2000. Viral vectors in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 15: 9-17
118. Lemke, L. E., G. D. Paine-Murrieta, C. W. Taylor, G. Powis. 1999. Wortmannin inhibits the growth of mammary tumors despite the existence of a novel wortmannin-insensitive phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Chemother Pharmacol.* 44: 491-7
119. Leroy, E., R. Boyer, G. Auburger, B. Leube, G. Ulm, E. Mezey, G. Harta, M. J. Brownstein, S. Jonnalagada, T. Chernova, A. Dehejia, C. Lavedan, T. Gasser, P. J. Steinbach, K. D. Wilkinson, M. H. Polymeropoulos. 1998. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease [letter]. *Nature.* 395: 451-2
120. Li, J., G. P. Smith, J. C. Walker. 1999. Kinase interaction domain of kinase-associated protein phosphatase, a phosphoprotein-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 7821-6
121. Liaw, D., D. J. Marsh, J. Li, P. L. Dahia, S. I. Wang, Z. Zheng, S. Bose, K. M. Call, H. C. Tsou, M. Peacocke, C. Eng, R. Parsons. 1997. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet.* 16: 64-7
122. Lin, L. F., D. H. Doherty, J. D. Lile, S. Bektesh, F. Collins. 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [see comments]. *Science.* 260: 1130-2

123. Lu, P. J., X. Z. Zhou, M. Shen, K. P. Lu. 1999. Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules [see comments]. *Science*. 283: 1325-8
124. Lu, R., L. Song, R. S. Jope. 1999. Lithium attenuates p53 levels in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroreport*. 10: 1123-5
125. Maehama, T., J. E. Dixon. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*. 273: 13375-8
126. Mahalik, T. J., W. E. Hahn, G. H. Clayton, G. P. Owens. 1994. Programmed cell death in developing grafts of fetal substantia nigra. *Exp Neurol*. 129: 27-36
127. Martin, S. J. G., D.R. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*. 82: 349-352
128. Mayer, B. a. B., D. 1993. Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends in Cell Biology*. 3: 8 -13
129. McAllister, A. K., D. C. Lo, L. C. Katz. 1995. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*. 15: 791-803
130. McAllister, A. K., L. C. Katz, D. C. Lo. 1997. Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth. *Neuron*. 18: 767-78
131. McDonald, N. Q., W. A. Hendrickson. 1993. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*. 73: 421-4
132. McGeer, P. L., S. Itagaki, H. Akiyama, E. G. McGeer. 1988. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol*. 24: 574-6
133. McGeer, E. G. M., P.L. 1994. Neurodegeneration and the immune system. *Calne, D.B.: Neurodegenerative diseases*. 1: 277-299
134. Michel, P. P., F. Hefti. 1990. Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *J Neurosci Res*. 26: 428-35
135. Michel, P. P., B. K. Dandapani, B. Knusel, J. Sanchez-Ramos, F. Hefti. 1990. Toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium for rat dopaminergic neurons in culture: selectivity and irreversibility. *J Neurochem*. 54: 1102-9
136. Minichiello, L., F. Piehl, E. Vazquez, T. Schimmang, T. Hokfelt, J. Represa, R. Klein. 1995. Differential effects of combined trk receptor mutations on dorsal root ganglion and inner ear sensory neurons. *Development*. 121: 4067-75
137. Moghal, S., A. H. Rajput, C. D'Arcy, R. Rajput. 1994. Prevalence of movement disorders in elderly community residents. *Neuroepidemiology*. 13: 175-8
138. Mohajeri, M. H., D. A. Figlewicz, M. C. Bohn. 1999. Intramuscular grafts of myoblasts genetically modified to secrete glial cell line-derived neurotrophic factor prevent motoneuron loss and disease progression in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Gene Ther*. 10: 1853-66
139. Morrison, P., K. Takishima, M. R. Rosner. 1993. Role of threonine residues in regulation of the epidermal growth factor receptor by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 268: 15536-43
140. Myers, M. P., N. K. Tonks. 1997. PTEN: sometimes taking it off can be better than putting it on [editorial]. *Am J Hum Genet*. 61: 1234-8
141. Narhi, L. O., R. Rosenfeld, J. Talvenheimo, S. J. Prestrelski, T. Arakawa, J. W. Lary, C. G. Kolvenbach, R. Hecht, T. Boone, J. A. Miller, et al. 1993. Comparison of the biophysical characteristics of human brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and nerve growth factor. *J Biol Chem*. 268: 13309-17
142. Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, S. J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 74: 609-19



143. Ozes, O. N., L. D. Mayo, J. A. Gustin, S. R. Pfeffer, L. M. Pfeffer, D. B. Donner. 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase [In Process Citation]. *Nature*. 401: 82-5
144. Pap, M., G. M. Cooper. 1998. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3- Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*. 273: 19929-32
145. Pawson, T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature*. 373: 573-80
146. Pearson, R. B., G. Thomas. 1995. Regulation of p70s6k/p85s6k and its role in the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res*. 1: 21-32
147. Perese, D. A., J. Ulman, J. Viola, S. E. Ewing, K. S. Bankiewicz. 1989. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res*. 494: 285-93
148. Pollard, H. B., K. Dhariwal, O. M. Adeyemo, C. J. Markey, H. Caohuy, M. Levine, S. Markey, M. B. Youdim. 1992. A parkinsonian syndrome induced in the goldfish by the neurotoxin MPTP. *Faseb J*. 6: 3108-16
149. Polverini, P. J., J. E. Nor. 1999. Apoptosis and predisposition to oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med*. 10: 139-52
150. Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. Di Iorio, L. I. Golbe, R. L. Nussbaum. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease [see comments]. *Science*. 276: 2045-7
151. Ponder, B. A. 1999. The phenotypes associated with ret mutations in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome. *Cancer Res*. 59: 1736s-1741s; discussion 1742s
152. Porter, A. C., R. R. Vaillancourt. 1998. Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene*. 17: 1343-52
153. Posern, G., R. Saffrich, W. Ansorge, S. M. Feller. 2000. Rapid lamellipodia formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells is dependent on Rac and PI3K activity. *J Cell Physiol*. 183: 416-24
154. Powis, G., R. Bonjouklian, M. M. Berggren, A. Gallegos, R. Abraham, C. Ashendel, L. Zalkow, W. F. Matter, J. Dodge, G. Grindey, et al. 1994. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3- kinase. *Cancer Res*. 54: 2419-23
155. Pumiglia, K. M., S. J. Decker. 1997. Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 448-52
156. Rameh, L. E., C. S. Chen, L. C. Cantley. 1995. Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell*. 83: 821-30
157. Rapoport, M., A. Ferreira. 2000. PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons. *J Neurochem*. 74: 125-33
158. Rasheed, B. K., T. T. Stenzel, R. E. McLendon, R. Parsons, A. H. Friedman, H. S. Friedman, D. D. Bigner, S. H. Bigner. 1997. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res*. 57: 4187-90
159. Rhei, E., L. Kang, F. Bogomolny, M. G. Federici, P. I. Borgen, J. Boyd. 1997. Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. *Cancer Res*. 57: 3657-9
160. Riley, D. E., A. E. Lang. 1993. The spectrum of levodopa-related fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology*. 43: 1459-64
161. Roach, P., Y. Zick, P. Formisano, D. Accili, S. I. Taylor, P. Gorden. 1994. A novel human insulin receptor gene mutation uniquely inhibits insulin binding without impairing posttranslational processing. *Diabetes*. 43: 1096-102
162. Robertson, G. S., S. J. Crocker, D. W. Nicholson, J. B. Schulz. 2000. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis [In Process Citation]. *Brain Pathol*. 10: 283-92

163. Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield, J. Downward. 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras [see comments]. *Nature*. 370: 527-32
164. Romashkova, J. A., S. S. Makarov. 1999. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling [In Process Citation]. *Nature*. 401: 86-90
165. Rossel, M., A. Pasini, S. Chappuis, O. Geneste, L. Fournier, I. Schuffenecker, M. Takahashi, L. A. van Grunsven, J. L. Urdiales, B. B. Rudkin, G. M. Lenoir, M. Billaud. 1997. Distinct biological properties of two RET isoforms activated by MEN 2A and MEN 2B mutations. *Oncogene*. 14: 265-75
166. Saez, R., A. M. Chan, T. Miki, S. A. Aaronson. 1994. Oncogenic activation of human R-ras by point mutations analogous to those of prototype H-ras oncogenes. *Oncogene*. 9: 2977-82
167. Sambrook, J., Frisch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition
168. Santoro, M., F. Carlomagno, A. Romano, D. P. Bottaro, N. A. Dathan, M. Grieco, A. Fusco, G. Vecchio, B. Matoskova, M. H. Kraus, et al. 1995. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science*. 267: 381-3
169. Sauer, H., W. H. Oertel. 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*. 59: 401-15
170. Schapira, A. H., J. M. Cooper, D. Dexter, P. Jenner, J. B. Clark, C. D. Marsden. 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease [letter] [see comments]. *Lancet*. 1: 1269
171. Scheid, M. P., V. Duronio. 1998. Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 7439-44
172. Schierle, G. S., O. Hansson, M. Leist, P. Nicotera, H. Widner, P. Brundin. 1999. Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat Med*. 5: 97-100
173. Schlaepfer, D. D., C. R. Hauck, D. J. Sieg. 1999. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol*. 71: 435-78
174. Sheehan, J. P., P. E. Palmer, G. A. Helm, J. B. Tuttle. 1997. MPP+ induced apoptotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells: an electron microscope study. *J Neurosci Res*. 48: 226-37
175. Shoulson. 1993. Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. The Parkinson Study Group [see comments]. *N Engl J Med*. 328: 176-83
176. Smith, R. D., Z. Zhang, R. Kurlan, M. McDermott, D. M. Gash. 1993. Developing a stable bilateral model of parkinsonism in rhesus monkeys. *Neuroscience*. 52: 7-16
177. Soltoff, S. P., L. C. Cantley. 1996. p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J Biol Chem*. 271: 563-7
178. Sonoda, Y., S. Watanabe, Y. Matsumoto, E. Aizu-Yokota, T. Kasahara. 1999. FAK is the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3-kinase- Akt survival pathway in hydrogen peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line. *J Biol Chem*. 274: 10566-70
179. Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, M. Goedert. 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies [letter]. *Nature*. 388: 839-40

180. Staal, S. P. 1987. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84: 5034-7
181. Taha, J. M., M. A. Janszen, J. Favre. 1999. Thalamic deep brain stimulation for the treatment of head, voice, and bilateral limb tremor. *J Neurosurg.* 91: 68-72
182. Tahira, T., Y. Ishizaka, F. Itoh, T. Sugimura, M. Nagao. 1990. Characterization of ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line. *Oncogene.* 5: 97-102
183. Takahashi, M., Y. Buma, T. Iwamoto, Y. Inaguma, H. Ikeda, H. Hiai. 1988. Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene.* 3: 571-8
184. Takahashi, M., N. Asai, T. Iwashita, T. Isomura, K. Miyazaki, M. Matsuyama. 1993. Characterization of the ret proto-oncogene products expressed in mouse L cells. *Oncogene.* 8: 2925-9
185. Takishima, K., I. Griswold-Prenner, T. Ingebritsen, M. R. Rosner. 1991. Epidermal growth factor (EGF) receptor T669 peptide kinase from 3T3-L1 cells is an EGF-stimulated "MAP" kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 2520-4
186. Treanor, J. J., L. Goodman, F. de Sauvage, D. M. Stone, K. T. Poulsen, C. D. Beck, C. Gray, M. P. Armanini, R. A. Pollock, F. Hefti, H. S. Phillips, A. Goddard, M. W. Moore, A. Buj-Bello, A. M. Davies, N. Asai, M. Takahashi, R. Vandlen, C. E. Henderson, A. Rosenthal. 1996. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF [see comments]. *Nature.* 382: 80-3
187. Trieu, V. N., R. Liu, X. P. Liu, F. M. Uckun. 2000. A specific inhibitor of janus kinase-3 increases survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 267: 22-5
188. Trojanowski, J. Q., V. M. Lee. 1994. Phosphorylation of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease and Lewy body dementias. *Ann N Y Acad Sci.* 747: 92-109
189. Trupp, M., R. Scott, S. R. Whittemore, C. F. Ibanez. 1999. Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells. *J Biol Chem.* 274: 20885-94
190. Uberall, F., K. Hellbert, S. Kampfer, K. Maly, A. Villunger, M. Spitaler, J. Mwanjewe, G. Baier-Bitterlich, G. Baier, H. H. Grunicke. 1999. Evidence that atypical protein kinase C-lambda and atypical protein kinase C-zeta participate in Ras-mediated reorganization of the F-actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 144: 413-25
191. Ullrich, A., J. Schlessinger. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61: 203-12
192. Ungerstedt, U. 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 5: 107-10
193. van der Geer, P., S. Wiley, G. D. Gish, V. K. Lai, R. Stephens, M. F. White, D. Kaplan, T. Pawson. 1996. Identification of residues that control specific binding of the Shc phosphotyrosine-binding domain to phosphotyrosine sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 963-8
194. van Weering, D. H., J. P. Medema, A. van Puijenbroek, B. M. Burgering, P. D. Baas, J. L. Bos. 1995. Ret receptor tyrosine kinase activates extracellular signal-regulated kinase 2 in SK-N-MC cells. *Oncogene.* 11: 2207-14
195. van Weering, D. H., J. L. Bos. 1997. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces Ret-mediated lamellipodia formation. *J Biol Chem.* 272: 249-54
196. van Weering, D. H., J. de Rooij, B. Marte, J. Downward, J. L. Bos, B. M. Burgering. 1998. Protein kinase B activation and lamellipodium formation are independent

- phosphoinositide 3-kinase-mediated events differentially regulated by endogenous Ras. *Mol Cell Biol.* 18: 1802-11
197. Walkinshaw, G., C. M. Waters. 1994. Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. *Neuroscience.* 63: 975-87
  198. Weiss, A., J. Schlessinger. 1998. Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell.* 94: 277-80
  199. Welch, H., A. Eguinoa, L. R. Stephens, P. T. Hawkins. 1998. Protein kinase B and rac are activated in parallel within a phosphatidylinositide 3OH-kinase-controlled signaling pathway. *J Biol Chem.* 273: 11248-56
  200. Wells CL, J. R., Kinneberg KM, Debol SM, Erlandsen SL. 1999. The isoflavone genistein inhibits internalization of enteric bacteria by cultured Caco-2 and HT-29 enterocytes. *Journal of nutrition.* 120: 634-640
  201. Welsh, M. J., M. Gaestel. 1998. Small heat-shock protein family: function in health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 851: 28-35
  202. Wenning, G. K., P. Odin, P. Morrish, S. Rehncrona, H. Widner, P. Brundin, J. C. Rothwell, R. Brown, B. Gustavii, P. Hagell, M. Jahanshahi, G. Sawle, A. Bjorklund, D. J. Brooks, C. D. Marsden, N. P. Quinn, O. Lindvall. 1997. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 42: 95-107
  203. Wilden, P. A., C. R. Kahn, K. Siddle, M. F. White. 1992. Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J Biol Chem.* 267: 16660-8
  204. Worby, C. A., Q. C. Vega, Y. Zhao, H. H. J. Chao, A. F. Seasholtz, J. E. Dixon. 1996. Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the RET receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 271: 23619-22
  205. Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, M. E. Greenberg. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 270: 1326-31
  206. Yaffe, M. B., K. Rittinger, S. Volinia, P. R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S. J. Gambelin, S. J. Smerdon, L. C. Cantley. 1997. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell.* 91: 961-71
  207. Yang, E., J. Zha, J. Jockel, L. H. Boise, C. B. Thompson, S. J. Korsmeyer. 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell.* 80: 285-91
  208. Zha, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel, S. J. Korsmeyer. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L) [see comments]. *Cell.* 87: 619-28
  209. Zhao, M., H. Kiyoi, Y. Yamamoto, M. Ito, M. Towatari, S. Omura, T. Kitamura, R. Ueda, H. Saito, T. Naoe. 2000. In vivo treatment of mutant FLT3-transformed murine leukemia with a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia.* 14: 374-8
  210. Zhong, H., K. Chiles, D. Feldser, E. Laughner, C. Hanrahan, M. M. Georgescu, J. W. Simons, G. L. Semenza. 2000. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics [In Process Citation]. *Cancer Res.* 60: 1541-5
  211. Zhou, S., K. L. Carraway, 3rd, M. J. Eck, S. C. Harrison, R. A. Feldman, M. Mohammadi, J. Schlessinger, S. R. Hubbard, D. P. Smith, C. Eng, et al. 1995. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling [see comments]. *Nature.* 373: 536-9
  212. Zimmermann, S., K. Moelling. 1999. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science.* 286: 1741-4

213. Zuddas, A., F. Fascetti, G. U. Corsini, M. P. Piccardi. 1994. In brown Norway rats, MPP+ is accumulated in the nigrostriatal dopaminergic terminals but it is not neurotoxic: a model of natural resistance to MPTP toxicity. *Exp Neurol*. 127: 54-61

## 9 Danksagung

Für ihre Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit danke ich meinen Eltern, Jürgen und Marlies Neff, meinen Schwestern Katrin und Kirsten mit ihren Familien; Prof. Dr. Jürgen Schlegel, Dr. Gabriele Stumm, Prof. Dr. H. D. Mennel für ihre Anregungen und Hilfen; Dr. Alison Kraus, Ginette Bortolussi, Guido Piontek und allen Doktoranden der AG Schlegel für ihre Unterstützung im Labor; Dr. Barbara Marte und Dr. Julian Downward, ohne deren Hilfe mein Aufenthalt im ICRF in London und die radioaktiven Akt-Assays nicht zustande gekommen wären. Als weiteres Danke ich Pascal Wodtke für seine Geduld und Mühe, sowie Wolfgang Kratzert für den Druck.

## **10 Meine akademischen Lehrer waren Damen und Herren in Marburg:**

Arnold, Basler, Baum, Baum, Bautz-Holzherr, Beato, Christiansen, Daut, Engel, Eschenbach, Feuser, Fruhstorfer, Geus, Gotzen, Gressner, Griß, Ganz, Habermehl, Happle, Hesse, Kälble, Kern, Klenk, Kraus, Krieg, Kroll, Lennartz, Oertel, Pohlen, Remschmidt, Schachtschabel, Schäfer, Schulz, Seifart, Seitz, Steiniger, Stinner, Thomas, Vohland, Werner, Wichert.

# 11 Lebenslauf

Rübezahlstr. 62  
81739 München

Telefon 089 / 60 60 10 50  
E-Mail: [Frauke.Neff@gmx.de](mailto:Frauke.Neff@gmx.de)  
[Neff@neuropathologie-muenchen.de](mailto:Neff@neuropathologie-muenchen.de)

Frauke Neff

## Persönliche Angaben:

- Alter: 28 Jahre
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsort: Unna
- Eltern: Marlies und Jürgen Neff

## Ausbildung

1980 – 1984 Besuch der Diesterweg Grundschule in Kamen (NRW)

1984 –1993 Besuch des Städt. Gymnasium Kamen (NRW)

1993 Abitur am Städt. Gymnasium Kamen

Ab Sept. 1993 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg

1995 Physikum

1996 1. Staatsexamen

1999 2. Staatsexamen

2000 3. Staatsexamen



## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Charakterisierung der Aktivierung des antiapoptotischen Phosphatidylinositol-3`-Kinase-abhängigen Signalwegs durch den neuroprotektiven Faktor *Glial cell line derived neurotrophic factor* (GDNF)“ im Institut für Pathologie, Abt. für Neuropathologie unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Schlegel mit Unterstützung durch Prof. H. D. Mennel und Dr. Gabriele Stumm ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frauke Neff  
München, den 20.01.2002