Aus dem Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung am
Universitätskrankenhaus Eppendorf,

Arbeitsgruppe molekulare Diagnostik

Gruppenleiter Prof. Dr. rer. nat. W. Höppner

Molekular- und zellbiologische Charakterisierung spezifischer RET-Protoonkogen-Mutationen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Boris Baur

aus Hamburg

Hamburg im Jahr 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Korreferent:

Inhaltsverzeichnis

Liste der verwendeten Abkürzungen

1. Einleitung 1

1.1. MEN 2A: eine hereditäre Krebserkrankung und ihre Klinik 1
1.2. Historie 2
1.3. Der RET-Rezeptor 2
1.4. Liganden des RET-Rezeptors 4
1.5. Signaltransduktion 5
1.6. Das RET-Protoonkogen 8
1.7. Mutationen des RET-Protoonkogens 9
1.8. Spezifische Duplikations-Mutationen 11
1.9. Aufgabenstellung 12

2. Material und Methoden 14

2.00. Reagenzien und Lösungen 14
2.01. Klonierungsstrategie 19
a. Amplifikation der mutierten Patienten-DNA mittels PCR 19
b. Umklonierung des die Duplikationsmutation enthaltenden DNA-Fragments aus der Patienten-DNA in die RET-Wildtyp-DNA 19
c. Schematische Darstellung der RET-DNA und der relevanten Schnittstellen im pBluescript-Vektor sowie dem Vorgehen beim partiellen Verdau 20
d. Religation der Fragmente zum Erhalt der +9bp-Mutation im Vektor 21
e. Subklonierung des mutierten RET-Rezeptors für die Transfektion in eukaryotische Zellen 22
2.02. RNA-Isolierung 23
2.03. Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes 24
2.04. cDNA-Synthese 24

2.05. Polymerase Kettenreaktion (PCR) 24
a. Touch-down PCR
b. verwendete Primer
c. amplifizierte Sequenz
2.06. Überprüfung der Amplifikate durch die horizontale Flachbett-Agarosegelelektrophorese 27
2.07. Enzymatische Restriktionsverdaus 27
a. Restriktionsverdau der Amplifikate mit der Restriktionsendonuklease BAM HI 27
b. Restriktionsverdau der RET-Sequenz (Short Isoform) im pBluescript Vektorsystem mit BAM HI, NotI und EcoRI 28
c. Partieller Restriktionsverdau von N + E mit BAM HI 29
d. Gel Partialverdau mit BAMHI 30
e. Herausschneiden des +9bp-ret-Fragments aus pBluescript SK +/- mit Restriktionsenzymen ClaI und ScaI 30
f. Verdau von pRC/CMV mit Hind III 30
2.08. DNA-Extraktionen aus Agarosegelen 31
2.09. Photometrische Ermittlung der DNA-Konzentration 32
2.10. Phenol-Chloroform-Fällung 32
2.11. Ligation 33
a. Ligation aus 3 Komponenten (DUP, 1.8, N+B); cohesive-ends-ligation 33
b. Ligation aus 2 Komponenten (pRC/CMV, RET-fragment+9bp); blunt-ended-ligation 33
2.12. Transformation 33
2.13. Präparation der Plasmid-DNA 34
a. Mini-Prep 34
b. Maxi-Prep 35
2.14. Überprüfung der Produkte durch Kontroll-Restriktionsverdau 36
2.15. Überprüfung der Produkte durch radioaktive Dideoxy-Sequenzierung 39
2.16. CIP-Behandlung der Vektorfragmente 40
2.17. Klenow-Behandlung zwecks Blunt-ended-polishing 40
2.18. Mutagenese 41

2.19. RT-PCR 44
2.20. Zellkulturtechnik 45
2.21. Stabile Transfektion durch Elektroporation 46
2.22. Selektion 46
2.23. Aufzucht von Klonen transfizierter Zellen 47
2.24. Ernten der Zellen für Gesamtzelllysate 47
2.25. Proteinbestimmung 47
2.26. SDS Polyacrylamidgelelektrophorese 48
2.27. Western-Blot 49
2.28. Ponceau S-Färbung 49
2.29. Immunologische Detektion 49
2.30. Immunpräzipitation 50

3. Ergebnisse 51

3.1. Ergebnisse der Klonierung 51
3.1.1. Mutagenese des Wildtyp-RET-Rezeptors mit +12bp-Duplikationsmutation 58
3.2. Immunhistochemische Ergebnisse 59
3.2.1. Ligandenunabhängige Dimerisierung von +9bp- und +12bp-RET 59
3.2.2. Ausbildung von RET-Dimeren durch intermolekulare Disulfidbrücken 61
3.2.3. Vergleich von Klonen unterschiedlicher Expression 61
3.2.4. Konstitutive Aktivierung der +9bp- bzw. +12bp-RET-Tyrosinkinase in NIH 3T3-Mäusefibroblastenzellen 62

4. Diskussion 64

4.1. Diskussion der Klonierungsstrategie 64
4.2. Diskussion des verwendeten Zellmodells 65
4.3. Modell für einen möglichen Pathomechanismus 65

5. Zusammenfassung 71

6. Literaturverzeichnis 72

7. Danksagung 79

Liste der verwendeten Abkürzungen

APS	-	Ammoniumperoxidsulfat
Bp	-	basepair (=Basenpaare)
BSA	-	Bovine Serum Albumin
C	-	Cystein
DAG	-	Diacylglycerin
DEPC	-	Diethylpyrocarbonat
DNA	-	Desoxyribonucleic Acid (=Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	-	EthylenDiaminTetraAcetat
EGFR	-	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK2	-	Extracellular Signal Regulated Kinase 2
FAK	-	Focal Adhesion Kinase
FCS	-	Fetal Calf Serum
FMTC	-	Familiar Medullary Thyroid Carcinoma (=familiär gehäuft auftretendes medulläres Schilddrüsenkarzinom)
GAP	-	GTPase aktivierendes Protein
GDNF	-	Glial Cell-line Derived Neurotropic Factor
GFR	-	GDNF-Rezeptor
GRB2	-	Growth Factor Receptor Bound Protein 2
GRF	-	Guanine Nucleotid Releasing Factor
HEPES	-	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HPT	-	Hyperparathyreoidismus
HRP	-	Horseradish Peroxidase
$Ins(1,4,5)P_3$	-	Inositol 1,4,5-Trisphosphat
kb	-	Kilobasen
kDa	-	Kilo-Dalton
MAP-Kinase	-	Mitogen Activated Protein Kinase
MEK	-	MAP/ERK-Kinase
PBS	-	Phosphate-Buffered Saline
PCC	-	Phäochromocytom
PCR	-	Polymerase Chain Reaction
PDGFR	-	Plateled Derived Growth Factor Receptor
$PLC\gamma$	-	Phospholipase C γ

PMSF	-	Phenylmethylsulfonylflourid
PTB	-	Phosphotyrosin-Bindestelle
PTC	-	Papillary Thyroid Carcinoma (=papilläres Schilddrüsenkarzinom)
PtdIns-3K	-	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PtdIns(4,5)P_2	-	Phosphatidylinositol(4,5)-Bisphosphat
RNA	-	Ribonucleic Acid (=Ribonukleinsäure)
RTK	-	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	-	Sodiumdodecylsulfat
SH2	-	SRC-Homologiedomäne 2
SRE	-	Serum Response Element
TBE	-	Tris Borsäure EDTA
TBS	-	Tris Buffer System
TE	-	Tris EDTA
TEMED	-	Tetramethylendiamin
TGF-β	-	Transforming Growth Factor β
wt	-	Wildtyp

1. Einleitung

Im Rahmen der Grundlagenforschung zur Krebsentstehung spielen hereditäre Tumorerkrankungen eine zunehmend wichtige Rolle. Differenzierte Untersuchungen bekannter Veränderungen im Genom, wie sie bei einigen Erkrankungen vorliegen, führen zu Erkenntnissen zum Ablauf, der Entstehung und auch den theoretisch denkbaren Möglichkeiten zur Verhinderung der Erkrankung.
Zu den hereditären Krebserkrankungen wird der Syndromkomplex der multiplen endokrinen Neoplasien (MEN) gezählt. Je nach den betroffenen Organen erfolgt die Einteilung in MEN 1 (primärer Hyperparathyreoidismus in 80% der Fälle, Pankreastumoren in 60 - 70% der Fälle, Hypophysentumoren in 50 - 60% der Fälle), MEN 2A (C-Zell-Karzinom der Schilddrüse in ca. 95% der Fälle, Phäochromozytom in ca. 50% der Fälle, primärer Hyperparathyreoidismus in 15 - 30% der Fälle) und MEN 2B (marfanoider Habitus, Neurome der Mukosa, Megakolon, C-Zell-Karzinom in 80% der Fälle, Phäochromozytom in 30 - 60% der Fälle) [Chew et al. (1), Heitz et al. (2)].

1.1. MEN 2A: eine hereditäre Krebserkrankung und ihre Klinik

Die MEN 2A ist eine genetisch bedingte Erkrankung. Sie tritt familiär auf, wobei ihr Erbgang autosomal dominant ist. Die Expression ist dabei sehr variabel. Nicht jedes Familienmitglied erkrankt und entwickelt dabei das Vollbild einer polyglandulären Neoplasie; die Penetranz ist jedoch hoch und wird heute mit über 90 % angenommen [Frank-Raue (3)]. Die Veränderungen an den Drüsen reichen von Hyperplasien über Adenome bis zu Karzinomen, wobei diese Veränderungen zeitlich und kausal unabhängig voneinander auftreten können.
Führend im Krankheitsbild der MEN 2A ist das medulläre Schilddrüsenkarzinom [Skinner et al. (4)]. Es entsteht aus einer malignen Entartung der parafollikulär gelegenen C-Zellen der Schilddrüse, häufig nach einer Phase von Jahren oder Jahrzehnten bestehenden diffusen C-Zellhyperplasie. Ein Phäochromozytom manifestiert sich bei der Hälfte der betroffenen Familien [International RET Mutation Consortium (5)]. Typischerweise findet man es bilateral, synchron oder metachron.
Der primäre Hyperparathyreoidismus ist bei den MEN 2A-Patienten meist nur milde ausgeprägt [Schuffenecker et al. (6)].

1.2. Historie

Bemühungen die Multiplen Endokrinen Neoplasien (MEN) des Typs 2 einer bestimmten chromosomalen Lokalisation zuzuweisen, gehen bis in das Jahr 1970 zurück [Kaplan et al. (7)]. 1987 konnte erstmals von zwei unabhängigen Gruppen gezeigt werden, dass das betreffende Gen auf Chromosom 10 in Nähe des Centromers gelegen ist [Mathew et al. (8), Simpson et al. (9)]. Anhand von weiteren Forschungen an einer großen MEN 2-Familie, in der zwei rekombinante Ereignisse simultan aufgetreten waren, konnte sechs Jahre später der zur Diskussion stehende Bereich auf eine 0.5 Mb lange Region eingegrenzt werden [Kwok et al. (10)]. Im gleichen Jahr identifizierten Mulligan et al., sowie Donis-Keller et al. Mutationen in zwei Exons eines Gens, welches in der Mitte dieser untersuchten Region lokalisiert war [Donnis-Keller et al. (11), Mulligan et al. (12)] und als RET-Protoonkogen bezeichnet wird.

1.3. Der RET-Rezeptor

Das RET-Genprodukt ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der eine glykosylierte extrazelluläre Domäne, eine transmembranäre Region mit hydrophoben Aminosäureresten und eine intrazelluläre Domäne aufweist [Takahashi et al. (13)] (Abbildung I.1). Der extrazelluläre Bereich des Rezeptors besitzt eine Liganden-Bindungsdomäne, eine cadherinähnliche Sequenz, sowie eine cysteinreiche Region [Takahashi et al. (14)]. Die cadherinähnliche Sequenz wurde als Bindungsdomäne oder als an Adhäsionsvorgängen beteiligte Region diskutiert [Asai et al. (15)]. In der ebenfalls extrazellulären cysteinreichen Region können sich intra- sowie intermolekulare Bindungen durch Disulfidbrücken ausbilden. Diese sind maßgeblich beteiligt an der Ausbildung der Struktur des Rezeptors sowie an der Signalübertragung, welche auch durch die zellintern liegende Tyrosinkinase-Domäne ausgelöst wird, die durch den Aktivierungsmechanismus des Rezeptors in einen phosphorylierten Zustand übergeht [Takahashi (16)].

Für den RET-Rezeptor sind zwei verschiedene Varianten von 150 kD und 170 kD bekannt, die aus einer 120 kD großen Vorstufe durch unterschiedliche posttranslationale Glykolysierung entstehen [Chew et al. (1)]. Die 150 kD-Variante

stellt eine unreife Zwischenstufe dar und findet sich im rauhen endoplasmatischen Retikulum. Sie erscheint nach Bindung der Oligosaccharide in der Zellmembran [Asai et al. (15)].

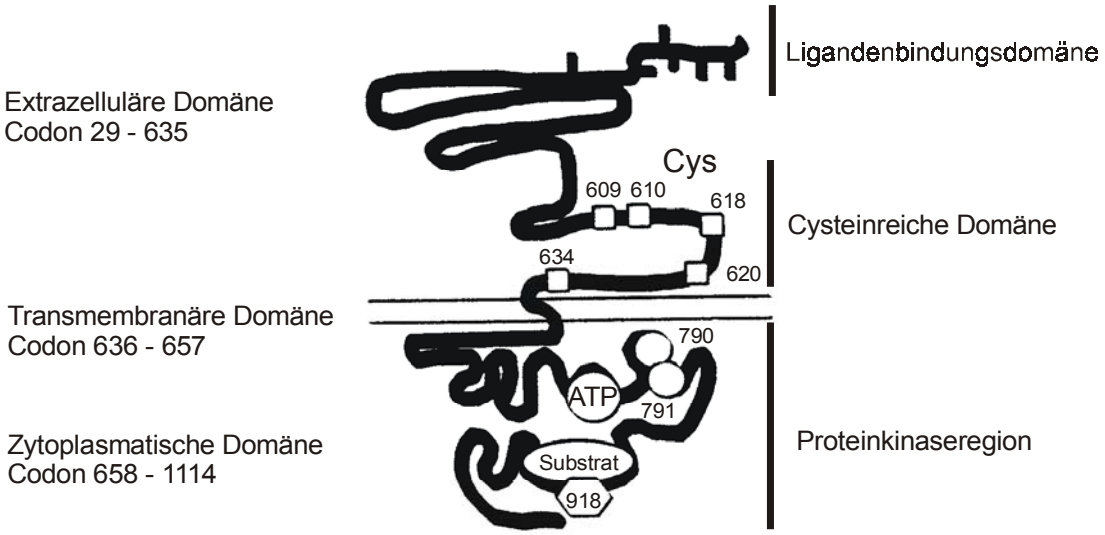


Abbildung I.1: Schematische Darstellung der putativen Struktur des RET-Rezeptors. Die Zahlenangaben entsprechen Codons spezifischer Aminosäurereste, welche für die Erkrankungen der multiplen endokrinen Neoplasien von Bedeutung sind und auf welche im weiteren Textverlauf genauer eingegangen wird. Cys = Cystein, ATP = ATP-Bindungsstellen (730 – 738, 758), Substrat = Substratbindungsstelle.

Des weiteren wurden 3 verschiedene Isoformen des RET-Proteins charakterisiert, welche durch alternatives Spleißen des 3´-Endes der RET-Sequenz entstehen. Sie betreffen das intrazelluläre carboxy-terminale Ende des Rezeptors. In Einklang mit dem Auftreten von einer jeweils spezifischen Anzahl von Aminosäuren nach Codon 3365 (Exon 19) heißen die Varianten RET9, RET43 und RET51 [Tahira et al. (17)].
Auch Spleiß-Varianten vom 5´-Ende sind bekannt, welche für RET-Isoformen mit unterschiedlichen extrazellulären Domänen kodieren [Lorenzo et al. (18)].

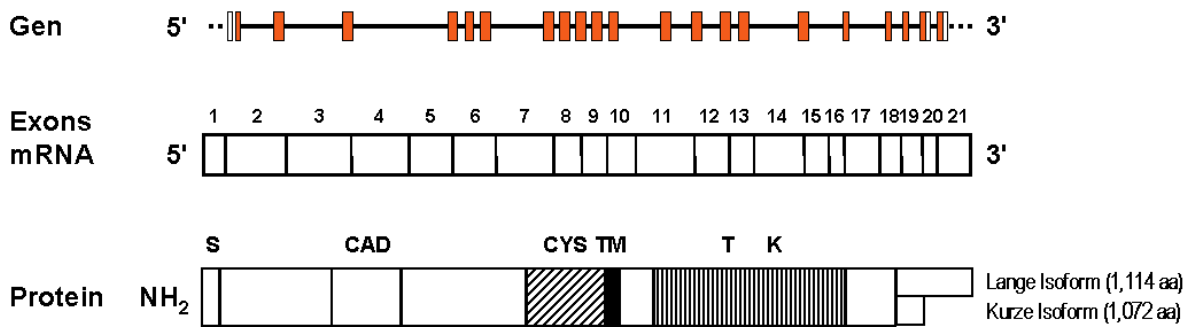


Abbildung I.2: Die Abbildung zeigt die Korrelation zwischen Gen, den Exons der mRNA sowie dem exprimierten RET-Protein in seiner langen und kurzen Isoform. S = Ligandenbindungsdomäne, CAD = cadherinähnliche Sequenz, CYS = cysteinreiche Region, TM = transmembranäre Region, TK = Tyrosinkinaseregion, aa = Länge in Anzahl der Aminosäuren.

1.4. Liganden des RET-Rezeptors

Vor einigen Jahren sind der Glial Cell-line Derived Neurotrophic Factor (GDNF), ein entferntes Mitglied der Transforming Growth Factor (TGF)-ß Superfamilie, Neurturin (NTN), Persephin (PSP) und Artemin als funtionelle Liganden für den RET-Rezeptor nachgewiesen worden [Durbec et al. (19), Creedon et al. (20), Milbrandt et al. (21), Baloh et al. (22)].

Diese vermitteln Signale in den Zellkern über die Bildung von Multirezeptorkomplexen, die das RET-Protein und Glykosylphosphatidylinositol-gebundene Corezeptoren einschließen [Treanor et al.(23)]. Als Corezeptoren sind GFR-α1 [Jing et al. (24)], GFR-α2 [Baloh et al. (25)] und GFR-α3 bekannt [Worby et al. (26)]. Die unterschiedlichen Corezeptoren vermitteln die Bindung der Liganden GDNF, Neurturin und Persephin mit unterschiedlichen Affinitäten. Während GDNF eine höhere Affinität zu GFR-α1 hat, bindet Neurturin eher an GFR-α2 [Buj-Bello et al. (27)]. Für Persephin konnte bisher nur eine Bindung an GFR-α3 nachgewiesen werden.

Eine schematische Darstellung dieses Vorgangs ist in Abbildung I.3 gegeben. Die Verbindung von GDNF und dem GFR-α führt zur Bildung eines Multi-Rezeptorkomplex aus dimerisiertem GDNF, GFR-α und RET-Rezeptortyrosinkinasen. Dieser Vorgang resultiert in der Autophosphorylierung von

Tyrosinresten in der intrazellulären Rezeptordomäne des RET-Rezeptors und dadurch in der Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade.

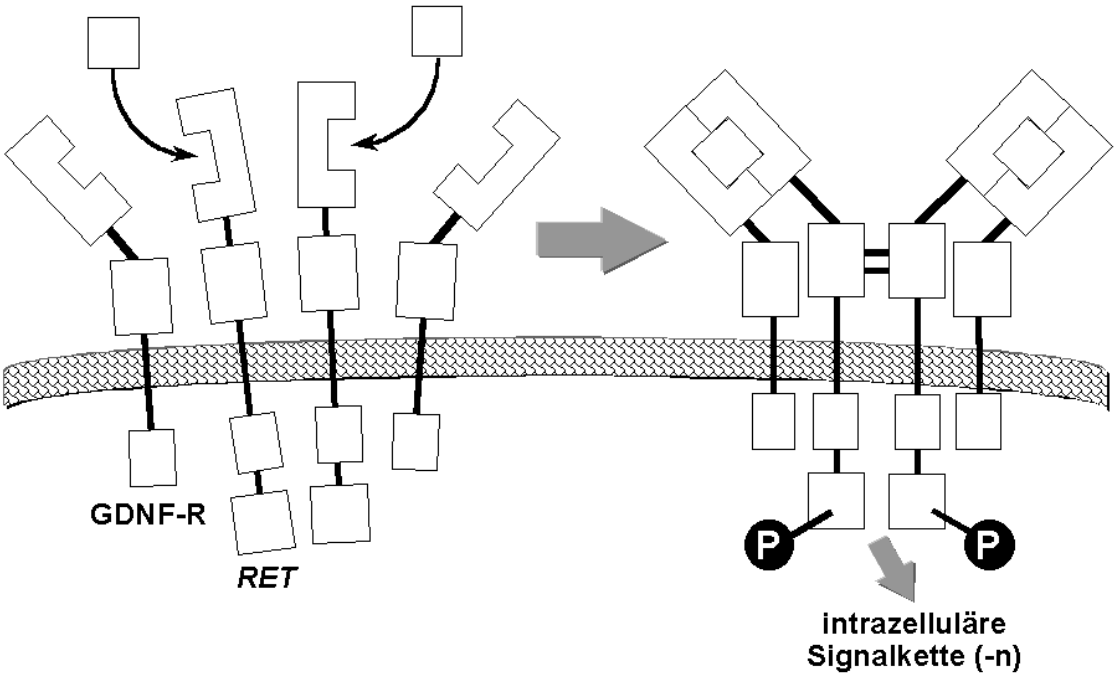


Abbildung I.3: Die Abbildung zeigt das Modell der GDNF-Signalübermittlung am Rezeptorkomplex bestehend aus GFR-α 1 - 4 und RET. P = phosphorylierter Tyrosinrest

1.5. Signaltransduktion

Die RET-Rezeptor Tyrosinkinase ist in der Lage, auf unterschiedlichen Wegen ein Signal in das Innere der Zelle zu übertragen.

Der aktivierte RET-Rezeptor vermag Proteine mit SH2-Domänen (SRC-Homologie 2-Domänen) zu binden. Bereits nachgewiesen sind Bindungen von Phospholipase-Cγ (PLCγ), Shc-Adapterprotein und GRB2 (Growth Factor Receptor Bound Protein 2) [Santoro et al. (28), Lorenzo et al. (18), Asai et al. (29)]. Dabei ist zu beachten, dass lediglich die lange der beiden Isoformen Grb2 direkt binden kann, da die Trunkierung der kurzen Isoform die hierfür nötige Bindungsstelle (pY1096) durch den Spleißvorgang eliminiert.

Bis zur Entdeckung der RET-Liganden wurden Chimären aus PTC-RET bzw. EGFR-RET als Quelle für aktiviertes RET benutzt, um den Signalweg zu untersuchen [Santoro et al. (28), van Weering et al. (30)]. Hierbei wurde gezeigt, dass das Shc-Adapterprotein mit dem Tyrosinrest 1062 (pY1062) in der intrazellulären Tyrosinkinaseregion im RET-Rezeptor über seine Phosphotyrosin-Bindungsstelle (PTB) sowie über seine SH2-Domäne interagieren kann. Die Tyrosin Phosphorylierungsstelle Y317 des Shc kann nun wiederum mit der SH2-Domäne des GRB2 koppeln, was eine Kaskade initiert, die via SOS (Son of Sevenless), p21ras, Raf1, MEK1 zur Aktivierung der MAP-Kinase (Mitogen Activated Protein Kinase) ERK2 (Extracellular signal Related Kinase 2) führt. In Zellen neuroektodermalen Ursprungs, die endogenes RET exprimieren, werden Shc und ERK2 durch EGFR-RET Chimären aktiviert [van Weering et al. (30)]. Die Funktion von ERK2 besteht darin, nach Translokation in den Zellkern Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren, die an SRE (Serum Response Element) binden. Das SRE vermittelt die Transkription von früh exprimierten Genen, wie z. B. c-FOS und c-JUN. Versuche mit konstitutiv aktiviertem RET der kurzen und langen Isoform führten zur Initiierung von FOS-SRE [Lorenzo et al. (18)]. Dies weist darauf hin, dass aktiviertes RET ERK2 initiieren kann, wie es in Neuroblastomzellen gezeigt wurde [van Weering et al. (30)].

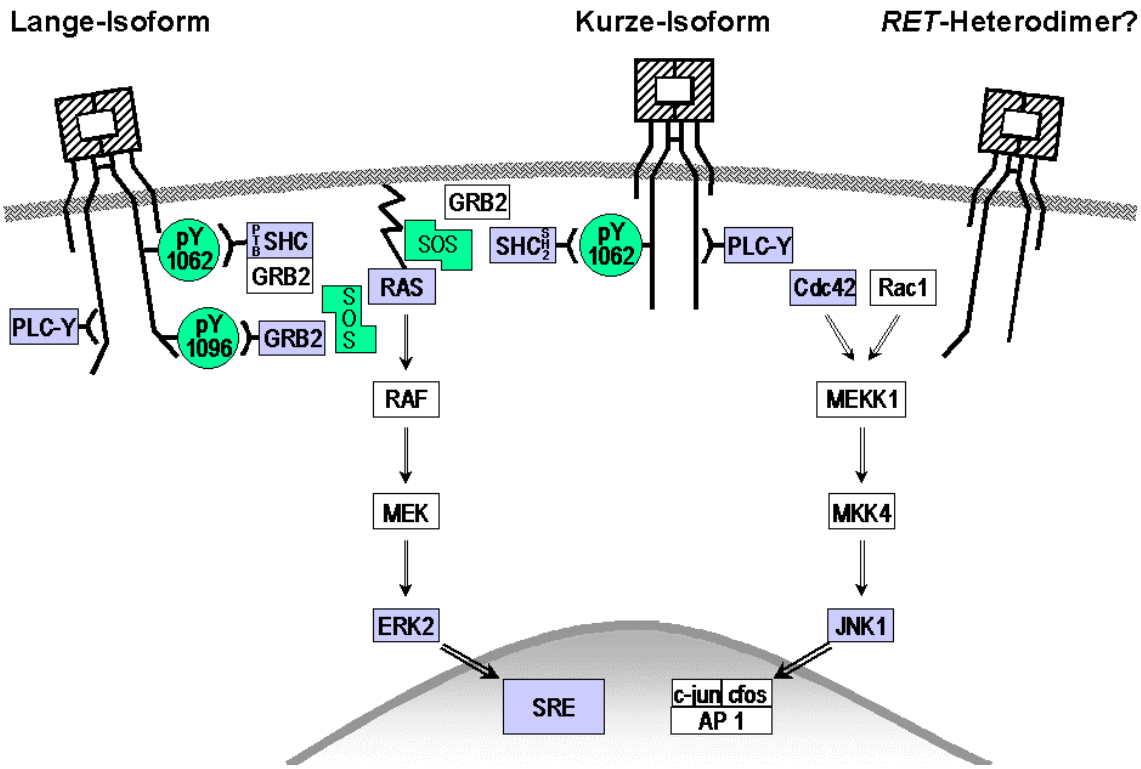


Abbildung I.4: Schematische Darstellung der transmembranären Signalübermittlung durch membranständige Rezeptoren (RET in der langen und kurzen Isoform; RET Heterodimer) und die dadurch vermittelten intrazellulären Vorgänge. PLC-Y = Phospholipase-Cγ, pY = Phosphotyrosinrest, GRB2 = Growth Factor Rebound Protein 2, SOS = Son Of Sevenless, ERK2 = Extracellular signal Related Kinase 2, SRE = Serum Response Element, JNK = c-JUN NH2-terminal protein KInase

In neueren Studien konnte ein weiterer Signalweg des RET aufgezeigt werden. Dieser führt zur Aktivierung von JNK (c-JUN NH2-terminal protein kinase). Stimuli, welche JNKs aktivieren, sind unterschiedlich zu denen, welche ERK2-Aktivität in Gang setzen, und können UV-Strahlung, Hitzeschock, Veränderungen der Osmolarität, Proteinsynthese-Inhibitoren, Cytokine oder Interleukin 1 sein. Vermittelt wird die Aktivierung von JNK durch Rac1 und Cdc42, kleine GTPasen, welche mittels MEKK1 und MKK4 auf JNK wirken. Rac1 und Cdc42 haben jedoch keine Wirkung auf ERK2- Aktivität [Chiariello et al. (31)].

1.6. Das RET-Protoonkogen

Gene, die an der Zellzyklusregulation, der DNA-Reparatur oder der Signalübermittlung beteiligt sind, können durch Mutationen zur malignen Transformation von Zellen führen [Gause, Pfreundschuh, Diehl (32)].

Bei den Tumorsuppressorgenen führt der Verlust beider Allele oder deren Inaktivierung zur Entartung der Zellen. Da eine Kopie eines solchen Gens ausreicht, um die Wachstumskontrolle aufrecht zu erhalten, macht sich ein Defekt erst bemerkbar, wenn beide Allele betroffen sind (= rezessive Mutation). Dies hat eine große Bedeutung im Falle von Mutationen, die bereits in den Keimzellen stattfinden. Da hierdurch alle Körperzellen diese Genomveränderung (= konstitutionelle Mutation) in einem Allel aufweisen, genügt im weiteren Verlauf eine somatische Mutation, um das noch intakte Allel auszuschalten und der Zelle eine ungebremste Vermehrung zu gestatten [Riede, Wiestler, Müller (33)]. Dieser Vorgang erklärt, weshalb bei einigen hereditären Tumorsyndromen der Wegfall eines Tumorsuppressorgens die Entstehung nicht nur eines, sondern mehrerer Tumoren in verschiedenen Organen und Geweben zur Folge hat. Als Beispiel können die vererbbaren Veränderungen des Retinoblastomgens genannt werden [Picksley et al. (34)].

Protoonkogene werden durch aktivierende Mutationen zu Onkogenen, die zur neoplastischen Transformation von Zellen beitragen. Die Protoonkogene steuern über ihr Genprodukt, das Onkoprotein, die Signalaufnahme im Bereich der Zellmembran, die Signalübermittlung im Zytoplasma oder die Signalumsetzung im Zellkern [Gause, Pfreundschuh, Diehl (32)]. Hieraus ergibt sich, dass die DNS-Sequenzen der Onkogene, sowie sie künstlich in eine normale Zelle gebracht werden (Transfektion) oder durch Viren in eine normale Zelle gelangen (Infektion) oder anderweitig aktiviert werden, ein unkontrolliertes Wachstum auslösen. Entdeckt wurde daher der größte Teil der Onkogene zuerst in Retroviren. Diese integrieren Teile des Wirtsgenoms, u. a. Protoonkogene, in ihr eigenes Genom. Durch Mutation dieser neu aufgenommenen Sequenzen können Onkogene entstehen, mit denen die Viren in infizierten Zellen die Kontrolle über das Wachstum erlangen. Da Onkogene eine dominante Wirkung haben, genügt die Mutation eines Allels, um ein übermäßiges oder nicht zyklusgerechtes, ungebremstes Wachstum auszulösen. Ein Beispiel für diese Veränderungen im kodierenden Bereich sind Punktmutationen im

N-ras-Onkogen [Feramisco et al. (35)]. Das N-ras-Produkt wirkt als Signalübermittler für wachstumsstimulierende Signale in die Zelle. Durch spezifische Punktmutationen in N-ras kommt es unter anderem bei der akuten myeloischen Leukämie zu einer veränderten Aminosäuresequenz des N-ras-Produkts und somit zu einem defekten (permanent aktivierten) Signalübermittler, der die Zelle mit wachstumsstimulierenden Signalen überflutet.

Für Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität sind viele onkogene Mutationen beschrieben, bei denen als Auswirkung eine konstitutive Dimerisierung und Aktivierung zur Transformation der Zellen führt [Rodrigues et al. (36)]. Im Falle der MEN-Erkrankungen verwandeln bestimmte Mutationen RET in ein dominant transformierendes Gen. Es ist das erstbeschriebene dominant wirkende Onkogen mit transformierender Funktion bei einem erblichen Tumorleiden [Wagener (37)].

1.7. Mutationen des RET-Protoonkogen

Das RET-Protoonkogen wurde zuerst als das für papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTC, Papillary Thyroid Carcinoma) verantwortliche Onkogen identifiziert [Bongarzone et al. (38)]. Es handelt sich dabei um somatische Rearrangements, bei denen die cytoplasmatische Domäne des Rezeptors mit einem nicht verwandten Genabschnitt rekombiniert ist. Die resultierenden Fusionsproteine sind im Cytoplasma lokalisiert und die RET-Tyrosinkinase ist konstitutiv aktiviert [Borello et al. (39)].

Die für den RET-Rezeptor kodierende Sequenz ist auf Chromosom 10q11.2 lokalisiert und besteht aus 21 Exons [Ceccherini et al. (40)]. Für dieses Gen sind diverse Mutationen beschrieben, die mit der Entwicklung der autosomal dominant vererbbaren Krebserkrankungen MEN 2A, MEN 2B und FMTC assoziiert sind.

Tumore der betreffenden Gewebe etablieren sich dadurch, dass das Onkogenprodukt einen veränderten Wachstumsfaktor-Rezeptor auf der Oberfläche darstellt, der auch in Abwesenheit des Liganden seine wachstumsstimulierenden Signale in die Zelle weitergibt. Somit kommt es zu einer permanenten Aktivierung zellproliferativer Mechanismen.

Exon	Codon	Aminosäureausstausch	Phänotyp	Häufigkeit
10	609 610 618 620	Cys → x[1] Cys → x Cys → x Cys → x	MEN 2A, FMTC MEN 2A, FMTC MEN 2A, FMTC MEN 2A, FMTC	 609 - 620 insgesamt 23%
11	634	Cys → x	MEN 2A	66%
13	768 790 791	Gln → Asp Leu → Phe Tyr → Phe	FMTC MEN 2A, FMTC MEN 2A, FMTC	< 1% 790 und 791 insgesamt 8%
14	804 844	Val → Leu → Met Arg → Leu	FMTC FMTC FMTC	< 1% < 1% < 1%
15	883	Ala → Phe	MEN 2B	5%
16	918	Met → Thr	MEN 2B	95%
16	922		MEN 2B	

Tabelle 1: Die häufigsten Mutationen im RET Protoonkogen und der damit korrelierte Phänotyp bei deutschen MEN 2 Familien

Bei MEN 2A ist das Codon 634 in Exon 11 mit einer Beteiligung von 66 % an allen auftretenden Mutationen am häufigsten betroffen. Für den Austausch des Cysteins 634 durch die Aminosäuren Tyrosin, Arginin, Glycin oder Tryptophan ist eine Dimerisierung des RET-Rezeptors ohne Anwesenheit eines Liganden nachgewiesen [Santoro et al. (41)], was eine konstitutive Aktivierung des Rezeptors und dadurch permanente Autophosphorylierung zur Folge hat.

MEN 2B offenbart sich zusätzlich zum MEN 2A-Komplex durch Auftreten von mukosomalen Neuromen und Ganglioneuromatosen des Darms. Darüber hinaus können die Patienten mit Skelettveränderungen und marfanoidem Habitus imponieren. Hyperparathyreoidismus wird jedoch nicht beobachtet. Bei über 94 % der Patienten mit MEN 2B wurden Keimbahnmutationen in Codon 918 des RET-Protoonkogens gefunden [Carlson et al. (42)]. Eine Basensubstitution führt zum Austausch der Aminosäure Methionin in Treonin innerhalb der Tyrosinkinasedomäne des RET. Hierdurch erlangt der Rezeptor eine veränderte Substratspezifität und ist auch als Monomer aktiv [Santoro et al. (41)].

Beim familiär gehäuft auftretenden medullären Schilddrüsenkarzinom (FMTC) bilden sich bei den Patienten allein C-Zellkarzinome der Schilddrüse. Am häufigsten werden FMTCs mit Mutationen in Exon 10 (Codon 609, 611, 618 oder 620) assoziiert und liegen damit im gleichen Bereich wie Mutationen der MEN 2A [Mak et al. (43)].

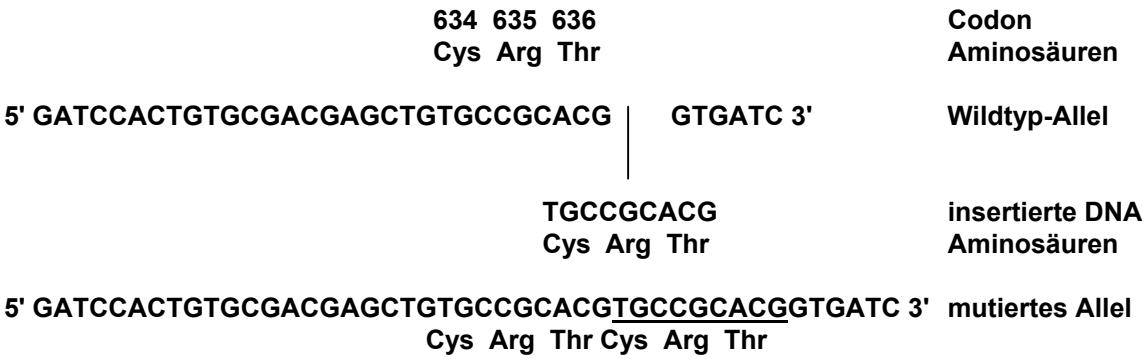
[1] "x" steht für die Umwandlung des Cysteins in eine beliebige andere Aminosäure

In Exon 13 wurden Mutationen gefunden (Codon 790 und 791), bei denen die Aminosäure des Wildtyps gegen Phenylalanin ausgetauscht wird. Sie gehören somit zu Mutationen, die mit FMTC assoziiert werden, jedoch nicht die cysteinreiche Region des Rezeptors betreffen [Berndt et al. (44)]. Darüber hinaus zeichnen sie sich durch einen variablen Phänotyp aus.
In Exon 13 (Codon 768) [Boccia et al. (45)] und Exon 14 (Codon 804; Codon 844) [Bartsch et al. (46)] wurden weitere Mutationen gefunden, die im Zusammenhang mit FMTCs gesehen werden.

1.8. Spezifische Duplikations-Mutationen

Im Blut eines Patienten mit dem Vollbild einer MEN 2A wurde beim Screening der entsprechenden Region im RET-Gen eine Duplikation von 9 Basen in Exon 11 (Codon 634, 635 und 636) gefunden [Höppner et al. (47)]. Diese Duplikation mit der Addition eines Cysteinrestes resultiert im gleichen Phänotyp wie Mutationen, denen eine Deletion eines Cysteinrestes zugrunde liegt.
Ähnlich verhält es sich bei einer Familie, die neben medullären Schilddrüsenkarzinom (MTC) durch ungewöhnliche Häufung von primären Hyperparathyreoidismen und dem Fehlen von Phäochromozytomen auffällig wurde. Nachgewiesen werden konnte eine 12 bp-Duplikation im Exon 11 [Höppner et al. (48)], die ebenfalls zu einem zusätzlichen Cysteinrest innerhalb der cysteinreichen Domäne des RET führen.

+9bp-Mutation:



+12bp-Mutation:

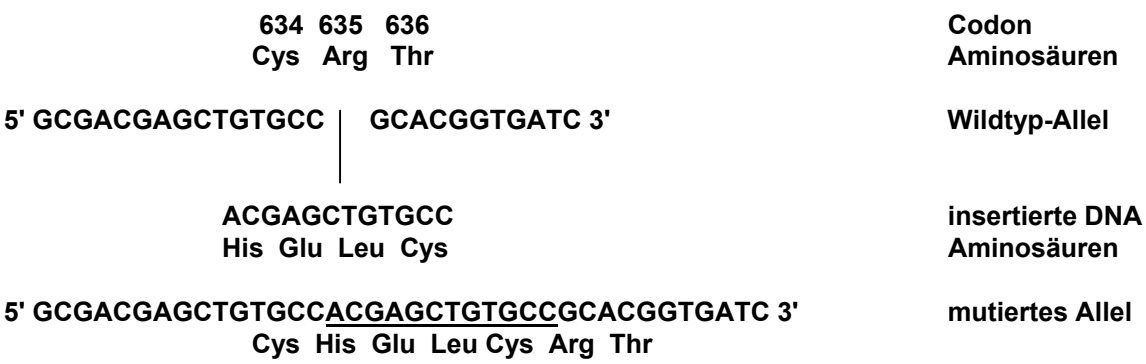


Abbildung I.5: Darstellung der Duplikationsmutationen, die durch Insertion von 9bp bzw.12bp in Exon 11 der RET-DNA entstanden sind.

1.9. Aufgabenstellung

Im Hinblick auf den Nachweis der liganden-unabhängigen Dimerisierung und der dadurch bedingten Aktivierung der RET-Tyrosinkinase nach Substitution eines Cysteins in der extrazellulären, cysteinreichen Region, stellt sich die Frage, ob ein zusätzliches Cystein einen ähnlichen Effekt auf die Aktivierung hat.

Zwei spezifische Mutationen, welche mittels Screening von an MEN 2A erkrankten Familien aufgefunden wurden (siehe Kapitel 1.8.), stehen für Versuche zur Verfügung. Ziel der Arbeit ist es, die unterschiedlichen Duplikations-Mutationen (+9-bp bzw. +12-bp) aus Patienten-DNA in Wildtyp-RET-cDNA zu klonieren bzw. durch Site-Directed Mutagenesis zu erstellen, welche dann in ein eukaryotisches Vektorsystem eingebaut werden, wodurch hiermit transfizierte spezielle Zellinien das mutierte Ret-Protein exprimieren sollen. Das entstehende RET-Protein wird daraufhin

durch Immun-Präzipitation und Western-Blotting mit Hilfe eines passenden Antikörpers unter folgenden Fragestellungen untersucht:

a) Bildet das mutierte RET-Protein spontan Dimere ohne Anwesenheit eines Liganden?

Hierfür sollen Mäusefibroblasten der Linie NIH 3T3 eingesetzt werden, um die exprimierten RET-Proteine mit spezifischen Antikörpern durch Western Blot-Analysen zu charakterisieren. Zum Nachweis eventuell vorhandener intermolekularer Disulfidbrücken zwischen den RET-Molekülen sollen die Membranproteine unter nichtreduzierenden und unter reduzierenden Bedingungen untersucht werden. Die TT-Zellinie exprimiert RET mit der Mutation C634W, für die eine Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken nachgewiesen ist [Santoro et al. (41)]. Sie eignet sich somit als Positivkontrolle. Um den Wildtyp nachzuweisen wird die Neuroblastomzellinie Neuro 2A der Maus eingesetzt.

b) Wie ist der Phosphorylierungsstatus des RET-Proteins?

Der Phosphorylierungsstatus des RET-Proteins wird unter Zuhilfenahme von Antiphosphotyrosin-Antikörper auf Western-Blots von immunpräzipitierten Protein-Lysaten durchgeführt.
Diese Analysen dienen dazu herauszufinden, ob die neuen RET-Duplikations-Mutationen aus diesem Projekt zu spontaner Aktivierung der RET-Tyrosinkinase führen.

2. Material und Methoden

2.00. Reagenzien und Lösungen

- Agarose (Serva, Heidelberg)
- Ethidiumbromid (Fluka, Neu-Ulm)
- DNA-Längenstandard (Boehringer, Mannheim)
- 30 % Acrylamid / Methylenbisacrylamid-Lösung (Roth, Karlsruhe)
- Ampicillin (Gibco BRL, Eggenstein)
- LB Broth Base (Gibco BRL)
- LB-Agar (Gibco BRL)
- DEPC-behandeltes ddH_2O: 1ml DEPC (Sigma, Deisenhofen) auf 1l ddH_2O, autoklaviert
- TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl; pH 7,5 (Sigma)
  1 mM EDTA (Sigma)
- Solution I: 50 mM Glukose
  10 mM EDTA
  25 mM Tris/HCl, pH 8,0
- Solution II: 0,2 N NaOH, 1% SDS
- Solution III: 29,4 g Kaliumacetat, 5 ml Essigsäure, H_2O ad 100 ml
- Solution E 1: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
  10 mM EDTA
  10 µg/ml RNAse A
- Solution E 2: 200 mM NaOH
  1 % SDS
- Solution E 3: 3,2 M Kaliumacetat / Essigsäure, pH 5,5

- Solution E 4: 600 mM NaCl
  100 mM Natriumacetat / Essigsäure, pH 5,0
  0,15 % Triton x - 100

- Solution E 5: 800 mM NaCl
  100 mM Natriumacetat / Essigsäure, pH 5,0

- Solution E 6: 1250 mM NaCl
  100 mM Tris / HCl, pH 8,5

- Probenpuffer: 5 ml Glycerin (Merck)
  5 ml 1x TE-Puffer
  0,25 % Bromphenolblau (Sigma)
  100 µl 0,5 M EDTA; pH 8,0

- 10x TBE-Puffer: 0,89 M Tris
  0,89 M Borsäure (Merck)
  0,02 M EDTA

- Fixierlösung für Silberfärbungen:
  10 % Essigsäure (Merck)
  50 % Ethanol (Merck)

- Silberfärbelösung: 0,037 % Formaldehyd (Merck)
  0,1 % Silbernitrat (Merck)

- Entwicklerlösung für Silberfärbungen:
  0,025 % Natriumkarbonat (Merck)
  0,037 % Formaldehyd
  0,002 % Natriumthiosulfat (Merck)

- PBS:
  140 mM NaCl (Sigma)
  3 mM KCl (Merck)
  8mM Na_2HPO_4 (Sigma)
  1,5 mM K_2HPO_4 (Sigma)
  500 mM $NaVO_3$ (Sigma)

- Lyse-Puffer:
  50 mM Hepes; pH 7,5 (Sigma)
  1 % Triton X-100 (Merck)
  5 mM EGTA (Sigma)
  50 mM NaF (Sigma)
  20 mM Natriumpyrophosphat (Sigma)
  1 mM $NaVO_3$ (Sigma)
  2 mM PMSF (Sigma)
  0,2 mg Aprotenin / ml (Sigma)
  0,2 mg Leupeptin / ml (Sigma)

- Waschpuffer:
  50 mM Tris-HCl; pH 7,5
  1 mM EDTA
  0,1 mM PMSF
  0,6 M KCl

- Tris-Puffer:
  50 mM Tris-HCl, pH 7,5

- Trenngelpuffer (4x):
  1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
  0,4 % SDS (Merck)

- Sammelgelpuffer:
  0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
  0,4 % SDS (Merck)

- Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer:
  0,125 M Tris
  0,96 M Glycin (Sigma)
  0,5 % SDS, pH 8,3

- Probenpuffer (4x): 250 mM Tris-HCl
  8 % SDS
  40 % Glycerin (Merck)
  0,004 % Bromphenolblau (Merck)

- Transferpuffer: 25 mM Tris-HCl
  192 mM Glycin
  10 % Methanol

- Coomassie-Färbelösung:
  0,1 % Coomassie-Blue (Sigma)
  40 % Methanol
  10 % Eisessig (Merck)

- Entfärbelösung: 45 % Methanol
  10 % Eisessig

- Ponceau S-Färbelösung:
  0,5 % Ponceau S (Sigma)
  1 % Eisessig

- TBS-Puffer: 20 mM Tris-HCl
  500 mM NaCl, pH 7,5

- HNTG-Puffer: 20 mM HEPES, pH 7,5
  150 mM NaCl
  0,1 % Triton X-100
  10 % Glycerol
  10 mM NaF

- NET-Blockierungspuffer:

  1,5 M NaCl
  50 mM EDTA
  0,5 % Triton X-100
  2,5 % Gelantine
  0,5 M Tris, pH 7,4

2.01. Klonierungsstrategie

a. Amplifikation der mutierten Patienten-DNA mittels PCR:

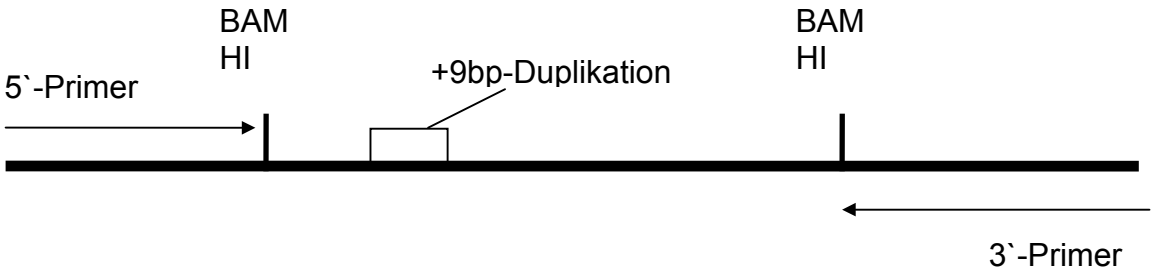


Abbildung II.1: Die Abbildung zeigt schematisch einen Ausschnitt aus Exon 11 der RET-DNA des Patienten, welcher die in diesem Fall 9 Basenpaare umfassende Duplikationsmutation enthält. Die Zahlenangaben der BAM HI-Schnittstellen entsprechen ihrer Entfernung in Basen vom Startcodon der RET-DNA.

b. Umklonierung des die Duplikationsmutation enthaltenden DNA-Fragments aus der Patienten-DNA in die RET-Wildtyp-DNA:

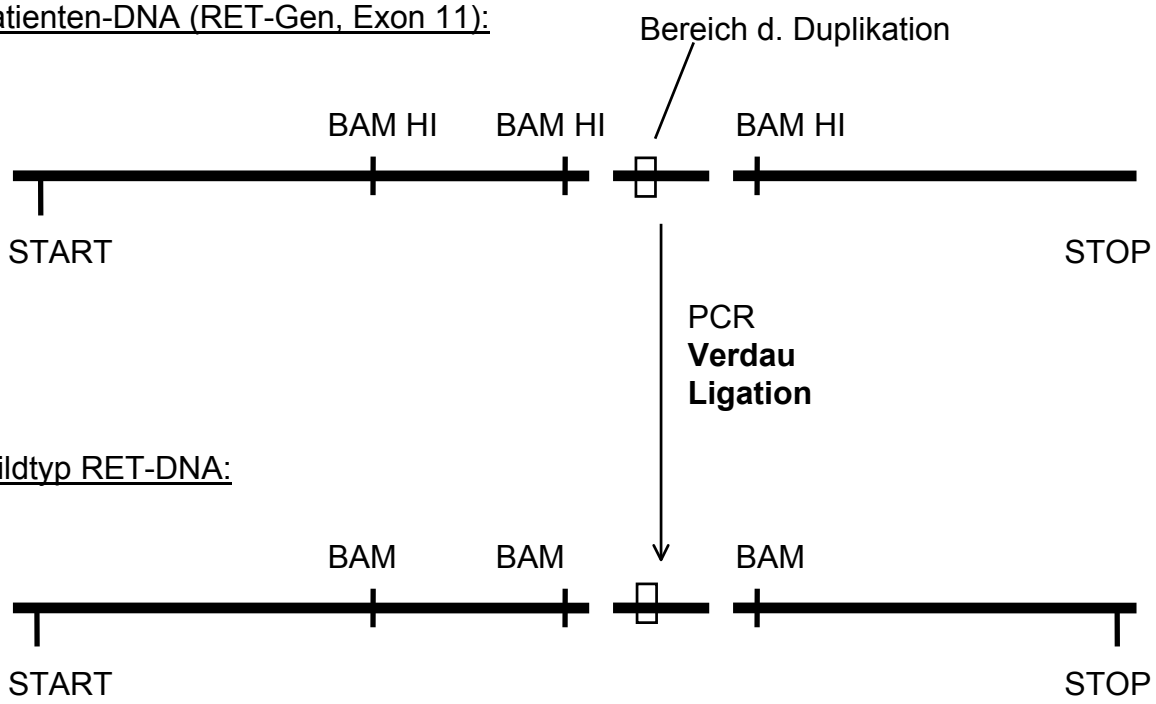


Abbildung II.2: Die Abbildung zeigt das Schema für die Umklonierung des die Duplikationsmutation enthaltenden DNA-Fragments aus der Patienten-DNA in die RET-Wildtyp-DNA. START = Startcodon, STOP = Stopcodon.

c. Schematische Darstellung der RET-DNA und der relevanten Schnittstellen im pBluescript-Vektor sowie dem Vorgehen beim partiellen Verdau:

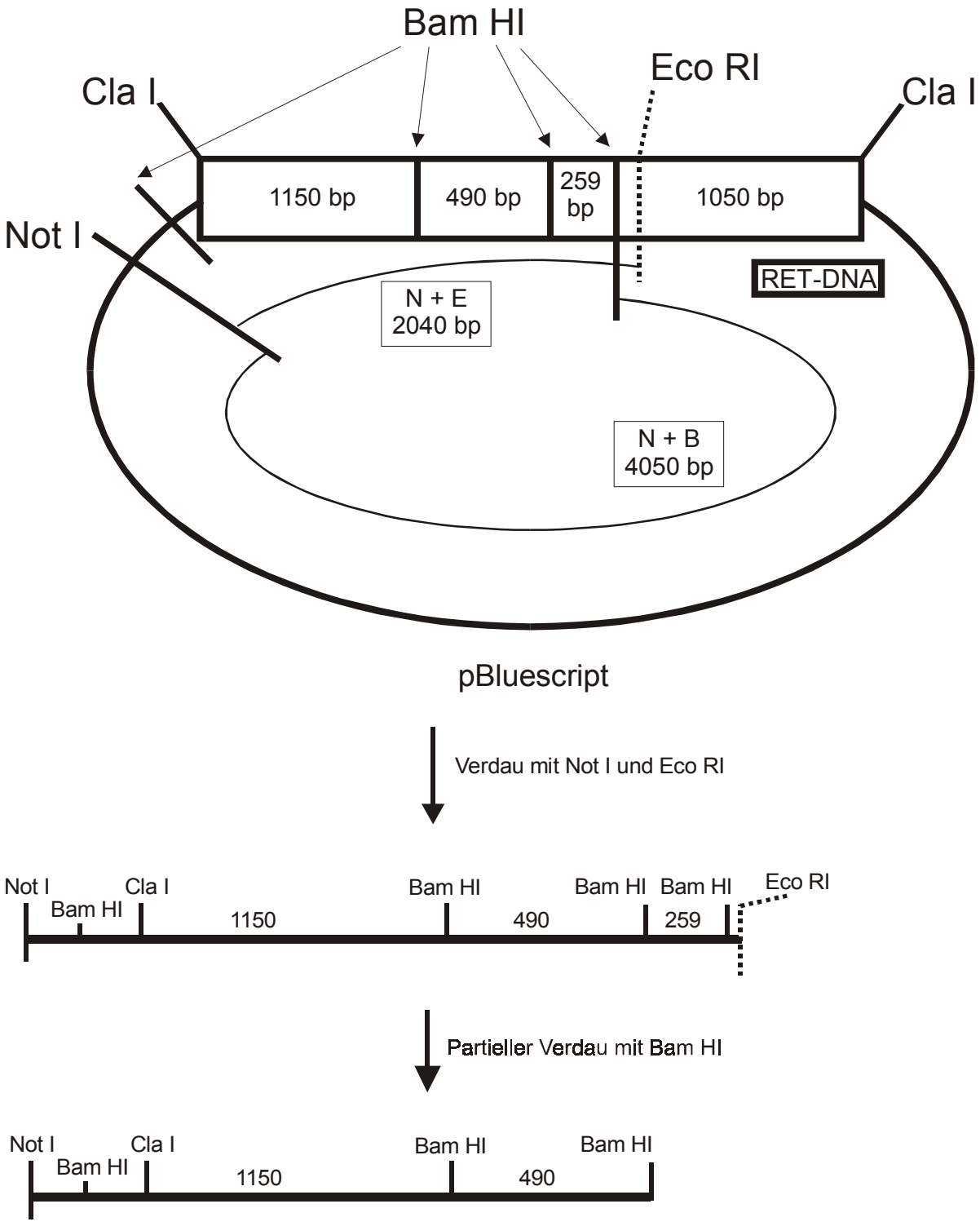


Abbildung II.3 : Dargestellt sind die relevanten Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen Not I, Bam HI, Cla I und Eco RI des RET-cDNA / pBluescript Vektor-Produktes zur Herstellung der für die Klonierung notwendigen Zwischenstufen „N+E“ und „N+B“. Die Zahlenangaben repräsentieren die Größe der Fragmente in Basenpaaren.

d. Religation der Fragmente zum Erhalt der +9bp-Mutation im Vektor:

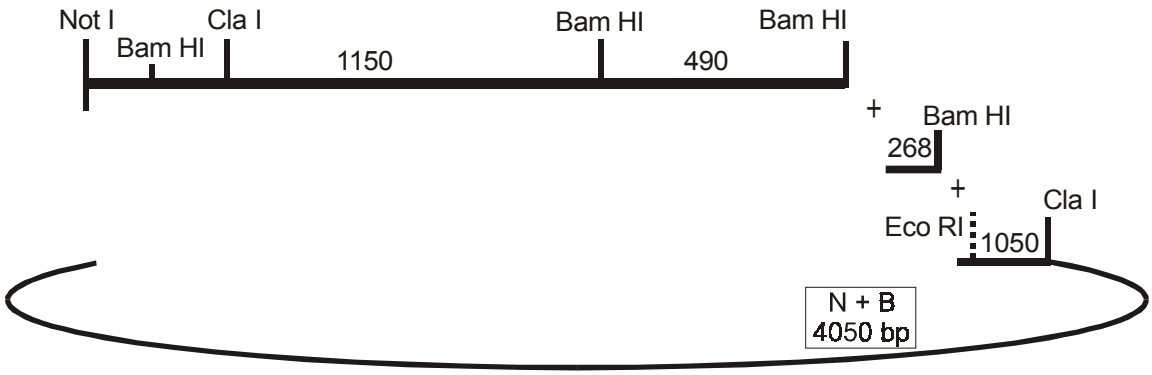


Abbildung II.4: Schematische Darstellung der Religation der Fragmente „1800 bp“, dem Amplifikat mit der enthaltenen +9bp-Duplikation und N+B.

e. Subklonierung des mutierten RET-Rezeptors für die Transfektion in eukaryotische Zellen:

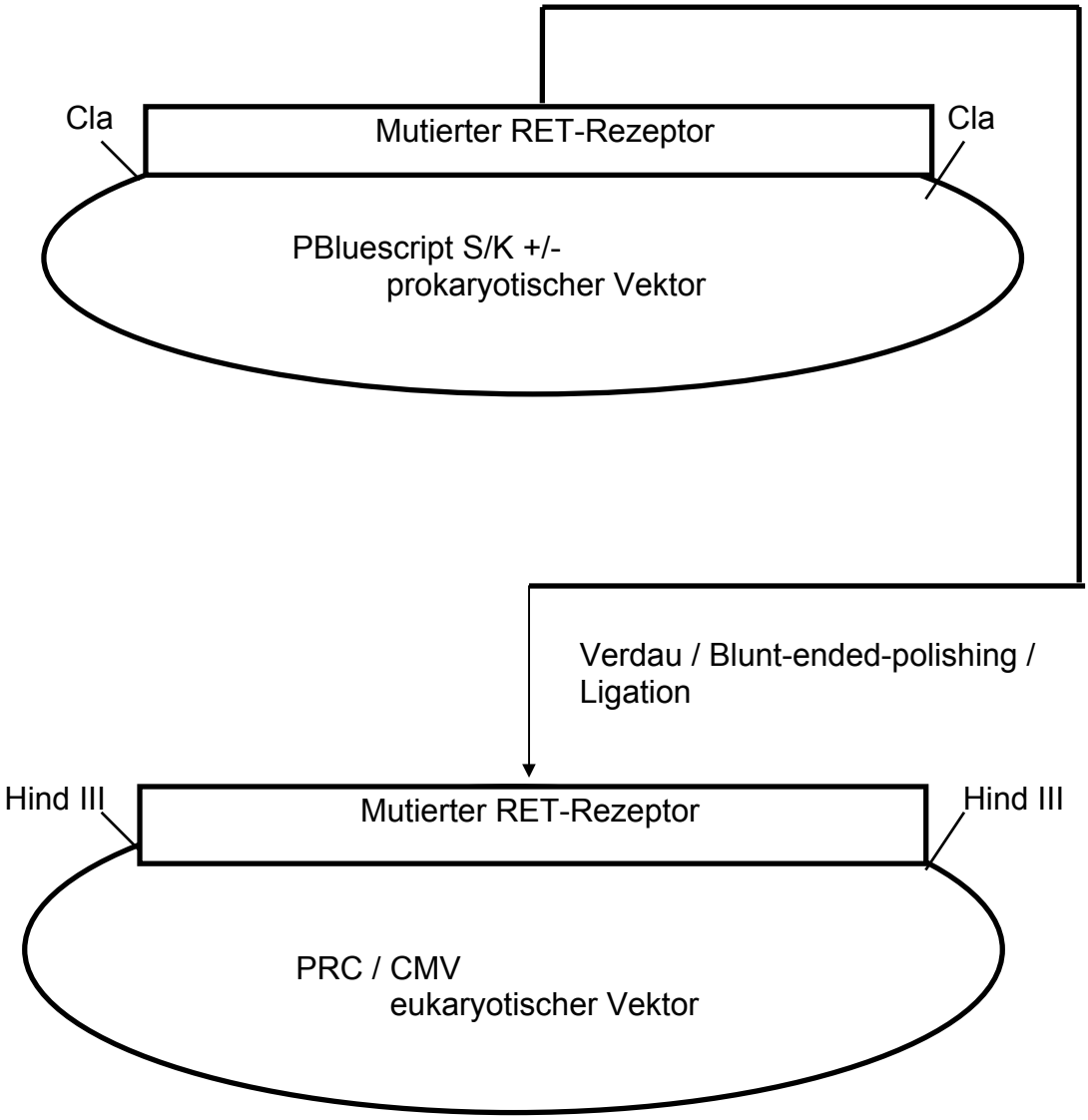


Abbildung II.5: Schematische Darstellung der Umklonierung des mutierten DNA-Teils aus dem prokaryotischen Vektorsystem PBluescript S/K +/- in das eukaryotische Vektorsystem PRC/CMV.

2.02. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNAzol™B - Kit (Biotec Laboratories, Houston/Texas) durchgeführt.

a. Extraktion

Für die Homogenisierung des Gewebes (C-Zellkarzinom eines MEN 2B-Patienten und Nebenschilddrüsengewebe eines MEN 2A-Patienten mit der +9bp-Duplikation) wurden 2 ml RNAzol B pro 100 mg Gewebe eingesetzt. In einem sterilen 50 ml Tube (Greiner, Frickenhausen) wurde das Gewebe mit einem Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, Staufen) homogenisiert. Dieses Homogenisat wurde in sterile 2 ml Tubes (Eppendorf, Hamburg) umgefüllt und 0,2 ml Chloroform (Merck, Darmstadt) pro 2 ml Homogenisat zugegeben. Nach 15 sec vortexen wurde das Gemisch 5 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge: Eppendorf). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues steriles Tube überführt.

b. Präzipitation

Auf die wässrige Phase wurde das gleiche Volumen Isopropanol (Merck) gegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurde 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen.

c. Waschen

Auf das Pellet wurden 0,8 ml 75% Ethanol gegeben. Nach kurzem Vortexen wurde 8 min bei 7500g und 4°C zentrifugiert und das Ethanol mit einer Pipette entfernt. Das Pellet wurde 5 min im Vakuum-Trockner (Eppendorf) getrocknet und in 50 µl DEPC-behandelten ddH_2O aufgenommen. Bis zur Messung des RNA-Gehaltes wurde die Lösung bei –20°C gelagert.

2.03. Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes

Um die Menge an RNA zu ermitteln, wurde eine 1:50-Verdünnung der RNA-Lösung mit DEPC-behandelten ddH_2O eingesetzt. 100 µl der Verdünnung wurden in eine Küvette gegeben und die Messung in einem Photometer (Pharmacia Biotech, Uppsala; Schweden) bei 260 nm und 280 nm durchgeführt. Anschließend wurde der RNA-Gehalt errechnet, indem die Absorption der Wellenlänge λ=260 mit dem Verdünnungsfaktor 1 : 100 und der RNA-Konstante multipliziert wurde. Die Division mit 1000 ergab den RNA-Gehalt in µg/µl. Außerdem wurde das Verhältnis der λ=260/ λ=280 Absorption ermittelt, um den Reinheitsgrad zu überprüfen.

2.04. cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wurde nach bekannten Protokollen verfahren [Maniatis et al. (49)], die zum Teil für den jeweiligen Einsatzzweck optimiert wurden.
Für die cDNA-Synthese wurden für einen Ansatz 10 µl RNA eingesetzt und 5 µl Reserve-Transkriptase-Puffer (AGS, Heidelberg), 2 µl DTT (Sigma), 4 µl 25mM dNTP`s (Pharmacia Biotech) und 4 µl Oligo dT (Eurogentec, Seraing, Belgien) zugegeben. Nach 30 sec vortexen wurden die Ansätze kurz zentrifugiert (Eppendorf Mikrozentrifuge) und 2 µl AMV-Reverse Transkriptase (AGS) zupipettiert. Nochmals wurde 30 sec gewhirlt und der Mix für eine Stunde bei 42°C in einem Wärmeblock (Eppendorf) inkubiert. Danach wurden 75 µl autoklaviertes ddH_2O zugegeben und dies für die PCR (Polymerase Chain Reaction) bei -20°C gelagert.

2.05. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wurde nach bekannten Protokollen verfahren [Maniatis et al. (49)], die zum Teil für den jeweiligen Einsatzzweck optimiert wurden.
Pro 50 µl PCR-Ansatz wurden 3µl cDNA eingesetzt, die zu einem Mix von 5 µl 10x PCR-Puffer (AGS), 2 µl dNTP`s jeweils 2 µl beider Primer (siehe unten), 1,5 µl 50 mM $MgCl_2$ (AGS), 1,5 µl BSA (AGS), 34 µl autoklaviertes ddH_2O und 0,25 µl Taq-Polymerase (Roche, Grenzach-Wyhlen) pipettiert wurden. In einem Thermocycler (Hybaid) wurden Amplifikate von Teilbereichen des Exon 10 und Exon 11 der RET-

cDNA hergestellt. Dabei wurde eine Touch-Down-PCR mit den folgenden Zyklen durchgeführt:

a. Touch-Down-PCR:

95°C	2 min	1x	cDNA-Denaturierung
95°C	1 min		Denaturierung
61°C	1 min	2x	Annealing
72°C	1 min		Extension
95°C	1 min		
59°C	1 min	2x	
72°C	1 min		
95°C	1 min		
57°C	1 min	2x	
72°C	1 min		
95°C	1 min		
51°C	1 min	30x	
72°C	1 min		
72°C	10 min	1x	Finale Extension

Die Amplifikate wurden bei 4°C gelagert.

b: Primer:

hRET 5`: 5` - TTA AAG CTG GCT ATG GCA CC - 3`, 100 ng/µl (MWG)

hRET 3`: 3` - GG GAG CCT TCT TGA ACC AAG AAC - 3`, 100 ng/µl (Gibco BRL)

c. Amplifizierte Sequenz:

```
     hRET 5`
TTAAAGCTGGGCTATGGCACCTGCAACTGCTTCCCTGAGGAGGAGAAGTGCTTCTGCGAGCCC
----------------------------------------------------------------
AATTTCGACCCGATACCGTGGACGTTGACGAAGGGACTCCTCCTCTTCACGAAGACGCTCGGG

           BAM HI              Cys 634
GAAGACATCCAGGATCCACTGTGCGACGAGCTGTGCCGCACGGTGATCGGCAGCCGCTGTCCT
----------------------------------------------------------------
CTTCTGTAGGTCCTAGGTGACACGCTGCTCGACACGGCGTGCCACTAGCCGTCGGCGACAGGA


CTTCTCCTTCATCGTCTCGGTGCTGCTGTCTGCCTTCTGCATCCACTGCTACCACAAGTTTGC
----------------------------------------------------------------
GAAGAGGAAGTAGCAGAGCCACGACGACAGACGGAAGACGTAGGTGACGATGGTGTTCAAACG


CCACAAGCCACCCATCTCCTCAGCTGAGATGACCTTCCGGAGGCCCGCCCAGGCCTTCCCGGT
----------------------------------------------------------------
GGTGTTCGGTGGGTAGAGGAGTCGACTCTACTGGAAGGCCTCCGGGCGGGTCCGGAAGGGCCA


CAGCTACTCCTCTTCCGGTGCCCGCCGGCCCTCGCTGGACTCCATGGAGAACCAGGTCTCCGT
----------------------------------------------------------------
GTCGATGAGGAGAAGGCCACGGGCGGCCGGGAGCGACCTGAGGTACCTCTTGGTCCAGAGGCA

                      BAM HI       Eco RI
GGATGCCTTCAAGATCCTGGAGGATCCAAAGTGGGAATTCCCTCGGAAGAACTTGGTTCTTG
----------------------------------------------------------------
CCTACGGAAGTTCTAGGACCTCCTAGGTTTCACCCTTAAGGGAGCCTTCTTGAACCAAGAAC
                                              hRET 3` Eco
```

2.06. Überprüfung der Amplifikate durch horizontale Flachbett-Agarosegelelektrophorese

Um die Größe der Amplifikate zu überprüfen, wurden jeweils 5 µl der PCR in 3 µl Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden in einem 2%igen Agarosegel bei 90 V (Power Pac 3000, Bio Rad, München) für eine Stunde in einer Flachbett-Agarosegelkammer (MWG) mit 0,5x TBE-Puffer laufen gelassen. Mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Biometra, Göttingen) wurden die DNA-Fragmente sichtbar und deren Lauflänge mit denen der Markerbanden verglichen.

Gießen des Agarosegels:

2g Agarose wurden in 100 ml 0,5x TBE aufgenommen und in der Mikrowelle (Siemens, Berlin) erhitzt, bis die Agarose gelöst war. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurden 6 µl Ethidiumbromid zugegeben und durch kurzes Schwenken wurde die Lösung gemischt. Dann wurde das Gel im Gießstand mit ein bzw. zwei Kämmen gegossen.

2.07. Enzymatische Restriktionsverdaus

Bei den enzymatischen Restriktionsverdaus wurde nach bekannten Protokollen verfahren [Maniatis et al. (49)], die zum Teil für den jeweiligen Einsatzzweck optimiert wurden.

a. Restriktionsverdau der Amplifikate mit der Restriktionsendonuklease

BAM HI

Die Amplifikate aus der PCR enthalten am 5`-Ende sowie am 3`-Ende eine BAM HI-Schnittstelle (5`-GGATCC -3`). Um das +9bp-Fragment in die RET-cDNA zu integrieren, wurden Verdaus nach folgendem Protokoll durchgeführt:

40 µl Template (wobei 40 µl ~ 4 µg DNA)
5 µl Puffer B (Boehringer)
3 µl BAM HI (Boehringer)
1 µl ddH_2O

wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und 1h bei 37°C im Brutschrank (Heraeus) inkubiert.

b. Restriktionsverdau der RET-Sequenz (Short Isoform) im pBluescript Vektorsystem mit BAM HI, NotI und EcoRI

Um die +9bp-Mutation in die Wildtyp-RET-DNA klonieren zu können, wurde letztere komplett mit dem pBluescript Vektorsystem (Stratagene) mit Hilfe der Restriktionsenzyme Not I, BAM HI sowie Eco RI mit zwei unterschiedlichen Doppelverdaus nach folgenden Protokollen behandelt:

5 µl wt-RET-DNA ~ 20 µg
10 µl Puffer 3 (NEB, Schwalbach/Taunus)
2 µl BAM HI (NEB)
2 µl Not I (NEB)
1 µl BSA (NEB)
80 µl ddH_2O

7,5 µl wt-RET-cDNA ~ 30 µg
10 µl Puffer 3 (NEB)
3 µl Not I (NEB)
3 µl EcoRI (NEB)
1 µl BSA (NEB)
75,5 µl ddH_2O

wurden jeweils in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und 1h bei 37°C im Brutschrank (Heraeus) inkubiert.

Es entstehen mehrere verschieden große DNA-Stücke, welche mittels Agarose-Flachbettgelelektrophorese (Agaroseanteil 1,5 bzw. 1,0 %) aufgetrennt werden. Die Stücke der Größe 2040 bp (N + E; mit 5`-Not I-Site und 3`-Eco RI-Site) bzw. 4050 bp (N + B; mit 5`- Eco RI-Site und 3`- BAM HI-Site) werden zur weiteren Verwendung aus dem jeweiligen Gel extrahiert und danach einer Phenol-Chloroform-Fällung unterzogen.

c. Partieller Restriktionsverdau von N + E mit BAM HI

Zum späteren Austausch mit dem +9bp-Fragment mußte ein 259 bp großes Stück vom 3 `-Ende des N + E -DNA Stückes durch einen Restriktionsverdau mit BAM HI entfernt werden. Da noch weitere BAM HI-Schnittstellen innerhalb dieses DNA-Stückes existieren, welche jedoch nicht geschnitten werden sollten, wurde ein partieller Verdau nach folgendem Muster durchgeführt:

40 µl Template (nach Phenol-Chloroform-Fällung)
5 µl Puffer B (Boehringer)
0,5 µl BSA (NEB)
1 µl BAM HI (Boehringer)
3,5 µl ddH_2O

wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und bei 37°C im Heizblock (Eppendorf) inkubiert.
Nach jeweils 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 min wurden 5 µl in ein gekennzeichnetes 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit 5 µl 0,5 M EDTA pipettiert um den Restriktionsverdau zu inhibieren und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Anschließend wurde ein 1,5 %iges Agarosegel mit den Proben beschickt.

d. Gel Partialverdau mit BAMHI

Hierbei wurde der beste Zeitpunkt zum Stoppen des partiellen Verdaus ermittelt. Bei 10 min war der Anteil der Bande bei ca. 1800 bp (~2040 bp - 259 bp) am größten. Demzufolge wurde ein neuer Verdau (siehe oben) angesetzt und der gesamte Inhalt mit 0,5 M EDTA nach 10 min gestoppt und auf ein quantitatives Gel gegeben.
Die betreffende Bande wurde mittels QIAEX II (QIAGEN) extrahiert.

e. Herausschneiden des +9bp-RET-Fragments aus pBluescript SK +/- mit Restriktionsenzymen Cla I und Sca I

Um das im pBluescript fertiggestellte +9bp-RET-Fragment in einen eukaryotischen Expressionsvektor klonieren zu können, wurde mit Cla I und Sca I doppelverdaut, wobei Sca I den nicht benötigten Vektorrest in ca. 1500 bp große Stücke zerschneidet, was eine Trennung vom ca. 3200 bp umfassenden +9bp-RET-Fragment im Agarosegel erleichtert.

10 µl pBluescript mit +9bp-RET-Fragment (wobei 10 µl ~ 8 µg DNA)
5 µl Puffer 3 (NEB)
2,5 µl Cla I (NEB)
2,5 µl Sca I (NEB)
30 µl ddH_2O

wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und bei 37°C über Nacht im Brutschrank (Heraeus) inkubiert.

f. Verdau von pRC/CMV mit Hind III

Um Inserts in den eukaryotischen Vektor pRC/CMV zur Expression einzubringen, muß im Bereich der Multiple-Cloning-Site mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden. Dies geschah mit Hind III (uniqe restriction site) auf folgende Weise:

10 µl pRC/CMV (wobei 30 µl ~ 4 µg DNA)
5 µl Puffer B (Boehringer)
2 µl Hind III (Boehringer)
33 µl ddH_2O

wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und 2h bei 37°C im Brutschrank (Heraeus) inkubiert.

2.08. DNA-Extraktionen aus Agarosegelen

Die DNA-Banden aus Agarosegelen wurden mit dem QIAEX II Agarosegel-Extraktionskit (Qiagen, Hilden) isoliert. Dazu wurde die Bande mit einem Skalpell (Braun, Melsungen) aus dem Gel herausgeschnitten. Die Agarose wurde soweit wie möglich entfernt und jeweils 250 mg der DNA-enthaltenden Agarose in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Pro 100 mg wurden 300 µl QX 1-Puffer eingesetzt. Die QIAEX II-Lösung wurde 30 sec gewhirlt und 10 µl der Agarose hinzugegeben. Nach 1 min vortexen wurde die Suspension für 10 min bei 50°C im Heizblock inkubiert. Alle 2 min wurde die Suspension gewhirlt. Anschließend wurde 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Mikrozentrifuge) und der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Das Pellet wurde mit 500 µl QX 1-Puffer gewaschen, um die Agarose-Reste zu entfernen. Nach 1 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 500 µl PE-Puffer gewaschen, um die Salzreste zu entfernen. Nach jedem Waschschritt wurde 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde 15 min an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl sterilem ddH_2O aufgenommen. Durch kurzes Vortexen wurde die DNA eluiert. Die Suspension wurde 1 min zentrifugiert und der Überstand mit der DNA vorsichtig mit der Pipette in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.09. Photometrische Ermittlung der DNA-Konzentration

Für den Vergleich der DNA-Konzentrationen wurden jeweils 1 µl der extrahierten DNA und 1 µl eines zuvor bei 260 nm gemessenen Standards mit 1 ml Probenpuffer versetzt und in die Tasche eines 1 %igen Agarosegels pipettiert. Nach 30 min wurde die Intensität der Ethidiumbromidfärbung verglichen.

2.10. Phenol-Chloroform-Fällung

Da verschiedene Enzymreste sowie Verunreinigungen eine Ligation behindern, wurden die Ligationsfragmente durch eine Phenol-Chloroform-Fällung gereinigt. Dazu wurden gleich große Volumina (z.B. 30 µl + 30 µl) der Templates und eines Phenol-Chloroform-Gemisches (roti-Pharma,Verhältnis: 1 : 1) vermengt und nach kurzem Vortexen 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die DNA enthält, wurde entnommen und mit ddH_2O auf 100 µl aufgefüllt. Darauf wurden 100 µl Chloroform (Merck) gegeben und nach kurzem Vortexen 2 min bei 13000rpm zentrifugiert. Wieder wurde die obere Phase entnommen und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (Merck) sowie das dreifache Volumen Ethanol abs. zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 30 min bei -70°C inkubiert und anschließend 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet 10 min an der Luft getrocknet und in 20 µl ddH_2O aufgenommen.

2.11. Ligation

Bei den Ligationen wurde nach bekannten Protokollen verfahren [Maniatis et al. (49)], die zum Teil für den jeweiligen Einsatzzweck optimiert wurden. Es wurden Ansätze mit unterschiedlichen Verhältnissen von Vektor/Insert eingesetzt. Die genauen Ligationsprotokolle lauten wie folgt:

a. Ligation aus 3 Komponenten (DUP, 1.8, N + B); cohesive-ends-ligation

5 µl DUP
1 µl 1.8
1 µl N + B
2 µl 5 x T4-DNA Ligase Puffer (Gibco, BRL)
1 µl T4-DNA Ligase (Gibco)

b. Ligation aus 2 Komponenten (pRC/CMV, RET-fragment+9bp); blunt-ended-ligation

0,5 µl pRC/CMV
5 µl RET-fragment+9bp
2 µl 5 x T4-DNA Ligase Puffer (Gibco)
1 µl T4-DNA Ligase (Gibco)
1,5 µl ddH_2O

Inkubation: in einem 1 ml Eppendorfreaktionsgefäß bei 16°C über Nacht

2.12. Transformation

Für die Transformation wurden kompetente Zellen der E. Coli-Stämme XL-1 blue (Stratagene, Heidelberg) und SURE (Stratagene) verwendet, die bei -80°C gelagert wurden. Für die Ligationen wurden ca. 5 x 10^6 Zellen 10 min auf Eis aufgetaut. In einem Heizblock wurde ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 900 µl LB-Medium erwärmt. Zu den aufgetauten Zellen wurden 2 bzw. 4 µl des Ligationsansatzes pipettiert und

vorsichtig geschwenkt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 45 sec bei 42°C im Heizblock erwärmt und dann für 1 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die erwärmten 900 µl LB-Medium auf die Zellen gegeben und dies 1h bei 37°C (Inkubator, Heraeus, Hanau) inkubiert. Jeweils 500 µl jedes Ansatzes wurden auf eine LB-Ampicillin-Agarpetrischale verteilt und diese für 16 h im 37°C-Brutschrank gehalten.

2.13. Präparation der Plasmid-DNA

Um von der neu hergestellten DNA ausreichende Mengen herzustellen, mit denen man weitere Arbeiten durchführen kann, gibt es unterschiedliche Methoden. Zwei Verfahren wurden insbesondere angewendet:

a. Mini-Prep

Von der für die Transformation verwendeten Agarplatte wurden mit einer sterilen Pipettenspitze Kolonien aus dem Bewuchs gepickt und in 15 ml Falcon-Tubes mit 2 ml LB-Medium + 2 µl Ampicillin überführt. Über Nacht wurden die Suspensionen bei 37°C im Schüttler (Infors AG, Bottmingen, CH) geschüttelt.
Am zweiten Arbeitstag wurden jeweils 1,4 ml der Suspension in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 2 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Mikrozentrifuge). Danach wurde das überstehende Medium abgesaugt und das Pellet in 100 µl Solution I resuspendiert und gevortext. Nacheinander wurden folgende Reagenzien hinzupipettiert:

200 µl Solution II
200 µl Chloroform
150 µl Solution III

Anschließend wurde kurz gevortext und 5 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Es entstehen drei Phasen. Die oberste, wässrige Phase (ca.

400 µl) wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 2 Vol. (entspr. ca. 800 µl) abs. Ethanol und 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,8) versetzt. Anschließend wurde 15 min mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 80 %igem Ethanol (1 ml) erneut 15 min mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt worden ist, wurde das Pellet 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl ddH_2O zur weiteren Verwendung resuspendiert.

b. Maxi-Prep

Von der für die Transformation verwendeten Agarplatte wurden mit einer sterilen Pipettenspitze Kolonien aus dem Bewuchs gepickt und in einen 2-l-Erlenmeierkolben mit 400 ml LB-Medium + 400 µl Ampicillin überführt. Über Nacht wurden die Suspensionen bei 37°C im Schüttler (Infors AG, Bottmingen, CH) geschüttelt. Am zweiten Arbeitstag wurde mit Hilfe des Genomed JETstar plasmid prep kit die Plasmid-DNA präpariert. Zuerst wurden die Übernachtkulturen 10 min bei 4000 rpm in 250 ml-Zentrifugiergefäßen zentrifugiert (Heraeus) und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden dann in 10 ml Solution E1 resuspendiert, in 40 ml-Zentrifugenröhrchen (Beckmann) überführt und zum Lysieren der Bakterien mit 10 ml Solution E2 versetzt. Die Suspension wurde 5 x gewendet und zur Neutralisation mit 11 ml Solution E3 vermengt. Sofort wurde gemischt, 20 min bei 16000 rpm zentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge, Schrägwinkelrotor) und der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Erneut wurde 20 min bei 16000 rpm zentrifugiert. Währenddessen wurden zur späteren Verwendung benutzte Filter-Säulen (Resin-Columns, Genomed) mit Solution E4 equilibriert. Anschließend wurde der Überstand aus der Zentrifugation direkt auf die Filter-Säulen gegeben. Nachdem keine Flüssigkeit mehr aus den Säulen lief, wurden diese mit 60 ml Solution E% gewaschen, anschließend die Plasmid-DNA mit 15 ml Solution E6 in 50 ml Falcon-Röhrchen eluiert. Mit 10,5 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt und 30 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 80 %igem Ethanol gewaschen, erneut

zentrifugiert und anschließend 20 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Aufnahme des Pellets geschah in 300 µl ddH_2O.

2.14. Überprüfung der Produkte durch Kontroll-Restriktionsverdau

Durch die Lage der BAM HI -Schnittstellen auf der RET-cDNA sowie in den Vektorsystemen, entstehen bei Verdau mit diesem Enzym spezifische Bandenmuster, welche zur Identifikation der Ligations-/Transformationsprodukte herangezogen werden können. Typischerweise erfolgte ein solcher Verdau wie folgt:

10 µl Template aus Miniprep-Produkt (respektive 1 µl aus Maxiprep-Produkt)
2 µl Puffer B (Boehringer)
1 µl BAM HI (Boehringer)
0,5 µl RNASE A (Boehringer)
6,5 µl ddH_2O (respektive 15,5 µl)

wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Kontrolle durch Agarosegelelektrophorese, welche je nach benutztem Vektorsystem folgende charakteristische Ergebnisse zeigte:

Agarosegel nach BAM HI-Verdau im pBluescript-Vektor:

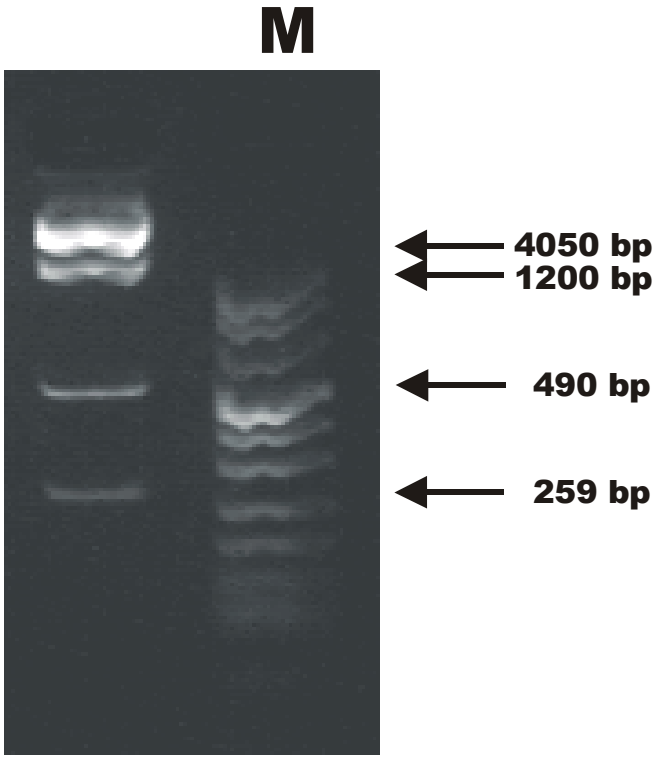


Abbildung II.6: Kontrollverdau auf positive Klone im pBluescript-Vektor mit BAM HI. Man erkennt das hierfür typische Bandenmuster (259, 490, 1200, 4050 bp), bedingt durch die Lage der Schnittstellen innerhalb des Plasmids. M = Molekulargewichtsmarker 8

Agarosegel nach BAM HI-Verdau im pRC/CMV-Vektor:

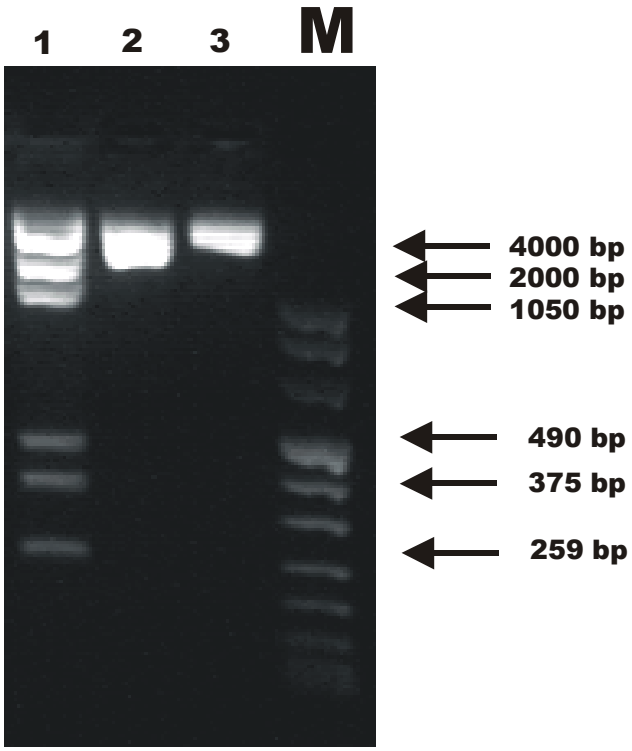


Abbildung II.7: Kontrollverdau auf positive Klone im pRC/CMV-Vektor mit BAM HI. Man erkennt das hierfür typische Bandenmuster in Bahn 1 (259, 490, 1050, 2000, 4000 bp), bedingt durch die Lage der Schnittstellen innerhalb des Plasmids. Bahn 2 und 3 = negative Ergebnisse. Agaroseanteil im Gel: 1 %. M = Molekulargewichtsmarker 8.

2.15. Überprüfung der Produkte durch radioaktive Dideoxy-Sequenzierung

Um die Ligations- bzw. Klonierungsergebnisse im Genauen überprüfen zu können, wurde mittels radioaktiver Dideoxy-Sequenzierung (T7-Sequencing™-Kit, Pharmacia Biotech) der jeweilige DNA-Bereich lesbar gemacht. Hierbei wurde wie folgt verfahren:

32 µl Template (ca. 2 µg DNA)
8 µl 2M NaOH

wurden in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert, gevortext, kurz zentrifugiert und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte unter Zugabe von 7 µl 3M Natriumacetat (pH 4,8),4 µl ddH_2O und 120 µl abs. Ethanol eine Fällung der DNA mit Wiederaufnahme des Pellet in 10 µl ddH_2O. Nun wurde der betreffende Primer (Konzentration 2,5 - 5 µM) mit 2 µl Annealing-Puffer hinzugegeben, gevortext und bei 65°C (Heizblock; Eppendorf) 5 min inkubiert. Danach erfolgte sofort ein Transfer zu einem 37°C Heizblock für 10 min, 5 min Abkühlen bei Raumtemperatur und eine Kurzzentrifugation. Hiernach wurden 3 µl Labelling-Mix, 1 µl [α-^{35}S] dATPα S -Nukleotid und 2 µl T7-DNA-Polymerase hinzupipettiert und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Jeweils 4,5 µl der Reaktion wurden anschließend zu 2,5 µl vorgewärmten Read-Short-Mixes (T,C,G oder A) zugegeben und nach 5 min bei 37°C mit 5 µl Stop-Solution inhibiert.
Danach wurden die Proben bei 80°C 5 min denaturiert und auf ein 5 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen, welches nach folgender Rezeptur angefertigt wurde:

56 ml Polyacrylamid-Diluent (Ultra Pure Seq. System, National Diagnostics)
16 ml Polyacrylamid-Concentrate (Ultra Pure Seq. System, National Diagnostics)
8 ml 10x TBE
160 µl 25 % APS
80 µl TEMED

Nach halbstündigem Warmlaufen des Gels wurden die Proben aufgetragen und bei 85 Watt konstanter Leistung (Netzteil: ECPS 3000/150, Pharmacia Biotec) in zwei unterschiedlich langen Läufen 3,5 und 1,5 h aufgetrennt. Das Gel wurde auf

Whatman-Paper (3M) übertragen und 1h auf einem Geltrockner (Sr. Gel Dryer) unter Vakuum getrocknet. Dann wurde das Gel über Nacht in einer Filmkassette (REGO) auf einen Biomax-Röntgenfilm (Kodak, Rochester, New York) gelegt und am anschließenden Morgen entwickelt.

2.16. CIP-Behandlung der Vektorfragmente

Vor der Ligation wurden die Vektorfragmente mit CIP (Calf Intestinal alcline Phosphatase) behandelt, um eine Religation ohne Insert zu verhindern:

25 µl Vektorfragment mit ca. 1 µg DNA
3 µl CIP-Puffer (NEB)
1 µl CIP-Enzym (NEB)
2 µl ddH_2O

wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1µl 0,5 M EDTA für 10 min bei 75°C im Heizblock gestoppt.

2.17. Klenow-Behandlung zwecks Blunt-ended-polishing

Die 5´- und 3`- Enden des Hind III-geschnittenen pRC/CMV-Vektors sowie des Cla I-geschnittenen RET-+9bp-Fragmentes sind nicht kompatibel. Deshalb wurden, um die zu ligierenden Enden anzupassen, beide mit Klenow-Enzym nach folgendem Muster behandelt:

20 µl pRC/CMV bzw. RET+9bp-Fragment ≈ ca. 2 µg DNA
1,5 µl dNTP`s (NEB)
2,5 µl Klenow-Puffer (NEB)
1 µl Klenow-Enzym

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) wurden die Komponenten gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 5 min bei 70°C inaktiviert.

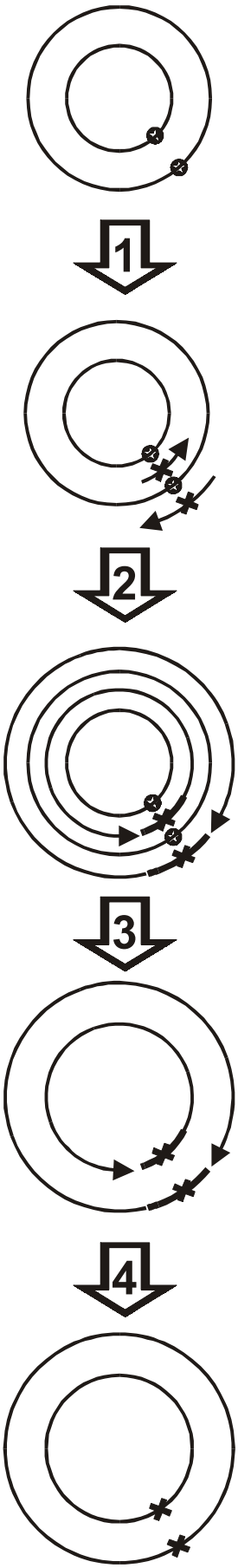
2.18. Mutagenese

Bei der Herstellung des Konstruktes für die +12bp-Duplikations-Mutation wurde nach erfolglosen Klonierungsversuchen das Verfahren der Site-Directed-Mutagenesis angewendet. Die Mutagenese wurde mit Hilfe eines Kits erstellt („QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ Stratagene). Für dieses in einem Thermocycler durchgeführten Mutagenese-Verfahren wird Pfu-DNA-Polymerase verwendet, welche beide Stränge des Plasmids mit hoher Genauigkeit reproduziert, ohne die für das Einfügen der mutierten Sequenz notwendigen Oligonukleotid-Primer von den DNA-Strängen zu lösen. Für das Grundverfahren werden ein Doppelstrang-DNA-Vektor und zwei synthetisch erzeugte, komplementär zueinander liegende Oligonukleotid-Primer, welche die gewünschte Mutation enthalten, benötigt [Papworth et al. (49)]. Als Vorlage für die Herstellung der in diesem Fall benötigten Primer diente die betreffende Patienten-DNA.

3´- und 5´- Primer für die Mutagenese (Eurogentec, Belgien):

MUTA12-3:
5´-GCT-GCG-ATC-ACC-GTG-CGG-CAC-AGC-TCG-TGG-CAC-AGC-TCG-TCG-C-3´
MUTA12-5:
5´-GCG-ACG-AGC-TGT-GCC-ACG-AGC-TGT-GCC-GCA-CGG-TGA-TCG-CAG-C-3´

Die Oligonukleotid-Primer werden durch den thermozyklischen Prozess mit Hilfe der Pfu-Polymerase extendiert. Unter Einbeziehung der Oligonukleotid-Primer entsteht ein mutiertes Plasmid mit versetzten Enden.



Original Doppelstrang-DNA

Zugabe der die Mutation enthaltenen Primer

Extension der Primer mit Pfu-Polymerase und thermozyklischer Reaktion

Durch DpnI-Verdau Selektion der dam-methylierten synthetisierten DNA

Neu synthetisierte DNA enthält Mutation und wird transformiert

Die thermozyklische Reaktion hierzu wurde wie folgt angesetzt:

5 µl	10 x Reaktionspuffer
2 µl	(50 ng) Wildtyp-Plasmid (im Vektorsystem pRC / CMV 2)
2 µl	Primer MUTA12-3
2 µl	Primer MUTA12-5
1 µl	dNTP-Mix
38 µl	ddH_2O

Dann wurden 1 µl Pfu-DNA Polymerase (2,5 U/µl) und 30 µl Mineralöl zugegeben. Die anschließende thermozyklische Reaktion verlief nach folgendem Schema:

95°C	2 min	1x
95°C	30 sec	
53°C	1 min	18x
68°C	18 min	

Die Reaktionsgefäße wurden anschließend 5 min auf Eis gekühlt, bevor 1µl DpnI-Restriktionsenzym (10 U/µl) unter die Mineralölschicht hinzugegeben und untergemischt wurde. Der Verdau der paternalen methylierten DNA wurde 1,5 h bei 37°C (Zielsequenz: 5´-G^{m6}ATC-3´) inkubiert. DpnI ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA; es wird benutzt, um die Ursprungs-DNA zu verdauen und dadurch eine Selektion zugunsten der synthetisierten DNA zu erwirken, welche die gewünschte Mutation enthält. DNA aus nahezu allen Escherichia coli Stämmen ist dam-methyliert und dadurch für den DpnI-Verdau angreifbar. Die übriggebliebene Vektor-DNA mit der gewünschten Mutation wurde dann in E. coli (Epicurian Coli® XL-1Blue superkompetente Zellen) transformiert (siehe Abschnitt Transformation). Die über Nacht bebrüteten Ampicillin-Agarplatten zeigten Bewuchs von Kolonien, welche dann mittels Kontrollverdau und später durch Dideoxy-Sequenzierung auf positive Klone untersucht wurden.

2.19. RT-PCR

Um die Expression diverser Klone aus der Zellkultur-Aufzucht zu überprüfen, wurde mit der aus den Gewebekulturflaschen gewonnenen RNA eine RT-PCR („Access RT-PCR System“, Promega) nach folgendem Schema durchgeführt:

10 µl AMV/Tfl 5 x Reaktionspuffer
1 µl dNTP-Mix (10mM jedes dNTP)
2,5 µl Downstream-Primer
2,5 µl Upstream-Primer
2 µl $MgSO_4$ (25mM)
1 µl AMV Reverse Transkriptase (5U/µl)
1 µl Tfl DNA Polymerase (5U/µl)
2 µl RNA-Template
28 µl Nuclease-freies ddH_2O

PCR-Programm:

48°C	45 min	1x	Reverse Transkription
94°C	2 min	1x	AMV-Reverse Transkriptase Inaktivierung und RNA/cDNA/Primer-Denaturierung
94°C	30 sec		Denaturierung
60°C	1 min	40x	Annealing
68°C	2 min		Extension
68°C	7 min	1x	Finale Extension

Danach wurden die Amplifikate mittels Flachbett-Gelelektrophorese überprüft.

2.20. Zellkulturtechnik

Bei der Zellkulturtechnik wurde nach bekannten Protokollen verfahren [Maniatis et al. (49), Santoro et al. (41)], die zum Teil für den jeweiligen Einsatzzweck optimiert wurden. Alle Arbeiten wurden an einer sterilen Gewebekulturbank (Heraeus) durchgeführt. Die Zellen wurden in 75 cm³ Plastikflaschen (Greiner) in einem Brutschrank (Heraeus) mit 5% CO_2-Beimischung bei 37°C kultiviert. Als Nährmedium dienten Eagle`s Minimal Essential Medium (MEM, Life Technologies, Eggenstein) für die Neuro 2A-Zellen, Dulbecco`s MEM mit 4,5 g/l Glukose (Life Technologies) für NIH 3T3-Fibroblasten und RPMI 1640 (Life Technologies) für die TT-Zellen. Allen Medien wurden 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technologies) und 10% FCS (Life Technologies) zugesetzt. Dem RPMI 1640 wurde zusätzlich 1% L-Glutamin (Life Technologies), und dem Eagle`s MEM 1x nichtessentielle Aminosäuren (Life Technologies) zugegeben. Das Nährmedium wurde alle drei Tage gewechselt. Das Medium wurde bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch in einem Wasserbad (GFL, Burgwedel) auf 37°C erwärmt. Waren die Kulturen konfluent gewachsen, wurden sie

mit sterilem PBS (Life Technologies) gewaschen und mit 2-3 ml Trypsin-EDTA (Life Technologies) vom Flaschenboden gelöst. Dazu wurden sie 2-5 min im Brutschrank inkubiert. Auf die vollständig abgelösten wurden 10 ml Medium gegeben, um die Trypsinwirkung zu blockieren. Die Zellsuspension wurde zur weiteren Kultivierung in neue Flaschen aufgeteilt oder es wurden 2/3 verworfen, der Rest mit neuem Medium versorgt und in Kultur gehalten.

2.21. Stabile Transfektionen durch Elektroporation

Bei der Transfektionen durch Elektroporation wurde nach bekannten Protokollen verfahren [Lamon-Fava et al. (51)], die zum Teil für den jeweiligen Einsatzzweck optimiert wurden.
Subkonfluent gewachsene Zellen der Linie NIH 3T3 wurden mit 3 ml Trypsin-EDTA behandelt. Waren die Zellen von der Oberfläche gelöst, wurden 10 ml Dulbecco`s MEM zugegeben und die Suspension bei Raumtemperatur für 4 min mit 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 400 µl Medium resuspendiert. Die Suspension wurde in Elektroprationsküvetten (Bio Rad, München) überführt und 50 µg Plasmid-DNA zupipettiert. Nach leichtem Mischen mit der Pipette wurde die Küvette geschlossen und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Elektroporation bei 250 mV/ 960 C (Pulser, Bio Rad) durchgeführt. Die Zellen wurden zügig in ein 15 ml Gefäß (Greiner) mit 10 ml Medium transferiert. Mit einer 10 ml Pipette (Falcon, Hamburg) wurde die Suspension vorsichtig gemischt und jeweils 5 ml in eine T25-Flasche überführt.

2.22. Selektion

Zwei Tage nach der Transfektion wurde das Medium und die toten Zellen entfernt und jeweils 5 ml Medium + G418 (1,2 mg/ml) zugegeben. Nach 4 Tagen wurde das Medium gewechselt, nach 8 Tagen wurden die überlebenden Zellen für die Aufzucht von Klonen verwendet.

2.23. Aufzucht von Klonen transfizierter Zellen

Zunächst wurde die Zellzahl/ml mit einer Neugebauer-Zählkammer ermittelt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe in 1: 10 - Schritten angesetzt, bis eine Verdünnung von 0,3 Zellen/100 µl erreicht war. Das verwendete Medium enthielt 20% FCS. Die Suspension wurde mit einer 10 ml Pipette gründlich gemischt und mit einer Multipette (Eppendorf) wurden jeweils 100 µl in jedes Well einer 96-Well-Plate (Greiner) gegeben. Nach acht Tagen wurden die Wells auf Zellklone überprüft. Wells mit nur einem Klon wurden markiert und nach weiteren vier Tagen wurde das Medium entfernt, um die Zellen mit 200 µl Trypsin-EDTA zu behandeln. Nach kurzer Inkubation wurden die Zellen mit der pipette gelöst und in 5 ml Medium mit10 % FCS überführt. Die Suspension wurde dann in eine T25-Kulturflasche transferiert. Nach fünf Tagen waren die Zellen konfluent gewachsen und wurden nach der Trypsinierung in 75 cm² -Flaschen gegeben.

2.24. Ernten der Zellen für Gesamtzelllysate

Die Zellen wurden in 6-Well-Plates (Greiner) ausgesäht, wobei je nach Klon und Zellinie 1 bis 4 Tropfen (chem. Pipette, Braun) trypsinierte Suspension pro Well eingesetzt worden sind. Es folgte ein Waschschritt mit 1ml PBS + $NaVO_3$ pro Well. Anschließend kamen 200 µl Lyse-Puffer pro Well hinzu, um 5 Minuten auf Eis zu inkubieren. Die Lysate wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

2.25. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BIO RAD-Farbassay durchgeführt. Als Proteinstandard diente eine BSA-Lösung (Sigma), die 4, 8, 12 und 16 µg Protein /100 µl enthielt. Es wurden Doppelbestimmungen mit jeweils 100 µl angesetzt. Zu dem Standard wurden 600 µl, in die Probenröhrchen 700 µl ddH_2O pipettiert. Dazu kamen jeweils 100 µl 0,5 M NaOH. Für die Membranpräparation wurden Röhrchen mit 2,5 , 5 und 10 µl, für die Gesamtzellysate mit 1µl Proteinextrakt vorbereitet. Anschließend wurden 200 µl Farbreagenz zu jedem Ansatz pipettiert und kurz

gewhirlt. Jeweils 350 µl wurden in eine Vertiefung einer 96-Well-Plate gefüllt und bei einer Wellenlänge von 620 nm wurde die Extinktion gemessen.

2.26. SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurden Elektrophoresen in 6,5 %igen Polyacrylamidgelen mit den Maßen 1,5 mm x 150 mm x 200 mm durchgeführt. Das Trenngel mit der Zusammensetzung

6,5 % Acrylamid
0,18 % Methylenbisacrylamid
25 % Trenngelpuffer
0,167 % TEMED
0,88 % APS
52,26 % ddH_2O

wurde gegossen und mit 1 ml ddH_2O überschichtet, um unter sauerstofffreien Bedingungen eine vollständige Polymerisation zu erreichen. Nach ca 1h konnte das Wasser entfernt werden und das Sammelgel mit der Zusammensetzung

5% Acrylamid
0,13% Methylenbisacrylamid
15,8% Sammelgelpuffer
0,32% TEMED
1,89% APS
71,4% ddH_2O

gegossen werden. Der Kamm wurde luftblasenfrei eingeführt. Nach ca. 1,5h wurde der Kamm gezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Beide Pufferreservoire wurden mit Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Proteine aus der Membranpräparation wurden mit ddH_2O auf den gleichen Proteingehalt verdünnt, mit 25 % 4x Probenpuffer versetzt und mit einer Hamilton-Pipette in die Geltaschen gegeben. Zur Überprüfung der Molekulargewichte wurde ein Gemisch

von farbmarkierten Proteinen (Rainbow^{TM} coloured protein molecular weight markers; MW 14300-220000 Da, Amersham, Braunschweig) mit aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 60V 14h.

2.27. Western Blot

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (BIO RAD) erfolgte in einem Transfer-Sandwich, welches in einer BIO RAD-Transferkammer zwischen zwei Elektroden gehängt wurde. Der Sandwich bestand aus zwei Faserschwämmen, 2 x 2 Filterpapieren Whatman-Filterpapier (Schleicher und Schüll, Dassel), einer Nitrozellulose-Membran und dem Gel. Vor dem Zusammenbau des Sandwiches wurden alle oben genannten Komponenten 15 min im Transferpuffer inkubiert. Zur Stapelung des Transfersandwiches wurde in den Gelhalter ein Faserschwamm und darauf zwei Filterpapiere gelegt. Die Membran und das Gel wurden luftblasenfrei aufgelegt. Darauf kamen wieder zwei Filterpapiere und ein Faserschwamm, so daß der Halter geschlossen werden konnte. Der Gelhalter wurde so in die Kammer gehängt, daß die Membran zur Anode zeigte. Die Kammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und der Transfer bei 50V für 4h durchgeführt.

2.28. Ponceau S-Färbung

Die Membran wurde 3 min in 0,5 %iger Ponceau-Färbelösung inkubiert und anschließend bis zum Erkennen der Proteinbanden in ddH_2O geschwenkt.

2.29. Immunologische Detektion

Die unspezifische Bindung der Antikörper an die Membranoberfläche wurde durch Blockierung mit NET-Puffer 1 h bei Raumtemperatur vermindert. Danach wurde die Membran über Nacht im Kühlraum mit dem primären Antikörper (Rabbit Anti-RET, Santa Cruz, CA; Verdünnung: 1 : 1000 in NET) inkubiert. Nach 4 x 10 min Waschen der Membran mit NET wurde mit dem sekundären Antikörper (Anti-Rabbit HRP-

konjugiert, Santa Cruz; Verdünnung: 1 : 1000 in NET) für 60 min inkubiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben gewaschen, einmal mit TBS gespült und für 1 min die Detektionslösung („Super Signal® Chemiluminescent Substrate“, Pierce, Illinois, USA) aufgegeben. Nach Abtropfen der Detektionslösung wurde die Membran in eine Klarsichtfolie gelegt und in einer Röntgenkassette wurde der Röntgenfilm (Fuji) für unterschiedliche Zeiten entwickelt.

2.30. Immunpräzipitation

Die zur Immunpräzipitation verwendeten Zellen wurden wie unter 2.24. beschrieben geerntet und 20 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Es folgte eine Proteinbestimmung wie in 2.25. Vom Überstand wurden ca. 100 µl eingesetzt. Hinzu kamen:

500 µl HNTG
25 µl Sepharose-A
5 µl Anti-RET

und wurden über Nacht am Drehrad (BIO-RAD) bei 4°C gedreht.
Die Proben wurden dann 3 mal für 10 Minuten bei 4°C und 7000 rpm zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 15 µl entfernt, mit 500 µl HNTG gewaschen und gemischt. 10 µl der Proben wurden für das Gel der Immunpräzipitation verwendet (Gelbeschaffenheit siehe 2.26., Lauf über Nacht bei 30V)

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Klonierung

Zunächst sollten Fragmente, welche die +9bp- bzw. +12bp-Duplikationsmutationen aus Patienten-DNA in Exon 11 des RET-Protoonkogens enthalten, zur Herstellung von Transfektionsvektorprodukten in DNA des Wildtyp-RET-Rezeptors kloniert werden.

Als Ausgangsmaterialien stand DNA des Wildtyp-RET-Rezeptors zur Verfügung, die bereits in das prokaryotische Vektorsystem pBluescript II +/- kloniert war. Des weiteren war Nebenschilddrüsengewebe eines Patienten mit der +9bp-Duplikation, sowie Schilddrüsengewebe eines Patienten mit der +12bp-Duplikation vorhanden.

Zunächst wurde RNA aus dem jeweiligen Gewebe der Patienten isoliert. Anschließend wurde cDNA synthetisiert und mittels PCR ein Bereich des Gens amplifiziert, der die +9bp- bzw. +12bp-Duplikation, sowie enzymatische Schnittstellen beiderseits der Mutation enthielt.

Die hergestellten Amplifikate enthielten sowohl Wildtyp-DNA, als auch DNA mit der Duplikation von 9 bzw. 12 Basenpaaren, da der Gendefekt beim Patienten in heterozygoter Form vorliegt. Um später sicherzugehen, dass lediglich die mutierte Variante als Insert in die Wildtyp-RET-cDNA integriert wird, wurden die Amplifikate zunächst mit BAM HI verdaut und später mittels Agarose-Flachbettgelelektrophorese aufgetrennt.

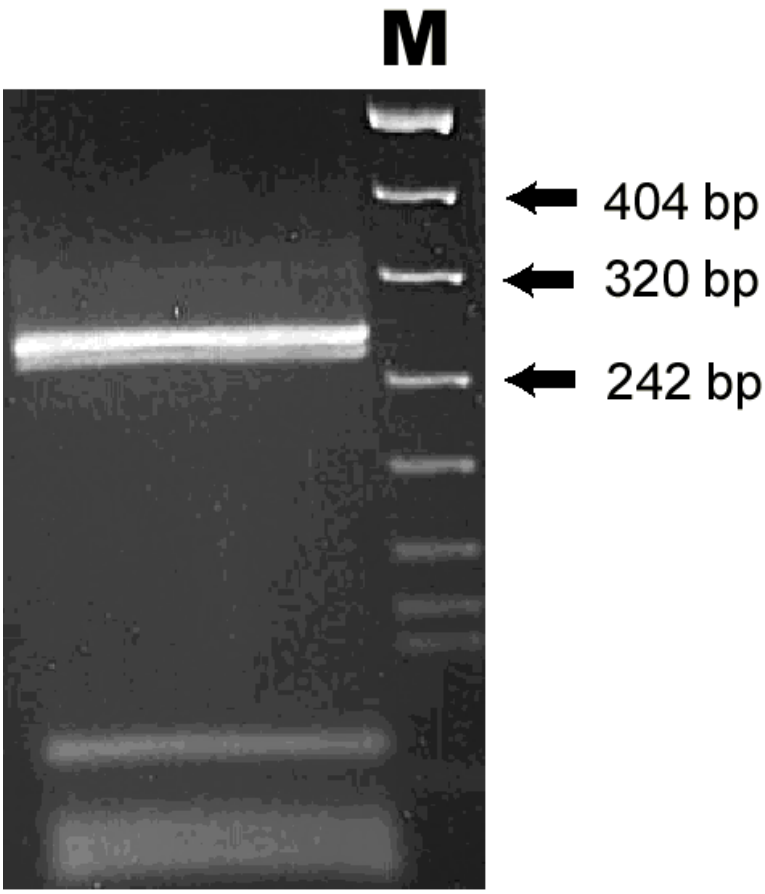


Abbildung III.1: Da die Patienten heterozygot für den Gendefekt sind und bei der Klonierung nur Inserts benutzt werden sollten, welche die erwünschte Duplikation enthalten, mussten die sich in der Größe nur um 9 bzw. 12 Basen unterscheidenden Fragmente getrennt werden. Dargestellt ist die Auftrennung zweier spezifischer Banden bei 259 bp bzw. in diesem Fall 259 +9 = 268bp. Agaroseanteil im Gel: 2 %. M = Molekulargewichtsmarker 8

Anschließend erfolgte die Extraktion der betreffenden Bande, welche das Amplifikat mit der +9bp- bzw. +12bp-Duplikation darstellt, aus dem Agarosegel zur weiteren Verwendung für die Klonierung.

Der Wildtyp-RET-cDNA, welche im pBluescript II SK +/- Expressionsvektor eingebaut war, wurde das Analogon des Amplifikats mit Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten, um später die Fragmente, welche die Mutationen enthalten, einzusetzen.

Da das beschriebene Konstrukt mehrere BAM HI-Schnittstellen besitzt, musste mit Hilfe mehrerer Restriktionsenzyme (Not I, BAM HI sowie Eco RI) mit zwei unterschiedlichen Doppelverdaus verfahren werden. Dadurch entstanden mehrere verschieden große DNA-Stücke, welche mittels Agarose-Flachbettgelelektrophorese (Agaroseanteil 1,5 bzw. 1,0 %) aufgetrennt wurden. Die Stücke der Größe 2050 bp (N + E; mit 5´-Not I-Site und 3´-EcoRI-Site) bzw. 4050 bp (N + B; mit 5´- EcoRI-Site und 3´- BAM HI-Site) wurden zur weiteren Verwendung aus dem jeweiligen Gel extrahiert und danach einer Phenol-Chloroform-Fällung unterzogen.

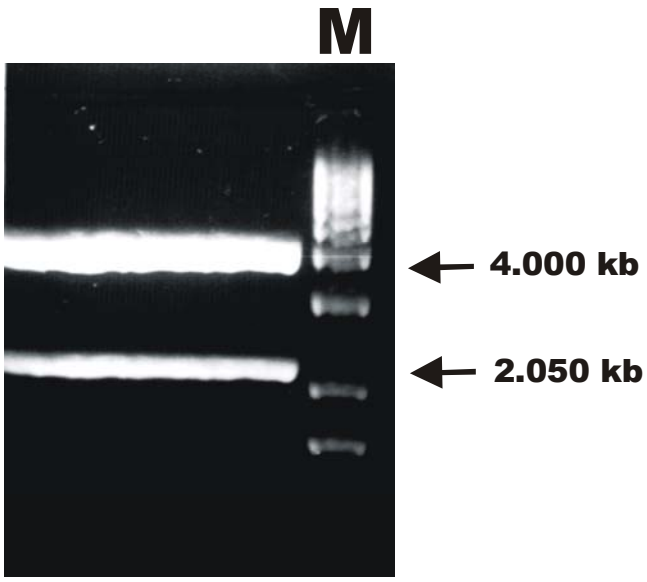


Abbildung III.2: Dargestellt ist die Auftrennung des Verdaus des RET-cDNA / pBluescript Vektor-Produktes mit den Restriktionsenzymen Not I und Eco RI. Die Bande bei 2050 bp (= „N+E“) wurde extrahiert und nach dem im Text wiedergegebenen Arbeitsschema weiterverwendet. Agaroseanteil im Gel: 1,5%. M = 1kb-Leiter

Zum späteren Austausch mit dem +9bp-Fragment musste ein 259 bp großes Stück vom 3´-Ende des N + E -DNA Stückes durch einen zusätzlichen Restriktionsverdau mit BAM HI entfernt werden. Da noch weitere BAM HI-Schnittstellen innerhalb dieses DNA-Stückes existieren, welche jedoch nicht geschnitten werden sollten, wurde nach Phenol-Chloroform-Fällung ein partieller Verdau durchgeführt.

Agarosegel des partiellen Verdaus von N+E mit Bam HI:

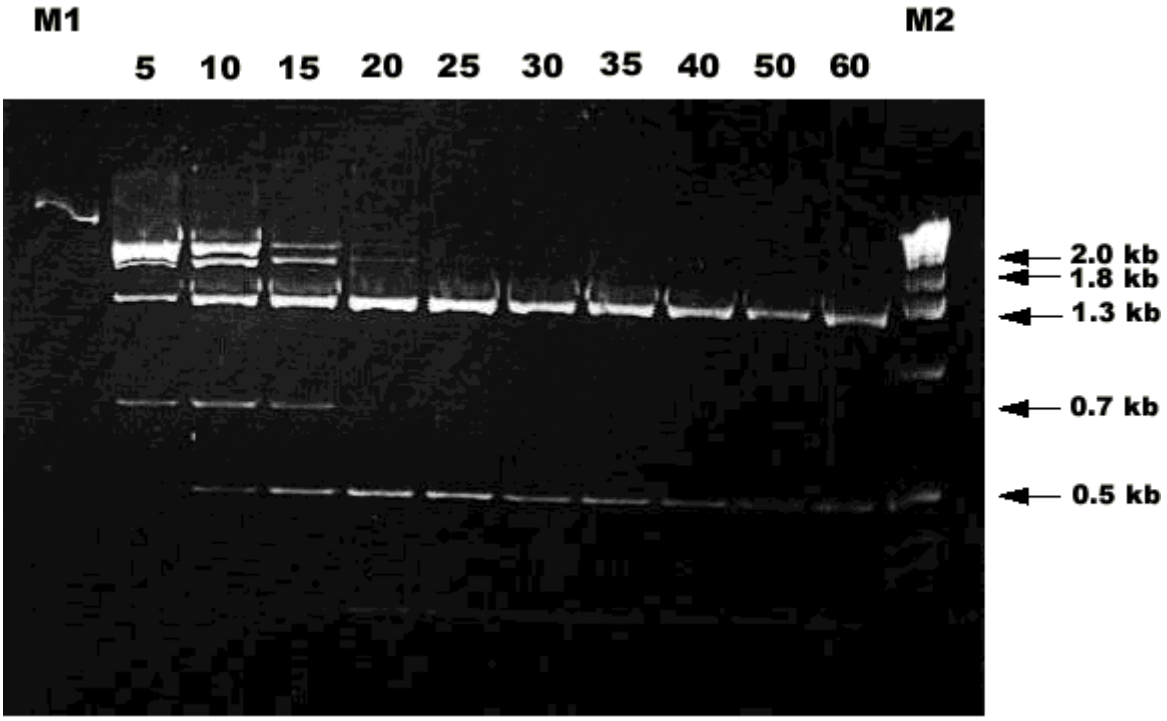


Abbildung III.3: Ergebnis des partiellen Verdaus von „N+E“ über die Zeit. Agaroseanteil im Gel: 1,5 %. Obere Reihe: Zeitangaben in Minuten. Rechte Spalte: Größenangaben in Kilobasen. M1 = Molekulargewichts-Standard 3, M2 = 1-kb-Leiter

Nach 10 min Inkubation war der Anteil der Bande bei ca. 1800 bp (~2050 bp - 259 bp) am größten. Demzufolge wurde ein präparatives Gel angefertigt und die betreffende Bande extrahiert.

Agarosegel des präparativen Verdaus von N+E mit Bam HI:

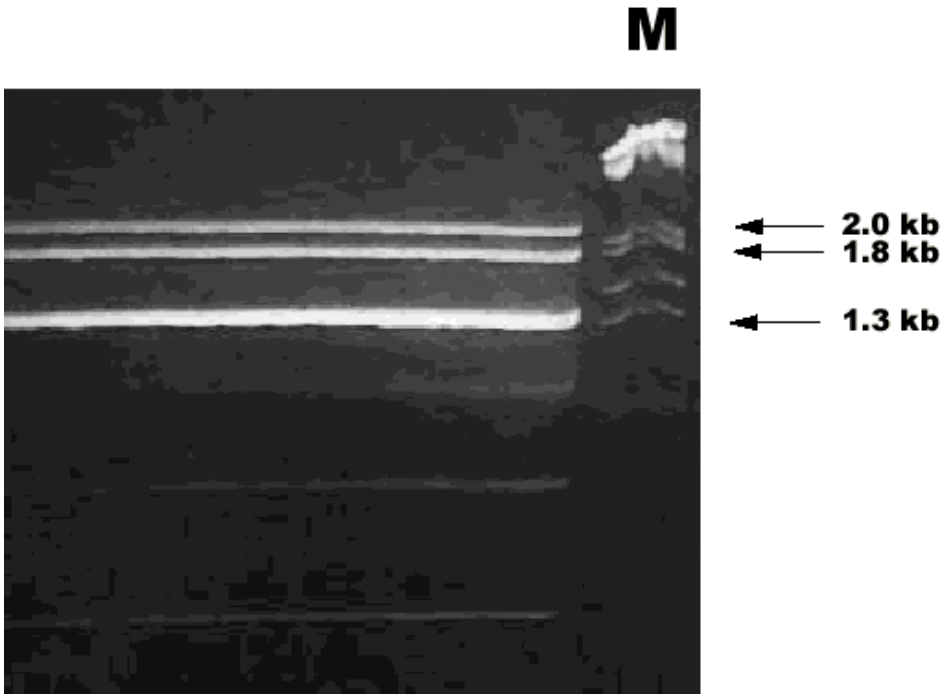


Abbildung III.4 : Darstellung des Agarosegels (1,2 % Agaroseanteil) vom präparativen Partialverdau der ret-cDNA. Rechte Spalte: Größenangaben in Kilobasen. M = Molekulargewichts-Standard 3

Im nächsten Schritt wurde das Amplifikat der +9bp-Duplikation in die vorbereitete fragmentierte DNA, bestehend aus N+B und dem neu hergestellten 1800 bp-Fragment, ligiert.

Nach der Ligation wurden mit dem so neu gewonnenen Produkt aus Amplifikat mit Mutation, Wildtyp-RET-cDNA und prokaryotischem Vektor Bakterien (E. Coli) transformiert, um anschließend größere Mengen der DNA zur weiteren Verwendung zur Verfügung zu haben. Durch einen Kontrollverdau mit BAM HI wurden die hierbei entstandenen positiven Klone herausgesucht.

Die positiven Klone wurden im entsprechenden Bereich um die Stelle der Mutation mittels Dideoxy-Sequenzierung überprüft:

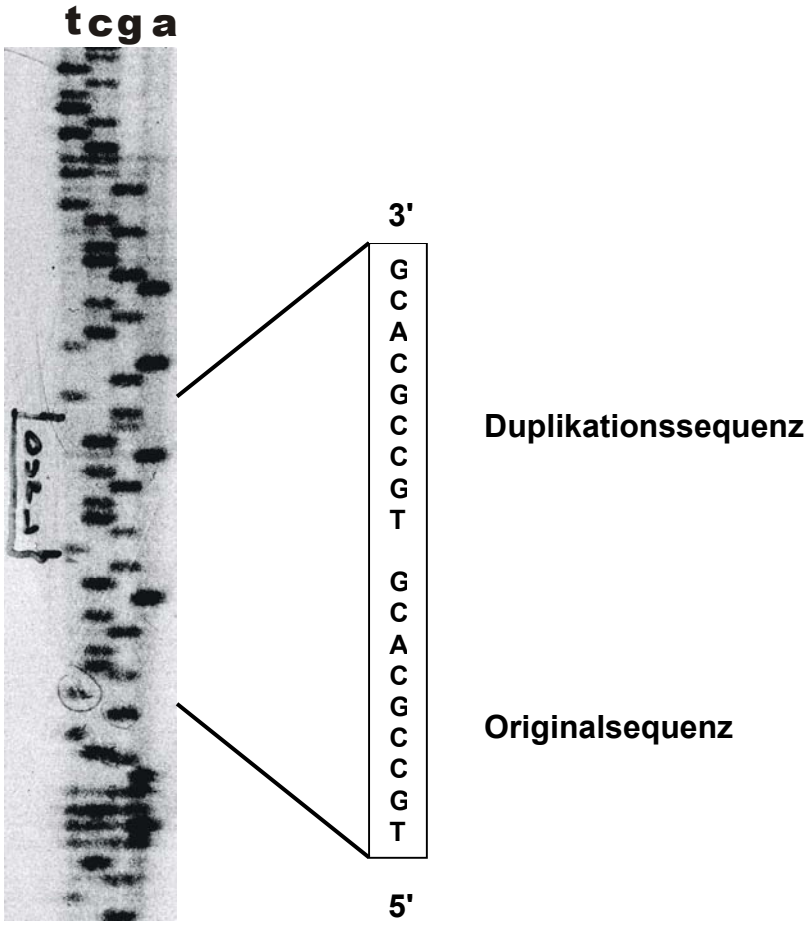


Abbildung III.5: Gezeigt ist ein Ausschnitt aus einem Dideoxy-Sequenzgel. Der Duplikationsbereich von 9bp ist markiert (= DUPL). 3´ zu 5´ Orientierung. Oberste Reihe: t = Thymin, c = Cytosin, g = Guanin, a = Adenin.

Als nächster Schritt erfolgte die Subklonierung des mutierten RET-Rezeptors in den eukaryotischen Expressionsvektor pRC/CMV.

Um die im pBluescript fertiggestellten +9bp bzw. +12bp-ret-Fragmente in einen eukaryotischen Expressionsvektor klonieren zu können, wurde mit Cla I und Sca I doppelverdaut, wobei Sca I den nicht benötigten Vektorrest in ca. 1500 bp und 1600 bp große Stücke zerschneidet, was eine Trennung vom ca. 3200 bp umfassenden Teil, welches auch das +9bp- bzw. +12bp-ret-Fragment enthält, im Agarosegel erleichtert:

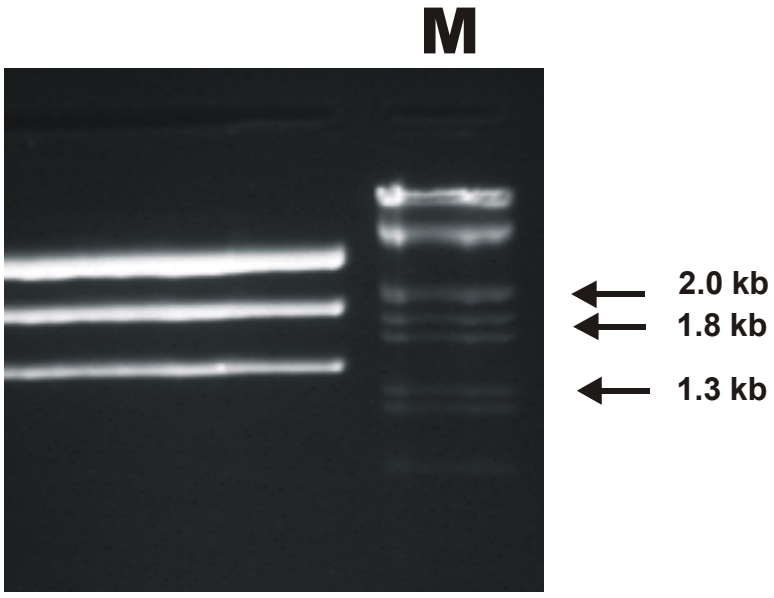


Abbildung III.6: Darstellung des Agarosegels (1% Agaroseanteil) vom Verdau des RET-cDNA/pBluescript Vektor-Produktes mit Sca I und Cla I. Rechte Spalte: Größenangaben in Kilobasen. M = Molekulargewichts-Standard 3

Um das mutierte RET-cDNA-Konstrukt in den eukaryotischen Vektor pRC/CMV zur Expression einzubringen, muss im Bereich der Multiple-Cloning-Site mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden. Dies geschah mit HindIII (unique restriction site). Leider sind die Schnittstellen Hind III des Vektors und Cla I des Rezeptors inkompatibel, so dass bei beiden geschnittenen Produkten vor der Ligation mittels Klenow-Enzym die entsprechenden 3´- bzw. 5´-Überhänge mit Nukleotiden aufgefüllt werden mussten. Anschließend wurden beide DNA-Stücke mit einer Phenol-Chloroform-Fällung gereinigt, ligiert und in Bakterien (E.Coli) transformiert.

Nach der Präparation der DNA (Mini- bzw. Maxi-Prep) wurden die Vektor-cDNA-Grenzen und das Insert mit den 5`- und 3`- flankierenden Bereichen sequenziert, um die Identität des Produktes eindeutig zu belegen:

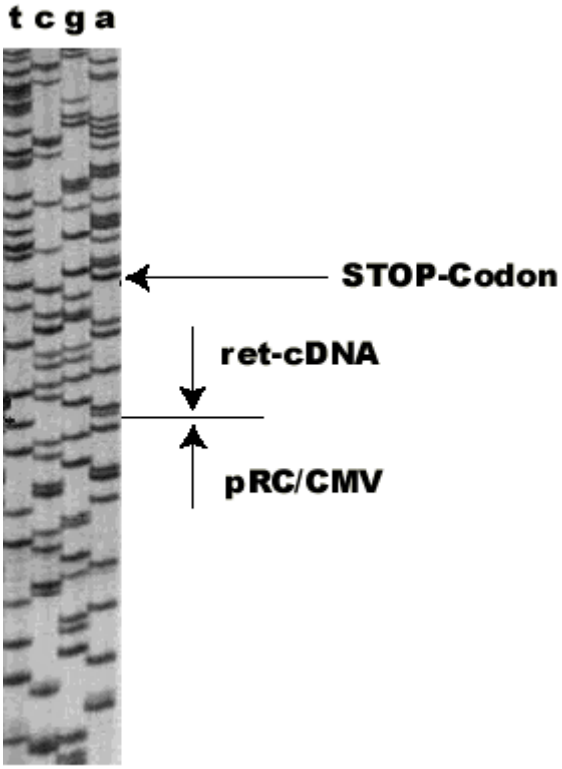


Abbildung III.7: radioaktive Dideoxy-Sequenzierung. Angezeigt sind der Übergang der RET-cDNA zum Vektor pRC/CMV in 3´ zu 5´ Orientierung. Oberste Reihe: t = Thymin, c = Cytosin, g = Guanin, a = Adenin

3.1.1. Mutagenese des Wildtyp-RET-Rezeptors mit +12bp-Duplikationsmutation

Bei der Herstellung des Konstruktes für die +12bp-Duplikations-Mutation wurde nach erfolglosen Klonierungsversuchen das Verfahren der Site-Directed-Mutagenesis angewendet [Papworth et al. (50)]. Als Vorlage für die Herstellung der hierfür benötigten Primer diente die betreffende Patienten-DNA. Nach der Transformation gefundene Klone wurden zuerst mittels Kontrollverdau überprüft und anschließend in ihrem gesamten Verlauf sequenziert, um Fehler bei den thermozyklischen Prozessen der Mutagenese auszuschließen. Die Sequenzanalysen wurden in diesem Fall mit einem PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycler Kit von Perkin Elmer auf automatisierten 377-Sequencern von Applied Biosystems durchgeführt.

3.2. Immunhistochemische Ergebnisse

Um den Mechanismus der Aktivierung des mutierten RET auf zellbiologischer Ebene zu untersuchen, wurde die RET c-DNA in ihrer Short-Isoform in den eukaryotischen Expressionsvektor pRC/CMV2 kloniert. Die beschriebenen +9- bzw. +12-Basen-Duplikationsmutationen wurden wie im Ergebnisteil Klonierung dargestellt eingefügt.
Die Mäusefibroblastenzelllinie NIH 3T3 wurde transfiziert und Klone selektiert, die wt-RET, +9bp-RET und +12bp-RET exprimieren. TT-Zellen, eine Zelllinie aus humanem C-Zellkarzinom, die heterozygot für eine der klassischen Mutationen in Codon 634 (C634W) des RET Proto-Onkogens ist, wurden als spätere Positivkontrolle ebenfalls kultiviert.

3.2.1. Ligandenunabhängige Dimerisierung von +9bp- und +12bp-RET

Nach der Zelllysis wurden die Proteine unter nichtreduzierenden bzw. reduzierenden Bedingungen durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Abbildung III.8) analysiert.
Die Mutation C634W bewirkt eine ligandenunabhängige Dimerisierung des RET-Rezeptors, welche durch die 300 kD große Bande im Elektrophoresegel, respektive des in TT-Zellen exprimierten RET, zur Darstellung kommt (Abbildung III.8 A, Bahn 1). Die monomeren Formen treten als 150 kD- bzw. 170 kD-Bande in Erscheinung. Das +9bp-RET (Abbildung III.8 A, Bahn 2) und das +12bp-RET (Abbildung III.8 A, Bahn 3) zeigen sich ebenfalls in der dimerisierten Form bei 300 kD. Im Gegensatz hierzu stellen sich die RET-Proteine der Zellen, welche den wt-RET-Rezeptor exprimieren, in der monomeren Form dar (Abbildung III.8 A, Bahn 4).
Hieraus lässt sich schließen, das ein zusätzlicher Cystein-Rest zu einer ligandenunabhängigen Dimerisierung des RET-Rezeptors führt.

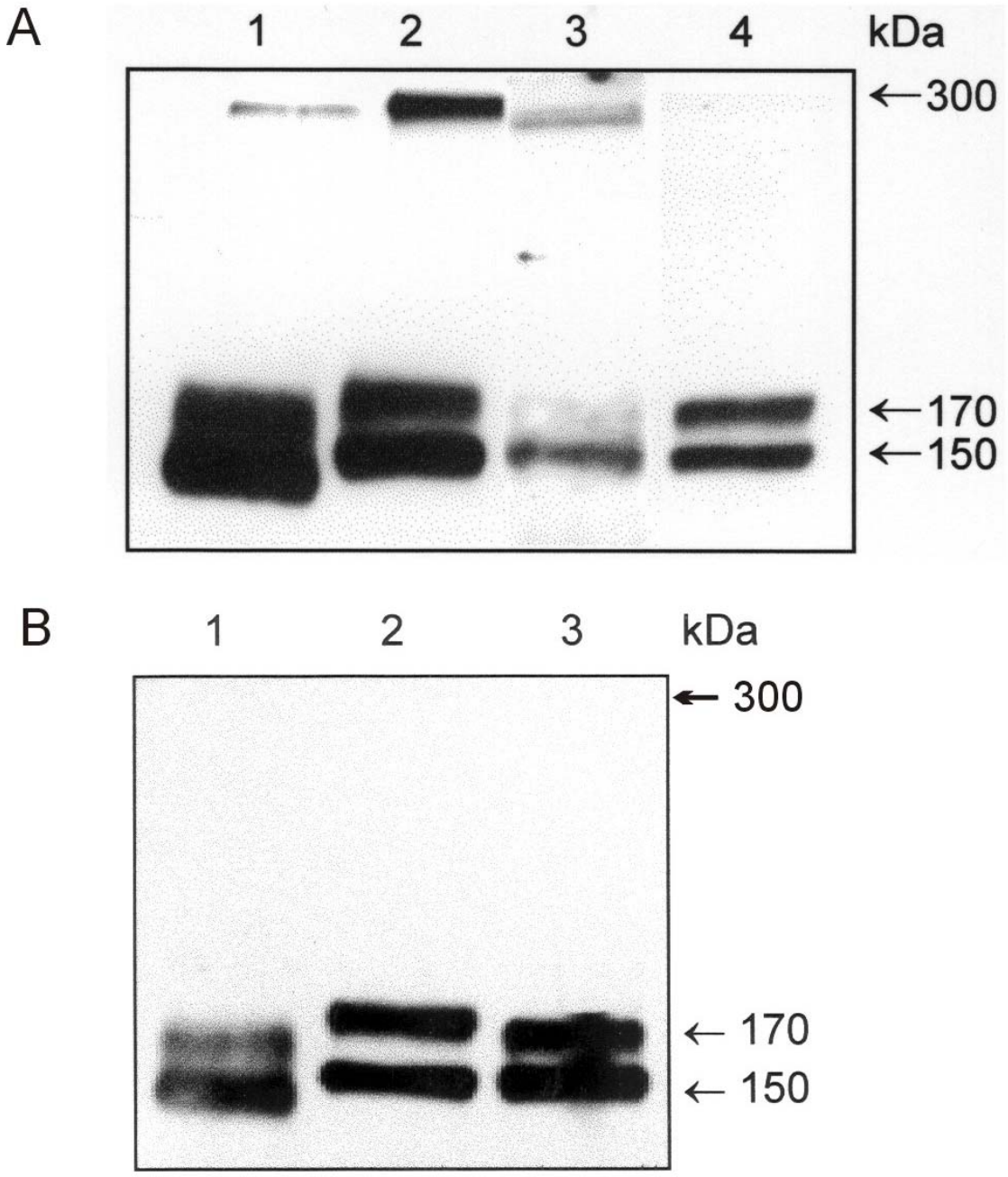


Abbildung III.8: (A) Western Blot von Wildtyp- und mutierten RET-Rezeptoren unter nichtreduzierenden Bedingungen. Vergleichbare Mengen zellulären Gesamtproteins von TT-Zellen (Bahn 1), stabil mit +9bp-RET (Bahn 2) und +12bp-RET (Bahn 3) transfizierten NIH3T3 Zellen, sowie Wildtyp-RET (Bahn 4) wurden in DTT-Puffer ohne Zusatz von DTT gelöst und mit SDS-PAGE untersucht. Nach dem Blotting wurden die Proteine mit einem polyklonalen Anti-RET-Antikörper (Santa Cruz) detektiert. Die Immunkomplexe wurden durch ein Chemiluminescence Detection Kit (ECL, Pierce) unter Zuhilfenahme von Anti-Goat-Antikörpern, die an Meerrettichperoxidase gebunden waren (DIANOVA), sichtbar gemacht. +9bp-RET, +12bp-RET und C634W-RET (TT-Zellen, Bahn 1) zeigen eine Dimerisierung in Form einer 300 kDa-Bande, während das Wildtyp-RET (Bahn 4) nur als Monomer in Form von 150 bzw. 170 kDa-Bande imponiert. (B) Unter reduzierenden Bedingungen zeigen +9bp-RET(Bahn 1), +12bp-RET (Bahn 2) und C634W-RET (Bahn 3) ebenfalls nur die monomere Form von 150 bzw. 170 kDa.

3.2.2. Ausbildung von RET-Dimeren durch intermolekulare Disulfidbrücken

Unter reduzierenden Bedingungen kommt das mutierte C634W-RET in der monomeren Form zur Darstellung (Abbildung III.8 B, Bahn 1). Dies dient unter Berücksichtigung obiger Ergebnisse als Beweis, dass die Mutation eine ligandenunabhängige Dimerisierung durch Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken bewirkt. Das +9bp-RET- (Abbildung III.8 B, Bahn2) und das +12bp-RET-Genprodukt (Abbildung III.8 B, Bahn 3) sind unter reduzierenden Bedingungen ebenfalls nur in der monomeren Form detektierbar. Offensichtlich bewirkt das zusätzliche Cystein 634 ebenfalls die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den beiden Rezeptorhälften, was zu einer ligandenunabhängigen Dimerisierung führt.

3.2.3. Vergleich von Klonen unterschiedlicher Expression

Um zu untersuchen, dass nicht die Überexpression von RET für die ligandenunabhängige Dimerisierung des RET-Rezeptors verantwortlich ist, wurden Klone der +12bp-Mutation mit unterschiedlich starker Expression verglichen. Wie in Abbildung III.9 dargestellt, zeigen sowohl der Klon mit starker Expression (Bahn 2), als auch der Klon mit niedriger Expression (Bahn 3) ein Signal bei 300 kDa. Hieraus wird ersichtlich, dass die ligandenunabhängige Dimerisierung des RET-Rezeptors nicht durch Überexpression bewirkt wird.

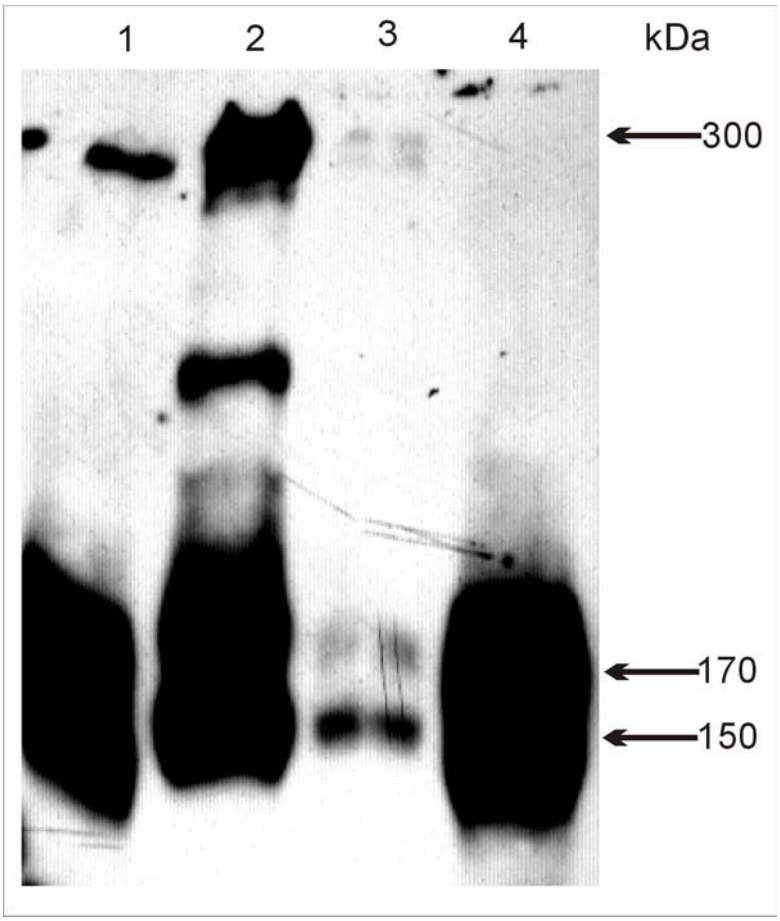


Abbildung III.9: Western Blot von Wildtyp- und mutierten RET-Rezeptoren unter nichtreduzierenden Bedingungen. Vergleichbare Mengen zellulären Gesamtproteins von TT-Zellen (Bahn 1), stabil mit +12bp-RET (Bahnen 2 und 3) transfizierten NIH3T3 Zellen, sowie Wildtyp-RET wurden wie in Abb III.8 mit SDS-PAGE untersucht. Zwei verschiedene Klone der +12bp-Mutation (Bahnen 2 und 3) exprimieren RET unterschiedlich stark. Beide zeigen in Analogie zum C634W-RET (TT-Zellen, Bahn 1) eine Dimerisierung in Form einer 300 kDa-Bande, während das Wildtyp-RET (Bahn 4) nur als Monomer in Form von 150 bzw. 170 kDa-Banden imponiert.

3.2.4. Konstitutive Aktivierung der +9bp- bzw. +12bp-RET-Tyrosinkinase in NIH 3T3-Mäusefibroblastenzellen

Um die ligandenunabhängige Aktivierung des mutierten Rezeptors zu untersuchen, wurde RET aus verschieden transfizierten NIH3T3-Mäusefibroblastenzellen immunpräzipitiert und auf den Gehalt an Phosphotyrosin (pTyr) geprüft. Phosphotyrosin spiegelt die Aktivierung des Rezeptors wider. Im Falle der TT-Zellen zeigte sich, dass die Mutation C634W die Autophosphoryliereung der intrazellulären Tyrosinkinase bewirkt (Abbildung III.10, Bahn 1).

Die Ergebnisse zeigen weiter, dass das +9bp- bzw. +12bp-RET-Protein ebenfalls autophosphoryliert sind (Abbildung III.10, Bahn 2 und 3). Im Vergleich mit den TT-

Zellen lässt sich eine ähnliche Menge an pTyr bei den mutierten Rezeptoren mit dem zusätzlichen Cystein 634 ermitteln und zeigt auf diese Weise, dass dieser Typ Mutation eine konstitutive Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase nach Dimerisierung zur Folge hat.

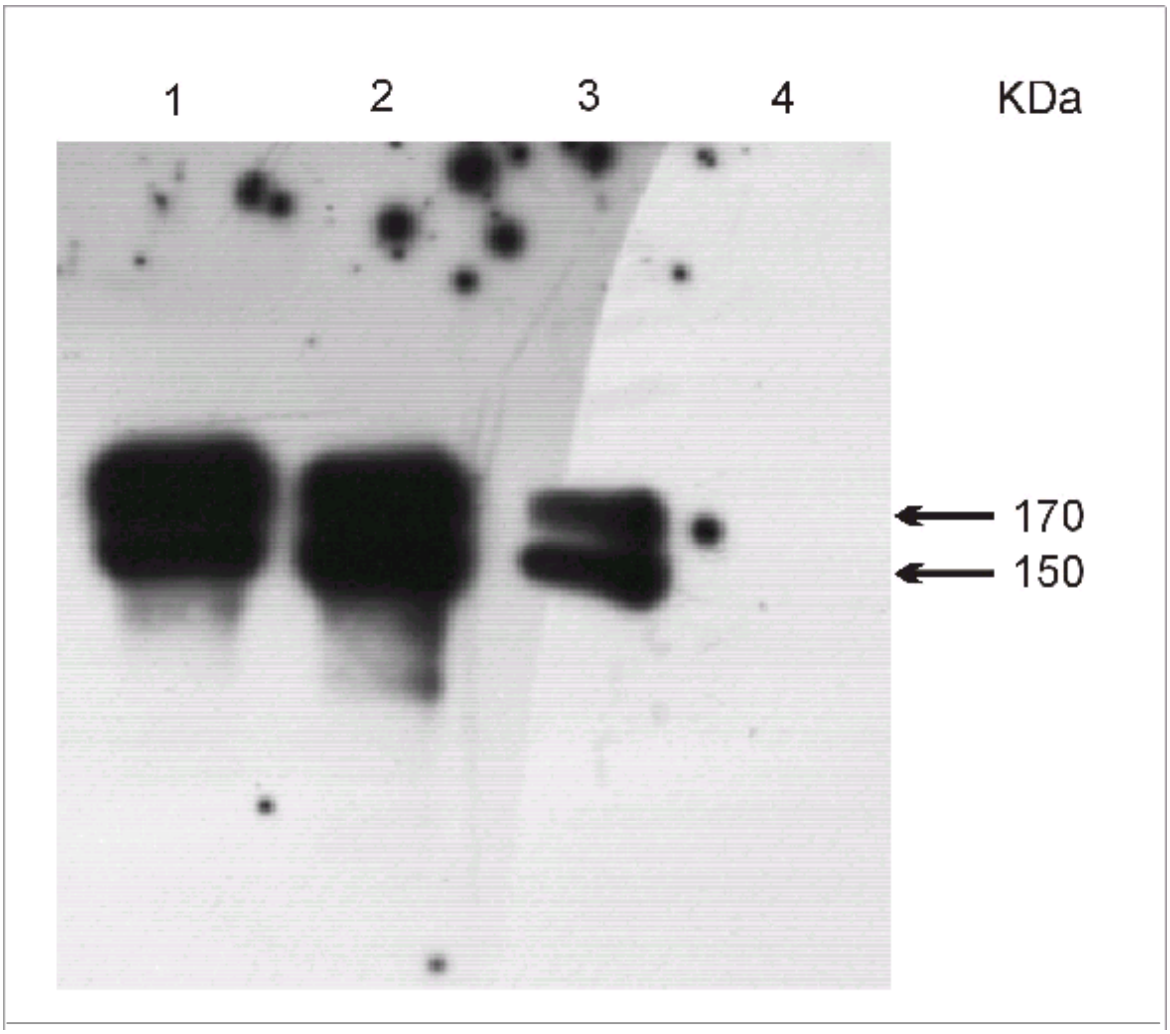


Abbildung III.10: Aktivierung der Tyrosinkinase des RET-Rezeptors. Vergleichbare Mengen zellulären Gesamtproteins der beschriebenen transfizierten Zellen wurden mit einem polyklonalen Anti-RET-Antikörper immunopräzipitiert. Die Präzipiptate wurden anschließend mit einem monoklonalen Antikörper für Phosphotyrosin (pTyr PY 99, Santa Cruz) immungeblottet. Bei den Duplikationsmutationen in Exon 11 zeigt das RET-Produkt hohe Werte an pTyr (Bahn 1: +9bp; Bahn 2: +12bp). Das RET-Protein der TT-Zellen (Bahn 3) zeigt ein niedrigeres Signal für pTyr, der Wildtyp (Bahn 4) zeigt kein Signal.

4. Diskussion

In Analogie zum Nachweis der liganden-unabhängigen Dimerisierung und der dadurch bedingten Aktivierung der RET-Tyrosinkinase nach Substitution eines Cysteins in der extrazellulären, cysteinreichen Region [Santoro et al. (41)] wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob durch ein zusätzliches Cystein in diesem Bereich ebenfalls eine Aktivierung resultiert.
Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass
a) das mutierte RET-Protein spontan Dimere ohne Anwesenheit eines Liganden bildet,
b) die RET-Tyrosinkinase dabei phosphoryliert bzw. aktiviert ist.

4.1. Diskussion der Klonierungsstrategie

Die spezifischen Duplikations-Mutationen (+9-bp bzw. +12-bp), welche mittels Screening von an MEN 2A erkrankten Familien aufgefunden wurden [(Höppner et al. (47); Höppner et al. (48)], konnten erfolgreich durch Klonierung bzw. Site-Directed Mutagenesis hergestellt werden.
Allerdings war die durchgeführte Klonierung der +9bp-Mutation durch ihre Komplexizität mit zum Teil erheblichem Aufwand auf dem Gebiet der molekularbiologischen Technik verbunden. Noch wesentlich problematischer gestaltete sich die Klonierung der +12bp-Mutation, die parallel durchgeführt wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Herstellung von DNA-Fragmenten gemäß der +9bp-Klonierungsstrategie nicht möglich war, da die eingesetzten Restriktionsenzyme keine Wirkung zeigten. Vermutlich ist dies auf Methylierungsvorgänge in den betreffenden DNA-Abschnitten zurückzuführen, die bei Bakterienpassagen zum Zwecke der Vervielfältigung stattfanden [Nelson et al. (52), McClelland (53)]. Denkbar ist auch das Auftreten von Verunreinigungen bei den unterschiedlichen Aufbereitungsschritten der DNA.
Trotz Anwendung unterschiedlicher Ligationsstrategien und Einsatzes verschiedener E. coli-Stämme konnte so keine Transformation durchgeführt werden. Dies hatte zur Folge, dass für die Klonierung der +12bp-Mutation die Methode der Mutagenese angewandt wurde [Papworth et al. (50)]. Hierdurch war es anschließend erforderlich, die neu erzeugte DNA in voller Länge zu sequenzieren.

4.2. Diskussion des verwendeten Zellmodells

In der Erforschung von Mutationen des RET-Proteins sind Mäusefibroblasten der Linie NIH 3T3, die durch Immun-Präzipitation und Western-Blotting mit Hilfe passender Antikörper untersucht werden, als Zellmodell etabliert [Santoro et al. (41), Iwashita et al. (54), Wada et al. (55)]. Mit dem Nachweis der konstitutiven Dimerisierung durch die +12bp-Mutation stellt sich im Hinblick auf den unterschiedlichen Phänotyp die Frage, ob im Gegensatz zu den bekannten Mutationen nicht eine veränderte Substratspezifität besteht. Möglicherweise hat der zusätzlich vorhandene Histidinrest in der extrazellulären Domäne des Rezeptors Auswirkung auf die Struktur des Proteins und dadurch auch auf dessen Funktion [Weiss et al. (56)]. Ein verändertes Verhalten in der Signaltransduktion ist ebenfalls denkbar [Liu et al. (57)].
Gerade für die Aufklärung dieser Fragestellungen könnten zusätzliche Transfektionen humaner Zellinien anstelle der NIH 3T3-Zelllinie hilfreich sein, da es möglich wäre, dass sich die Signaltransduktion in den Mäusefibroblasten von derer in humanen Zelllinien stark unterscheidet. Außerdem stellen die verwendeten NIH 3T3-Zellen RET nicht endogen her, was ebenfalls zu Abweichungen im Signalverhalten gegenüber Zellen führen kann, die RET natürlicherweise exprimieren, wie zum Beispiel neuroektodermale Zellen [van Weering et al. (30), Asai et al. (15)].

4.3. Modell für einen möglichen Pathomechanismus

Der Nachweis und die Erforschung pathogener Mutationen im RET-Protoonkogen haben in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt. Gerade für die Betreuung und Behandlung von Familien mit hereditären Schilddrüsenkarzinomen oder multiplen endokrinen Neoplasien ist dies von besonderer Bedeutung. Wird bei einem Indexpatienten eine Mutation festgestellt, sollte bei allen Verwandten ein eventuelles Vorliegen der Mutation überprüft werden [Hoie et al. (58)]. Entsprechend dem autosomal dominanten Erbgang ist statistisch bei 50 % der blutverwandten Angehörigen das Vorliegen der Mutation zu erwarten. Genträger haben wegen der hohen Penetranz (ca. 70 % bis zum 60. Lebensjahr in Abhängigkeit des Mutationstypus) eine hohe Wahrscheinlichkeit, zu erkranken [Phay et al. (59)].

MEN 2 kann im Krankheitsverlauf durchaus gefährliche Komplikationen aufweisen. Zum einen bedroht das medulläre Schilddrüsenkarzinom das Leben der Patienten [Machens et al. (60)]. Dieses kann nur vor der Bildung von Metastasen kurativ behandelt werden [Le et al. (61)]. Aus diesem Grund gilt es, den Genträgerstatus frühzeitig, möglichst präsymptomatisch zu ermitteln, damit eine prophylaktische Thyreoidektomie als Therapie der Wahl durchgeführt werden kann. Die Operation wird im Alter von 5 – 6 Jahren empfohlen, da bereits im Alter von 10 Jahren einzelne Fälle von metastasierten medullären Schilddrüsenkarzinomen beschrieben wurden [Dralle et al. (62)].

Des weiteren kann das Phäochromozytom der Nebenniere mit seiner Auftretenswahrscheinlichkeit von ca. 50 % zu lebensgefährlichen hypertensiven Krisen und durch längeres Bestehen zu Gefäßschäden mit der Folge von Herzinfarkten und Schlaganfällen führen [Rosenthal et al. (63)] . Aus diesem Grund ist die operative Entfernung des Organs die Therapie der Wahl und sollte frühzeitig in Erwägung gezogen werden [de Graaf et al. (64), Nguyen et al. (65)].

In der vorliegenden Arbeit wurden Auswirkungen zweier Mutationen im RET-Protoonkogen auf die Funktionsweise des daraus entstehenden Rezeptors untersucht. Mutationen durch Basensubstitutionen im Codon 634 sind bekannt und beschrieben [International RET Mutation Consortium (5)]. Eine ligandenunabhängige Dimerisierung sowie Aktivierung durch Autophosphorylierung in der Tyrosinkinase-Domäne der so entstandenen Rezeptoren konnten nachgewiesen werden [Santoro et al. (41)]. Die Dimerisierung des Rezeptors findet durch Bildung intermolekularer Disulfidbrücken zwischen den Schwefel enthaltenden Cysteinen statt. Ein Modell hierzu gibt Abbildung IV.1 wieder.

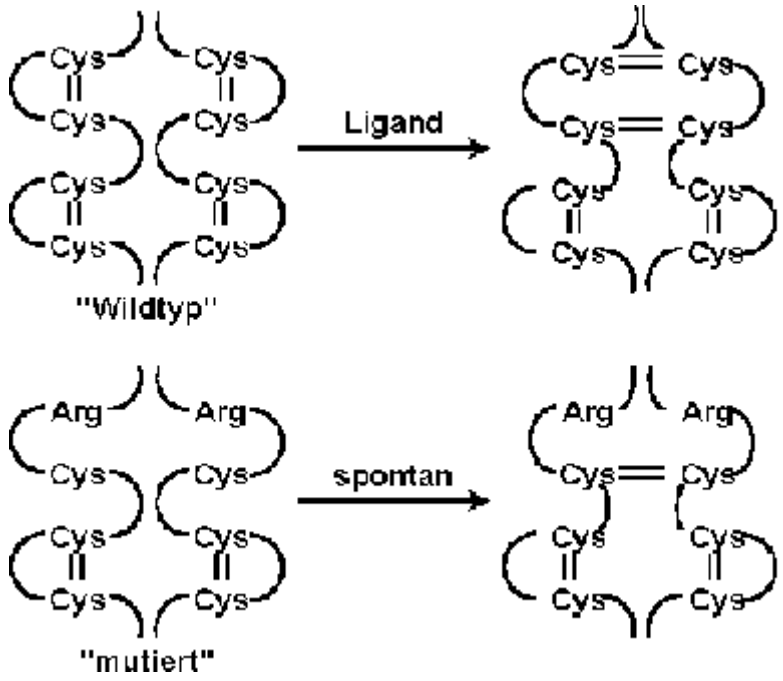


Abbildung IV.1: Möglicher Mechanismus der ligandenunabhängigen Dimerisierung des RET-Rezeptors nach dem Austausch des Cystein 634 in die Aminosäure Arginin.

Demzufolge verliert ein Cysteinrest, der ursprünglich in eine intramolekulare Disulfidbrücke eingebunden war, seinen Bindungspartner und kann nun als freier Cysteinrest mit dem Cysteinrest eines anderen Rezeptor-Monomers interagieren. Eventuell wird so eine Konformationsänderung des jetzt entstandenen Rezeptorkomplexes ausgelöst, welche eine Ligandenbindung vortäuscht, und so die Aktivierung des Rezeptors veranlasst [Liu et al. (56)]. Im Fall der in dieser Arbeit untersuchten Mutationen von +9bp bzw. +12bp erscheint jeweils ein zusätzlicher Cysteinrest in der cysteinreichen Region des Rezeptors. Hieraus leitet sich die Annahme ab, dass das zusätzliche Cystein ebenfalls keinen Bindungspartner innerhalb seiner Rezeptorhälfte besitzt und dadurch Disulfidbrücken mit den Cysteinresten auf gleiche Art und Weise mutierter Rezeptoren ausbilden kann (Abbildung IV.2).

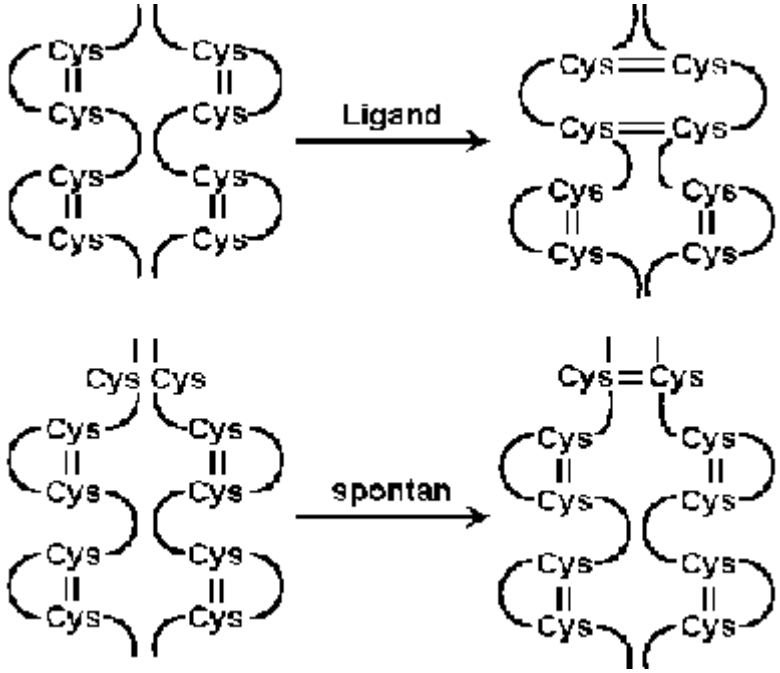


Abbildung IV.2: Möglicher Mechanismus der ligandenunabhängigen Dimerisierung des RET-Rezeptors bei Duplikationsmutation und Insertion eines zusätzlichen Cysteinrestes in die cysteinreiche Region des Rezeptors.

Als Ergebnis wird also ebenfalls eine ligandenunabhängige Bildung von Homodimeren durch Ausbildung von Disulfidbrücken angenommen.

Auch für andere Rezeptoren ist eine Homodimerisierung und konstitutive Aktivierung durch Disulfidbrückenbildung zwischen Cysteinresten bekannt. Beim Erythropoetin-Rezeptor führt der Austausch eines Arginins zu Cystein in der extrazellulären Domäne zur Dimerisierung und Aktivierung [Watowich et al. (66)].

Im Falle der +12bp-Duplikation ist die Sequenz out of frame (Abbildung IV.3), und führt des weiteren zu einer Einbringung eines zusätzlichen Histidinrestes.

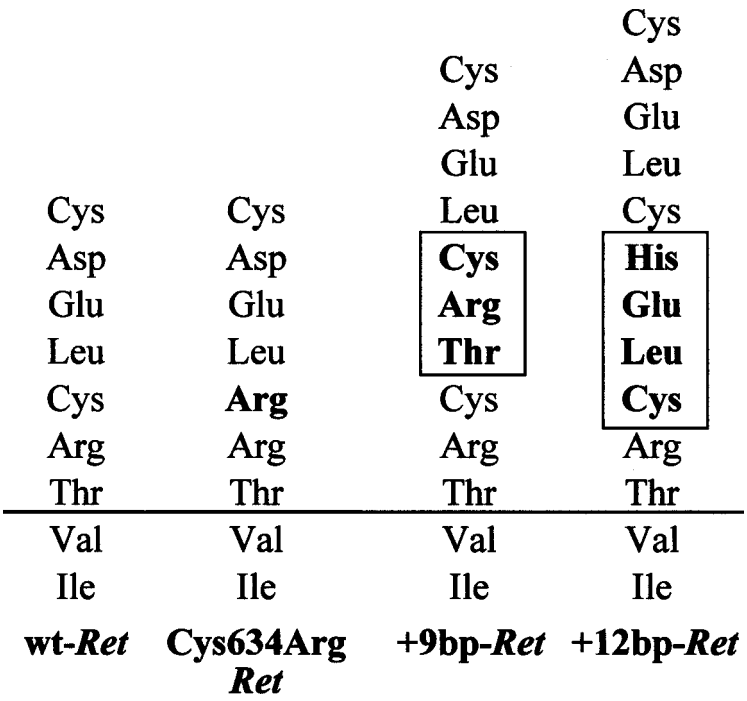


Abbildung IV.3: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenzen in der Nähe der Zellmembran. Die wt-Ret-Sequenz zeigt die ursprüngliche Anordnung von Cys 630 und Cys 634. Daneben sind drei unterschiedliche Mutationen dargestellt. Die klassische Mutation ist eine Substitution von Cys 634; hier durch Arginin (Cys634Arg-Ret). Des weiteren die in dieser Arbeit beschriebenen Duplikationsmutationen (+9bp-Ret, +12bp-Ret).

Klinisch wird diese Mutation im Zusammenhang mit einem anderen MEN 2-Phänotyp gesehen. Neben dem medullären Schilddrüsenkarzinom erkranken die betroffenen Patienten ungewöhnlich häufig an primärem Hyperparathyreoidismus, jedoch weist bisher keines der Familienmitglieder ein Phäochromozytom auf [Höppner et al. (48)].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein zusätzliches Cystein zu einer ligandenunabhängigen Dimerisierung führen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Mutationen intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den mutierten Rezeptoren ausbilden und dies zu einer konstitutiven Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase führt.

In vitro gibt es keinen Hinweis darauf, dass die Mechanismen zur Aktivierung des Rezeptors bei der +9bp- bzw. der +12bp-Duplikation unterschiedlich sind. Trotzdem unterscheidet sich der Phänotyp der +12bp-Familien von dem der Familien mit den klassischen RET-Mutationen oder denen der +9bp-Duplikation [Höppner et al. (47), Höppner et al. (48)]. Die Tatsache, dass kein Phäochromozytom entsteht, jedoch eine auffällige Häufung von Erkrankungen an primären Hyperparathyreoidismus, legt das Vorhandensein gewebsspezifischer Komponenten nahe [Nakamura et al. (67)].

Möglicherweise spielen aber auch Interaktionen mit den unterschiedlichen Liganden eine Rolle, da MEN2-Patienten heterozygot für die RET-Mutationen sind und deshalb in vitro teilweise auch das Wildtyp-Protein exprimiert wird [Tansey et al. (68)]. Man könnte auch annehmen, dass die Duplikation in der cysteinreichen Domäne eine Konformationsänderung bewirkt, welche die Affinität zu den Liganden beeinflusst. Die bekannten Liganden (GDNF, Neurturin, Artemin und Persephin) könnten in den unterschiedlichen Geweben, in denen RET vorhanden ist, auch in unterschiedlichen Mengen exprimiert werden, was eventuell die Aktivierung des mutierten Rezeptors beeinflusst und dadurch verschiedene Phänotypen hervorrufen könnte [Edstrom et al. (69), Baudet et al. (70), Enokido et al. (71)] .

Eine andere Möglichkeit der Änderung des Aktivierungsmechanismus des RET-Rezeptors ergibt sich aus der Interaktion mit seinen Co-Rezeptoren GFR-α 1 – 4 [Frisk et al. (72), Lindahl et al. (73)]. Die duplizierte Sequenz befindet sich in unmittelbarer Nähe der Membran und könnte durch Konformationsänderung oder dem zusätzlichen Histidinrest in dieser Region im Falle der +12bp-Duplikation die Interaktion mit den Co-Rezeptoren beeinflussen und eine unterschiedliche RET-Aktivierung oder Signalübermittlung bewirken.

5. Zusammenfassung

Multiple Endokrine Neoplasien vom Typ 2A bezeichnet ein dominant vererbbares Krebsleiden, welches sich durch die kombinierte Manifestation von medullärem Schilddrüsenkarzinom, Phäochromozytom und Hyperparathyreoidismus auszeichnet. Missense-Mutationen in einem von sechs Cystein-Codons im extrazellulären Bereich des RET-Protoonkogens führen zum Verlust eines Cysteinrestes und zur Erkrankung an MEN 2A. Diese Mutationen bewirken eine liganden-unabhängige konstitutive Aktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors durch die Bildung von Homodimeren, die über Disulfid-Brückenbildungen gebildet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden molekular- und zellbiologische Experimente zum Pathomechanismus zweier Mutationen durchgeführt, die sich von den klassischen Punktmutationen unterscheiden. Im ersten Fall handelt es sich um eine Duplikation von 9 Basenpaaren, die eine Insertion von drei Aminosäuren zwischen Codon 633 und 634 des RET-Proteins bewirkt. Im zweiten Fall führt eine Duplikation von 12 Basenpaaren in Exon 11 zu vier zusätzlichen Aminosäuren zwischen Codon 634 und 635 des RET-Proteins.

Nach erfolgreicher Klonierung der Mutationen in eukaryotische Expressionsvektoren erfolgte die Transfektion von Mäusefibroblasten der Linie NIH 3T3, um die mutierten RET-Proteine zu charakterisieren. Zur Kontrolle wurden wt-RET-transfizierte NIH 3T3-Zellen und Zellen einer C-Zellkarzinom-Linie parallel kultiviert und untersucht.

Die exprimierten RET-Proteine wurden in einem Polyacrylamidgel unter nichtreduzierenden und unter reduzierenden Bedingungen getrennt, um durch Western-Blot-Analysen das RET-Protein zu charakterisieren.

Für die untersuchten RET-Proteine der Mutationen +9bp und +12bp mit den jeweiligen zusätzlichen Cysteinen konnte nachgewiesen werden, dass eine liganden-unabhängige Dimerisierung stattfand, die zu einer Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase führte. Versuche unter nichtreduzierenden und reduzierenden Bedingungen lassen darauf schließen, dass der Mechanismus der Dimerisierung auf der Bildung von Disulfidbrücken beruht.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Einführung eines zusätzlichen Cysteins ebenso eine spontane Dimerisierung zur Folge hat und die Erkrankung der Patienten auf das gleiche pathologische Prinzip zurückzuführen ist.

6. Literaturverzeichnis

1 Chew SL, EngC. Multiple endocrine neoplasia type 2 and related genetic conditions. Current Science 1995; 2: 121-126

2 Heitz PU, Komminoth P, Kloppel G. Pathology of MEN-1: morphology, clinicopathologig correlations and tumor development. J Intern Med 1998Jun; 243(6): 455-64

3 Frank-Raue K, Hoppner W, Frilling A, Kotzerke J, Dralle H, Haase R, Mann K, Seif F, Kirchner R, Rendl J, Deckart HF, Ritter MM, Hampel R, Klempa J, Scholz GH, Raue F. Mutations of the ret protooncogene in German multiple endocrine neoplasia families: relation between genotype and phenotype. German Medullary Thyroid Carcinoma Study Group. J Clin Endocrinol Metab 1996 May;81(5):1780-3

4 Skinner MA, Wells SA Jr. Medullary carcinoma of the thyroid gland and the MEN 2 syndromes. Semin Pediatr Surg 1997 Aug;6(3):134-40

5 International RET Mutation Consortium. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. JAMA 1996 Vol. 276, No. 19: 1575-1578

6 Schuffenecker I, Virally-Monod M, Brohet R, Goldgar D, Conte-Devolx B, Leclerc L, Chabre O, Boneu A, Caron J, Houdent C, Modigliani E, Rohmer V, Schlumberger M, Eng C, Guillausseau PJ, Lenoir GM. Risk and penetrance of primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 2A families with mutations at codon 634 of the RET proto-oncogene. Groupe D'etude des Tumeurs a Calcitonine. J Clin Endocrinol Metab 1998 Feb;83(2):487-91

7 Kaplan EL, Arnaud CD, Hill BJ, Peskin GW. Adrenal medullary calcitonin-like factor: a key to multiple endocrine neoplasia, type 2? Surgery 1970 Jul;68(1):146-9

8 Mathew CG, Chin KS, Easton DF, Thorpe K, Carter C, Liou GI, Fong SL, Bridges CD, Haak H, Kruseman AC. A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. Nature 1987 Aug 6-12;328(6130):527-8

9 Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ, McDermid H, Myers S, Kidd JR, Jackson CE, Duncan AM, Farrer LA, Brasch K. Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. Nature 1987 Aug 6-12;328(6130):528-30

10 Kwok JB, Gardner E, Warner JP, Ponder BA, Mulligan LM. Structural analysis of the human ret proto-oncogene using exon trapping. Oncogene 1993 Sep;8(9):2575-82

11 Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P, Wells SA Jr. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. Hum Mol Genet 1993 Jul;2(7):851-6

12 Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. Nature 1993 Jun 3;363(6428):458-60

13 Takahashi M, Cooper GM. Ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. Mol Cell Biol 1987 Apr;7(4):1378-85

14 Takahashi M, Buma Y, Hiai H. Isolation of ret proto-oncogene cDNA with an amino-terminal signal sequence. Oncogene 1989 Jun;4(6):805-6

15 Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Takahashi M. Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. Mol Cell Biol 1995 Mar;15(3):1613-9

16 Takahashi M. Oncogenic activation of the ret protooncogene in thyroid cancer. Crit Rev Oncog 1995;6(1):35-46

17 Tahira T, Ishizaka Y, Itoh F, Sugimura T, Nagao M. Characterization of ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line. Oncogene 1990 Jan;5(1):97-102

18 Lorenzo MJ, Gish GD, Houghton C, Stonehouse TJ, Pawson T, Ponder BA, Smith DP. RET alternate splicing influences the interaction of activated RET with the SH2 and PTB domains of Shc, and the SH2 domain of Grb2. Oncogene 1997 Feb 20;14(7):763-71

19 Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiowaara K, Suvanto P, Smith D, Ponder B, Costantini F, Saarma M, et al. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. Nature 1996 Jun 27;381(6585):789-93

20 Creedon DJ, Tansey MG, Baloh RH, Osborne PA, Lampe PA, Fahrner TJ, Heuckeroth RO, Milbrandt J, Johnson EM Jr. Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Jun 24;94(13):7018-23

21 Milbrandt J, de Sauvage FJ, Fahrner TJ, Baloh RH, Leitner ML, Tansey MG, Lampe PA, Heuckeroth RO, Kotzbauer PT, Simburger KS, Golden JP, Davies JA, Vejsada R, Kato AC, Hynes M, Sherman D, Nishimura M, Wang LC, Vandlen R, Moffat B, Klein RD, Poulsen K, Gray C, Garces A, Johnson EM Jr, et al. Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. Neuron 1998 Feb;20(2):245-53

22 Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM Jr, Milbrandt J. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. Neuron 1998 Dec;21(6):1291-302

23 Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. Nature 1996 Jul 4;382(6586):80-3

24 Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW, Fox GM. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. Cell 1996 Jun 28;85(7):1113-24

25 Baloh RH, Tansey MG, Golden JP, Creedon DJ, Heuckeroth RO, Keck CL, Zimonjic DB, Popescu NC, Johnson EM Jr, Milbrandt J. TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret. Neuron 1997 May;18(5):793-802

26 Worby CA, Vega QC, Chao HH, Seasholtz AF, Thompson RC, Dixon JE. Identification and characterization of GFRalpha-3, a novel Co-receptor belonging to the glial cell line-derived neurotrophic receptor family. J Biol Chem 1998 Feb 6;273(6):3502-8

27 Buj-Bello A, Adu J, Pinon LG, Horton A, Thompson J, Rosenthal A, Chinchetru M, Buchman VL, Davies AM. Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. Nature 1997 Jun 12;387(6634):721-4

28 Santoro M, Wong WT, Aroca P, Santos E, Matoskova B, Grieco M, Fusco A, di Fiore PP. An epidermal growth factor receptor/ret chimera generates mitogenic and transforming signals: evidence for a ret-specific signaling pathway. Mol Cell Biol 1994 Jan;14(1):663-75

29 Asai N, Murakami H, Iwashita T, Takahashi M. A mutation at tyrosine 1062 in MEN2A-Ret and MEN2B-Ret impairs their transforming activity and association with shc adaptor proteins. J Biol Chem 1996 Jul 26;271(30):17644-9

30 van Weering DH, Medema JP, van Puijenbroek A, Burgering BM, Baas PD, Bos JL. Ret receptor tyrosine kinase activates extracellular signal-regulated kinase 2 in SK-N-MC cells. Oncogene 1995 Dec 7;11(11):2207-14

31 Chiariello M, Visconti R, Carlomagno F, Melillo RM, Bucci C, de Franciscis V, Fox GM, Jing S, Coso OA, Gutkind JS, Fusco A, Santoro M. Signalling of the Ret receptor tyrosine kinase through the c-Jun NH2-terminal protein kinases (JNKS): evidence for a divergence of the ERKs and JNKs pathways induced by Ret. Oncogene 1998 May 14;16(19):2435-45

32 Gause A, Pfreundschuh M, Diehl V. Innere Medizin: Allgemeine internistische Onkologie. 1994 Urban & Schwarzenberg Verlag München

33 Riede UN, Wiestler OD, Müller HJ. Allgemeine und spezielle Pathologie: Autonomes Zellwachstum (Tumorpathologie). 1993 Georg Thieme Verlag Stuttgart

34 Picksley SM, Lane DP. p53 and Rb: their cellular roles. Curr. Opin. Cell Biology 1994 6: 853-858

35 Feramisco JR, Gross M, Kamata T, Rosenberg M, Sweet RW. Microinjection of the oncogene form of the human H-ras protein results in rapid prolife ration of Quintescent cells. Cell 1984 38: 109-117

36 Rodrigues GA, Park M. Oncogenic activation of tyrosine kinases. Curr. Opin. Genetic Developement 1994 4: 15-24

37 Wagener C. Einführung in die molekulare Onkologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart

38 Bongarzone I, Pierotti MA, Monzini N, Mondellini P, Manenti G, Donghi R, Pilotti S, Grieco M, Santoro M, Fusco A, et al. High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. Oncogene 1989 Dec;4(12):1457-62

39 Borello MG, Pelicci G, Arighi E, De Filippis L, Bongarzone I, Rizzetti MG, Pelicci PG, Pierotti MA. The oncogenic versions of ret and trk tyrosine kinases bind Shc and Grb2 adaptor proteins. Oncogene 1994 9: 1661.1668

40 Ceccherini I, Bocciardi R, Luo Y, Pasini B, Hofstra R, Takahashi M, Romeo G. Exon structure and flanking intronic sequences of the human RET proto-oncogene. Biochem Biophys Res Commun 1993 Nov 15;196(3):1288-95

41 Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, GriecoM, Fusco A, Veccio G, Matoskova B, Kraus MH, Di Fiore PP. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN 2A and MEN 2B. Science 1995 Vol. 267: 381-383

42 Carlson KM, Dou S, Chi D, Scarvada N, Toshima K, Jackson CE, Wells SA, Goodfellow PJ, Donis-Keller H. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET-proto-oncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. Proc Natl Acad Sci 1994 91: 1579-1583

43 Mak YF, Ponder AJ. Ret oncogene. Genetics & Developement 1996 6: 82-86

44 Berndt I, Reuter M, Saller B, Frank-Raue K, Groth P, Grußendorf M, Raue F, Ritter MM, HöppnerW. A new hot spot for Mutation in the RET proto-oncogene cause familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1998 Vol. 83 No. 3: 770-774

45 Boccia LM, Green JS, Joyce C, Eng C, Taylor SA, Mulligan LM. Mutation of RET codon 768 is associated with the FMTC phenotype. Clin Genet 1997 Feb;51(2):81-5

46 Bartsch DK, Hasse C, Schug C, Barth P, Rothmund M, Höppner W. A RET double mutation in the germline of a kindred with FMTC. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2000;108(2):128-32

47 Höppner W, Dralle H, Brabant G. Duplication of 9 base pairs in the critical cysteine-rich domain of the RET proto-oncogene causes multiple endocrine neoplasia type 2A. Hum Mutat 1998;Suppl 1:S128-30

48 Höppner W, Ritter MM. A duplication of 12 bp in the critical cysteine rich domain of the RET proto-oncogene results in a distinct phenotype of multiple endocrine neoplasia type 2A. Hum Mol Genet 1997 Apr;6(4):587-90

49 Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

50 Papworth C, Braman J, Greener A. Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. Methods Mol Biol. 1996;57:31-44.

51 Lamon-Fava S, Ordovas JM, Mandel G, Forte TM, Goodman RH, Schaefer EJ. Secretion of apolipoprotein A-I in lipoprotein particles following transfection of the human apolipoprotein A-I gene into 3T3 cells. J Biol Chem 1987 Jul 5;262(19):8944-7

52 Nelson M, McClelland M. The effect of site specific methylation on restriction endonuclease digestion. Nucleic Acid Res 1981 Nov 25;9(22): 5859-66

53 McClelland M. The effect of sequence specific DNA methylation on restriction endonuclease cleavage. Methods Mol Biol 1996;57: 31-44

54 Iwashita T, Asai N, Murakami H, Matsuyama M, Takahashi M.
Identification of tyrosine residues that are essential for transforming activity of the ret proto-oncogene with MEN2A or MEN2B mutation. Oncogene 1996 Feb 1;12(3):481-7

55 Wada M, Asai N, Tsuzuki T, Maruyama S, Ohiwa M, Imai T, Funahashi H, Takagi H, Takahashi M. Detection of ret homodimers in MEN 2A-associated pheochromocytomas. Biochem Biophys Res Commun 1996 Jan 17;218(2):606-9

56 Weiss FU, Daub H, Ullrich A. Novel mechanisms of RTK signal generation. Curr Opin Genet Dev 1997 Feb;7(1):80-6

57 Liu X, Vega QC, Decker RA, Pandey A, Worby CA, Dixon JE. Oncogenic RET receptors display different autophosphorylation sites and substrate binding specificities. J Biol Chem 1996 Mar 8;271(10):5309-12

58 Hoie J, Heimdahl K, Nesland JM, Bormer O. Prophylactic thyroidectomy in carriers of RET oncogene mutation. Tidsskr Nor Laegeforen 2000 Nov 10;120(27): 3249-52

59 Phay JE, Moley JF, Lairmore TC. Multiple endocrine neoplasias. Semin Surg Oncol 2000 Jun;18(4):324-32

60 Machens A, Gimm O, Hinze R, Höppner W, Boehm BO, Dralle H. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological

features and biochemical properties. J Clin Endocrinol Meatb 2001 Mar;86(3): 1104-9

61 Le HN, Norton JA. Perspective on RET proto-oncogene and thyroid cancer. Cancer J 2000 Mar-Apr;6(2):50-7

62 Dralle H, Gimm O, Simon D, Frank-Raue K, Gortz G, Niederle B, Wahl RA, Koch B, Walgenbach S, Hampel R, Ritter MM, Spelsberg F, Heiss A, Hinze R, Höppner W. Prophylactic thyroidectomy in 75 children and adolescents with hereditary medullary thyroid carcinoma: German and Austrian experience. World J Surg 1998 Jul;22(7):744-50; discussion 750-1

63 Rosenthal R, Conen D. [Pheochromocytoma: diagnosis and treatment]. Schweiz Med Wochenschr 2000 Sep 16;130(37):1298-304

64 de Graaf JS, Lips CJ, Rutter JE, van Vroonhoven TJ. Subtotal adrenalectomy for phaeochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2A. Eur J Surg 1999 Jun;165(6):535-8

65 Nguyen L, Niccoli-Sire P, Caron P, Bastie D, Maes B, Chabrier G, Chabre O, Rohmer V, Lecomte P, Henry JF, Conte-Devolx B. Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2: a prospective study. Eur J Endocrinol 2001 Jan;144(1):37-44

66 Watowich SS, Yoshimura A, Longmore GD, Hilton DJ, Yoshimura Y, Lodish HF. Homodimerization and constitutive activation of the erythropoietin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 1992 Mar 15;89(6):2140-4

67 Nakamura T, Ishizaka Y, Nagao M, Hara M, Ishikawa T. Expression of the ret proto-oncogene product in human normal and neoplastic tissues of neural crest origin. J Pathol 1994 Mar;172(3):255-60

68 Tansey MG, Baloh RH, Milbrandt J, Johnson EM Jr. GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. Neuron 2000 Mar;25(3):611-23

69 Edstrom E, Frisk T, Farnebo F, Hoog A, Backdahl M, Larsson C. Expression analysis of RET and the GDNF/GFRalpha-1 and NTN/GFRalpha-2 ligand complexes in pheochromocytomas and paragangliomas. Int J Mol Med 2000 Oct;6(4):469-74

70 Baudet C, Mikaels A, Westphal H, Johansen J, Johansen TE, Ernfors P. Positive and negative interactions of GDNF, NTN and ART in developing sensory neuron subpopulations, and their collaboration with neurotrophins. Development 2000 Oct;127(20):4335-44

71 Enokido Y, de Sauvage F, Hongo JA, Ninkina N, Rosenthal A, Buchman VL, Davies AM. GFR alpha-4 and the tyrosine kinase Ret form a functional receptor complex for persephin. Curr Biol 1998 Sep 10;8(18):1019-22

72 Frisk T, Farnebo F, Zedenius J, Grimelius L, Hoog A, Wallin G, Larsson C. Expression of RET and its ligand complexes, GDNF/GFRalpha-1 and NTN/GFRalpha-2, in medullary thyroid carcinomas. Eur J Endocrinol 2000

Jun;142(6):643-9

73 Lindahl M, Poteryaev D, Yu L, Arumae U, Timmusk T, Bongarzone I, Aiello A, Pierotti MA, Airaksinen MS, Saarma M. Human glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 4 is the receptor for persephin and is predominantly expressed in normal and malignant thyroid medullary cells. J Biol Chem 2001 Mar 23;276(12):9344-51

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. W. Höppner, der mich 1995 in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir somit die vorliegende Arbeit ermöglichte. In dieser Zeit habe ich die Grundzüge des wissenschaftlichen Arbeitens gelernt, was meinen heutigen Werdegang mindestens genauso stark beeinflusst hat wie der Abschluss meines Medizinstudiums an unserer Universitätsklinik.
Allen Mitarbeitern des Instituts für Hormon- und Fortpflanzungsforschung im Grandweg und in der Lornsenstraße danke ich für die hilfreiche Zusammenarbeit und die freundliche Unterstützung. Hier seien insbesondere Frau Monika Kistler, Herr Werner Rust, Herr Roger Domagalski, Frau Marlene Reuter, Herr Dr. Nick Hunt, Herr Dr. Tadashi Kimura, Herr Dr. Thomas Krietsch, Herr Dr. Ross Bathgate, Herr Dr. Norbert Walther und Herr Dr. Detlev Jähner erwähnt.
Mein spezieller Dank gilt Frau Dipl. Biologin Dorit Arlt, die mir mit Kollegialität und Fachkompetenz stets zur Seite stand und deren Unterstützung auf dem Gebiet der Zellbiologie unverzichtbar war.
Meiner Familie danke ich für die Ermöglichung meiner schulischen Ausbildung, meines Studiums und meiner Promotion.

Mein Dank gilt außerdem der Mildred-Scheel-Stiftung der deutschen Krebshilfe sowie dem Graduiertenkolleg 336, die diese Arbeit gefördert haben.

Veröffentlichung

Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Arlt DH, **Baur B**, Wagner B, Hoppner W. A novel type of mutation in the cysteine rich domain of the RET receptor causes ligand independent activation. Oncogene 2000 Jul 13;19(30):3445-8

Lebenslauf

Name:	Boris Baur
Geboren:	26. Mai 1970 in Hamburg
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung und Wehrdienst

1976 bis 1989	Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium in Norderstedt, Schleswig-Holstein 05-1989 Allgemeine Hochschulreife
1989 bis 1990	Wehrdienst als Sanitätssoldat

Studium

1991 bis 2000	Universitätskrankenhaus Hamburg Eppendorf 03-1993 Physikum 04-1994 I. Staatsexamen 10-1999 II. Staatsexamen 1999-2000 Praktisches Jahr, Hamburg 11-2000 III. Staatsexamen

Promotion

1995 bis 1999	Durchführung der experimentellen Arbeiten zur Promotion in der Arbeitsgruppe molekulare Diagnostik am Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. W. Höppner

Berufliche Tätigkeit

seit 09-2000	im Bereich Flugphysiologie bei der Firma Autoflug Libelle GmbH